

ი. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის
ფიზიკის დეპარტამენტის დოქტორანტი

ტატიანა ტრეტიაკოვა

ორგანული დანამატების გავლენა
გლობულური ცილების სტაბილობასა და
ფუნქციურ აქტივობაზე

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ფიზ.-ქიმ. მეცნ. დოქტორი
დიმიტრი ხოშტარია

ს ა რ ზ ე ვ ი

შესავალი	3
1. ლიტერატურული მიმოხილვა	4
2. კვლევის მიზანი და ამოცანები	4
3. კვლევის მეთოდика:	
3.1 კვლევის ობიექტები	5
3.2 ციკლური ვოლტამპერომეტრია	7
3.3 ავტომატური ტიტრაციის მეთოდი	9
3.4 დიფერენციური მასკანირებელი კალორიმეტრია	9
4. მიღებული სამეცნიერო შედეგები	
4.1 აზურინი	9
4.2 α -ქიმოტრიპსინი	12
5. დასკვნები	14
6. გამოყენებული ლიტერატურა	15

ბიომოლეკულების, მათ შორის გლობულური ცილების, სტაბილობას, ფლექსიბილობას და ფუნქციურ აქტივობას შორის ურთიერთკავშირის შესწავლა მნიშვნელოვანია ფუნდამენტური მოლეკულური ბიოფიზიკის და მისი გამოყენებითი ასპექტების განვითარების თვალსაზრისით.

მოცემულ ნაშრომში განხილულია ორი განსხვავებული გლობულური ცილის, ელექტრონის გადამტანი ცილის, აზურინის და ჰიდროლიზური ფერმენტის, α -ქიმოტრიპსინის, სტაბილობის და დინამიკის თავისებურებები, ფუნქციური აქტივობა და მათი ურთიერთდამოკიდებულება ხსნარებში სხვადასხვა კონცენტრაციის დანამატების არსებობის პირობებში. კერძოდ, ოქროს ელექტროდზე ალკანთიოლების ფირების საშუალებით დამაგრებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესის მექანიზმები, პროტონულ იონურ ლღობილთან ურთიერთქმედების შემთხვევაში. ასევე შესწავლილი იყო არასპეციფიური მცირე ორგანული ნაერთის, დიმეთილსულფოქსიდის, გავლენა α -ქიმოტრიპსინის კატალიზურ აქტივობასა, მის სტაბილობასა და ფლექსიბილობაზე.

აზურინის შემთხვევაში ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო ცილის გლობულის შეზოჭვის (როგორც ალკანთიოლის ზედაპირის, ასევე იონური ლღობილის გარემოს საშუალებით) გავლენა ელექტრონის გადატანის სიჩქარეზე, ცილის შინაგანი დინამიკის არსებით შეზღუდვის გამო, განსაკუთრებით მაღალი წნევის ან/და დაბალი ტემპერატურის პირობებში. ეს იწვევს ელექტრონის გადატანის ადიაბატური მექანიზმის მნიშვნელოვან შეუღლებას არაერგოდულ და არაწრფივ კინეტიკურ ეფექტებთან.

ხოლო მიკროკალორიმეტრული და დინამიკური პოტენციომეტრიის მეთოდების ერთობლივი გამოყენების შედეგად გამოვლინდა DMSO-ს დუალისტური გავლენა α -ქიმოტრიპსინის სტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობაზე. ეს მოვლენა აიხსნება ნატივური და განხვეული ცილის სოლვატაციის საპირისპირო ბუნებით წყლის და DMSO-ს მიმართ. ასევე, ცილის კომპაქტური ნაწილის და აქტიური ცენტრის განსხვავებული სოლვატური თავისებურებებით.

1. ლიტერატურული მიმოხილვა

ცილები - რთული სტრუქტურის მქონე მაღალმოლეკულური ორგანული ნაერთებია. ისინი შედგება პეპტიდური ბმებით დაკავშირებულ ამინომჟავათა თანამიმდევრობებისგან, რომლებიც, თავის მხრივ, ქმნიან წყალბადურ, ჰიდროფობურ, ელექტროსტატიკურ და ვან-დერ-ვაალსის ურთიერთქმედებებით დასტაბილებულ სპეციფიკურ სამგანზომილებიან სტრუქტურებს. ყველა ცილას აქვს თავისი ფუნქცია და მუშაობის ოპტიმალური პირობების ფარგლები, რომლებშიც ის იმყოფება კომპაქტურ ნატივურ მდგომარეობაში და ახორციელებს მაღალ ფუნქციურ აქტივობას.

მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ (კონფიგურაციულ) სივრცეში ნატივურ მდგომარეობას შეესაბამება თავისუფალი ენერგიის ზედაპირის გლობალური მინიმუმი, ხოლო ენერგეტიკულად არახელსაყრელ ნაწილი კი - ცილის განხვეულ (დენატურირებულ) მდგომარეობას. ენერგეტიკული პროფილის შუალედურ უბანს კი მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობები იკავებენ, რომლებშიც მყოფი ცილის გლობულაც გაზრდილი ლაბილობით (ფლექსიბილობით) ხასიათდება და შეიძლება ნაწილობრივ განხვეულიც კი იყოს, რაც განპირობებულია მისი ჰეტეროგენული სტრუქტურით [1].

ცილის ენერგიის გლობალური მინიმუმის უბანს გააჩნია ბევრი ენერგეტიკულად ახლო მდგომი ქვემდგომარეობა, რომლებსაც თავის მხრივ, აქვთ კიდევ უფრო ნატივი სტრუქტურა. გლობალური მინიმუმის პირობებში სხვადასხვა ქვემდგომარეობებში გადასვლის უნარი, ანუ ცილების ფლექსიბილობა, აუცილებელია იმისათვის, რომ მათ შეასრულონ თავისი ფუნქცია. ელექტრონის გადატანა, ფერმენტული კატალიზი და სხვა პროცესები, რომლებიც ბუნებაში ცილების მეშვეობით ხორციელდება, წარმოადგენენ მრავალსტადიურ პროცესებს, შემდგარს ელემენტარული კონფორმაციული და ქიმიური გარდაქმნებისაგან. ქიმიური გარდაქმნების კოორდინატები განუყოფლად შეუღლებულია კონფორმაციულ გარდაქმნებთან. აქედან გამომდინარე, იმისათვის, რომ ბიომოლეკულური პროცესი ფიზიკურ დონეზე აღვწეროთ, ჩვენ უნდა განვიხილოთ მთელი სარეაქციო სისტემის თავისუფალი ენერგია, როგორც შესაბამისი თავისუფლების ხარისხების ფუნქცია.

