

შესავალი

ნაშრომის აქტუალობა. ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების, მათ შორის გლობულური ცილების, ფუნქციური მექანიზმების შესწავლას ამ ობიექტების კონფორმაციულ ძვრადობასა და თერმოდინამიკურ სტაბილობასთან ურთიერთკავშირში ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანი ადგილი უკავია თანამედროვე მოლეკულურ ბიოფიზიკასა და მომიჯნავე მიმართულებებით.

თანამედროვე წარმოდგენების მიხედვით, ბიომაკრომოლეკულები, მათი ფუნქციიდან გამომდინარე, ხასიათდებიან როგორც ჩამოყალიბებული სტრუქტურული თავისებურებებით (კარგად გამოკვეთილი სამ-განზომილებიანი აგებულება), ასევე მათი ფუნქციონირებისათვის აუცილებელი მოქნილობით (ფლუქტუაციული ლაბილობით), და იმის უნარით, რათა ერთი კონკრეტული სტრუქტურული მდგომარეობიდან გადავიდნენ სხვა, მსგავსს, ან განსხვავებულ სტრუქტურულ მდგომარეობაში (ან ქვე-მდგომარეობაში). ასეთი გადასვლები, გარდა უშუალო ფუნქციური დანიშნულებისა (მაგალითად, ფერმენტული კატალიზი, ელექტრონების ტრანსპორტი, უნბადის ტრანსპორტი და სხვა), აგრეთვე ასრულებენ უმნიშვნელოვანეს როლს ბიო-მაკრომოლეკულების სასიცოცხლო წრებრუნვაში (მაგალითად მათი აწყობა და დეგრადაცია, ტრანსმემბრანული ტრანსპორტი, და სხვა).

გლობულური ცილების ფუნქციური აქტივობის მექანიზმების ექსპერიმენტული შესწავლის მიზნით ტრადიციულად სხვადასხვა კინეტიკური მეთოდი გამოიყენება. მაგრამ, ატომ-მოლეკულური გარდაქმნების, მათ შორის, მუხტის გადატანის თანამედროვე ფიზიკური თეორიის წარმოშობამდე ამ მიმართულებით ჩატარებული ექსპერიმენტული კვლევები ძირითადად უფრო ბიოქიმიის სფეროს მიეკუთვნებოდა. XX საუკუნის 50-60-იანი წლებიდან დაწყებული, ინტენსიურად ვითარდებოდა და ამ დროისათვის მაღალი განვითარების დონეს მიაღწია თეორიულმა წარმოდგენებმა კონდენსირებულ გარემოში (სითხეები, თხევადი კრისტალები, მინისებრი მატერია, ბიომოლეკულები) მიმდინარე პროცესების ფიზიკური მექანიზმების შესახებ. ამ საქმეში მნიშვნელოვანი როლი ითამაშეს გამოჩენილმა მეცნიერებმა: რ. მარკუსმა, რ. დოლონაქემ, ჯ. ჯორტნერმა, ჯ. ჰოპფილდმა, ლ. ზუსმანმა. აღნიშნული თეორიული წარმოდგენების საფუძველზე შესაძლებელი გახდა და ეხლაც მზარდი ტემპით მიმდინარეობს მრავალი, მათ შორის ბიოლოგიური, პროცესის ფიზიკური შინაარსის გაშიფვრა, ასევე ისეთი ახალი კინეტიკური ექსპერიმენტების დაგეგმვა, რომლებიც პირდაპირ ტესტირებას გაუწევდნენ თეორიული მოდელების ფარგლებში პროგნოზირებულ კანონზომიერებებს, მათ შორის ელექტრონების და ატომების კვანტური ბუნების ტუნელირების ეფექტის გამოვლინებებით.

ამრიგად, კინეტიკურმა, მათ შორის, ბიო-კინეტიკურმა ექსპერიმენტმა ახალი, მეტად ღრმა ფიზიკური დატვირთვა შეიძინა და, უკვე XX საუკუნის 70-80-იანი წლებიდან დაწყებული, სრულფასოვნად ემსახურება მოლეკულური ბიოფიზიკის ახალ ქვემომართულებას ბიომოლეკულური გარდაქმნების ფიზიკას. ამასთან ერთად, სულ უფრო ცხადი ხდება მოლეკულური ბიოფიზიკის და ფიზიკური ქიმიის როგ ქვემომართულებებთან, მაგალითად ბიომოლეკულების თერმოდინამიკასთან, ბიოელექტროქიმიასთან სინერგიული ურთიერთკავშირის არსებობის აუცილებლობა, როგორც თეორიული ისე ექსპერიმენტული კვლევების დონეზე.

მოცემულ სადისერტაციო ნაშრომში განსხვავებული ფუნქციის მქონე გლობულური ცილების ფუნქციონირების ფიზიკური არსის, ანუ ელექტრონულ-კონფორმაციული გარდაქმნების მექანიზმების თანამედროვე თეორიული წარმოდგენების საფუძველზე ჩადრმავებული ანალიზის მიზნით, რიგი

კინეტიკური მეთოდების გამოყენებით (pH-მეტრული ტიტრაცია, სწრაფი შერევის სპექტროსკოპია, ციკლური ვოლტამპერომეტრია) შესწავლილია ცვლადი სარეაქციო გარემოს (მადესტაბილური ან მასტაბილური ორგანული დანამატები, ტემპერატურა, წნევა, იმობილიზაცია სხვადასხვა სისქის ორგანულ ფირებზე) გავლენა შესაბამისი ბიომოლეკულური პროცესების მახასიათებელ კინეტიკურ პარამეტრებზე. რიგ შემთხვევებში, ბიომოლეკულის თერმოდინამიკურ სტაბილურობასა, მის ფლუქუაციურ ძვრადობასა და ფუნქციურ აქტივობას შორის შინაგანი კავშირის შესახებ კომპლემენტური ინფორმაციის მიღების მიზნით გამოყენებული იყო აგრეთვე თერმოდინამიკური კვლევის მეთოდოლოგია (მიკროკალორიმეტრია). აქედან გამომდინარე, სადისერტაციო ნაშრომის აქტუალურობა ეჭვს არ უნდა იწვევდეს.

ნაშრომის მიზანი. სადისერტაციო ნაშრომის უმთავრეს მიზანს წარმოადგენდა იმის გამოკვლევა, თუ რა როლს თამაშობენ ცილებისთვის მეტად დამახასიათებელი ე.წ. კონფორმაციული თავისუფლების ხარისხები (რელაქსაციების დრო მეტად ფართო სპექტრით) სხვადასხვა წარმოშობისა და სრულიად განსხვავებული ფუნქციის მქონე ცილების მუშაობის დროს (მაგალითად, ფერმენტ-სუბსტრატის ურთიერთ-გამოცნობის საწყის, თუ მომდევნო კატალიზურ სტადიებზე). ამასთან, განსაკუთრებული ყურადღება ეთმობოდა კონფორმაციული თავისუფლების ხარისხების და სხვა ტიპის, სახელდობრ ელექტრონული დრუბლების გადანაწილების (ქიმიური გარდაქმნების) და გარემოს დინამიკური რეორგანიზაციის მახასიათებელი თავისუფლების ხარისხების ურთიერთ-შეუღლებების ხარისხს, ანუ ელექტრონულ-კონფორმაციული გარდაქმნების კლასიფიკაციას.

კვლევის ამოცანები. ამათგან უნდა აღინიშნოს შემდეგი უმთავრესი ამოცანები:

1. ენდოპეპტიდაზური ფუნქციის მქონე ცილა-ფერმენტის α -ქიმოტრიპსინის მიერ სპეციფიკური ესთერული სუბსტრატის ჰიდროლიზის მახასიათებელ კინეტიკურ პარამეტრების შესწავლა სარეაქციო არეში მადესტაბილური დანამატის - შარდოვანას კონცენტრაციის ფართო ფარგლებში.
2. შარდოვანას დანამატების გავლენის შესწავლა α -ქიმოტრიპსინის თერმულ სტაბილურობაზე კინეტიკურ ექსპერიმენტების პირობებთან მაქსიმალურად მიახლოებულ პირობებში და მიღებული შედეგების შეჯერება კინეტიკური კვლევების შედეგებთან.
3. ეგზოპეპტიდაზური ფუნქციის მქონე ცილა-ფერმენტის, კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს მიერ ქიმიურად განსხვავებული ორი სუბსტრატის ჰიდროლიზის მახასიათებელ კინეტიკურ პარამეტრების შესწავლა ცვლადი ტემპერატურის, ასევე სარეაქციო არეში მასტაბილური და მადესტაბილური დანამატების სხვადასხვა კონცენტრაციებით თანაობისას.
4. ელექტრონის გადამტანი ცილის, აზურინის იმობილიზაცია თვითაწყობილ, თხელი ორგანული ფირებით დაფარულ ოქროს ელექტროდებზე და აზურინის სპილენძის შემცველ ცენტრსა და ელექტროდს შორის ელექტრონის მიმოცვლის მექანიზმების ჩაღრმავებული შესწავლა ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდით.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. ნაშრომის შემაჯამებელ ნაწილის პრაქტიკულად ყველა დასახელებულ პუნქტში მითითებული შედეგები (გარდა პირველი ზოგადი პუნქტისა) მეცნიერული თვალსაზრისით წარმოადგენს სიახლეს.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა. სადისერტაციო ნაშრომში მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანწილად აღრმავებს ფუნდამენტურ ცოდნას სხვადასხვა ტიპის გლობულური ცილების ფუნქციონირების ფიზიკური მექანიზმების შესახებ, კერძოდ მათში ელექტრონულ-კონფორმაციული შეუღლების ტიპების და ხარისხის თვალსაზრისით. მნიშვნელოვანია მიღებული ინფორმაცია ცილების თერმოდინამიკურ სტაბილობას, ფლექსიბილობას და ფუნქციას შორის არსებული შინაგანი კავსირების შესახებ. აგრეთვე მოცემულია ახალი განზოგადებანი დენატურანტით ან ტემპერატურით ინდუცირებული მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობების არსებობის და მათი ფუნქციონირების შესახებ. პრაქტიკული თვალსაზრისით, მიღებული ცოდნა, განსაკუთრებით აზურინის “ნანომოწყობილობის” შესახებ, შესაძლებელია სასარგებლო იყოს სხვადასხვა ტიპის ბიოსენსორების, ან მზის ენერჯის გარდამქმნელ ბიონიკური სისტემების კონსტრუირების თვალსაზრისით; აგრეთვე სამრეწველო ბიორეაქტორებში ცილების სტაბილობისა და რეაქციის უნარის ვარირების თვალსაზრისით.

ნაშრომის აპრობაცია. სადისერტაციო ნაშრომის შედეგები მოხსენებული იყო მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის სამეცნიერო სემინარებზე, 2004, 2006 წწ., და წარდგენილი იყო პოსტერის ტიპის ორი მოხსენების სახით ევროპის ბიოფიზიკოსთა მე-7 კონგრესზე (2009 წ. 11-15 ივლისი, გენუა, იტალია).

პუბლიკაციები. დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულია ოთხი სამეცნიერო ნაშრომი რეცენზირებად ჟურნალებში, აქედან ერთ-ერთი მაღალრეიტინგულ, აშშ ნაციონალური მეცნიერებათა აკადემიის გამოცემაში (იხ. პუბლიკაციების ნუსხა).

დისერტაციის მოცულობა და სტრუქტურა. სადისერტაციო ნაშრომი შედგება შესავლის, სამი ნაწილის, დასკვნებისა და გამოქვეყნებული ლიტერატურის სიისგან. I ნაწილი წარმოადგენს ლიტერატურის მიმოხილვას, II ნაწილში აღწერილია სადისერტაციო ნაშრომში გამოყენებული კვლევის მეთოდები, ხოლო III ნაწილი წარმოგვიდგენს მიღებულ შედეგებს და მათ განხილვას. ნაშრომი გადმოცემულია ნაბეჭდი ტექტის 105 გვერდზე, შეიცავს 20 სურათსა და 10 ცხრილს, ციტირებული ლიტერატურის სია მოიცავს 110 დასახელების ნაშრომს.

შეჯამება:

1. განსხვავებული ფუნქციის მქონე გლობულური ცილების ელექტრონულ-კონფორმაციული გარდაქმნების ფიზიკური არსის გამოვლენის მიზნით, რიგი კინეტიკური მეთოდების გამოყენებით შესწავლილია ცვლადებადი სარეაქციო გარემოს გავლენა შესაბამისი პროცესების მახასიათებელ კინეტიკურ პარამეტრებზე.
2. ენდოპეპტიდაზური ფუნქციის მქონე ცილა-ფერმენტის α -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში pH-მეტრული ტიტრაციის მეთოდით შესწავლილი იყო მადესტაბილუბელი დანამატის შარდოვანას გავლენა ესთერული სუბსტრატის ჰიდროლიზის მახასიათებელ კინეტიკურ პარამეტრებზე და მიღებული შედეგები შეჯერებულ იქნა ადრე მიღებულ შედეგებთან იმავე პროცესზე ტემპერატურის გავლენის კუთხით.
3. ასევე დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდით შესწავლილი იყო შარდოვანას დანამატების გავლენა α -ქიმოტრიპსინის თერმულ სტაბილობაზე და მიღებული შედეგები შეჯერებულ იქნა კინეტიკური კვლევების შედეგებთან.
4. α -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში მიღებული შედეგები მიუთითებენ იმაზე, რომ შარდოვანას კონცენტრაციის ზრდა 0 5 M ფარგლებში, საზოგადოდ, იწვევს ცილის თანდათანობით თერმოდინამიკურ დესტაბილიზაციას, რაც ასევე გამოიხატება ფერმენტ-სუბსტრატის კომპლექსის სტაბილობის შემცირებაში (მიხაელისის კონსტანტის ზრდაში). ეს გარემოება არ აისახება პროცესის სიჩქარის კონსტანტაზე, რაც მიუთითებს ცილის აქტიური ცენტრის დესტაბილუბულ, მაგრამ ჯერ კიდევ ფუნქციურად მოქმედ მდგომარეობაზე. ეს მდგომარეობა შეიძლება დახასიათდეს როგორც მოლტენ-გლობულის მსგავსი მდგომარეობა.
5. ექსპერიმენტული მონაცემების შემდგომმა კომპლექსურმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ტემპერატურის ზომიერი მომატება (თერმული დენატურაციის წინმსწრებ ინტერვალში), ისევე როგორც შარდოვანას კონცენტრაციის მნიშვნელოვანი ზრდა, იწვევს მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობას (ტემპერატურით ინდუცირებული მოლტენ-გლობულა), რაც სავარაუდოდ, გლობულური ცილებისთვის ზოგადად დამახასიათებელ მოვლენას უნდა წარმოადგენდეს.
6. ეგზოპეპტიდაზური ფუნქციის მქონე ცილა-ფერმენტის კარბოქსიპეპტიდაზა A-ს შემთხვევაში, სწრაფი შერევის კინეტიკური მეთოდით, ორი ქიმიურად განსხვავებული სუბსტრატის გამოყენებით, შესწავლილი იყო მასტაბილუბელი და მადესტაბილუბელი დანამატების, ასევე ტემპერატურის გავლენა კატალიზური პროცესის კინეტიკურ და მიხაელისის კონსტანტებზე.
7. პეპტიდური და ესტერული სუბსტრატებისთვის კინეტიკურმა კვლევებმა დაადგინა პროცესის საწყის ეტაპზე ფერმენტ-სუბსტრატის კონფორმაციული ურთიერთქმედების ნატიფი “მორგების” განსხვავებული მექანიზმი, რაც შემდგომ საკუთრივ კატალიზურ სტადიაზე განაპირობებს ქიმიური გარდაქმნების განსხვავებულ მექანიზმებს, ანუ ელექტრონულ-კონფორმაციული გარდაქმნების განსხვავებულ განხორციელებას.
8. ამ კინეტიკურმა კვლევებმა დაადასტურა, რომ პეპტიდური სუბსტრატის ჰიდროლიზის შემთხვევაში კატალიზური სტადიის სიჩქარე ძირითადად განპირობებულია ქიმიური თავისუფლების ხარისხების გარდაქმნებით (სუსტი ელექტრონულ-კონფორმაციული შეუღლება), მაშინ როდესაც ესთერული სუბსტრატის შემთხვევაში კატალიზური პროცესი დაკავშირებულია როგორც ქიმიურ, ისე კონფორმაციული გარდაქმნებთან (ძლიერი ელექტრონულ-კონფორმაციული შეუღლება).

9. ელექტრონის გადამტანი ცილის, აზურინის შემთხვევაში, გამოყენებული იყო ოქროს ელექტროდზე თხელი ორგანული ფირების თვითაწყოების ტექნიკა და ბიოელექტროქიმიური მეთოდი.
10. ტემპერატურის და წნევის ვარირების პირობებში დადგინდა, რომ ყველაზე თხელი ორგანული ფირების შემთხვევაში ელექტროდთან ელექტრონის მიმოცვლის აქტივაციის ენერგია შეიცავს კომპონენტს, რომელიც უშუალოდ არის განპირობებული ცილის კონფორმაციული დინამიკის ტემპერატურული ფაქტორით, ხოლო პროცესის აქტივაციის მოცულობა დადებითია. შედარებით სქელი ფირების შემთხვევაში პროცესის აქტივაციის ენერგია განპირობებულია მხოლოდ ფრანკ-კონდონის წევრით, ხოლო აქტივაციის მოცულობა უარყოფითია. ეს შედეგი მიუთითებს ელექტრონის მიმოცვლის ორ სხვადასხვა მექანიზმზე და მათში ელექტრონულ-კონფორმაციული ურთიერთქმედების სრულიად სხვადასხვა ხასიათზე.

