

Обращенные мицеллы – ферментативные нанореакторы (биология / медицина)

(решение задач блока БИОЛОГИЯ / МЕДИЦИНА, как и других блоков, позволит отобрать ТРЕХ человек на очный тур, набравших при решении задач ЭТОГО блока наибольшее количество баллов. Дополнительно по результатам очного тура эти претенденты будут бороться за специальную номинацию «Нанотехнологии в биологии и медицине». На очный тур будет отобрано также еще 5 человек, набравших наибольшее абсолютное количество баллов, поэтому после решения задач по своей специальности есть полный смысл решать задачи из других блоков.)

В последние годы все большее применение как среда для ферментативных реакций находят системы гидратированных обращенных мицелл поверхностно-активных веществ (ПАВ) в неполярных органических растворителях. Обращенные мицеллы можно рассматривать как реакторы нанометрового размера, в каждом из которых на одну мицеллу приходится одна молекула фермента.

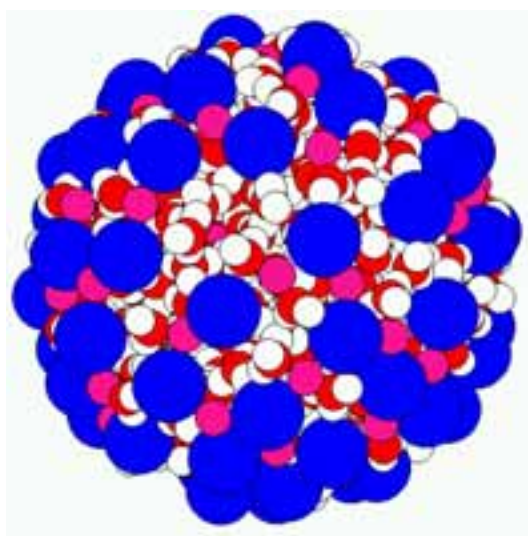


Рис. 1. Обращенная мицелла.

1. Приведите схематически строение обращенной мицеллы, обозначая полярную голову ПАВ кружочком, а неполярный «хвост» волнистой линией. (1 балл)

Системы с органическими растворителями находят широкое применение для проведения реакций, которые невозможно осуществить в воде в силу неблагоприятного положения равновесия. Примером может служить синтез дипептидов, состоящих из остатков аминокислот с неполярными боковыми группами. Такой синтез может быть проведен с высоким выходом в двухфазных системах «вода – несмешивающийся с водой органический растворитель», однако для этого могут потребоваться недели и даже месяцы.

2. Из приведенных ниже вариантов ответа выберите один, который отражает главную причину столь низкой скорости ферментативной реакции в двухфазной системе (1 балл).

- А) Недостаточно высокая температура реакционной среды
- Б) Низкая растворимость аминокислот в среде
- В) Высокая растворимость дипептида в неполярном растворителе
- Г) Низкая скорость массопереноса через поверхность раздела фаз
- Д) Инактивация фермента в процессе реакции

Е) Частичное распределение органического растворителя в воду.

3. Из дипептидов *Ala-Ala*, *Val-Val*, *Ile-Ile* выберите тот, для которого выход при ферментативном синтезе из соответствующих аминокислот в двухфазной системе окажется наибольшим (2 балла).

Переход от двухфазных систем к нанореакторам - обращенным мицеллам - позволяет существенно повысить скорость ферментативных реакций.

Было установлено, что ферменты проявляют максимальную каталитическую активность, когда их размеры (диаметр для глобулярного фермента и большая ось для эллиптического фермента) совпадают с диаметром внутренней полости обращенной мицеллы (см. примеры на рис. 2).

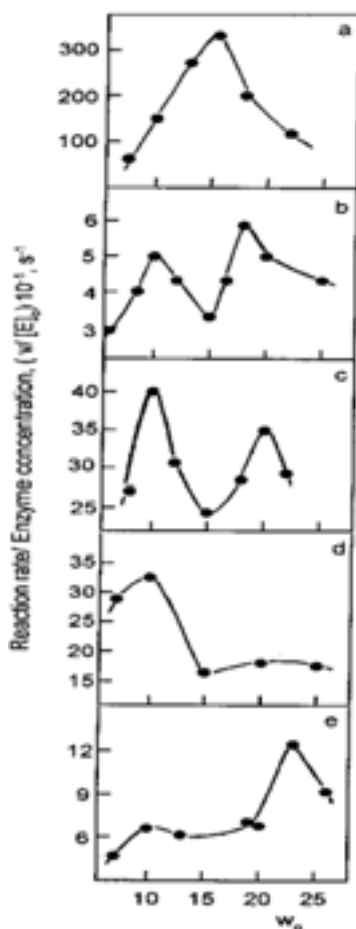


Рис. 2. Типы зависимости каталитической активности ферментов от степени гидратации обращенных мицелл.