2. კვლევის მიზანი და ამოცანები

ბიომეცნიერებების უახლესი წარმოდგენების თანახმად ცილების ფუნქციონირების მექანიზმების ფუნდამენტური ახსნა მოითხოვს ამ პროცესში ცილის სტაბილობის და ფლექსიბილობის როლის გათვალისწინებას.

ამისთვის მიზანშეწონილია ინტერდისციპლინური კვლევების ჩატარება, სხვადასხვა გამოთვლითი და ექსპერიმენტული მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც იძლევიან ინფორმაციას როგორც ცილების აქტივობის კინეტიკაზე, ასევე მისი სტაბილობის და

ფლექსიბილობის ცვლილებების შესახებ სხვადასხვა გარემოს ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ. ცოცხალ უჯრედებში მეტად მნიშვნელოვანია ცილების აქტივობის რეგულაცია და მათთვის დამახასიათებელი ნატივური კონფორმაციის შენარჩუნება, რაც გარემოში მყოფი სხვადასხვა იონების და ორგანული ნაერთების მეშვეობით ხორციელდება.

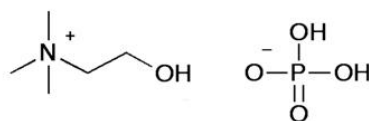
მოცემულ ნაშრომში განხილულია ორი განსხვავებული გლობულური ცილის, ჰიდროლიზური ფერმენტის, α -ქიმოტრიპსინის, და ელექტრონის გადამტანი ცილის, აზურინის, სტაბილობასა და ფუნქციური აქტივობის დამახასიათებელი პარამეტრების დამოკიდებულება ხსნარებში სხვადასხვა კონცენტრაციის დანამატების პირობებში.

მსგავსი სახის სისტემატური ფუნდამენტური კვლევის შედეგად მიღებული ინფორმაცია ხელს უწყობს ცილების მუშაობის მექანიზმების ამომწურავ და ჩაღრმავებულ გაგებას და შესაბამისად მათი თვისებების რეგულირების შესაძლებლობას, რომელიც საფუძვლად ედება ბიონანოტექნოლოგიების განვითარებას.

3. კვლევის მეთოდика

3.1 კვლევის ობიექტები

კვლევის ერთერთი ობიექტი არის აზურინი, 128 ამინომჟავისაგან შემდგარი სპილენძის იონის შემცველი ცილა (გამოყოფილი ბაქტერია *Pseudomonas aeruginosa*-დან). ის მიეკუთვნება ელექტრონის გადამტანი ცილების, კუპრედოქსინების ოჯახს. სავარაუდოდ, *in vivo*, აზურინი მონაწილეობს ელექტრონის გადატანაში ოქსიდატიური სტრესის დროს. ამ სამუშაოს მიზანი არის პროტონული იონური სითხის, ქოლინდიჰიდროგენფოსფატის, (სურ.1) გავლენის შესწავლა აზურინის სტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობაზე.

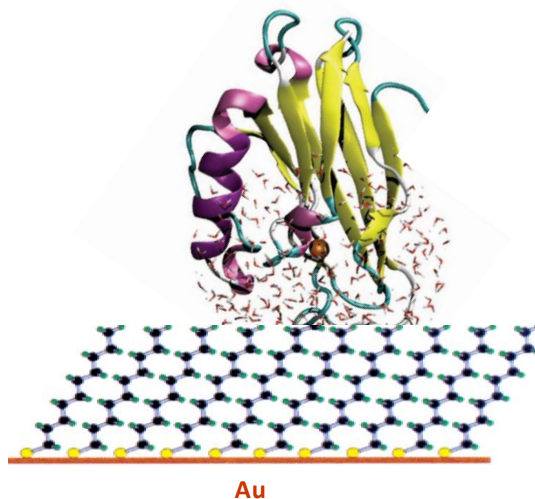


სურ. 1. იონური ლღობილის ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატის ([ch]/[dhp]) მოლეკულური სტრუქტურა.

იონურ სითხეს უწოდებენ ორგანული მარილების დაბალტემპერატურულ ლღობილებს. პროტონულ იონურ სითხეებს, რომლებსაც აქვთ დისოცირებადი პროტონები, კერძოდ ქოლინდიჰიდროგენფოსფატს, ახასიათებს მაღალი იონური გამტარობა და ბიომოლეკულების დასტაბილების უნარი, რაც მნიშვნელოვანია როგორც ელექტრონის გადატანის მექანიზმების ფუნდამენტურ კვლევაში, ასევე გამოყენებით სფეროშიც [2].

ელექტრონის გადატანის პროცესის მექანიზმის შესასწავლად ჩვენ დავამაგრეთ აზურინი ოქროს ელექტროდზე ალკანთიოლების თვითაწყობადი მონოშრებების ანუ SAM-ების საშუალებით. SAM-ი წარმოადგენს სხვადასხვა ტიპის ორგანული მოლეკულების

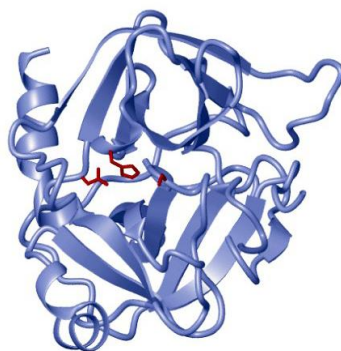
მოწესრიგებულ ფირს, რომელიც სპონტანურად იქმნება ზედაპირზე და განპირობებულია მათი ტერმინალური ჯგუფების ზედაპირისკენ მაღალი სწრაფვით. მსგავს ფირებს ფართოდ იყენებენ როგორც ფუნდამენტური კვლევების დროს, ასევე სხვადასხვა ნანოტექნოლოგიური მიზნებისთვის [3, 4, 5].