Тбилисский государственный университет им. И. Джавахишвили
Факультет точных и естественных наук
Биофизическое направление

Михаил Шушанян

ДОКТОРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

**Механизмы электронно-конформационных
взаимодействий в условиях функционирования
ряда глобулярных белков**

Руководители программы:
профессор,
док. физ. мат. наук

Тамаз Мдзинарашвили

докт. физ. хим. наук

Дмитрий Хоштария

Научный руководитель:
докт. физ. хим. наук

Дмитрий Хоштария

Тбилиси

2010 год

Введение

Часть 1. Глобулярные белки, ферменты. Теоретические основы белковых процессов

Глава 1.1 Структура белков. Основные факторы, определяющие структуру и функции глобулярных белков

Глава 1.2 Конформационные состояния глобулярных белков

Глава 1.3 Кинетика Михаэлиса-Ментен

Глава 1.4 Теория Аррениуса

Глава 1.5 Теория элементарного акта

Часть 2. Характеристика изучаемых белков.

Глава 2.1 α -химотрипсин

Глава 2.2 Карбоксипептидаза А

Глава 2.3 Азурин из *Pseudomonas aeruginosa*

Часть 3. Методы исследования

Глава 3.1 Метод автоматического титрования

Глава 3.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия

Глава 3.3 Метод остановленной струи

Глава 3.4 Циклическая сканирующая вольтамметрия

Глава 3.5 Препараты и растворы

Часть 4. Полученные результаты и их обсуждение

Глава 3.1 Результаты исследования α -химотрипсина

Глава 3.2 Результаты исследования карбоксипептидазы А

Глава 3.3 Результаты исследования азурина

Итоги работы

Использованная литература

Введение

Актуальность работы

Одним из наиболее важных направлений современной молекулярной биофизики является изучение механизмов функциональной активности биологических макромолекул, в том числе, в связи с конформационной подвижностью и термодинамической стабильностью этих объектов.

С современной точки зрения, биомacroмолекулы, исходя из их функций, с одной стороны характеризуются определёнными структурными особенностями (хорошо упакованной трёхмерной структурой), а с другой – необходимой для их функциональности подвижностью (флуктуационной лабильностью), а также способностью переходить из одного конкретного структурного состояния в другое, похожее или отличающееся состояние (или подсостояние). Такие переходы кроме функционального назначения (например, ферментативный катализ, транспорт электронов, перенос кислорода и др.), играют важнейшую роль и в жизненном цикле биомacroмолекул (например, сборка и деградация, трансмембранный транспорт и др.).

С целью экспериментального исследования механизмов функциональной активности белков традиционно применяется ряд классических кинетических методов. Однако до появления современной физической теории атомно-молекулярных преобразований, в том числе теории переноса заряда, проведённые исследования такого рода в основном относились к сфере биохимической науки, нежели биофизической. Начиная с 50-60 годов XX века, интенсивно развивались и в наши дни достигли высокого развития представления о механизмах процессов, протекающих в конденсированных средах (в растворах низкомолекулярных жидкостей, в жидких кристаллах, в стеклообразных веществах и биомолекулах). В этом важную роль сыграли выдающиеся учёные: Р. Маркус, Р. Догонадзе, Д. Джортнер, Д. Хопфилд, Л. Зусман. На основании вышеупомянутых теоретических представлений стала возможной и в наши дни идёт ускоряющимися темпами расшифровка физической сути множества процессов, в том числе биологических, а также планирование таких новых биологических экспериментов, которые непосредственно проверяют закономерности, прогнозируемые в рамках теоретических моделей, среди прочих квантовую природу электронов и атомов с выявлением эффекта туннелирования.

Таким образом, кинетические, среди них и биокинетические эксперименты получили новую, более глубокую нагрузку и, начиная уже с 70-80 годов XX столетия, служат в пользу нового направления молекулярной биофизики – физики биомолекулярных преобразований. Вместе с этим, более очевидной становится важность взаимосвязей с рядом таких направлений молекулярной биофизики и физической химии, как биомолекулярная термодинамика, биоэлектрохимия, и др., как на теоретическом, так и экспериментальном уровнях.

В данной диссертации с целью углублённого анализа физической сути функционирования ряда различных глобулярных белков, с применением ряда кинетических методов (рН-метрической титрации, остановленной струи, циклической вольтамперометрии) исследовано влияние целенаправленно манипулируемой реакционной среды (стабилизирующие или дестабилизирующие органические добавки, температура, давление, иммобилизация на органических плёнках разной толщины) на соответствующие кинетические параметры биомолекулярных процессов. В ряде случаев для получения комплементарной информации о фундаментальной взаимосвязи между термодинамической стабильностью,

функциональной подвижностью и активностью биомолекул, была применена термодинамическая методология (микрокалориметрия). Исходя из всего вышеизложенного, актуальность темы диссертации не должна вызывать сомнений.

Цели работы

Главнейшую цель диссертации представляло исследование роли так называемых конформационных степеней свободы, особенно характерных для белков и других биомолекул (с очень широким спектром времен релаксации) при осуществлении различных функций (например, при связывании ферментом субстрата, либо при последующих каталитических стадиях). Вместе с этим, особое внимание уделялось степеням сопряжения между конформационными степенями свободы и степенями свободы других типов, а именно перераспределением электронных облаков (химические превращения) и характерными динамическими реорганизациями окружающей среды, то есть классификации электронно-конформационных преобразований.

Задачи исследования

Нужно отметить следующие основные задачи:

1. Изучение характерных кинетических параметров гидролиза специфического эфира обладающим эндопептидазной активностью α -химотрипсином в реакционной среде с концентрациями дестабилизирующей добавки – мочевины в широких пределах.
2. Изучение влияния мочевины на термическую стабильность α -химотрипсина в условиях, максимально приближённых к условиям кинетических экспериментов, а также сравнение полученных результатов с результатами кинетических исследований.
3. Изучение характерных для гидролиза двух отличающихся субстратов карбоксипептидазой А, обладающего экзопептидазной активностью белка-фермента, кинетических параметров при различных температурах, а также различных концентрациях стабилизирующих и дестабилизирующих добавок.
4. Имобилизация переносчика электрона, азурина на самоорганизующихся на поверхности золотого электрода органических слоях и углублённое исследование механизмов обмена электроном между ионом меди в центре молекулы азурина и электродом методом циклической вольтамперметрии.

Научная новизна диссертации

Результаты практически по всем пунктам, перечисленным в подведении итогов работы (кроме первого общего пункта) с научной точки зрения представляет новизну.

Теоретическое и практическое значение работы

Результаты, представленные в диссертации, значительно углубляют фундаментальные знания о физических механизмах функционирования различных типов глобулярных белков, в частности с точки зрения типов и степеней электронно-конформационных сопряжений. Важной представляется полученная информация о внутренних связях между термодинамической стабильностью, подвижностью и функциональной активностью. Также дано новое обобщение между состоянием молтен-глобулы, вызванном денатурантом или температурой. С практической точки зрения, полученные сведения, в особенности о “наноустройстве” азурина, могут быть полезными в конструировании различных типов биосенсоров, либо биосистем

для преобразования солнечной энергии, также в производственном применении биореакторов с точки зрения белковой стабильности и варьировании реакционной способности.

Апробация работы.

Результаты, полученные в данной работе, были озвучены на семинарах, проводившихся в институте молекулярной биологии и биофизики в 2004, 2006 годах, а также были представлены в виде двух постеров на 7-м Европейском биофизическом конгрессе (11-15 июля 2009 года, Генуя, Италия)

Публикации

На тему диссертации опубликованы 4 научные работы в рецензируемых журналах, одна из которых в высокорейтинговом журнале издательства национальной академии наук США.

Объём и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, четырёх частей, подведения итогов и перечня цитируемой литературы. I часть представляет собой литературный обзор, во II части описаны изучаемые глобулярные белки, в III части представлены используемые методы исследования, в IV части рассмотрены результаты проведённых экспериментов.

Часть 1. Глобулярные белки, ферменты. Теоретические основы белковых процессов

Глава 1.1. Структура белков. Основные факторы, определяющие структуру и функции глобулярных белков.

Структурная иерархия глобулярных белков

Белки – это биологически активные макромолекулы, состоящие из аминокислот и обладающие определёнными функциями. Посредством пептидной связи аминокислоты связаны между собой в уникальной для каждого белка последовательности, называемой первичной структурой. Эта последовательность аминокислот определяет уникальную пространственную структуру белка. Многообразие функций белков определяется многообразием последовательностей и пространственных структур.

Основные свойства белков выражаются в том, что благодаря определённой пространственной структуре проявляются соответствующие динамические или иные свойства, необходимые для осуществления тех или иных функций. Эта структура, характеризующаяся наличием природной функциональности, получила название нативного состояния. В отличие от фибриллярных белков, вытянутых вдоль какой-то оси, глобулярные белки имеют сравнительно компактную форму. Имеются и другие существенные различия между этими двумя классами белков. Фибриллярные белки играют сократительные, механические роли в живой природе. В то время как диапазон функций глобулярных белков несколько более широк. Они осуществляют транспортные, рецепторные, регуляторные, иммунные и множество других функций. Одна из наиболее важных категорий белков – ферменты, то есть белки, катализирующие химические реакции. Важная особенность таких биологических катализаторов – высокая эффективность катализа.

В зависимости от первичной структуры, полипептидные цепи могут характеризоваться наличием таких элементов вторичной структуры, как α -спирали, β -структуры, их модификации, а также петли. Структура элементов вторичной структуры определяется водородными связями между пептидными группами. Наличие тех или иных аминокислот может либо стабилизировать вторичные структуры (Ala, Gly, Met), либо нарушать (Ser, Cys).

В свою очередь взаимодействия во всём объёме белковой цепи определяют третичную структуру, уникальную пространственную структуру белка. К таким взаимодействиям следует отнести и взаимодействия между боковыми группами, и гидрофобные взаимодействия, и дисульфидные мостики. В действительности разделять вторичную и третичную структуры белка не стоит, ведь рассматривая те или иные периодические структуры в цепи, мы имеем дело всего лишь с частью единой пространственной структуры. Нативные структуры больших глобулярных белков (например, киназы и дегидрогеназы, папаина, термолизина и др.) характеризуются наличием нескольких доменов размером от 40 до 400 аминокислотных остатков. В ферментах зачастую между доменами расположен каталитический центр.

Составленные из одной полипептидной цепи глобулы – мономеры – во многих белках объединяются в структуры более высокого порядка – олигомеры, которые характеризуются четвертичной структурой. Количество мономеров при этом может широко варьироваться. Олигомеры состоят из субъединиц при помощи

нековалентных связей, при этом зачастую может наблюдаться симметрия в расположении субъединиц.

Структура глобулярных белков тесно связана с их функциональными свойствами. Разделение субъединиц или их неправильная ассоциация существенно меняет функциональные свойства белков. В поддержании уникальной структуры белковой глобулы принимают участие различные силы. Одна из наиболее мощных сил, сохраняющих глобулу, является ковалентная дисульфидная связь, возникающая между остатками цистеина. Однако в общем объеме глобула сохраняется в основном балансом слабых сил. Ван-дер-Ваальсовы силы, водородные связи, ионные силы между заряженными частями и гидрофобные силы комплексно создают уникальную нативную структуру белка.

Внутримолекулярные водородные связи и другие полярные взаимодействия. Конформационная энтропия.

Ван-дер-Ваальсовы силы возникают между атомами или молекулами, находящимися на близком расстоянии. Эти силы определяются диполь-дипольными взаимодействиями постоянных, индуцированных и осциллирующих диполей. Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия очень зависят от расстояния между атомами и действуют на коротких дистанциях. Несмотря на определённую неясность в количественном определении роли Ван-дер-Ваальсовых сил в свёртывании глобулы белка, очевидно, что эти силы играют значительную роль в поддержании нативной структуры.

Количественный вклад водородных связей в стабильность белковой глобулы в настоящее время также является спорной темой. Как известно, водородные связи появляются благодаря электростатическим взаимодействиям при расположении атома водорода на одной линии между двумя отрицательно заряженными атомами. Природа водородной связи сложна и не объясняется чисто электростатическим взаимодействием. Расстояние, на котором действует водородная связь, на 0.04 нм меньше, чем для Ван-дер-Ваальсовой связи. Кроме электростатических и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий существует вклад в энергию водородной связи за счёт энергии взаимодействия двух электронов и неразделённой пары электронов одного из электроотрицательных атомов. В разное время роль водородных связей либо преувеличивалась, либо преуменьшалась по сравнению с другими стабилизирующими белок силами. Несмотря на трудности, связанные с количественной оценкой, целый ряд аргументов подтверждает мнение, что водородные связи играют большую роль в свёртывании белка и сохранении его глобулярной структуры. Водородные связи играют основную роль в стабилизации элементов вторичной структуры, таких как α -спирали и β -формы. В нативных белках полярные группы, погружённые вовнутрь глобулы, также связаны между собой водородными связями. Кроме этого, водородные связи имеют огромное значение для взаимодействий на поверхности молекулы белка [24-27].

Вклад в стабильность белка электростатических взаимодействий между заряженными группами, особенно зависит от pH среды. При увеличении или уменьшении pH относительно оптимального pH белки становятся нестабильными из-за возрастания сил отталкивания между зарядами. В близости от изоэлектрической точки электростатические силы не играют доминантной роли [22,23]. На поверхности белка электростатические взаимодействия компенсируются потерями энтропии за счёт иммобилизации взаимодействующих с белком молекул, и поэтому сравнительно малая доля в стабильность белка вносится этими поверхностными взаимодействиями [22]. Ионные связи в белках стабилизируются водным

окружением, так как ориентированные молекулы воды экранируют заряженные группы. Вследствие этого образование ионных связей сопровождается повышением энтропии воды. Выигрыш свободной энергии в этом случае также значителен. Воздействие воды на ионные связи в белке отличается от гидрофобного эффекта – ионные связи усиливаются, а гидрофобные ослабляются по мере добавления неводных растворителей.

При рассмотрении стабильности глобулярных белков нужно иметь в виду ещё один важный фактор – конфигурационную энтропию. Вообще, развёрнутое состояние белка представляет собой целый ансамбль различных конформаций, ни одна из которых не является более значимой, чем другие. Поэтому сворачивание белка в компактную глобулу сопровождается потерей конформационных степеней свободы. Потеря конформационной энтропии является основным фактором, который мешает свёртыванию полипептидной цепи. Численная оценка этого фактора более затруднительна, однако очевидно, что эти потери должны как-то компенсироваться. Для исследования этих фактов были проведены эксперименты, в которых создавались поперечные ковалентные связи в нативной структуре белка [28].

Гидрофобный эффект

О значении гидрофобных взаимодействий для глобулизации белков ещё в 1954 году Кауцман высказал предположение, что неполярные остатки аминокислот избегают контактов с водой, предпочитая больше контактов между собой [1]. Полярные радикалы же наоборот, стараются взаимодействовать как раз с водой. Вследствие этого гибкая макромолекула белка в воде сворачивается и старается принять форму, которая поможет избежать нежелательных контактов неполярных радикалов с водой, в то время как полярные остатки располагаются на поверхности глобулы в водном окружении. Если количество гидрофильных остатков достаточно для покрытия сферической поверхности, глобула примет эллипсоидную форму. Если же количество гидрофильных остатков недостаточно, тогда останутся незащищённые гидрофобные участки, последствием чего может стать деформация глобулы и возникновение четвертичной структуры. Однако это достаточно упрощённое представление, так как невозможно только двумя типами остатков заменить двадцать. Когда мы говорим о “степени гидрофобности” нельзя упускать её количественную степень. Степень гидрофобности аминокислотных остатков, в основном даёт информацию о стабилизации и форме в водном окружении. Детальные расчёты Брандтса прояснили, что с точки зрения статистического расположения гидрофобных, гидрофильных и нейтральных остатков, а также учитывая свободную энергию остатков на поверхности макромолекул и свободную энергию переноса остатка вовнутрь молекулы, гидрофобные группы могут расположиться и на поверхности молекулы [2]. Эксперименты подтвердили, что в целом ряде случаев количество неполярных групп на поверхности может даже превосходить их количество внутри молекулы (например, в случае лизоцима соответственно 32 и 16). Общая топография белковой глобулы определяется тем, что на её поверхности, в основном, располагаются полярные группы, связанные с водой электростатическими и водородными связями, а также малым количеством неполярных групп, в то время как внутри глобулы располагаются основное количество неполярных групп, образующих гидрофобное ядро.