Размер мицеллы можно контролировать, изменяя соотношение ПАВ и воды в системе. Обычно для этих целей варьируют содержание воды в системе, поддерживая концентрацию ПАВ постоянной. Соответствующий параметр называется степенью гидратации мицеллы (w_0) и задается как отношение молярных концентраций воды и ПАВ в системе:

$$w_0 = [\text{H}_2\text{O}]/[\text{ПАВ}] \quad (1)$$

Радиус мицеллы (R_m , Ангстремы) связан со степенью гидратации следующим соотношением:

$$R_m = 1,64 w_0 \quad (2)$$

4. Рассчитайте оптимальную степень гидратации для:

А) тетрамера, построенного из одинаковых сферических субъединиц фермента (диаметр = 10 нм), при планарной укладке субъединиц (все субъединицы касаются двух и только двух соседних субъединиц) (2 балла);

Б) тримера, построенного из одинаковых сферических субъединиц фермента (диаметр = 10 нм), если каждая из субъединиц касается двух соседей; (2 балла)

В) димера, построенного из двух одинаковых эллиптических субъединиц (длины осей = 8 и 12 нм), расположенных таким образом, что субъединицы упакованы наиболее плотно. (2 балла)

Ферменты имеют различную поверхность, которая определяет их локализацию в мицелле. Гидрофильные ферменты (I) локализуются во внутренней водной полости мицеллы; ферменты, содержащие длинноцепочечные неполярные заместители (II) могут встраиваться в слой поверхностно-активного вещества, а ферменты с протяженными гидрофобными областями на поверхности (III) даже могут частично вступать в контакт с неполярными растворителем.

5. В систему обращенных мицелл, построенных из анионного ПАВ внесли некоторое количество:

А) неионного ПАВ;

Б) мочевины;

В) маннита

Для каждого из веществ А)-В) укажите, на какой преимущественно тип ферментов (I, II или III) оно будет оказывать наибольшее влияние и почему (2 балла).

Многие лекарственные средства являются ферментами. Зачастую их надо доставить внутрь клетки, для чего необходимо преодолеть плазматическую мембрану. Обращенные мицеллы оказались очень удобной тест-системой на мембранотропность ферментов. Индивидуальные мицеллы находятся в постоянном хаотическом движении и сталкиваются друг с другом. При этом поверхностно-активные ферменты (II) на некоторое время теряют оптимальное окружение из молекул ПАВ, что снижает их каталитическую активность, а ферменты типа I к таким столкновениям нечувствительны. Чем чаще происходят столкновения мицелл, тем более выражен процесс снижения каталитической активности ферментами типа II и тем ниже измеряемая скорость ферментативной реакции. В первом приближении значение каталитической константы ферментативной реакции обратно пропорционально степени гидратации обращенных мицелл.

6А. Изобразите схематически зависимость величины, обратной каталитической константе, для фермента типа II от концентрации ПАВ при постоянной степени гидратации и укажите на графике предельно максимальное значение каталитической константы (2 балла).

6Б. Сколько мицелл и сколько молекул фермента будет присутствовать в такой идеальной системе (в которой фермент типа II будет проявлять наивысшую каталитическую активность) (2 балла).

В связи с возможностью включения одной молекулы фермента в один «нанореактор» системы обращенных мицелл весьма привлекательны для стабилизации ферментов путем введения дополнительных сшивок функциональных групп, присутствующих на поверхности белка. Для этих целей используются бифункциональные реагенты. Если такой процесс происходит в гомогенной системе, существует опасность возникновения межбелковых сшивок, а в системе обращенных мицелл такая побочная реакция просто невозможна.

7. Для введения шивов часто используют глутаровый диальдегид. Исходя из предположения, что на поверхности некоторого фермента присутствуют боковые группы всех гидрофильных аминокислот:

А) укажите, остатки каких аминокислот являются наиболее вероятной мишенью для взаимодействия с глутаровым диальдегидом (**1 балл**);

Б) запишите уравнения соответствующих реакций (**2 балла**).

Обычно степень заполнения мицелл ферментом составляет порядка 1 % (то есть из 100 мицелл только одна содержит фермент, а остальные мицеллы – пустые). Это позволяет делить олигомерные белки на субъединицы в мягких условиях, просто снижая степень гидратации мицелл (то есть размер мицелл при этом уменьшается и в какой-то момент субъединицы «расходятся» по разным мицеллам).

8. Изобразите схематически график зависимости скорости ферментативной реакции от степени гидратации (в широком диапазоне степеней гидратации) для гетеродимерного фермента, обе субъединицы которого являются сферическими (диаметры субъединиц 7,4 и 12,8 нм) и также проявляют каталитическую активность, поясните Ваш график (**3 балла**).