სურ. 2. ალკანთიოლებით მოდიფიცირებულ ოქროს ელექტროდზე დამაგრებული აზურინის სტრუქტურული გამოსახულება.

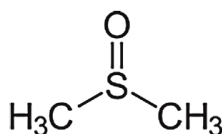
SAM-ების მისაღებად საჭიროა ოქროს მუშა ელექტროდის მოთავსება ალკანთიოლების ხსნარში, მათი ტერმინალური ჯგუფების გოგირდის ატომები უკავშირდებიან ოქროს ატომებს და იქმნება ერთი მოლეკულის სისქის მქონე ფირი. ექსპერიმენტში SAM-ების გამოყენება ერთდროულად იცავს ცილას მეტალთან დამაზიანებელი კონტაქტისგან, ჰიდროფობული ხსნარში ექსპონირებული CH_3 ჯგუფების საშუალებით ცილის ზედაპირზე დამაგრებას უზრუნველყოფს და შუალედური ნაწილის სიგრძის ვარირება სისტემის თვისებების შეცვლის საშუალებას გვაძლევს [3, 4, 5].

ჩვენი მეორე ობიექტი არის α -ქიმოტრიპსინი (სურ. 3) – მოდელური ფერმენტი, რომელიც მიეკუთვნება სერინის პროტეაზების კლასს და ახორციელებს პეპტიდური ბმების გაწყვეტას, ანუ ცილების დაშლას. მის აქტიურ ცენტრში განლაგებულია კატალიზური ტრიადა – სერინი, ჰისტიდინი, არგინინი და ე.წ. “ჰიდროფობული ჯიბე” – არომატული რგოლის შემცველი ამინომჟავების (ტიროზინი, ტრიპტოფანი და ფენილალანინი) კომპლემენტარული ღრმული. ამის გამო α -ქიმოტრიპსინი წყვეტს პოლიპეპტიდებს შესაბამისი ამინომჟავების შემცველ უბნებში [6]. ექსპერიმენტში ჩვენ ვიყენებთ ხელოვნურ ესთერულ სუბსტრატს, N-აცეტილ-L-ტიროზინის ეთილ-ესთერს ან ATEE. ამ შემთხვევაში ნახშირბად-აზოტის კოვალენტური ბმის (პეპტიდი) ნაცვლად ხდება ნახშირბად-ჟანგბადის კოვალენტური ბმის (ესთერი) გაწყვეტა, კატალიზის მექანიზმი კი არსებითად არ იცვლება.



სურ. 3. α-ჰიმოტრიპსინის სტრუქტურა.

აღსანიშნავია, რომ α-ჰიმოტრიპსინისათვის დამახასიათებელი ჰიდროლიზის რეაქცია მრავალსტადიურია [6]. ყველაზე ნელ მეოთხე სტადიაზე, რიმელიც განსაზღვრავს მთელი პროცესის სიჩქარეს, მონაწილეობს წყლის მოლეკულა და ხდება მისი ერთი პროტონის ტუნელირების გზით გადატანა ჰისტიდინის ნაშთის იმიდაზოლის ჯგუფზე, ამის შედეგად წარმოიშობა მეტასტაბილური მდგომარეობა – ე.წ. ტეტრაედრული ადუქტი, რომლის დაშლის შედეგად წარმოიქმნება ფერმენტული პროცესის საბოლოო პროდუქტი.



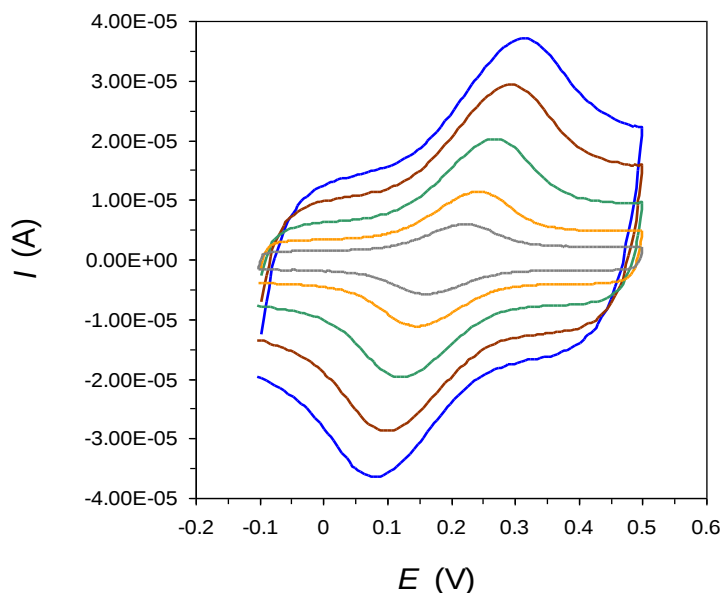
სურ. 4. დიმეთილსულფოქსიდის სტრუქტურა.

ფერმენტის სტაბილობის, ფლექსიბილობის და კატალიზური აქტივობის ურთიერთკავშირის ჩაღრმავებულად შესასწავლად, ჩვენ ვიყენებთ არასპეციფიურ მცირე ორგანულ დანამატს დიმეთილსულფოქსიდს (სურ. 4), რომელიც ზოგადად შეიძლება მოახდინოს როგორც დესტაბილიზაცია, ისე სტაბილიზაცია.