Гидрофобные группы составляют целые гидрофобные участки во вторичной структуре, на поверхности основных сегментов α -спиралей и β -структур. Причём эти участки ориентированы в сторону гидрофобного ядра. Спирализация полипептидной

цепи термодинамически выгодна для целого ряда аминокислот, способствуя насыщению структуры водородными связями. Однако α -спирализация, как и появления β -структур, наряду с этим определяются и гидрофобными взаимодействиями. Другими словами, вторичная структура стабилизируется пространственной структурой белка. Основываясь относительно простыми стереохимическими представлениями, утверждёнными популярными моделями Лима и Птицына, можно увидеть, что промежутки между конкретными гидрофобными группами α -спиралей и β -структур содержат гидрофобные группы других участков, чем и создаётся плотное гидрофобное ядро [3,4]. Оно защищено от воды и стабилизировано. Там же расположенные в малом количестве полярные участки, наоборот, дестабилизируют эти сегменты.

Структура воды, связанная вода.

Нужно всегда иметь в виду, что полипептидные цепи, имеющие сложный аминокислотный состав, чьи остатки взаимодействуют по всей длине цепи, только тогда становятся белками, когда в окружении воды свернутся в уникальную трёхмерную структуру. Белки функционируют в водной среде, и взаимодействие белков с водой является активным. Процесс взаимодействия с водой усложняется наличием растворённых ионов в воде. Как известно, присутствие растворённых ионов в воде меняет её структуру и свойства как растворителя. В водной среде белковая макромолекула имеет специфическое состояние, которое отличается от состояний в других средах и, очевидно структура воды играет в этом не последнюю роль. Изучение процессов свёртывания-развёртывания белка невозможно не только без учёта свойств и структуры самой воды, а также без учёта изменений этой структуры при взаимодействии со свёрнутой или развёрнутой молекулой белка, то есть взаимодействия всех боковых групп с водным окружением. Исследования на протяжении последних десятилетий указывают на то, что в термодинамической стабильности макромолекул, и в частности глобулярных белков, связанная вода может иметь значительное место. Исследования с применением Фурье-преобразований в инфракрасной дифференциальной спектроскопии показало, что связанная с поверхностными заряженными и полярными группами вода создаёт сеть сильных водородных связей, энергия которых значительно превышает энергию водородных связей в чистой воде [29]. Эти сильные водородные связи разрушаются при разворачивании белка.

Глава 1.2 Конформационные состояния глобулярных белков

Нативное состояние

В полипептидной цепи вокруг многих ковалентных связей возможно свободное вращение и любая молекула белка теоретически может принять огромное количество различных конформаций. Однако в биологических условиях большинство полипептидных цепей существует и функционирует только в одной конформации (либо в совокупности ограниченного количества конформаций), для которых характерна минимальная свободная энергия. Ещё в 60-х годах прошлого столетия Anfinsen признал постулатом, что вся информация для достижения нативного состояния белка содержится в его аминокислотной последовательности, и что нативное состояние термодинамически должно быть более стабильно, нежели другие возможные состояния. К тому же нативное состояние – это функция состояния, которая не зависит от пути процесса или начальных условий, которые определяют достижение этого состояния. Последующие исследования в значительной степени подтвердили правильность этих постулатов.

Белковые глобулы характеризуются не слишком плотной, но всё же компактной структурой, что обеспечивает, с одной стороны высокую специфичность внутриглобулярных контактов, и, с другой стороны, становится возможным пространственное перемещение отдельных сегментов свёрнутой в глобулу полипептидной цепи при осуществлении биологических функций белка. Другими словами, белковая глобула является компактной, регулярной структурой с определенными флуктуационными возможностями и характеристиками аperiодической кристаллической структуры. Нужно подчеркнуть, что компактная форма, плотно упакованное гидрофобное “ядро” и полярная гидрофильная внешняя “оболочка” являются общими структурными свойствами, выделяющими глобулярные белки в отдельный класс биополимеров.

Со времени Anfinsen считается, что нативная конформация соответствует минимуму свободной энергии и определяется всеми оговорёнными выше внутримолекулярными взаимодействиями. Но в последнее время приоритетным становится мнение, что нативному состоянию соответствует не глобальный минимум свободной энергии, а кинетически достигаемый минимум. Причём кинетика достижения минимума свободной энергии имеет сложный характер [30]. По современным представлениям нативное состояние представляет собой множество расположенных рядом конформационных микросостояний, что является следствием лабильности неупорядоченных участков белковой глобулы. Локальных минимумов свободной энергии соответствующих этому множеству состояний находится множество. Другими словами, можем с уверенностью сказать, что в физиологических условиях точно определённая конформация данной полипептидной цепи, являющаяся гарантом биологической активности этого глобулярного белка, с определённой точки зрения, явление особенное и не единственное среди множества конформаций, слегка отличающихся друг от друга энергиями.

Следует понимать, что нативное состояние – понятие несколько абстрактное. Потому как в естественных условиях *in vivo*, “в физиологических условиях” белки всегда работают в присутствии определённых количеств агентов, влияющих на биологическую активность, например ионов металлов. Были также проведены исследования влияния смеси мочевины и триметиламин-N-оксида (ТМАО) в определённых пропорциях [31,32], близких к естественным внутриклеточным.

Очевидно, должен соблюдаться определённый баланс сил в окружении белка для его функционирования.

Денатурация, развёрнутое состояние.

Нативное состояние белка сохраняется балансом различных, противоборствующих сил, и поэтому, можно сказать, что нативный белок существует на грани своего устойчивого состояния. Более того, именно на грани потери стабильности некоторые белки становятся максимально активными [33]. Для сохранения нативного состояния необходимо, чтобы целый ряд параметров окружения белка был бы на определённом уровне. Вследствие значительных изменений этих параметров (изменение температуры, pH, структуры воды и так далее) происходит плавление (то есть денатурация), что характерно для белков, и вследствие чего белок переходит в состояние стохастического клубка. Такое состояние, характеризующееся максимальной энтропией, представляет собой систему, для каждой молекулы которой в цепи реализовано положение согласно первичной последовательности. Клубок непрерывно испытывает макроскопические пульсации и для него не определена уникальная пространственная структура. В отличие от структур нативного состояния, структуры развёрнутого состояния значительно менее изучены из-за их свойств и из-за того, что не существует надёжной методики для их описания.

Хотя термин “неупорядоченный клубок” широко используется для описания развёрнутого состояния, в последнее время это представление меняется, и к изучению развёрнутых форм приступают по-новому. Частично этот интерес вызвал тот факт, что развёрнутые формы представляют собой субстраты для молекулярных “шаперонов”, которые участвуют *in vivo* в свёртывании белков и транспорте через мембрану [5-7]. С другой стороны, этот интерес определяется быстрым развитием техники ЯМР (Ядерный Магнитный Резонанс), что даёт возможность изучать различные структурные формы белков в растворах. В настоящее время, остаточные структуры нативного типа выявлены во многих белках развёрнутой конформации. Процент этой структуры зависит как от аминокислотного состава полипептидной цепи, так и от типа денатуранта. Для таких развёрнутых неглобулярных форм, в отличие от “достаточно компактных и свободно упакованных форм” (молтен-глобулы), был принят термин “премолтен-глобула”. Экспериментальные данные подтверждают, что от белка в состоянии “премолтен-глобулы” всё ещё сохраняется сигнал кругового дихроизма в ультрафиолетовой области, что доказывает существование определённой вторичной структуры [8].

Нужно заметить, что существуют различные мнения о качественном различии тепловой денатурации и денатураций, вызванных другими факторами. По видимому, к этому вопросу следует подходить индивидуально в зависимости от белка. Остаётся не до конца понятным механизм взаимодействия белков с мочевиной и гуанидин гидрохлоридом. Признано возможным, что эти соединения, эффективно разрушающие структуру белков, при высоких концентрациях обладают свойством образовывать структуры. Это с уверенностью подтвердили рентгеноструктурные методы [9]. Кроме этого, нужно заметить, что алкилмочевина может индуцировать реорганизацию некоторых белков (например α -химотрипсин) в ненативное, но всё же упорядоченное состояние. В целом, существование остаточных структур в развёрнутых белках достаточно общее свойство.

Природа развёрнутого состояния зависит от денатуранта, вызвавшего это состояние. Кроме этого, свойства развёрнутого состояния в значительной степени определяются аминокислотной последовательностью, как и в случае нативного

состояния. В условиях денатурации ансамбль полученных состояний представляет собой изменчивое, взаимопереходящее распределение конформаций.

Молтен-глобула

Долгое время в молекулярной биологии считалось, что существуют только два стабильных состояния белка – нативное и денатурированное. Однако, в середине 70-х годов прошлого века были выявлены устойчивые формы, которые, фактически, не являлись ни нативными, ни полностью развёрнутыми. Кувайима и сотрудники [13] впервые выявили, что лактальбумин в условиях низкого pH и определённых концентраций солей находится в достаточно стабильном состоянии, которое назвали “А состоянием”. Это состояние характеризуется таким же количеством вторичной структуры, как и для нативного белка, а также является слегка менее компактным, но с уже нарушенными специфическими третичными связями. Из-за этих характеристик Огуши и Вада назвали это состояние “молтен-глобулой” (расплавленная глобула) [14]. Впоследствии появилось понимание, что это принципиально новое термодинамическое промежуточное состояние, с помощью которого можно объяснить более-менее высокую скорость и эффективность сворачивания белка. Позднее было обнаружено, что равновесные формы молтен-глобулы очень схожи с кинетическими интермедиантами белков, и было высказано предположение, что молтен-глобула может играть существенную роль в живых клетках. Например, для токсинов состояние молтен-глобулы очень приближено к тем состояниям, которые наблюдаются в клетках [15,17]. Аналогичным примером может служить белок аспартат-аминотрансфераза, для которого показано, что мономер, перед тем как образуется димер, находится в состоянии молтен-глобулы [16].

По современным представлениям, молтен-глобула есть стабильное термодинамическое состояние молекулы белка, реализация которого происходит в мягких денатурирующих условиях (неестественные для данного белка значения pH, концентрации солей, влияние таких денатурирующих агентов, как мочевины, гуанидин гидрохлорид и др.) и по своим свойствам находится между нативным и полностью развёрнутым состоянием. Молекула белка в состоянии молтен-глобулы практически такая же компактная, как и в нативном состоянии, у неё есть вторичная структура, однако Ван-дер-Ваальсовы связи в мягких областях уже нарушены, в то время как водородные в жёстких областях (α -спирали и β -структуры) сохраняют свою структуру [15,17-19]. Микроскопические характеристики (относительное расположение атомов в мягких, разрыхлённых областях, амплитуда их тепловых колебаний и так далее) существенно отличаются от характеристик в нативном состоянии. Химическими свойствами, и в первую очередь каталитическими способностями, молтен-глобула может очень отличаться от нативного состояния: в ряде случаев функциональная активность в них очень понижена. Кроме того, белок в состоянии молтен-глобулы легче подвергается протеолизу, чем в нативном состоянии, но меньше, чем в полностью развёрнутой форме. Гидрофобные внутренние области молтен-глобулы всё ещё сохраняют упорядоченную пространственную конформацию и хорошо защищены от взаимодействия с растворителем.

Самое спорное в определении состояния молтен-глобулы – это степень участия дальних взаимодействий. В соответствии с определением, дальние взаимодействия – это взаимодействия атомов, удалённых друг от друга в последовательности полипептидной цепи, которые, однако, могут находиться рядом в пространстве вследствие свёртывания цепи. Поэтому их называют объёмными взаимодействиями. Ближние взаимодействия (взаимодействия близко

расположенных в цепи атомов) дают множество низкоэнергетических конформаций, а дальние взаимодействия вместе с гидрофобными, определяют выбор из этого множества тех конформаций, которые входят в конкретную жёсткую структуру. Промежуточное состояние молтен-глобулы энергетически менее выгодно, а энтропийно более выгодно, чем нативное состояние [19]. Это связано со значительным ослаблением объёмных взаимодействий и уменьшением упорядоченности внутри молекулы. В состоянии молтен-глобулы лёгкое “набухание” молекулы очень ослабляет короткодействующие Ван-дер-Ваальсовы силы по сравнению с гидрофобными. В то же время сильно увеличивается микроконформационное движение, вследствие чего нарушается плотная упаковка боковых аминокислотных групп. Все эти размышления навели Птицына на классическое определение, согласно которому: “ молтен-глобула есть флуктуирующая компактная глобула с третичной структурой” [17]. И всё же, исходя из существующего опыта, вопрос сохранения определённой третичной структуры решается индивидуально для каждого белка.

Самое характерное свойство состояния молтен-глобулы – это его компактность, которая подтверждается измерением характеристической вязкости, коэффициента диффузии, а также непосредственным измерением радиуса инерции при помощи нейтронного рассеяния [17,20]. Для всех изученных белков стабильное промежуточное состояние которых было обнаружено, таких как лактальбумин, апомиоглобин, лизоцим, рибонуклеаза, карбоангидраза, фаголизоцим, цитохром С, ингибитор трипсина, нуклеаза стафилококка и для многих других, было подтверждено, что своей компактностью и неизменностью вторичной структуры их промежуточное состояние похоже на нативное, однако если принять во внимание данные кругового дихроизма, их третичные структуры не имеют жёсткости [15,19-21].

Как уже было сказано выше, в стабилизации состояния молтен-глобулы большую роль осуществляют гидрофобные взаимодействия. В то же время на сегодняшний день считается, что состояние молтен-глобулы определяется несколько иными механизмами, по сравнению с нативным.

Метастабильные состояния

Учитывая то, насколько большое значение имеет кинетический фактор в свёртывании белка, существует вероятность того, что исследуемое свёрнутое состояние не является состоянием с минимальной свободной энергией. Вполне возможно, чтобы это было кинетически достижимое состояние с более низкой энергией, нативное состояние же представляет собой метастабильную конформацию. Такая возможность была продемонстрирована для ингибитор-плазминоген активации [10]. Этот белок сначала сворачивается в активную (с биологической точки зрения), но сравнительно нестабильную форму. Впоследствии активная форма при 37°C медленно принимает значительно более стабильную, но неактивную (латентную) форму. Восстановление метастабильной активной формы из латентной возможно путём разворачивания и последующего повторного сворачивания белка.

Другим примером может служить сворачивание α -литической протеазы. Бейкер с сотрудниками [11] доказали, что процесс сворачивания белка кинетически контролируется. Как выяснилось, в нативных условиях α -литическая протеаза может иметь два конформационных состояния: активное и неактивное. В процессе синтеза эта протеаза сворачивается в виде прекурсора, который содержит 166 аминокислотных пролиновых участка. Активная протеаза получается из прекурсора путём отщепления этих пролиновых участков. Вместе с этим было показано, что при

сворачивании протеаза сворачивается не в активную форму, а принимает достаточно стабильную неактивную форму [12]. Для конверсии из неактивной формы в активную необходимо существование пролинового участка, который, по-видимому, катализирует переход через высокий кинетический барьер, разделяющий активную и неактивную формы. Если для этих двух форм не существует пролинового участка, то никакой интерконверсии не наблюдается. Достаточно трудно провести сравнительную оценку этих двух стабильных состояний, так как трудно определить термодинамическое равновесие между двумя формами в отсутствие пролинового участка. Хотя неактивная форма похожа на метастабильное состояние, всё же это состояние характеризуется самой маленькой свободной энергией, в то время как активная форма представляет собой по существу состояние в кинетической “ловушке”.

Глава 1.3 Кинетика Михаэлиса-Ментен

Одна из важных особенностей ферментативного катализа, зависимость скорости реакции от концентрации субстрата, была обнаружена уже на ранних этапах развития энзимологии – науки о ферментах. Эта зависимость представлена на рис.1.

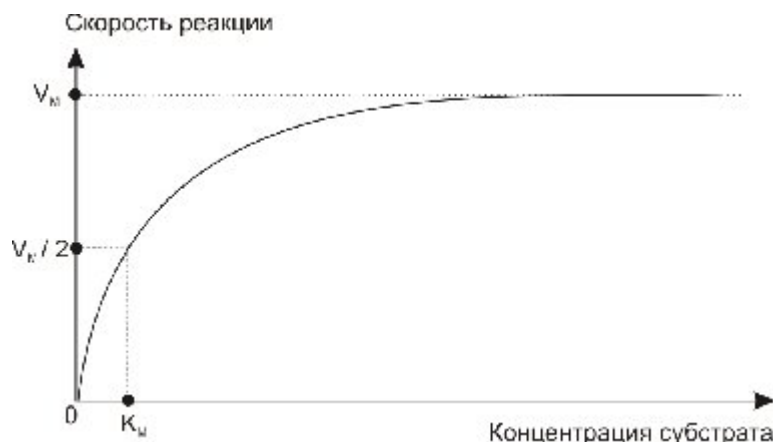
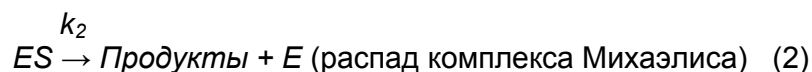
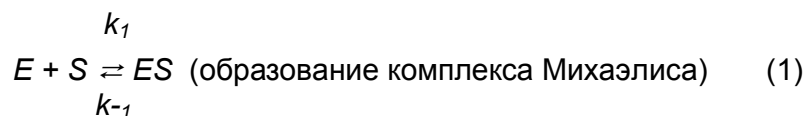


Рис.1 Зависимость скорости реакции от концентрации субстрата

При низких концентрациях субстрата реакция идёт в соответствии с уравнением первого порядка, т.е. скорость реакции пропорциональна первой степени от концентрации субстрата. А при высоких концентрациях субстрата уже в соответствии с уравнением нулевого порядка, т.е. независимо от концентрации субстрата.

Примерно в тот же период развития энзимологии была предложена идея, заключающаяся в том, что на ранних этапах реакций, катализируемых ферментами, образуется комплекс фермента с субстратом. После этого идёт распад комплекса с образованием свободного фермента и продуктов реакции. Причём последняя стадия – лимитирующая, т.к. идёт с гораздо меньшей скоростью, чем первая. В соответствии с механизмом, впервые предложенным Бриггсом и Холдейном в 1925г., уравнения реакции выглядят так:



Рассмотрим математическое описание ферментативного катализа. Скорость этого процесса, как указано выше, определяется скоростью распада комплекса Михаэлиса (комплекса фермента с субстратом) и равна

$$V = k_2[ES] \quad (3)$$

Из-за того, что количество всего фермента постоянно, в ходе реакции будет достигаться состояние, при котором концентрация комплекса Михаэлиса не меняется и, следовательно, можно написать:

$$d[ES]/dt = 0 = k_1[E][S] - (k_{-1}[ES] + k_2[ES]) \quad (4)$$

где первый член уравнения соответствует образованию комплекса Михаэлиса, а второй – его исчезновению. Отсюда:

$$[ES] = K_M[E][S] \quad (5)$$

где константа Михаэлиса равна

$$K_M = (k_{-1} + k_2) / k_1$$

Заменим концентрацию свободного фермента, которую мы не можем измерить экспериментально, на разность полной концентрации фермента $[E_{total}]$ и концентрации фермента, связанного с субстратом $[ES]$. Получим уравнение относительно $[ES]$:

$$[ES] = K_M[S]([E_{total}] - [ES]) \quad (6)$$

Решив это уравнение, получим выражение для концентрации связанного фермента – комплекса Михаэлиса:

$$[ES] = [E_{total}][S] / (K_M + [S]) \quad (7)$$

Умножив полученное выше уравнение на k_2 , и приняв во внимание (3), получим:

$$V = k_2[E_{total}][S] / (K_M + [S]) \quad (8)$$

Теперь представим, что концентрация субстрата очень высокая, тогда весь фермент связывается с субстратом. Скорость реакции становится максимальной и уже не зависит от концентрации субстрата, т.е. реакция становится реакцией нулевого порядка, уравнение которого выглядит следующим образом:

$$V_M = k_2[E_{total}] \quad (9)$$

Подставив это значение V_M , запишем уравнение скорости в окончательном виде:

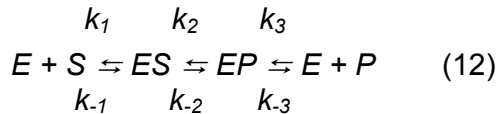
$$V = V_M [S] / (K_M + [S]) \quad (10)$$

где

$$K_M = k_{-1} + k_2 / k_1 \quad (11)$$

Это уравнение называется уравнением Михаэлиса-Ментен. При выводе этого уравнения мы ввели две постоянные величины – константу Михаэлиса K_M и максимальную скорость реакции V_M .

Существуют и более сложные модели, которые более реально описывают ферментативные реакции. Например:



Если для этой модели вывести уравнение скорости, то получим уравнение, аналогичное уравнению (10). K_M в этом случае будет иметь другое значение.

Физический смысл константы Михаэлиса состоит в том, что она численно равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной. Фактически константа Михаэлиса K_M является мерой количества фермента, связанного с субстратом в той или иной форме. И K_M , и $[S]$ выражаются в моль/литр.

На практике непосредственно использовать уравнение скорости (10) неудобно. Поэтому экспериментаторы обычно используют альтернативные формы уравнения скорости, например форму уравнения Лайнуивера-Берка.

Если (10) записать в обратных величинах

$$1/V = (K_M + [S]) / V_M [S] \quad (13)$$

а затем правую часть этого уравнения разбить на две части, то получится форма уравнения Лайнуивера-Берка:

$$1/V = K_M / ([S]V_M) + 1 / V_M \quad (14)$$

(14) в отличие от уравнения гиперболы (10) представляет собой уравнение прямой для обратных величин: $1/V$ от $1/[S]$.

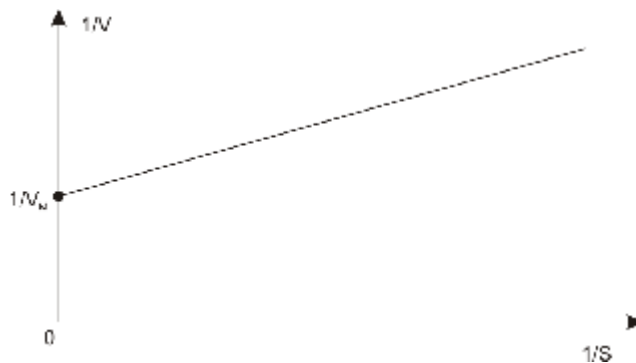


Рис.2 График Лайнуивера-Берка

Как видно из (14) и рис.2, точка пересечения этой прямой с осью ординат определяет величину $1/V_M$, а экстраполяция этой прямой до пересечения с осью абсцисс даёт значение величины $-1/K_M$. Очевидно, что тангенс угла наклона прямой равен K_M/V_M . Как видно, использование уравнения Лайнуивера-Берка упрощает работу. Следует отметить, что для некоторых ферментативных систем график в координатах Лайнуивера-Берка представляет собой не прямую линию.

Также часто используется график Эди-Хофсти:

$$V = -K_M V / [S] + V_M \quad (\text{уравнение прямой}) \quad (15)$$

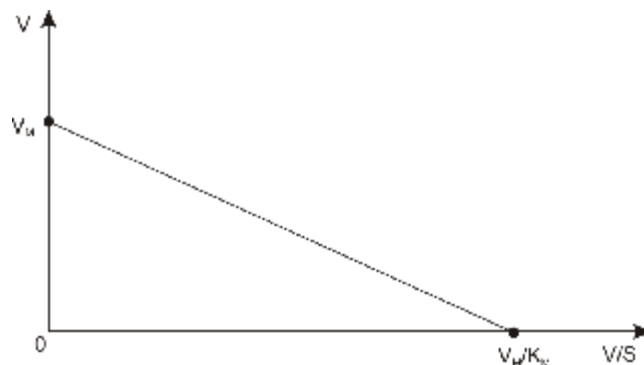


Рис.3 График Эди-Хофсти

Уравнение прямой для этого графика легко получается из (10) при помощи простейших математических преобразований. Эта прямая отсекает на оси ординат отрезок, равный V_M . Тангенс угла наклона этой прямой равен $-K_M$, а отрезок отсекаемый ею на оси абсцисс, V_M/K_M .

Недостаток графика Лайнуивера-Берка состоит в том, что при низких концентрациях субстрата экспериментальные точки попадают на небольшой отрезок, в результате чего точкам, соответствующим низким концентрациям, придается слишком большой вес. Достоинство же этого графика состоит в том, что он позволяет просто оценить значение V при данной концентрации субстрата $[S]$.

График Эди-Хофсти (рис.3) лишен указанного выше недостатка, однако определить с его помощью значение скорости труднее. Считается, что этот график даёт более точные результаты, поэтому экспериментаторы, определяющие значения K_M и V_M предпочитают пользоваться именно им [69].

Глава 1.4 Теория Аррениуса

Скорость химической реакции зависит от температуры. При повышении температуры скорость реакции, в том числе и катализируемой, возрастает. Тут следует заметить, что эта закономерность действует до тех пор, пока с реагентами не начнут происходить изменения, вызванные повышением температуры. Например, фермент при превышении определённой температуры переходит в денатурированное состояние, при котором, естественно, не может идти речь о нормальном функционировании этого белка и, следовательно, о скорости катализируемой им реакции (речь идёт о ферментах).

Вант-Гофф установил математическую зависимость констант равновесия от температур, при которых протекают реакции. Уравнение, выражающее эту зависимость, носит его имя:

$$\ln \frac{K_2}{K_1} = \frac{\Delta H^\circ (T_2 - T_1)}{RT_2 T_1} \quad (16)$$

Дифференциальное уравнение, из которого получено (16) выглядит так:

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T^2} \quad (17)$$

Руководствуясь тем, что константа равновесия реакции представляет собой отношение констант скорости прямой и обратной реакций, Аррениус предположил, что аналогичная математическая зависимость описывает влияние температуры на константу скорости реакции:

$$\frac{d(\ln K)}{dT} = a \cdot \frac{1}{T^2} \quad (18)$$

В настоящее время полагают, что коэффициент пропорциональности в (18) аналогичен члену $\Delta H/R$, в котором ΔH заменён на E_a – энергию активации. Проинтегрировав уравнение (18), получаем:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \ln A \quad (19)$$

или в экспоненциальной форме

$$k = A e^{-E_a/RT} \quad (20)$$

(19) и (20) представляют собой различные формы уравнения Аррениуса. Уравнение вида (19) очень удобно для построения графиков.

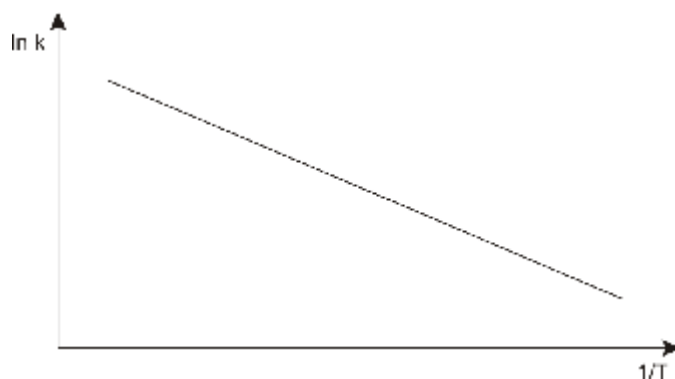


Рис.4 Зависимость $\ln k$ от $1/T$

Из наклона прямой на приведённом выше рис.4 легко определить энергию активации, т.к. известно, что наклон равен $-E_a/R$.

Энергия активации в отличие от ΔH всегда имеет положительный знак и равна молярному увеличению энергии, которое необходимо сообщить реагирующим молекулам для образования продуктов. Диаграмма на рис.5 построена для экзотермической реакции, т.е. продукты реакции расположены на более низком энергетическом уровне, нежели реагенты. В случае эндотермических реакций продукты реакции расположены на более высоком энергетическом уровне, чем реагенты.

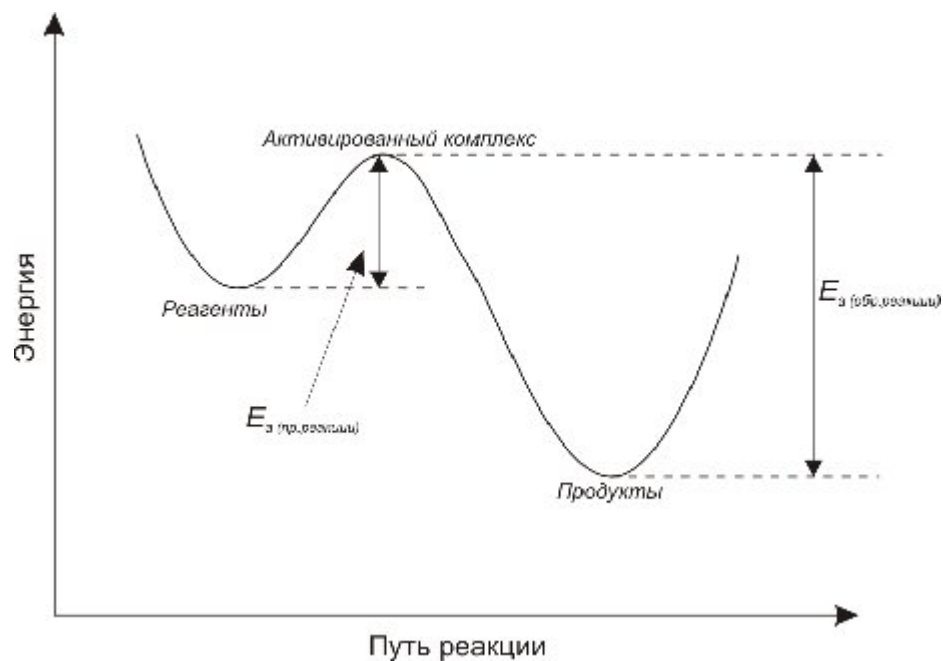


Рис. 5 Кривая реакции

Для процессов, протекающих при постоянном объёме, эта разница в энергиях равна ΔE , а для процессов, протекающих при постоянном давлении равна ΔH , называемой энтальпией реакции.

$$E_a(\text{пр.р.}) - E_a(\text{обр.р.}) = \Delta H_p$$

Нужно отметить, что предэкспоненциальный член в (20) на самом деле не постоянная величина, он в некоторой степени зависит от температуры, хотя на экспериментальных кривых непосредственно она не проявляется. Более того, энергия активации E_a тоже зависит от температуры.

Катализируемые реакции отличаются от простых химических реакций тем, что при адсорбции реагентов и продуктов на катализаторе их энергетический уровень меняется. Энергетический барьер реакции при этом понижается, что очень важно для катализа, т.к. даёт ферментам возможность функционировать при умеренно низких температурах в нейтральных разбавленных растворах.

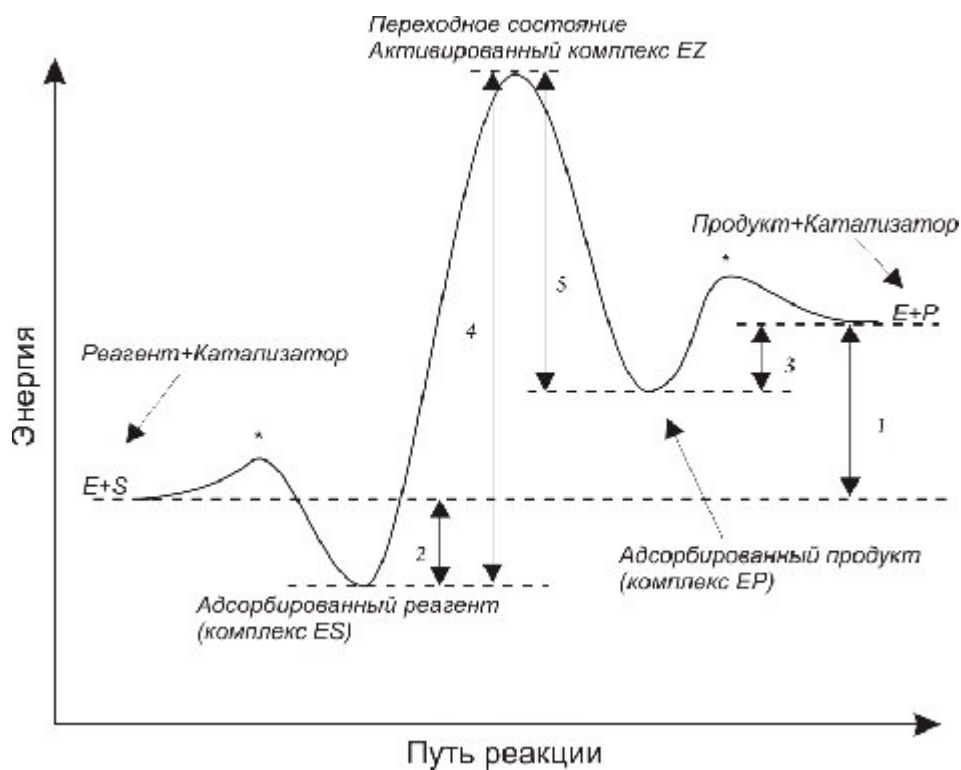
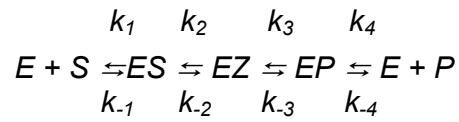


Рис.6 Кривая потенциальной энергии для эндотермической реакции, катализируемой ферментом. Обозначения: E - фермент, S - субстрат, P - продукт, EZ - переходное состояние активированного комплекса, * - небольшие энергетические барьеры между состояниями E+S и ES и между состояниями E+P и EP. 1 – ΔH реакции, рассчитывается из k_{eq} при T_1 и T_2 ; 2 - ΔH образования комплекса ES, рассчитывается из $1/K_M$ для реакции в прямом направлении при T_1 и T_2 ; 3 - ΔH образования комплекса EP, рассчитывается из $1/K_M$ для обратной реакции при T_1 и T_2 ; 4 и 5 - энергии активации соответственно прямой и обратной реакции, рассчитываются из констант скорости k при T_1 и T_2 по уравнению Аррениуса.

На рис.6 показана кривая потенциальной энергии для системы

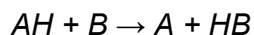


Энтальпию реакции можно рассчитать из уравнения Вант – Гоффа (16). Если принять, что константа Михаэлиса K_M равна k_{-1}/k_1 , т.е. является константой диссоциации комплекса ES , то можно рассчитать разницу между энергиями состояний ES и $E+S$. Подставив $1/K_M=k_{eq}$ в (16) при температурах T_1 и T_2 , можно найти значение ΔH_{ES} . Аналогично можно проделать расчёты для состояний EP и $E+P$.