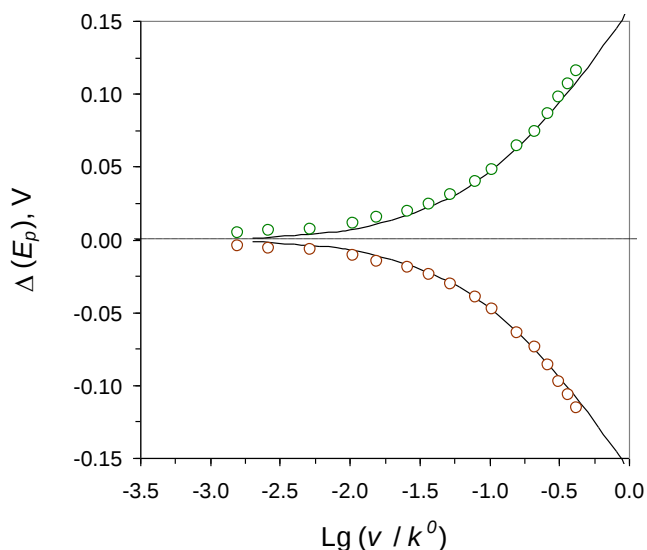
3.2 ციკლური ვოლტამპერომეტრია

აღკანთიოლებით მოდიფიცირებულ ოქროს ელექტროდზე დამაგრებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის მახასიათებლების მისაღებად ჩვენ გამოვიყენეთ ციკლური ვოლტამეტრიის მეთოდი. ჩვენს კვლევაში სამელექტროდიანი კონფიგურაციის ელექტროქიმიური უჯრედი ელექტროლიტის სახით შეიცავდა ქოლინდიჰიდროგენფოსფატის კონცენტრირებულ ბუფერის შემცველ წყალხსნარებს, მუშა ელექტროდის სახით - 1.6 მმ დიამეტრის ოქროს დისკს (ზედ დატანილი ნიმუშით), პლატინის მავთულს, როგორც დამხმარე ელექტროდს და ვერცხლის მავთულს შედარების ელექტროდის სახით [3, 4].

ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდი საზღვრავს ფარადეის დენს როგორც ციკლურად ცვლადი პოტენციალის ფუნქციას (სურ. 5) [7]. პოტენციალის სკანირების სიჩქარის ვარირება საშუალებას იძლევა მონაცემთა სტანდარტული დამუშავების მეთოდის (სურ. 6) გამოყენებით გამოითვალოს მუხტის გადატანის სიჩქარის კონსტანტა და გარემოს რეორგანიზაციის ჯამური ენერგიის მნიშვნელობა [8].



სურ. 5. Au/SAM/Az ($n=4$) სისტემაში ელექტრონის გადატანის პროცესის ექსპერიმენტული ვოლტამოგრამები ხსნარში 70% იონური სითხის და ბუფერის ნარევი ($pH\ 4.6$); $T = 20^{\circ}C$, $P = 0.1\ MPa$, პოტენციალის სკანირების სიჩქარეები: 10, 20, 40, 60 და $80\ V\ s^{-1}$ (პიკები იზრდება).



სურ. 6. მიღებული ვოლტამეტრული პიკების პოტენციალების პიკების გაფართოების როგორც სკანირების სიჩქარის ფუნქციის ფიტინგი მარკუსის მოდელის მიხედვით ხსნარში 70% იონური სითხის და ბუფერის ნარევი ($pH\ 4.6$); $T = 20^{\circ}C$; $P = 0.1\ MPa$. მიღებული პარამეტრები $k^{\circ} = 190\ s^{-1}$, $\lambda = 0.3\ eV$.

3.3 ავტომატური ტიტრაციის მეთოდი

α -ქიმოტრიპსინის ATEE-ს ჰიდროლიზის პროცესის კინეტიკის შესასწავლად ჩვენ გამოვიყენეთ “რადიომეტრის” ავტომატური ტიტრაციული დანადგარი, რომელიც უშუალოდ ზომავს ფერმენტული რეაქციის სიჩქარეს. მიღებული კინეტიკური მრუდების ცნობილი მეთოდოლოგიური პროცედურების საშუალებით დამუშავების შედეგად ჩვენ შეგვიძლია განვსაზღვროთ ფერმენტული კატალიზის პარამეტრები, კერძოდ, მიხაელისის კონსტანტა K_M და კატალიზური კონსტანტა k_{cat} [9, 10]. მიხაელისის კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტის და სუბსტრატის არაკოვალენტური ურთიერთქმედების ეფექტურობას, ხოლო კატალიზური კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტული ბიოქიმიური გარდაქმნის კატალიზურ ეფექტურობას.

3.4 დიფერენციური მასკანირებელი კალორიმეტრია

კინეტიკური ექსპერიმენტის პირობებთან საკმარისად დაახლოებულ პირობებში ქიმოტრიპსინის გლობულის ე. წ. თერმული სტაბილობის შესწავლის საშუალებას გვაძლევს დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდი. გამარტივებული მოდელის ფარგლებში, როდესაც განვიხილავთ ნატივურიდან დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლას, თერმული ლლობის მრუდებიდან შესაძლებელია გადასვლის ტემპერატურის T_m და ენტალპიის ΔH მიღება [9, 10, 12]. თერმოდინამიკური და კინეტიკური პარამეტრების პარალელური შესწავლა გვაძლევს საშუალებას, რომ დავადგინოთ შინაგანი კავშირები იმ ფაქტორებს შორის, რომლებიც განსაზღვრავენ ფერმენტის სტაბილობას, მის ფლექსიბილობას და კატალიზურ ეფექტურობას.

4. მიღებული სამეცნიერო შედეგები

4.1 აზურინი

ჩვენ გამოვიყენეთ სწრაფი სკანირების ციკლური ვოლტამეტრია $[ch][dhp]/წყლის$ გარემოში მოთავსებულ $Au/SAM/Az$ ($n=4$) სისტემაში ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის და რეორგანიზაციის ენერგიის გამოსათვლელად $[ch][dhp]$ -ის 5 სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში გაზომვები ჩატარებულია ტემპერატურის და წნევის ფართო ინტერვალში ($2-80^{\circ}C$ და $0.1-150$ Mpa, შესაბამისად) [3, 4].