Глава 1.5 Теория элементарного акта

Современные представления об элементарном акте переноса заряда в конденсированных средах развивались на основе идей, лежащих в основе квантовой теории кинетики окислительно-восстановительных реакций. Одна из главных особенностей этой теории заключается в учёте динамического влияния растворителя на кинетику процесса переноса. Представление о динамической роли растворителя в кинетике реакций восходит к работе Либби, в которой впервые было указано на то, что тепловые флуктуации в растворителе являются важнейшим фактором, обеспечивающим возможность протекания электронного переноса. Реальное воплощение идеи о динамическом влиянии растворителя получили далее в теории электронного переноса Маркуса и в работах Хаша. Однако эти подходы носили чисто классический характер. Квантовомеханический расчёт вероятности элементарного акта реакций электронного переноса в полярной среде, основанный на представлении о тепловых флуктуациях растворителя, был проведён Догонадзе и Левичем [34], а также Хашем [35]. Для вычисления вероятности в этих работах использован математический аппарат, разработанный в теории безызлучательных переходов.

Рассмотрим процесс переноса заряда, например протона, из одного положения в другое:



Протекание этой реакции будем рассматривать, как переход с начальной U_i на конечную U_f поверхность потенциальной энергии (см. рис 7). Эти поверхности U_i и U_f являются функциями многих координат реакции, например расстояния переноса. Для упрощения изложения, на рисунке показано всего лишь сечения поверхности U_i и U_f вдоль одной из координат реакции.

Переход между этими кривыми потенциальной энергии происходит в соответствии с принципом Франка-Кондона. Физическая суть этого принципа состоит в следующем. Если переход между термами U_i и U_f сопровождается изменением электронной энергии, то, согласно закону сохранения, оно должно быть скомпенсировано соответствующим изменением кинетической энергии тяжёлых частиц (протона, частиц A , B или молекул растворителя). Однако подобный процесс маловероятен, поскольку время, необходимое для изменения кинетической энергии последних (для протона $\sim 10^{-14}$ секунды, для A , B и диполей среды $\sim 10^{-12} - 10^{-13}$ секунды) значительно превышает время, за которое может происходить изменение электронного состояния ($\sim 10^{-15} - 10^{-16}$ секунды). Поэтому в соответствии с этим принципом перераспределение электронной плотности на реакционных центрах взаимодействующих частиц, т.е. уменьшение электронной плотности между A и H и увеличение электронной плотности между B и H , возможно только, если разность ΔU близка к нулю. Например, переход на терм U_f при равновесной конфигурации протона $r = r_{oi}$, как следует из принципа Франка-Кондона, маловероятен, так как связан с большим изменением энергии $U_f(r_{oi}) - U_i(r_{oi})$. Наиболее вероятен переход при $r \sim r^*$, когда энергии начального и конечного термов одинаковы или почти одинаковы $U_i(r^*) \approx U_f(r^*)$, т.е. в точке пересечения термов.

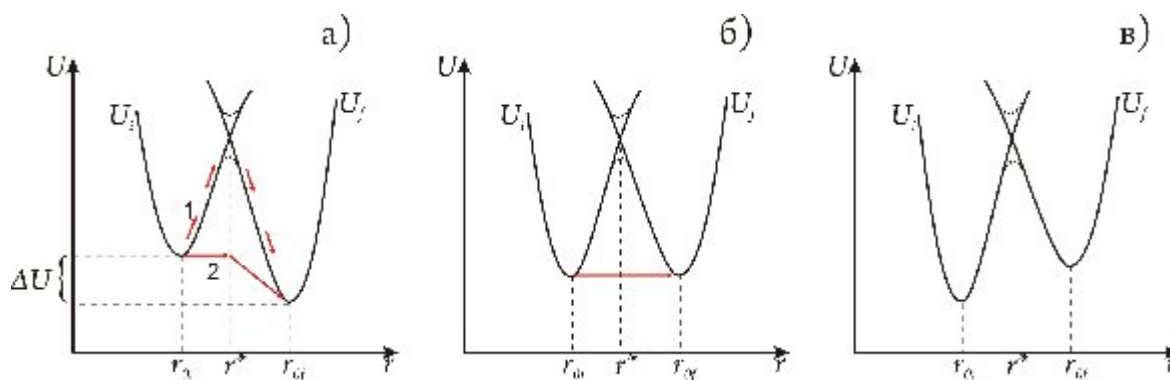


Рисунок 7. Энергетические кривые молекул АН и ВН. а) При начальном равновесном значении сольватации q_{0i} ; б) при промежуточном неравновесном значении сольватации q^* ; в) при конечном равновесном состоянии сольватации q_{0f} .

В конфигурацию, соответствующую пересечению термов, система может попасть разными способами:

1. За счёт растяжения связи А-Н до значения r^* (иными словами, за счёт классического движения по кривой U_i , по пути 1 на рис 7а);
2. В результате туннелирования протона под барьером (по пути 2 на рис.7а) на расстояние, при котором длина связи А-Н равна r^* .

Если энергетически выгодным является классическое растяжение связи (путь 1), то вероятность достижения точки пересечения термов определяется законом Аррениуса. В точке пересечения происходит перераспределение электронной плотности, и система релаксирует в конечное состояние.

Рассмотрим теперь, как протекает переход, если протону выгоднее туннелировать. После того как в результате туннелирования протона длина связи А-Н стала равной r^* , система достигла точки пересечения термов, в которой энергии электронных термов U_i и U_f одинаковы. В этой точке происходит разрыв связи А-Н и образование связи В-Н. После перестройки электронного состояния молекул протон должен выйти из туннельной области и попасть в конечную потенциальную яму. Однако, как видно из рис.7а, его энергия при этом должна измениться на величину ΔU . Разность энергий протон должен отдать другим частицам, например частицам А, В или молекулам среды. Поскольку характерная частота колебаний протона $\sim 10^{14} \text{ с}^{-1}$, а характерная частота колебаний диполей среды $\sim 10^{12}-10^{13} \text{ с}^{-1}$ [36], кинетическая энергия последних не может измениться на соответствующую величину за время перехода протона (т.е. протон не успеет отдать излишек энергии), и поэтому такой переход, согласно принципу Франка-Кондона, маловероятен. Следовательно, чтобы произошло туннелирование, соответствующие колебательные уровни протона в начальном и конечном состояниях должны быть выровнены. Это может быть достигнуто за счёт тепловой флуктуации ориентации диполей растворителя (см. рис. 7б). При таком состоянии сольватации реагентов протон с некоторой вероятностью совершает туннельный переход от А к В. После того как протон оказался в молекуле ВН, ориентация диполей среды релаксирует к конечному состоянию (рис.7в), символически обозначаемому как q_{0f} . Таким образом, в рассмотренной картине перехода растворитель играет существенно динамическую роль, так как именно за счёт тепловой флуктуации диполей среды обеспечивается возможность протекания реакции.

В последнее время удалось достичь значительных успехов в понимании процесса переноса электрона. Благодаря электрохимическим методам [36-42] стало

возможным раскрыть важные свойства процесса переноса электрона в окислительно-восстановительных процессах с участием биомолекул. Были проверены основные особенности теорий переноса заряда, например зависимость скорости переноса электрона в неадиабатическом случае (туннелирование) от расстояния переноса:

$$k_{ET(NA)} \propto \exp[-\beta(R_e - R_o)] \quad (21)$$

где R_e это расстояние, на которое переносится электрон, R_o это расстояние между редокс-активной молекулой и электродом и β это коэффициент затухания, обычно порядка 1 \AA^{-1} . Нужно отметить, что механизмы, контролирующие перенос электрона всё ещё остаются спорными. В частности, толкование зависимости константы скорости от вязкости может быть различным:

$$k_{ET(DC)} \propto \eta^{-\delta} \quad (22)$$

где δ эмпирический параметр связывания растворитель-белок со значением от 0 до 1. Корреляция между константой скорости и макроскопической (либо микроскопической) вязкостью это знак явного адиабатического механизма переноса электрона, при условии что перенос электрона не осложнён процессами перехода через другие барьеры, такие как перенос массы, конформационное перераспределение или связанным с переносом электрона переносом протона [43-45].

Зависимость от вязкости (уравнение 22) также может быть объяснена механизмом “конформационного гейтинга (gating)” [46-48], который возникает при переходе через дополнительный барьер (например, макромолекулярное внутри-либо межмолекулярное перераспределение), который по сути не связан с переносом электрона, но может быть скоростью лимитирующим.

Константа скорости для небиологических и биологических процессов переноса электрона в пределах обычно используемых температур имеет зависимость [49]:

$$k_{ET} = A \exp(-\Delta G_{a(EXP)}/RT) \quad (23)$$

где $\Delta G_{a(EXP)}$ эффективная (экспериментальная) свободная энергия активации, а A предэкспоненциальный фактор, зависящий от механизма переноса электрона. Сравнительно недавно Мишрой и Валдеком [50] была предложена объединённая модель для описания процесса переноса электрона. Константа скорости переноса электрона в рамках упрощённого подхода, который является интерполяцией между неадиабатическим (слабые связи) и динамически контролируемым адиабатическим пределом, записывается следующим образом [51, 52]:

$$k_{ET}^o = \frac{(H_{if})^2}{\hbar} \frac{\rho_m}{1+g} \left(\frac{\pi^3 RT}{\lambda} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{\Delta G_a^*}{RT}\right) \quad (24)$$

где H_{if} является матричным элементом электронного взаимодействия (см. рис. 8), λ свободная энергия общей реорганизации (см. объяснение ниже), и ρ_m плотность электронных состояний в металле (электроде). Свободная энергия активации выглядит так:

$$\Delta G_a^* = \frac{(\lambda - \Delta G_o)^2}{4\lambda} - H_{if} \quad (25)$$

где ΔG_a^* внутренняя свободная энергия активации, а ΔG_o свободная энергия реакции. Следует заметить, что мы различаем ΔG_a^* и $\Delta G_{a(EXP)}$ потому, что последнее понятие может включать в себя вклады, отличные от показанных в уравнении 25 (см. ниже).



Рисунок 8. Схематическая иллюстрация физических параметров, определяющих термически активированный перенос электрона при $\Delta G_o = 0$ между редокс-молекулой и электродом [3].

Кроме того, примечательно, что в этом обзоре рассматривается особый случай с $\Delta G_o = 0$, который также отмечен символом "о" для k_{ET}^o в уравнении 24 и далее. Параметр адиабатичности g представлен уравнением [41, 42, а также 51, 52, 54]:

$$g = \frac{\pi^3 RT (H_{if})^2 \rho_m}{\hbar v_{eff} \lambda}, \quad (26)$$

где эффективная частота релаксации v_{eff} (обратная величина от времени релаксации) связана с отдельным или несколькими процессами релаксации в соседстве с зоной реакции.

В неадиабатическом пределе, при $g \ll 1$, можно записать:

$$k_{ET(NA)}^o = \frac{(H_{if})^2}{\hbar} \rho_m \left(\frac{\pi^3 RT}{\lambda} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{\Delta G_a^*}{RT}\right) \quad (27)$$

где:

$$H_{if} = H_{if}^o \exp\left[-\frac{\beta}{2}(R_e - R_o)\right] \quad (28)$$

а H_{if} это величина электронного взаимодействия при переносе на расстояние R_e , электронное взаимодействие при переносе на расстояние R_o . Этот результат прямо приводит к уравнению 21.

В адиабатическом пределе $g \gg 1$, приходим к уравнению:

$$k_{ET(DC)}^o = v_{eff} \left(\frac{\lambda}{\pi^3 RT} \right)^{1/2} \exp\left(\frac{-\Delta G_a^*}{RT}\right) \quad (29)$$

где v_{eff} часто связана с вязкостью растворителя, окружающей среды, и эта зависимость не всегда может быть простой. Для выведения зависимости от вязкости можно использовать простую Дебаевскую форму для v_{eff} , а именно:

$$v_{eff} = \left(\frac{\varepsilon_s}{\varepsilon_\infty} \right) \frac{RT}{3\eta V_m} \quad (30)$$

Здесь η вязкость растворителя, ε_s статическая диэлектрическая константа, ε_∞ высокочастотная диэлектрическая константа, и V_m молярный объём. В случае Дебаевских растворителей v_{eff} связана со временем продольных диэлектрических релаксаций, в то время как в случае медленно релаксирующих веществ с

несколькими временами (например, ионные растворы, биомолекулы и т.д.), она может быть связана с рядом медленных диффузионных или квази-диффузионных режимов, связанных с локальной или объёмной вязкостью.

Энергия реорганизации λ является основным физическим параметром современной теории переноса электрона. Она состоит из компоненты от внутренней области $\lambda_{(IS)}$ (реактант) и внешней $\lambda_{(OS)}$ (ближайшее и дальнее окружение реактанта):

$$\lambda = \lambda_{(IS)} + \lambda_{(OS)} \quad (31)$$

В гармоническом приближении компонент внутренней области $\lambda_{(IS)}$ может быть записан следующим образом:

$$\lambda_{(IS)} = \sum_j \frac{f_j^r f_j^p}{f_j^r + f_j^p} (\Delta q_j) \quad (32)$$

где f_j^r и f_j^p соответственно являются j -ми силовыми константами реактантов и продуктов, а Δq_j изменение равновесной величины j -ой нормальной координаты. Внешняя компонента $\lambda_{(OS)}$ связана с поляризацией среды, и в общем случае её можно записать как:

$$\lambda_{(OS)} \propto (\Delta e)^2 F[\varepsilon_{op(i)}, \varepsilon_{s(i)}] \int (D_R - D_P)^2 dV \quad (33)$$

где Δe заряд, перенесённый при элементарном акте, $\varepsilon_{op(i)}$ и $\varepsilon_{s(i)}$ i -ые компоненты оптической и статической диэлектрической константы среды (включая белок, сольватированную воду и т. д.), D_R и D_P векторы диэлектрического смещения состояний реактанта и продукта соответственно, а dV является дифференциалом объёма реактант/продукт. В простой модели, в которой молекулы реактанта редставлены сферическими полостями в диэлектрической среде [36, 55, 56], энергия реорганизации внешней среды даётся формулой:

$$\lambda_{(OS)} = \frac{(\Delta e)^2 N_A}{4\pi \varepsilon_o} \left(\frac{1}{\varepsilon_{op}} - \frac{1}{\varepsilon_s} \right) \left(\frac{1}{2a} - \frac{1}{4R_e} \right) \quad (34)$$

где N_A постоянная Авогадро, Δe количество перенесённого заряда, а a эффективный радиус сферы реактанта (например, $a = 4.3 \text{ \AA}$ для $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$). В ряде случаев возможно более строгое вычисление $\lambda_{(OS)}$ [57-60].

Из уравнения 24 следует, что когда работает неадиабатический механизм, зависимость предэкспоненты от температуры слабая ($\sim T^{1/2}$), и по сравнению с экспоненциальным членом может быть проигнорирована. Вследствие этого упрощения и в духе уравнения Аррениуса можно написать [61]:

$$\Delta H_{a(EXP)} = -R \left[\frac{\partial(\ln k_{ET})}{\partial(1/T)} \right]_P \quad (35)$$

где $\Delta H_{a(EXP)}$ экспериментально определённое (эффективное) значение энтальпии активации. В этих специальных условиях $\Delta H_{a(EXP)} = \Delta H_{a(NA)}$, где последний член напрямую связан с ΔG_a ($\Delta G_a = \Delta H_a - T\Delta S_a$) и λ в уравнении 33. И теоретические оценки, и экспериментальные исследования [62, 63] показывают, что $\lambda_{(OS)}$ (вместе с $\lambda_{(IS)}$) слабо зависят от температуры.

Кинетические исследования под большим давлением дают уникальную информацию об объёмах активации и дают возможность строить представления о фундаментальных механизмах. Феноменологическое выражение для объёма активации любого процесса перехода через микроскопический барьер, в том числе и для переноса электрона, может быть определено так [64]:

$$\Delta V_{a(EXP)} = -RT \left[\frac{\partial(\ln k_{ET})}{\partial P} \right]_T \quad (36)$$

После замены посредством уравнения 7 и исключения некоторых незначительных членов получаем:

$$\Delta V_{a(NA)} = \beta RT \left(\frac{\partial R_e}{\partial P} \right)_T + \frac{1}{4} \left(\frac{\partial \lambda}{\partial P} \right)_T \quad (37)$$

для неадиабатического случая, где применяются уравнения 25 и 28, уравнение 37 показывает, что экспериментально измеримый объём активации, уравнение 36, может быть порождён эффектами давления на расстояние переноса электрона (здесь монослой/белок) и изменением в энергии (принцип Франка-Кондона) реорганизации среды (монослой/белок/растворитель).

В адиабатическом предельном случае, уравнения 29 и 30, можем записать [52, 53, 65]:

$$\Delta V_{a(DC)} = RT \left(\frac{\partial \ln \eta}{\partial P} \right)_T + \frac{1}{4} \left(\frac{\partial \lambda}{\partial P} \right)_T \quad (38)$$

где исключены некоторые незначительные члены.

Часть 2. Характеристика изучаемых белков.

Глава 2.1 α -Химотрипсин

α -Химотрипсин – один из самых изученных белков. Это протеолитический фермент (расщепляющий пептидные связи) с массой 24500 дальтон и характеристиками типичных глобулярных белков. Он состоит из трёх полипептидных цепей, в сумме содержащих 241 аминокислотный остаток. А, В и С цепи соответственно содержат 13, 131 и 97 остатков [68] и связаны между собой дисульфидными мостиками.

Как известно, α -химотрипсин является одним из ферментов, участвующих в разложении белковой пищи на составные аминокислоты. Этот фермент выделяется поджелудочной железой в кишечник в виде химотрипсиногена, белковой молекулы, из которой уже в кишечнике путём отщепления некоторых частей получается фермент α -химотрипсин. В отличие от желудка, в кишечнике среда щелочная, которая и является оптимальной для работы α -химотрипсина. Оптимальное значение pH для α -химотрипсина равно 8. Немаловажно, что пищевые белки попадают в кишечник уже в денатурированном виде, после кислой желудочной среды, что сильно ускоряет процесс разложения белка химотрипсином.

α -химотрипсин относится к классу сериновых протеаз (протеиназ) – ферментов, расщепляющих пептидные связи белков при участии серинового остатка в каталитическом центре фермента. Благодаря высокой специфичности, присущей всем ферментам, α -химотрипсин, например, расщепляет связи, образованные с участием карбонильной группы тирозина, триптофана и фенилаланина. Структура α -химотрипсина очень похожа на структуру таких протеаз как трипсин и эластаза, которые также работают в пищеварительном тракте, но в несколько других условиях. Однако малые отличия существенно влияют на структуру и функциональную активность этих белков. Трипсин, в отличие от α -химотрипсина, работает в желудочной кислой среде. В то время как α -химотрипсин теряет активность в кислой среде из-за протонирования имидазольного кольца остатка гистидина (His57). Дело в том, что имидазольное кольцо гистидина имеет такое свойство, что при низких pH оно связывает два протона, а при значениях в области pH 7-8 гистидин связывает один протон, тем самым появляется возможность образования водородной связи с остатком серина (Ser195), а значит и возможность катализа (см. рис.9). Также отличия в структурах этих ферментов приводят к отличиям в специфичности по отношению к субстратам, благодаря малым изменениям каталитического центра – центра связывания и химического превращения субстрата. Считается, что эти ферменты имеют полость, помогающую правильно сориентировать субстрат в каталитическом центре. Малые отличия наблюдаются как раз в области этого “кармана”, что и позволяет связывать различные субстраты.

Наиболее значительный вклад в понимание строения молекулы α -химотрипсина (и других протеаз) дали рентгеноструктурные исследования Блоу и др., которые сыграли огромную роль в выяснении роли их конформации в катализе. В установлении же динамики активных центров особенно эффективен подход химической кинетики, pH-метрия и метод автоматического титрования в частности. Успехи кинетических исследований обусловлены открытием Бергмана и Фрутона, установившими, что α -химотрипсин и другие сериновые протеазы способны гидролизовать не только пептидные связи белков, но и низкомолекулярные субстраты: амиды, сложные эфиры и другие (в данной работе изучается кинетика

реакции гидролиза Ас-Тур-Оет-эфира (АТЭЕ) α -химотрипсином [66]. Схема катализа гидролиза пептидов α -химотрипсином показана на рис.9.

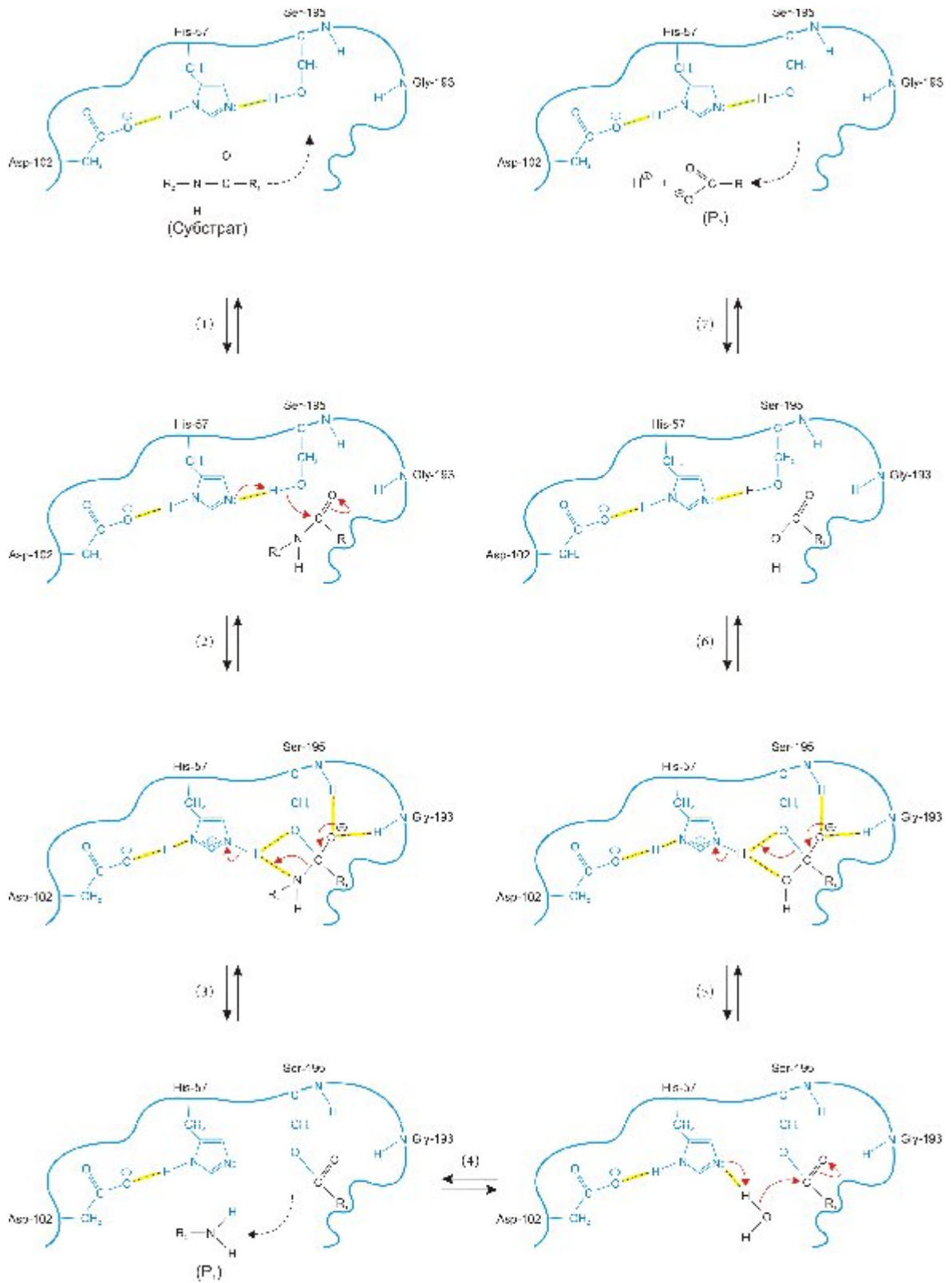
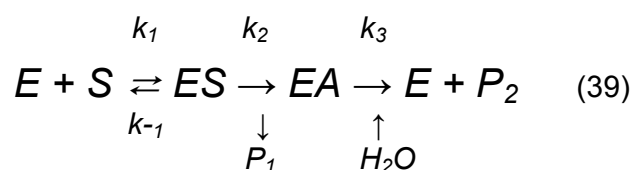


Рис.9 Схема действия α -химотрипсина [67]

Как видно из рис.9, свободный фермент должен находиться в состоянии, с депротонированным имидазольным кольцом His57, при этом образуется водородная связь с Ser195. При связывании субстрата с ферментом одна из боковых групп (R_1) субстрата попадает в гидрофобный карман. По результатам рентгеноструктурного анализа α -химотрипсина известно, что эта гидрофобная полость способна вместить боковую группу тирозина, триптофана или фенилаланина, причём только при определённой ориентации плоскости ароматического кольца этих аминокислот. Это сильно снижает энтропийный барьер реакции по сравнению с гомогенными реакциями общесосновного катализа. В настоящее время известно, что ферментная молекула за счёт сближения и ориентации реагирующих групп, т.е. энтропийных факторов, способна существенно повысить скорость катализа, примерно на 7-8 порядков. К тому же за счёт облегчения переноса протона (при сдвиге рК ОН Ser195 и вытеснении низкомолекулярного растворителя) снижается энергия активации реакции [66]. После сорбирования субстрата на активном центре происходит атака карбонильного углерода субстрата кислородом Ser195 с переносом протона на общесосновной катализатор – имидазол His57 и образованием тетраэдрического промежуточного продукта (стадии 1,2 рис.9). После протонирования имидазолом продукт (P_1) диффундирует в раствор (стадия 3 рис.9). И его место занимает молекула воды, после чего происходят аналогичные процессы, только вместо атакующего нуклеофила выступает кислород сорбированной молекулы (стадии 4,5 рис.9) и т.д. Надо отметить, что при физиологических значениях рН ~ 7-8 атакующий кислород Ser195 слабо ионизирован. Поэтому считается, что высокая активность Ser195 обусловлена его окружением в нативной молекуле фермента [66]. Как видно из рисунка, на последней стадии катализа образуется свободный протон, что на первый взгляд позволяет регистрировать скорость реакции методом автоматического титрования. Однако в случае гидролиза пептидов это невозможно. Дело в том, что полученный ранее амидный продукт P_1 легко связывает этот свободный протон. В случае же эфирных субстратов этого, естественно, не происходит, что и даёт возможность использовать метод автоматического титрования для исследования.

При анализе механизма действия α -химотрипсина Дженкс, Бендер и др. использовали данные по кинетическому изотопному эффекту водорода для реакции гидролиза амидов и сложных эфиров в ходе ферментативных реакций и в ходе соответствующих гомогенных реакций. Было отмечено, что в обоих случаях кинетический изотопный эффект примерно одинаков. В случае кинетического изотопного эффекта тяжёлых ядер N и O (при разрыве C-N и C-O связей) были получены аналогичные данные. На основании этих фактов был сделан вывод, что катализ α -химотрипсином протекает по общесосновному принципу. Блоу и сотрудники в своих рентгеноструктурных исследованиях подтвердили эти представления [66].

Для количественного описания катализа используется следующая модель. В начале ферментативного процесса происходит нековалентная (физическая) сорбция субстрата ферментом, образование комплекса Михаэлиса. А дальше идёт собственно сама реакция с промежуточным образованием ацилфермента:



где k_1, k_{-1}, k_2, k_3 – константы соответствующих стадий катализа; E – фермент, S – субстрат, ES – комплекс Михаэлиса, EA – ацилфермент, P_1 и P_2 – соответственно продукты гидролиза субстрата.

Реакция, протекающая в стационарном режиме (количество фермента по сравнению с субстратом мало), подчиняется уравнению Михаэлиса-Ментен. Скорость реакции выражается в следующем виде:

$$V = \frac{k_{cat}[S]_0[E]_0}{[S]_0 + K_{M(каж)}} \quad (40)$$

$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad K_{M(каж)} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3}$$

где $V_M = k_{cat}[E]_0$

Здесь $K_{M(каж)}$ – так называемая кажущаяся константа Михаэлиса; k_{cat} – каталитическая константа; $[E]_0$ – общая концентрация фермента; V_M – максимальная скорость реакции, при $[S]_0 \rightarrow \infty$; $[S]_0$ – исходная концентрация субстрата.

Кинетика первой стадии процесса изучена довольно слабо, что связано с методическими трудностями при измерении почти диффузионных скоростей. Согласно приблизительным данным и оценкам $k_1 \sim 10^6$ - 10^8 сек⁻¹, $k_{-1} \sim 10^3$ - 10^5 сек⁻¹. Последующие стадии проходят с образованием промежуточного ковалентного соединения, представляющего собой фермент, ацилированный по активному серину (Ser195). Некоторые промежуточные ацилферменты были выделены в чистом виде. Их образование в процессе гидролиза были также подтверждены спектрофотометрическими, кинетическими и другими методами [66].

Промежуточный ацилфермент является нестабильным соединением (в случае специфических субстратов время жизни $\sim 0,01$ секунды), который гидролизует под действием воды. При этом образуется кислота и свободный фермент. В случае специфических эфирных субстратов каталитические константы гидролиза – величины порядка 20 – 200 сек⁻¹. Последняя стадия (стадия деацилирования) является определяющей скоростью в случае гидролиза эфирных субстратов. В случае пептидных субстратов, первая стадия протекает значительно медленней из-за более сильной амидной связи по сравнению с эфирной.

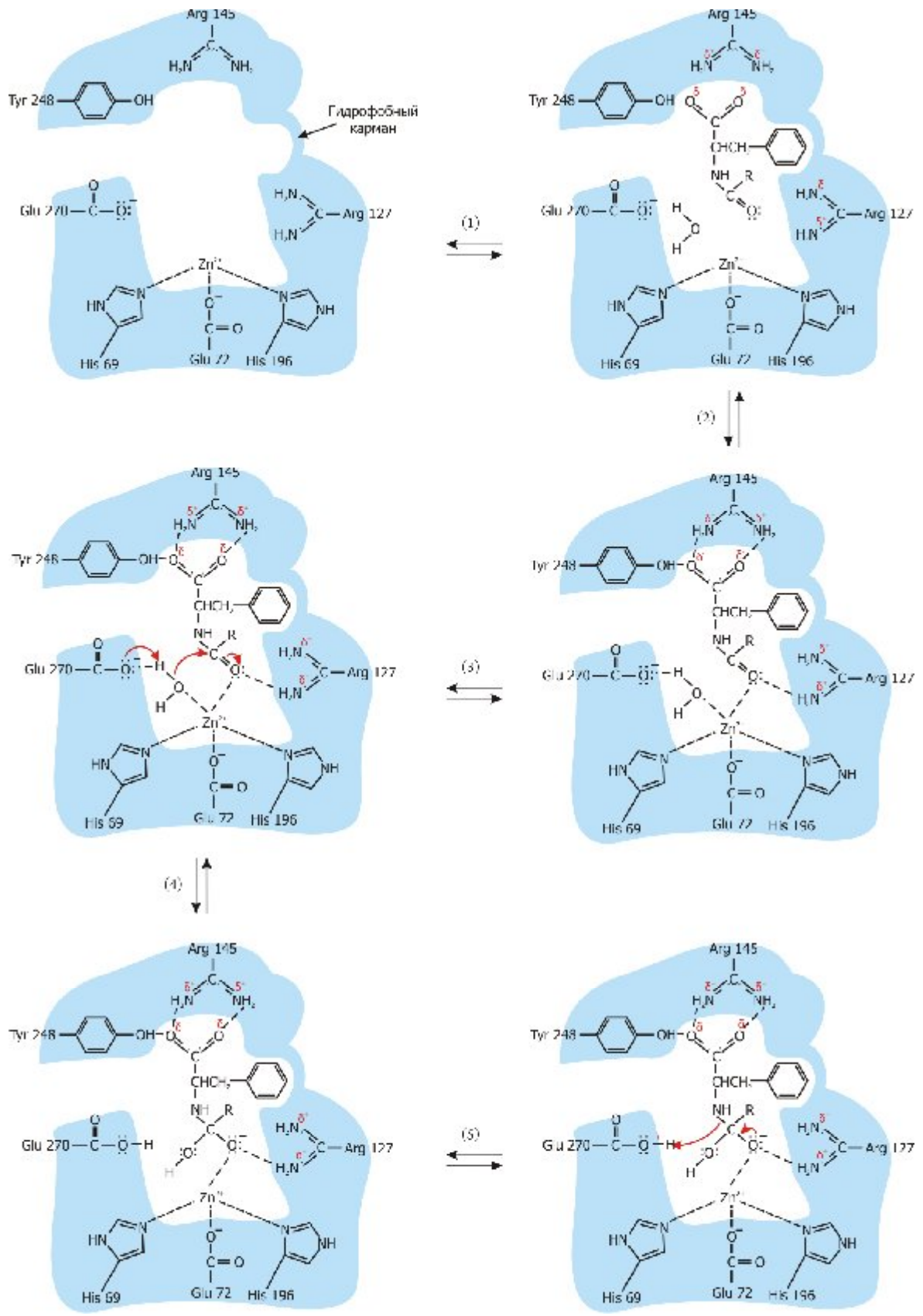
Следует отметить, что сериновые протеазы проявляют специфичность к среде, т.е. эти ферменты активны лишь в водной среде (каталитически активны и их влажные кристаллы). В неводной среде α -химотрипсин и другие сериновые протеазы частично или полностью теряют свою каталитическую активность. В случаях, когда α -химотрипсин конформационно стабилен в неводном растворителе, это происходит из-за прочно связанного с белковой глобулой водного окружения. Для проявления функциональных свойств α -химотрипсину также нужна вода, так как молекулы воды участвуют в катализе (см. рис.9).