ამ სერიის წინა სამუშაოში [3] დადგენილი იქნა, რომ იონური სითხის დანამატების გარეშე $Au/SAM/Az$ სისტემაში ელექტრონის გადატანის მექანიზმი და, საზოგადოდ, სიჩქარის კონსტანტაც დამოკიდებულია გადატანის მანძილზე, რომლის ვარირება შესაძლებელია

სხვადასხვა სისქის SAM-ების გამოყენებით. ელექტრონის გადატანის პროცესის სიჩქარე აღიწერება შემდეგი განტოლებით:

$$k^0 = A \exp\left(-\frac{\Delta G_a}{RT}\right), \quad \Delta G_a = \frac{\lambda_0}{4} - V_{AB}$$

სადაც ΔG_a არის აქტივაციის ენერგია, λ_0 - რეორგანიზაციის ენერგია და V_{AB} - ელექტრონული შეუღლების ენერგია.

მოკლე მანძილებზე ელექტრონის გადატანა ხორციელდება ადიაბატურ რეჟიმში, რომლის ფარგლებში სიჩქარის კონსტანტა არსებითად არის დამოკიდებული გარემოს (ამ შემთხვევაში ცილის გლობულის) რელაქსაციის დროზე სიჩქარის განტოლების ექსპონენტის წინა წევრის A_A -ს ხარჯზე.

$$A_A = \frac{1}{\tau_{eff}} \sqrt{\frac{\lambda_0}{\pi^3 RT}},$$

სადაც τ_{eff} არის გარემოს რელაქსაციის დრო.

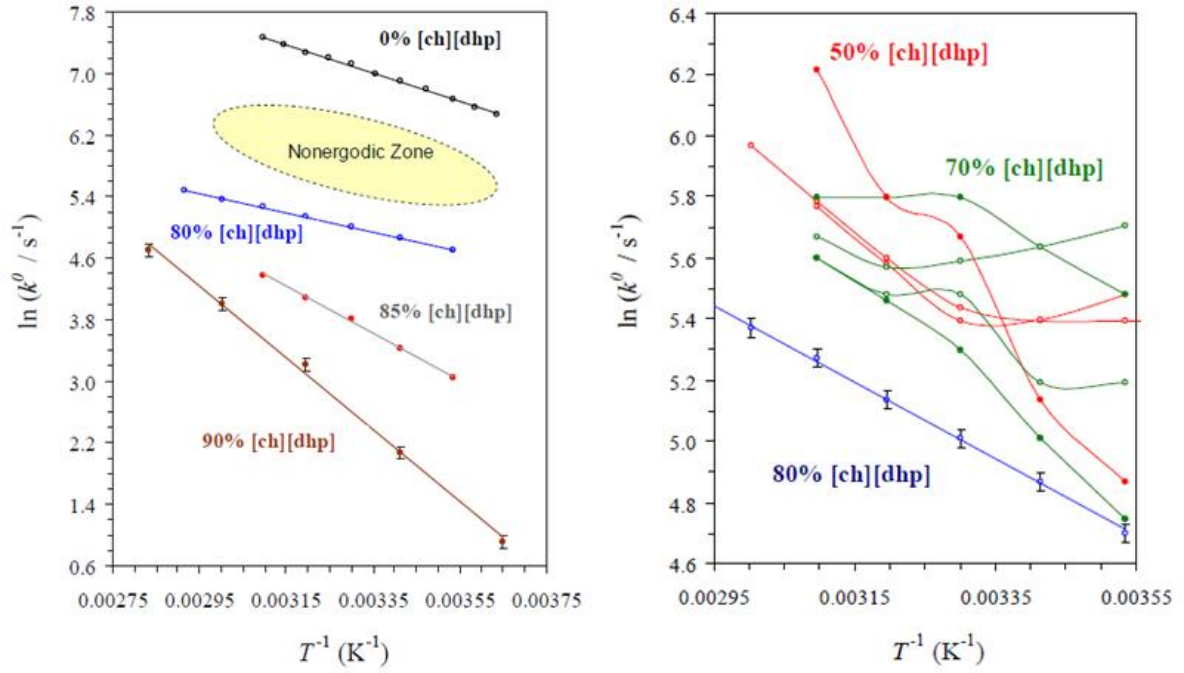
დიდ მანძილებზე კი ელექტრონის გადატანის პროცესი აღიწერება არაადიაბატური რეჟიმის ფარგლებში. სიჩქარის განტოლების ექსპონენტის წინა წევრში ამ შემთხვევაში შედის მხოლოდ ელექტრონული შეუღლების ენერგია:

$$A_{NA} \approx \exp[-\beta(R_e - R_0)]$$

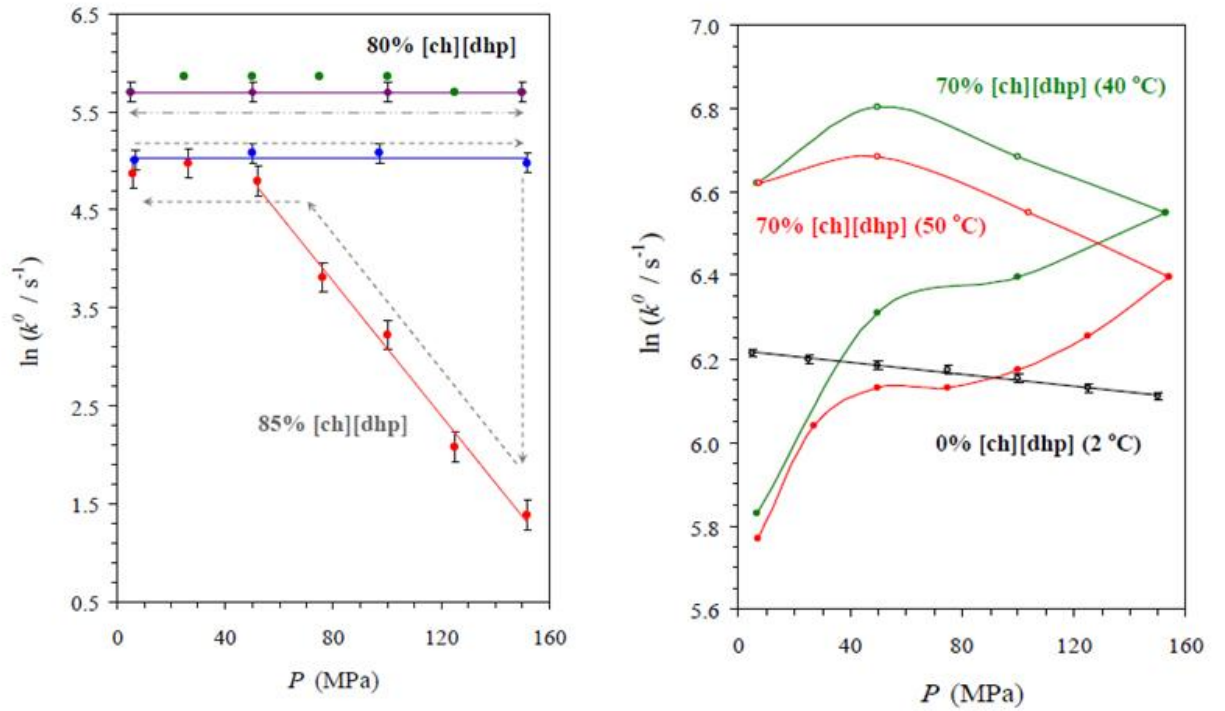
ანუ ელექტრონის გადატანა არსებითად არის დამოკიდებული დონორსა და აცეპტორს შორის მანძილზე. ამ ორ რეჟიმებს შორის გადასვლის უზანი შეესაბამება დაახლოებით 10-12 ანგსტრემის სისქის ფირებს.