Глава 2.2 Карбоксипептидаза А

Панкреатическая карбоксипептидаза А относится к протеолитическим ферментам, расщепляющим пептидные связи. Карбоксипептидаза А гидролизует полипептиды с С-конца цепи. Молекула этого фермента содержит атом цинка, имеет молекулярный вес 34472 дальтон, состоит из одной полипептидной цепи, образованной 307 аминокислотными остатками. Как и все ферменты карбоксипептидаза А проявляет специфичность, она специфична в отношении гидрофобных боковых цепей фенилаланина, тирозина и триптофана. То есть реакция гидролиза идёт намного быстрее, если на С-конце субстрата присутствует одна из этих трёх аминокислот. Карбоксипептидаза В специфична в отношении положительно заряженных боковых цепей лизина и аргинина. Между этими ферментами существует такая же связь, как и между химотрипсином и трипсином. Их аминокислотные последовательности идентичны на 49%. Что касается различий в третичной структуре, то они имеются лишь в участках молекул, расположенных на поверхности. Основное отличие состоит в том, что остаток Ile255, находящийся в кармане карбоксипептидазы А, в карбоксипептидазе В заменён на Asp255, необходимый для связывания положительно заряженных боковых цепей основных субстратов [80].

Ещё в 1967 году была установлена кристаллическая структура этого фермента [73, 81]. Активный центр (см. рис.10) представляет собой полость на поверхности фермента, имеющую гидрофобный карман для специфического связывания боковых групп субстрата на С-конце. Кроме молекулы субстрата в кармане могут помещаться несколько молекул воды, одна из которых также участвует в гидролизе. Лигандами иона цинка, играющего важную роль в катализе, являются основные боковые цепи остатков Glu72, His196 и His69. При удалении иона цинка фермент теряет активность. Этот процесс обратим, активность можно восстановить добавлением ионов цинка или некоторых других металлов. Приблизительно у 20% молекул фермента четвёртым лигандом атома цинка является атом кислорода фенольной группы Tyr248. Это возможно благодаря тому, что боковая цепь этого остатка обладает высокой конформационной подвижностью, что даже послужило источником разногласий в вопросе сходства структуры этого фермента в растворе и в кристалле [82, 83]. Немаловажным представляется зависимость активности фермента от степени подвижности активного центра [76, 77]. Также четвёртым лигандом иона цинка в свободном ферменте может быть молекула воды. Боковая цепь, содержащая фенольную группу, может поворачиваться вокруг своей C_α-C_β-связи, и примерно 80% электронной плотности этой группы локализовано на той части молекулы, которая направлена в раствор [82]. В карбоксипептидазе В этот остаток настолько подвижен, что его положение в кристаллической структуре определить не удаётся [80].

При связывании субстрата молекула карбоксипептидазы А претерпевает определённые структурные изменения, поэтому модель индуцированного соответствия как нельзя больше подходит для описания связывания субстрата ферментом. Достаточно лабильный и подвижный активный центр отчасти "подстраивается" под пространственную структуру субстрата на этапе связывания. Эти представления возникли благодаря данным, согласно которым боковые группы активного центра претерпевают значительные изменения в положении [70].



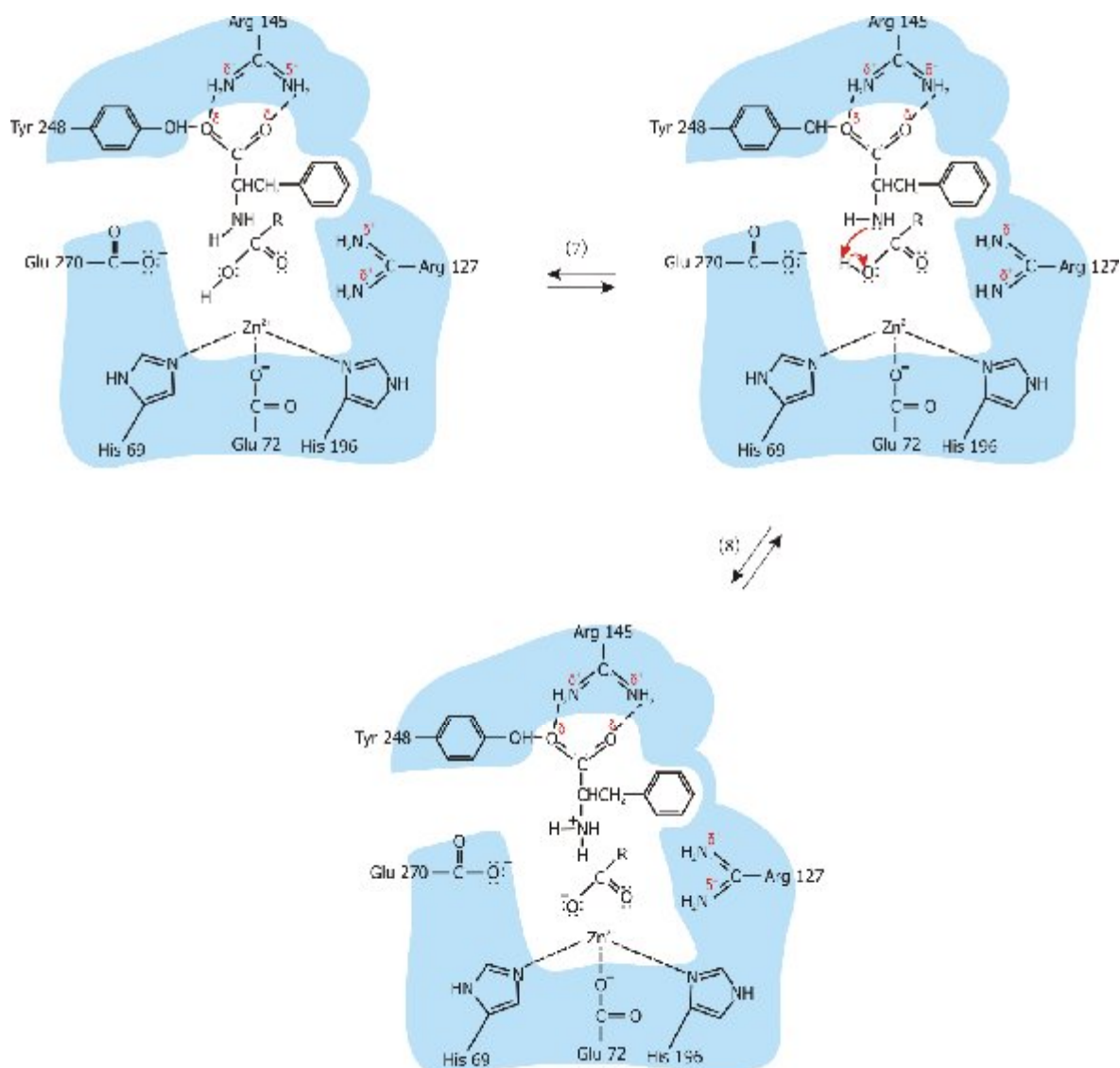


Рисунок 10. Схема гидролиза карбоксипептидазой А.

Сближение и ориентация молекул субстрата по отношению к каталитически активным группам белка происходит при электростатическом взаимодействии свободной карбоксильной группы субстрата с гуанидиновой группой Arg145 (рис.10). Связывание субстрата на ферменте влечет за собой нарушение системы водородных связей в белке и индуцирует поворот боковой группы Tyr248 с перемещением ее гидроксильной группы на 12 Å. Считается, что связывание субстрата приводит к созданию некоторого "напряжения" в субстрате. Так, в фермент-субстратном комплексе карбонильная группа субстратной молекулы оказывается вблизи иона цинка, входящего в активный центр. Это приводит к вытеснению из его сольватной оболочки нескольких молекул воды. В результате ион цинка поляризует карбонильную группу субстрата, при этом резко усиливается реакционная способность. Таким образом, в катализе карбоксипептидазой А не последнюю роль играют эффекты индуцированного соответствия и напряжения наряду с основным механизмом сближения и ориентации.

Исходя из данных о структуре комплекса фермента с глицил-L-тирозином, установленной разностным Фурье-методом с разрешением в 2 Å, была построена

модель продуктивного связывания субстратов карбоксипептидазой А [79, 81]. С некоторыми дополнениями она приведена на рис.10. Дипептиды гидролизуются очень медленно по сравнению с полипептидами и связываются в основном непродуктивно. Предполагается, что низкая скорость гидролиза обусловлена тем, что свободная аминогруппа субстрата-дипептида связывается с карбоксильной группой Glu270 через молекулу воды. Это не позволяет карбоксильной группе играть роль общего основания или нуклеофила в реакции гидролиза. При построении модели продуктивного связывания учитываются следующие особенности: боковая ароматическая цепь субстрата связывается в гидрофобном кармане; С-концевой карбоксилат-ион образует ионную связь с Arg145; карбоксильный кислород расщепляемой связи становится четвёртым лигандом иона цинка; фенольный кислород Tyr148 находится на расстоянии примерно 3 Å от расщепляемой связи; боковая цепь повернута на 120° относительно положения, занимаемого ею в свободном ферменте; в активном центре присутствует молекула воды, связанная с Glu270 и с ионом цинка.

Механизм действия карбоксипептидазы А изучен не столь хорошо, как например для α -химотрипсина, однако уже установлены важные черты реакции (см. рис.10). Роль всех каталитических групп однозначно не установлена. Ион цинка, по-видимому, играет роль электрофильного катализатора, поляризуя карбонильную группу и стабилизируя образующийся на атоме кислорода отрицательный заряд [84]. Характер рН-зависимости скорости реакции позволяет сделать вывод, что в каталитическом процессе участвует ионизированная карбоксильная группа Glu270. График зависимости активности фермента от рН представляет собой колоколообразную кривую с максимумом при рН 7.5; положение максимума определяется ионизацией основной формы группы с $pK_a=6$ и кислой формы группы с $pK_a=9.1$ в свободном ферменте [85, 86]. Более низкий pK_a соответствует Glu270, более высокий пока не отнесён ни к какой группе. По некоторым данным, гидроксильная группа Tyr248 выступает в этой реакции в роли общей кислоты [79]. Имеются прямые данные, свидетельствующие о том, что данный остаток, несомненно, необходим не только на стадии связывания субстрата, но и для проявления ферментом активности [76]. Модификация боковой цепи тирозина в результате ацилирования или диазотирования подавляет пептидазную активность, но усиливает эстеразную активность фермента [87]. Интересно, что при замещении цинка атомом ртути, кадмия или свинца эстеразная активность не меняется, а пептидазная подавляется [78, 88]

В процессе исследования механизма реакции с карбоксипептидазой А рассматривались два возможных пути реакции. А именно, важным представлялся вопрос о том, в какой роли выступает остаток Glu270 – является ли он нуклеофильным катализатором, образующим смешанный ангидрид с субстратом, или представляет собой общее основание, которое активирует атаку субстрата молекулой воды [79]. Так или иначе, споры о механизмах катализа карбоксипептидазой А продолжают до сих пор [71-76, 89, 90].

Глава 2.3 Азурин из *Pseudomonas aeruginosa*

Бактериальный белок азурин, выделенный из *Pseudomonas aeruginosa* представляет собой металлопротеин, содержащий ион меди. Это один из белков, участвующих в окислительно-восстановительных реакциях. Он содержит одну полипептидную цепь из 148 аминокислот. В настоящее время считается, что передавая электрон по цепи от цитохрома C₅₅₁ к цитохром-оксидазе, азурин осуществляет свою биологическую функцию. Хотя до конца роль азурин и механизмы его функционирования всё ещё остаются невыясненными, он используется как модельный в исследованиях процесса переноса электрона в окислительно-восстановительных реакциях [91-92].

Трёхмерная структура азурин из *Pseudomonas aeruginosa* была получена ещё в 1978 году. Позднее эти данные были уточнены [93]. Было показано, что центры, содержащие медь, у таких белков как некоторые пластоцианины и азурин из других бактерий, в значительной степени схожи с аналогичным центром для азурин из *Pseudomonas aeruginosa* [94].

Способность азурин участвовать в процессе переноса электрона, а также энергетическая эффективность этого процесса, объясняется конформацией содержащегося в составе белка иона меди. А именно, благодаря переходам между Cu(I) и Cu(II). Причём этот процесс не сопровождается какими-то значительными конформационными изменениями, и характеризуется высокой скоростью [95]. В нативной форме азурин ион меди главным образом связан с тремя аминокислотными остатками полипептидной цепи, His46, His117 и Cys112. Кроме того, в связывании металла играют роль остатки Gly45 и Met121 [96]. Роль Met121 вызвала повышенное внимание, так как считалось, что этот остаток играет роль в образовании подходящего потенциала для осуществления биологической функциональности азурин [94, 97].

По данным рентгеноструктурного анализа замена иона меди другими ионами металлов, например цинка, не вносит значительных изменений в общую структуру белка, хотя связывание металла с полипептидной цепью носит другой характер. Более заметно меняется структура ближайших к металлу областей. По сравнению со связыванием иона меди, связь цинка с Gly45 становится предпочтительней, и Met121 не участвует в связывании. В любом случае ион металла присоединяется к полипептидной цепи настолько надёжно, что даже после разворачивания белка и потери вторичной структуры, металл остаётся связанным со своими лигандами. Причём азурин, лишённый иона металла (холодазурин) легче принимает развёрнутую денатурированную форму [93,98].

Что касается передачи электрона, имеются противоречивые данные. Сильвестрини и сотрудники показали, что скорость передачи электрона определённо зависит от pH среды [99]. В то же самое время имеются сведения о независимости скорости этого процесса от pH среды в диапазоне значений от 5 до 9 [100].

Часть 3. Методы исследования

Глава 3.1 Метод автоматического титрования.

Метод автоматического титрования – широко применяемый в кинетических исследованиях метод. Он сравнительно прост и удобен. Этот метод применяется для исследования процессов, в ходе которых выделяются или поглощаются протоны. Основа этого метода – потенциометрическое измерение pH .

Впервые понятие pH определил датский учёный С.П.Соренсен в 1909 году, как отрицательный логарифм от молярной концентрации ионов водорода в растворе. Более общее понятие pH вводится как отрицательный логарифм активности иона водорода:

$$pH \equiv -\lg a_{H^+} = -\lg f_{H^+} m_{H^+}$$

где a_{H^+} - активность иона водорода, f_{H^+} - коэффициент активности иона водорода, m_{H^+} - моляльность ионов водорода. Для водных растворов коэффициент активности ионов водорода условно принимается равным единице при любых температурах [101].

Фактически pH является мерой кислотности растворов в соответствии с определением кислоты как некоторого вещества, которое является донором ионов водорода (соответственно основания – это акцепторы ионов водорода):



Если в ходе реакции выделяются (или поглощаются) протоны, то по количеству этих протонов можно судить о реакции (чем быстрее идёт реакция, тем быстрее изменяется количество протонов в растворе в единицу времени). Чтобы поддержать pH на определённом уровне, приходится титровать выделенные протоны (здесь и далее речь идёт о реакциях, в ходе которых выделяются протоны). Фиксируя количество затраченного титранта можно судить по нему о ходе исследуемой реакции. При этом поддерживается постоянным pH исследуемого раствора, что исключает нежелательное влияние изменения pH на реакцию. Всё это осуществляется системами автоматической титрации. Для этого pH -метр системы постоянно контролирует pH раствора. Если значение pH в ходе эксперимента изменилось, то автоматический титратор доводит его до заранее установленного рабочего значения, одновременно записывая кривую расходования титранта на графопостроителе или выдавая цифровой сигнал на какое-либо вычислительное устройство. По этой кривой и находят основные параметры реакции.

При потенциометрическом измерении pH растворов, измеряется потенциал цепи электродов, погружённых в исследуемый раствор. Полученный потенциал сравнивается с эталонным потенциалом, который получен заранее в буфере с известным pH . Эти значения потенциалов подставляются в следующую формулу:

$$pH(X) = pH(S) + (E(X) - E(S))/R'T$$

где $pH(X)$ и $pH(S)$ – это pH соответственно раствора и буфера, $E(X)$ и $E(S)$ – потенциалы раствора и буфера, $R'T$ – фактор Нернста ($R'=R*\ln 10/F$). Современные

pH-метры сразу показывают значение pH раствора, автоматически сравнивая потенциалы и вычисляя pH.

Наиболее часто используемая цепь электродов состоит из стеклянного электрода с встроенным электродом сравнения и каломельного электрода с солевым мостиком (соединением) из концентрированного раствора KCl. На рис.11 представлены оба электрода.