აქედან გამომდინარე, თხელი SAM-ების შემთხვევაში, $n=4$ (სადაც ხორციელდება ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონტროლი გარემოს სიბლანტი), ძალიან მაღალი კონცენტრაციის ბლანტი იორული სითხეების ნარევების გამოყენება, რომლებიც ექსპერიმენტის ზოგ პირობებში უახლოვდებიან მინისებურ მდგომარეობას, მოსალოდნელი იყო მეტად საინტერესო ახალი ტიპის კინეტიკური გამოვლინებების აღმოჩენა.

ჩვენ შევისწავლეთ Au/SAM/Az სისტემაში ელექტრონის გადატანის მახასიათებლები იონური ლღობილების ბუფერული წყალხსნარებთან კონტაქტში, იონური ლღობილების 50-დან 90 წონითი %-ის ფარგლებში (რაც შეესაბამება 2-დან 16-მდე წყლის მოლეკულას იონურ წყვილზე). ტემპერატურის და წნევის ფართო ინტერვალში (2-80 °C და 0.1-150 MPa) ჩატარებულმა გაზომვებმა გამოავლინა ადიაბატური მექანიზმის მნიშვნელოვანი შეუღლება არაერგოდულ და არაწრფივ კინეტიკურ ეფექტებთან (სურ. 7, 8). [4, 13]



სურ. 7. 1-პენტანთიოლების ($n=4$) SAM-ით დაფარულ ოქროს ელექტროდზე იმობილიზებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის წრფივი დამოკიდებულება ტემპერატურაზე $[ch][dhp]$ და ბუფერის ($pH\ 4.6$) 0, 80 და 90 წონითი % ნარევებში (ა) და ანომალური დამოკიდებულება 50 და 70% ხსნარებში (ბ).



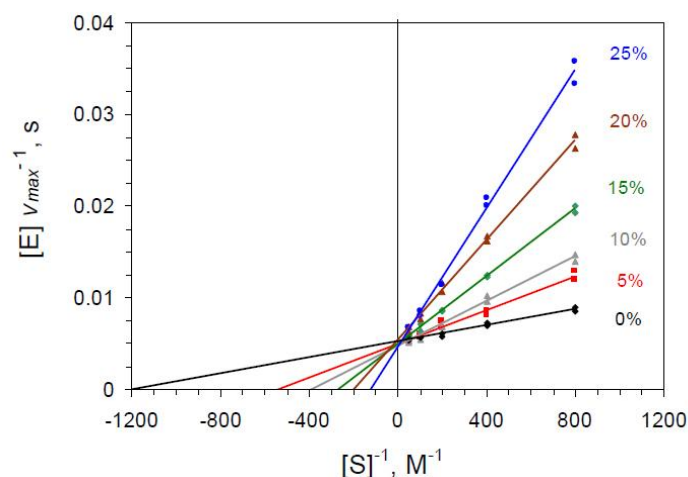
სურ. 8. 1-პენტანთიოლების ($n=4$) SAM-ით დაფარულ ოქროს ელექტროდზე იმობილიზებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის წნევაზე დამოკიდებულება $[ch][dhp]$ და ბუფერის ($pH\ 4.6$) 80 და 85 წონითი % ნარევებში (ა) და ანომალური დამოკიდებულება 50 და 70% ხსნარებში (ბ), $T=50\ ^\circ C$.

ბუფერში ჩატარებული ექსპერიმენტისგან განსხვავებით, მიუხედავად მეტად გაზრდილი Au/SAM/Az სისტემის მდგრადობისა ტემპერატურისა და წნევის მიმართ, ადგილი აქვს სიჩქარის კონსტანტის განსაკუთრებულ ქცევას, რომელიც არ აღიწერება კლასიკური მოდელების ფარგლებში, მაგრამ შეიძლება აიხსნას ნატიფი მატერიის ფიზიკის (soft matter physics) თანამედროვე წარმოდგენების ფარგლებში. იონური სითხის 50-70% ფარგლებში დარღვეულია როგორც კონსტანტის ტემპერატურაზე და წნევაზე წრფივი დამოკიდებულება, ასევე მისი გამეორებადობა და შექცევადობა.

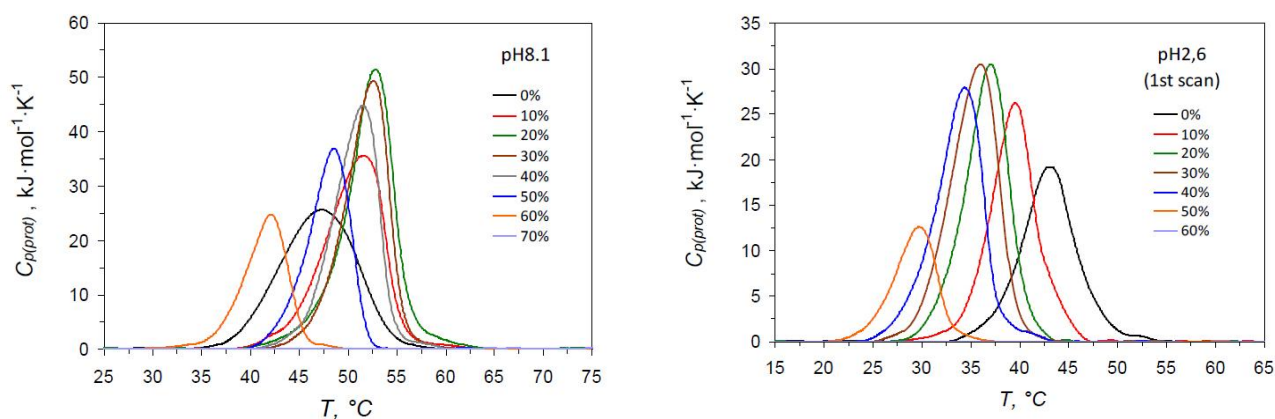
ასეთი მოვლენის ახსნა შეიძლება შემდეგნაირად: ამ ექსპერიმენტების სერიის ფარგლებში ელექტრონის გადატანის მახასიათებელი დრო და გარემოს თავისუფლების ხარისხების მახასიათებელ დროთა სიმრავლე განიცდიან მრავალჯერადი თანხვედრისა და გამოიწვევს ხდომილებებს. ამათგან ზოგიერთ სიტუაციაში გარემოს რელაქსაციები შეიძლება „გაიყინოს“ ელექტრონის გადატანის პროცესის მიმართ, ანუ მათი წვლილი ელექტრონის გადატანის მახასიათებელ პარამეტრებში შესაძლოა თანდათან ან ნახტომისებურად გამოირიცხოს. ამ დროთა თანხვედრის შედარებით ვიწრო ინტერვალებში სისტემებისთვის დამახასიათებელია განსაკუთრებით არასტაბილური ქცევა, რაც გამოიხატება ზემოთ აღწერილ ანომალიებში.

4.2 α -ქიმოტრიპსინი

DMSO-ს 25-30% ფარგლებში ფარგლებში მიხელისის კონსტანტა სისტემატურად იზრდებოდა, კატალიზური კი უცვლელი იყო (სურ. 9). რაც ნიშნავს, რომ ფერმენტ-სუბსტრატული სწრაფვა უარესდებოდა, მაგრამ კატალიზური ეფექტურობა ქიმიური თვალსაზრისით რჩებოდა უცვლელი. მაგრამ თერმოდინამიკური ქცევა მკვეთრად განსხვავდება და გამოვლენილია ცილის (ყოველ შემთხვევაში, მისი „კალორიმეტრულად აქტიური“ დომენის) სტაბილიზაცია (სურ. 10). ეს, ჩვენი აზრით, მიუთითებს იმაზე, რომ ცილის კომპაქტური ნაწილის სტაბილობის ზრდის პარალელურად, ადგილი აქვს ცილის აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობის მატებას. DMSO-ს კონცენტრაციის შემდგომი ზრდის პირობებში კი ცილა თანდათან განიცდის დესტაბილიზაციას, რასაც უკვე მოყვება კინეტიკური პარამეტრების მკვეთრი გაუარესება. კერძოდ, მიხელისის კონსტანტის ზრდა და კატალიზური კონსტანტის შემცირება, ანუ უარესდება ფერმენტ-სუბსტრატული სწრაფვაც და კატალიზის ეფექტურობაც. [10, 14]



სურ. 9. α -ქიმოტრიპსინის ATEE ჰიდროლიზის კინეტიკური მრუდები ხსნარში DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში (0.05 NaCl, pH 8.5).



სურ. 10. α -ქიმოტრიპსინის თერმული ლლობის (დენატურაციის) კალორიმეტრული მრუდები ხსნარში 0-70% DMSO-ს კონცენტრაციის პირობებში (ბორატის ბუფერი, pH 8.1, 0.05 NaCl).

მიღებული შედეგები, მეტყველებენ იმაზე, რომ α -ქიმოტრიპსინის აქტიური ცენტრი და კომპაქტური ნაწილი სხვადასხვაგვარად რეაგირებენ DMSO-ს დანამატებზე. აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობა, რომელიც, სავარაუდოდ, ისედაც საკმარისად დიდია მისი ფუნქციური დატვირთვისგამო, კიდევ უფრო იზრდება. შესაძლებელია ვივარაუდოდ ისიც, რომ აქტიური ცენტრი საერთოდ არ იძლევა წვლილს ცილის “ლლობის” კოოპერატიულ პროცესში (კალორიმეტრული პიკის სახით დამზერილ სიგნალში).

გარდა ამისა, ჩვენ შევისწავლეთ დიმეთილსულფოქსიდის გავლენა α -ქიმოტრიპსინის სტაბილობაზე მჟავე pH-ის პირობებში და აღმოვაჩინეთ საკმაოდ განსხვავებული ქცევა და საგულისხმო დეტალები. კერძოდ DMSO-ს კონცენტრაციის მთელ ინტერვალში ხდება α -ქიმოტრიპსინის დესტაბილიზაცია, გარდა ამისა ადგილი აქვს ცილის აღდგენას დენატურაციის შემდეგ, რაც სხვა პირობებში არ დაიმზირებოდა (იხ. ცხრილი).

ცხრილი. α -ქიმოტრიპსინის დამახასიათებელი კინეტიკური და თერმოდინამიკური პარამეტრები.

[DMSO], vol %	[DMSO], mol/l	K_m , M^{-1}	K_{cat} , s^{-1}	pH 8.1		pH 2.6, 1st scan		pH 2.6, 2st scan	
				T_m , °C	ΔH_{cal} , kJ mol^{-1}	T_m , °C	ΔH_{cal} , kJ mol^{-1}	T_m , °C	ΔH_{cal} , kJ mol^{-1}
0	0	8.2×10^{-4}	205	46.7	251	43.4	144	43.3	78
10	1.5	2.4×10^{-3}	210	51.4	264	39.7	190	39.8	149
20	3.0	5.4×10^{-3}	200	52.6	279	37.4	219	37.6	164
30	4.5	1.5×10^{-3}	150	51.5	274	36.3	213	36.5	144
40	6.0	2.2×10^{-2}	136	48.4	255	34.7	171	34.5	33
50	7.5	2.0×10^{-2}	44	41.5	205	30.0	69	-	0
60	9.0	1.5×10^{-2}	36	-	135	-	0	-	0
70	10.5	-	-		0	-	0	-	0

5. დასკვნები

1. ჩვენ დავადგინეთ, რომ DMSO-ს გავლენა α -ქიმოტრიპსინის სტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობაზე დუალისტური ხასიათისაა. კერძოდ,

- ხსნარებში DMSO-ს კონცენტრაციის 0-50% ფარგლებში აღინიშნება ცილის გლობულის კომპაქტური ნაწილის სტაბილიზაცია pH 8.1-ს პირობებში და დესტაბილიზაცია მჯავე pH-ს პირობებში, მაგრამ ორივე შემთხვევაში ადგილი აქვს სტაბილიზაციას ენტალპიის მხრივ. ამავე დროს ადგილი აქვს აქტიური ცენტრის დესტაბილიზაციას, რაც აისახება მიხაელისის კონსტანტის ზრდაში.
- DMSO-ს კონცენტრაციის შემდგომი ზრდა იწვევს როგორც ლოკალურ, ასევე გლობალურ დესტაბილიზაციას და ადგილი აქვს ე.წ. მოლტენ-გლობულის მსგავსი მდგომარეობაში გადასვლას და შემდგომ დენატურაციას.

ასეთი ქცევა შეიძლება აიხსნას 0-50% კონცენტრაციის პირობებში გამხსნელი წყლის მიერ უპირატესი სოლვატაციით DMSO-თან შედარებით, რომელიც აძლიერებს ბმული წყლის

სტრუქტურას და იწვევს ენტალპიურ სტაბილიზაციას. DMSO-ს 50%-ზე უფრო მაღალი კონცენტრაციებისას იწყება DMSO-ს მოლეკულების მიერ უპირატესი სოლვატაციის უბანი, სადაც ადგილი აქვს ჯერ ცილის მოლტენ-გლობულის, ხოლო შემდეგ დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლა.

2. აზურინის შემთხვევაში გამოვლინდა ცილის გლობულის შებოჭვის (როგორც ალკანთიოლის ზედაპირის, ასევე იონური ლლობილის გარემოს საშუალებით) გავლენა ელექტრონის გადატანის სიჩქარეზე, ცილის შინაგანი დინამიკის არსებით შეზღუდვის გამო, განსაკუთრებით მაღალი წნევის ან/და დაბალი ტემპერატურის პირობებში. ეს იწვევს ელექტრონის გადატანის ადიაბატური მექანიზმის მნიშვნელოვან შეუღლებას არაერგოდულ და არაწრფივ კინეტიკურ ეფექტებთან.

5. გამოყენებული ლიტერატურა

- [1] J.N. Onuchic, H. Nymeyer, A.E. Garcia, J. Chahine, N.D. Socci, The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios, *Adv. Protein Chem.* 53 (2000) 87-152.
- [2] H. Weingärtner, C. Cabrele, C. Herrmann, How ionic liquids can help to stabilize native proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* (2012) DOI: 10.1039/c1cp21947b.
- [3] D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, M. Shushanyan, K. L. Davis, D. H. Waldeck, and R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, *PNAS*, vol. 107, #7, (2010), 2757–2762.
- [4] D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, T. Tretyakova, D. H. Waldeck, and R. van Eldik, Nonergodic and nonlinear kinetic motifs for electron transfer with azurin at Au/SAM junctions in contact with a protic ionic melt: impact of glassy dynamics, 2013, submitted.
- [5] D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, S. Seyfert, D. Sarauli, G. Lee, R. van Eldik, Kinetic, thermodynamic and mechanistic patterns for free (unbound) cytochrome c at Au/SAM junctions. Impact of electronic coupling, hydrostatic pressure, and stabilizing/denaturing additives. *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 7041-7056.
- [6] H. Horton, L. Moran, R. Ochs, D. Rawn, G. Scrimgeour, *Principles of biochemistry*, 2nd ed., 1996.
- [7] A. J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed., 2001.
- [8] E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 101(1979) 19-28.

- [9] D.E. Khoshtariya, M. Shushanian, R. Sujashvili, M. Makharadze, E. Tabuashvili, G. Getashvili, Enzymatic activity of α -chymotrypsin in the urea-induced molten-globule-like state: a combined kinetic/thermodynamic study. *J. Biol. Phys. Chem. (Basel)* 3 (2003) 2-11.
- [10] T. Tretyakova, M. Shushanyan, T. Partskhaladze, M. Makharadze, R. van Eldik and D. E. Khoshtariya, Impact of dimethyl sulfoxide on the local and global stability/flexibility of α -chymotrypsin, as probed through functional and unfolding patterns, 2013, in revision.
- [11] M. Shushanyan, D.E. Khoshtariya, T. Tretyakova, M. Makharadze, R. van Eldik, Diverse role of conformational dynamics in carboxypeptidase A-driven peptide and ester hydrolyses. Disclosing the “perfect induced fit” and “protein local unfolding” pathways by altering protein stability, *Biopolymers* 95 (2011) 852-870.
- [12] P.L. Privalov, S.A. Potekhin, Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Methods Enzymol.* 131 (1986) 4-51.
- [13] J.C. Mauro, P.K. Gupta, R.J. Loucks (2007) Continuously broken ergodicity. *J Chem Phys* 126:184511(11).
- [14] T. Tretyakova, M. Shushanyan, M. Makharadze, T. Partskhaladze, D. E. Khoshtariya and R. van Eldik, Impact of variable DMSO additives on the catalytic and calorimetric performance of α -chymotrypsin, *Eur Biophys J*, (2011) 40 (Suppl 1):S210.