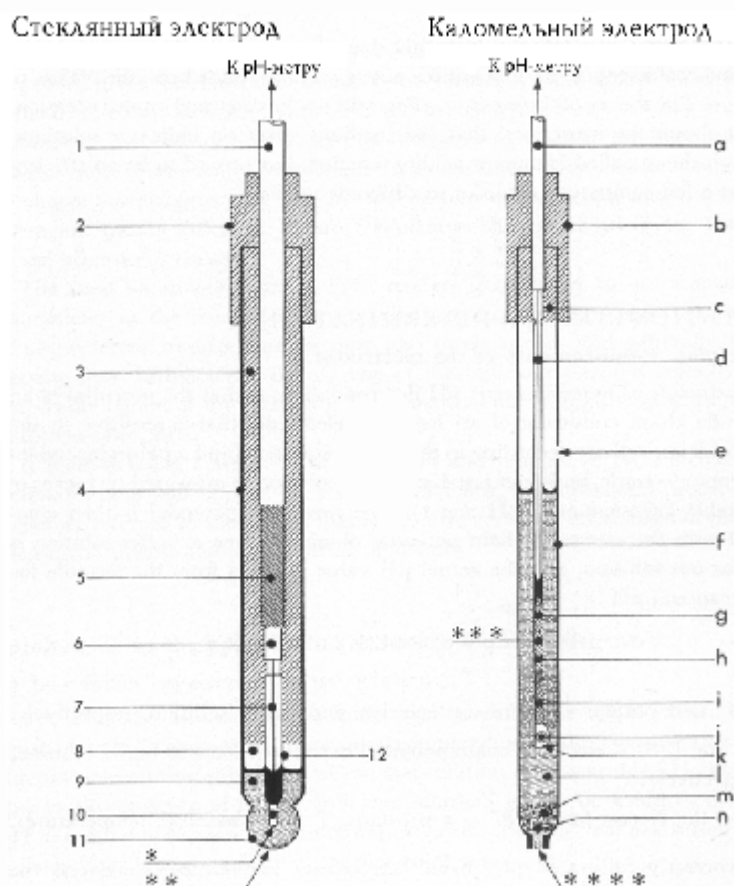


Рис.11 Электроды типичной электродной цепи для измерения pH

Обозначения: 1 – экранированный провод; 2 – крышка; 3 – изолирующий материал; 4 – изолирующий стеклянный стержень; 5 – экран; 6 – изоляция; 7 – платиновый провод; 8 – воздух; 9 – буферный раствор; содержащий хлорид-ионы (pH_1), "внутренний раствор"; 10 – серебряный провод, покрытый AgCl, "внутренний электрод сравнения"; 11 – стеклянная мембрана, чувствительная к pH в соответствии с равенством Нернста; 12 – стекло; a – провод; b – крышка; c – изолирующий материал; d – платиновый провод; e – отверстие для заполнения; f – солевой мостик; g – ртуть; h – каломельная паста, содержащая Hg, Hg₂Cl₂, KCl, H₂O; i – шерсть; j – контактное отверстие; k – асбест; l – концентрированный раствор KCl; m – кристаллы KCl; n – пористый керамический стержень; * - $E_{Ag,AgCl}$; ** - $E_{Membrane+Asymmetry}$; *** - E_{Hg,Hg_2Cl_2} ; **** - $E_{Liquid\ junction}$.

Как видно из этого рисунка, потенциал стеклянного электрода является суммой трёх разных потенциалов:

1. Потенциал внутреннего электрода сравнения, $E_{Ag,AgCl} = E_{0,Ag,AgCl} - R'T \lg a_{Cl^-}$, где $E_{0,Ag,AgCl}$ – стандартный потенциал серебряного электрода, $R'T$ – фактор Нернста, a_{Cl^-} – активность ионов хлора внутреннего раствора.
2. Мембранный потенциал, возникающий вследствие разности pH растворов по одну и по другую стороны мембраны, $E_{Membrane} = R'Ts (pH_2 - pH_1)/100$, где pH_2 –

значение pH исследуемого раствора, pH_1 – значение pH внутреннего раствора, а s – чувствительность в процентах от теоретической величины.

3. Потенциал асимметрии, $E_{Asymmetry}$. Его находят при погружении электрода в раствор с таким же pH , как и у внутреннего раствора. Потенциал асимметрии возникает вследствие разности свойств одной и другой сторон стеклянной мембраны электрода.

Потенциал каломельного электрода составляют два потенциала:

1. Потенциал каломельного полуэлемента, $E_{Hg,Hg_2Cl_2} = E_{0,Hg,Hg_2Cl_2} - R'T \lg a_{Cl^-}$, где E_{Hg,Hg_2Cl_2} – стандартный потенциал каломельного электрода, a_{Cl^-} – активность ионов хлора в концентрированном растворе хлорида калия.
2. Потенциал жидкостного соединения, $E_{Liquid\ junction}$, образующийся на конце электрода из-за разницы в составе растворов внутри электрода и снаружи.

Полный потенциал, снимаемый с электродов равен сумме всех вышеперечисленных потенциалов.

Формула для вычисления pH , приведённая выше, является приближённой, но для большинства случаев отклонение от неё пренебрежимо малы, при условии выполнения некоторых условий, приведённых ниже.

Перенос электрических зарядов должен осуществляться ионами, имеющими численно одинаковый заряд. А также, чтобы раствор, содержащий эти ионы, был концентрированный. Это нужно для установления постоянного потенциала. Концентрированный раствор хлорида калия вполне подходит на эту роль. Вся система должна находиться в равновесии, поэтому если используется мешалка, скорость помешивания должна быть постоянной.

При работе с такими приборами, как pH -метры, следует придерживаться следующих основных правил:

Практически всегда следует использовать мешалку во избежание неоднородности исследуемого раствора и адсорбции некоторых молекул на поверхности электродов, вызывающей появление ошибки измерения потенциалов. Чтобы избежать влияния газов, присутствующих в воздухе (кислорода или углекислого газа), можно использовать инертные газы. Сосуд, в котором производится измерение, должен иметь постоянную температуру, т.е. для получения точных результатов обязательно нужно использовать термостат. Прибор, особенно электродная часть, должен быть защищён от нежелательных электрических помех.

При работе с pH -метром могут выявиться такие нежелательные явления, как падение напряжения снимаемого с электродной цепи. Влияние этого фактора можно уменьшить путём увеличения входного сопротивления самого pH -метра. Обычно входное сопротивление порядка 10^{11} Ом. Рабочий ток при этом не превышает тока порядка 10^{-11} А, что помогает избежать некоторых других нежелательных факторов. Одним из основных требований к современным pH -метрам является стабильность так называемой нулевой точки, точки относительно которой проводятся все измерения pH .

Следуя вышесказанному можно заключить, что у каждого pH -метра должна быть возможность настройки буферного контроля, температуры, чувствительности и настройки изопотенциального значения pH . Настройка температуры даёт возможность скорректировать значение pH в соответствии с температурой, при которой работает прибор (температура, устанавливаемая термостатом). Она может осуществляться либо вручную, либо автоматически. Последняя возможность более удобна, однако имеется не на всех pH -метрах. Чтобы настроить электродную цепь для получения более точных результатов, нужна настройка чувствительности (для идеальных электродов $s = 100\%$). Настройка буферного контроля нужна для

калибровки получаемого прибором значения по буферному раствору с известным pH . Для этого измеряется pH буферного раствора с известным значением pH и при надобности корректируется. Эту процедуру желательно проводить как можно чаще. Если калибровка буфером была проведена при температуре, отличающейся от температуры непосредственно измерений, то необходимо воспользоваться настройкой изопотенциальной точки.

У современных pH -метров кроме этих настроек имеются и другие возможности, например цифровой выход для подключения к компьютерам или другим вычислительным устройствам, возможность расширения шкалы.

Как уже было сказано, автоматический титратор предназначен для титрования выделившихся в ходе реакции протонов. Перед опытом на титраторе устанавливается рабочее значение pH , отклонение от которого будет вызывать дотитровку. Отклонение может быть в сторону увеличения либо уменьшения значения pH . У титратора имеется соответствующая ручка управления для доводки pH в ту или иную сторону. Положение этой ручки управления устанавливается в соответствии с характером реакции. Соответственно ёмкость титратора заполняется либо щёлочью, либо кислотой. Варьируя концентрацию титранта, можно менять чувствительность прибора к изменению pH .

У титратора есть настройка, позволяющая менять дозу титранта, добавляемого в раствор в ходе титрования. Чем меньше доза, тем чувствительнее прибор, однако при этом он может не успевать реагировать на быстрые изменения pH , особенно в начале реакции, когда скорость реакции сравнительно высока, т.е. в каждом отдельном случае следует искать “золотую середину”. Аналогичные соображения следует иметь в виду и в отношении концентрации титранта, а также то, что более концентрированный титрант предпочтительнее из-за меньших погрешностей опыта. Дело в том, что добавляемый титрант разбавляет исследуемый раствор, т.е. меняется концентрация фермента, субстрата и других компонентов раствора.

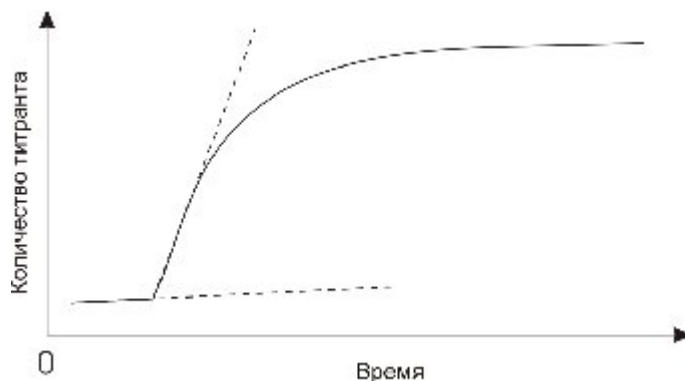


Рис.11 Типичная кривая титрации

В случае ферментов, подчиняющихся схеме кинетики Михаэлиса-Ментен, типичные кривые, получаемые с помощью описанных выше систем автоматической титрации, имеют вид, показанный на рис.11. Такие кривые получают для нескольких значений концентраций субстрата. Каждая кривая на рис.12, соответствующая определённой начальной концентрации субстрата, задаёт одну точку на графике Лайнуивера-Берка рис.13. Первая кривая соответствует минимальной концентрации субстрата, четвёртая – максимальной.

В начале этой кривой есть почти прямой участок с малым наклоном. Этот участок соответствует различным фоновым процессам в рабочем растворе в отсутствии фермента. После добавления фермента записывается участок, соответствующий собственно самой катализируемой реакции. После измерения максимального наклона этого участка кривой с учётом фоновых процессов строится график в координатах Лайнуивера-Берка (либо в других координатах) и находится значение кинетических параметров, максимальная скорость реакции, каталитические константы (см. рис.13). Найти кинетические параметры можно с помощью компьютера, введя в специальную программу данные кинетических кривых.

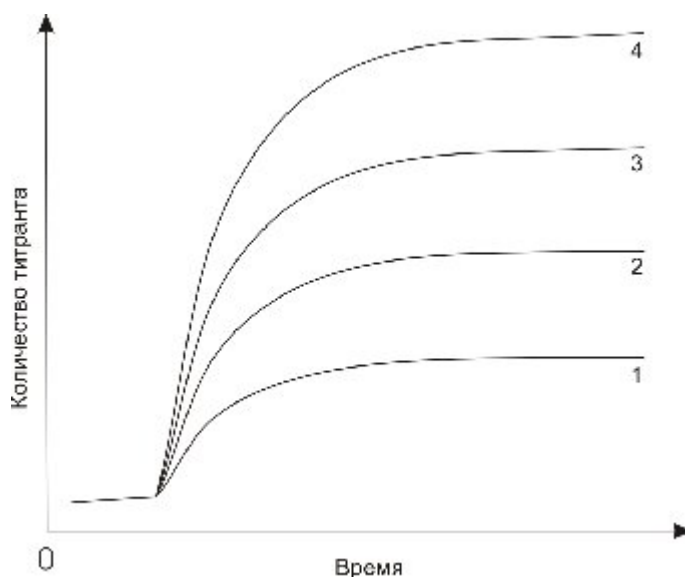


Рис.12 Типичные кривые титрации для разных концентраций субстрата (чем выше концентрация субстрата, тем круче кривая)

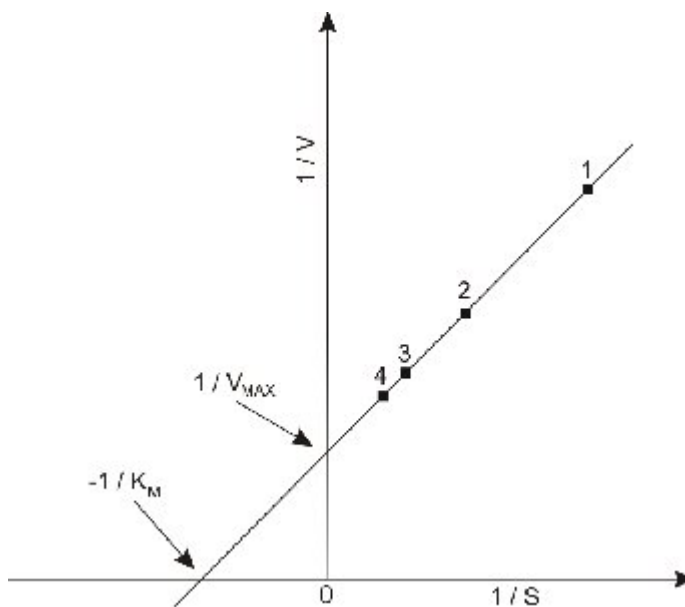


Рис.13 График в координатах Лайнуивера-Берка

Данная работа проводилась с использованием прибора RTS-822 (Radiometer, Copenhagen). К нему был подключён комбинированный стекляннокаломельный электрод SK242/C. Основные характеристики прибора приведены в таблице 1.

Таблица 1:

диапазон измерения pH – от 0 до 15 pH с точностью ± 0.01 pH
температурное смещение pH - < 0.002 $pH / ^\circ C$
компенсация температурного смещения pH – ручная, от 0 до 100 $^\circ C$ с точностью $\pm 3\%$
настройка чувствительности – от 90 до 102% с точностью $\pm 1\%$
диапазон установки рабочего pH – от 0 до 15 pH с точностью ± 0.02 pH
точность титратора – 0,7 $\mu\text{кл}$ с точностью $\pm 0,3\%$
скорость титрования – от 0,0125 мл/мин до 40 мл/мин
Мощность - 130 Вт

Глава 3.2 Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Сверхчувствительным калориметрам, предназначенным для измерения теплоёмкости жидких объектов небольшого объёма, был посвящён ряд обзорных статей [102-104]. Современные теплоёмкостные микрокалориметры для жидкостей обладают определёнными чертами:

Во-первых, в них не используется мешалка для механического перемешивания жидкости и выравнивания её температуры по всему объёму, как это делается в классических жидкостных калориметрах. Связано это с тем, что механическое перемешивание жидкости порождает джоулево тепло, которое может превзойти по величине исследуемый тепловой эффект. Причём, в условиях непостоянной вязкости исследуемой жидкости, это дополнительное тепло не поддаётся учёту. Вследствие этого, в сверхчувствительных теплоёмкостных калориметрах стремятся всячески избежать конвекционных потоков, которые могут изменяться с изменением вязкости объекта и приводят к ряду артефактов. Благодаря переходу к значительно меньшим объёмам измеряемых жидкостей, удалось избежать такого рода проблем. Небольшой рабочий объём является не только одной из характеристик теплоёмкостных микрокалориметров, но и принципиальным требованием к конструкции такого рода приборов.

Во-вторых, они измеряют теплоёмкость не дискретным образом, (путём ступенчатого прогрева объекта определённой порцией энергии), как это делается в абсолютных калориметрах, а при непрерывном прогреве или охлаждении объекта с постоянной скоростью. Иначе говоря, они как бы сканируют по температурной шкале, вследствие чего их стали называть “сканирующими микрокалориметрами”. Непрерывный прогрев даёт значительно более подробную информацию в рассматриваемом температурном интервале, позволяет полностью автоматизировать весь процесс измерения и обеспечить оптимальный режим для работы всех систем автоматического регулирования. Однако непрерывный прогрев приводит и к целому ряду сложностей, связанных с тем, что в этом случае объект исследования не находится в полном тепловом равновесии. Это обстоятельство накладывает ряд требований к конструкции калориметрических камер. В частности то, что они должны быть малы и должны обеспечивать минимальные температурные градиенты, неизменные при прогреве, во всём температурном диапазоне работы калориметра. Непрерывное измерение накладывает определённые требования и к объекту исследования: процесс перехода к равновесию при температурных переходах у него должен быть достаточно быстрым, изменения же состояния не должны быть очень резкими по температуре.

В-третьих, все сверхчувствительные калориметры измеряют не абсолютную, а разностную теплоёмкость, то есть они являются дифференциальными приборами с двумя идентичными калориметрическими камерами, и процесс измерения заключается в непрерывном сопоставлении теплоёмкости одной камеры с теплоёмкостью другой (рис.14). Одна из камер (С') этого двойного калориметра заполняется стандартной жидкостью, вторая (С'') же – исследуемой. В случае работы с разбавленными растворами в качестве стандартной жидкости обычно берётся растворитель. В таком случае, разностная теплоёмкость позволяет непосредственно определить теплоёмкостный эффект растворённых молекул.

Для определения разностной теплоёмкости в прецизионных микрокалориметрах обычно используется компенсационный метод измерения: к камере, которая отстаёт по температуре, подводится дополнительная мощность (контроллер 2, см. рис.14), такая, чтобы температура обеих камер в процессе всего

прогрева была бы одинакова. Легко видеть, что при постоянной скорости прогрева эта компенсирующая мощность пропорциональна разностной теплоёмкости обеих камер. Поскольку компенсирующая мощность регулируется автоматически в процессе прогрева, тем самым, обеспечивается и автоматическое непрерывное измерение разностной теплоёмкости камер. Обратная связь по тепловому балансу, которая при этом осуществляется, позволяет значительно повысить динамические характеристики прибора и, тем самым, более точно отслеживать температурную функцию разностной теплоёмкости.

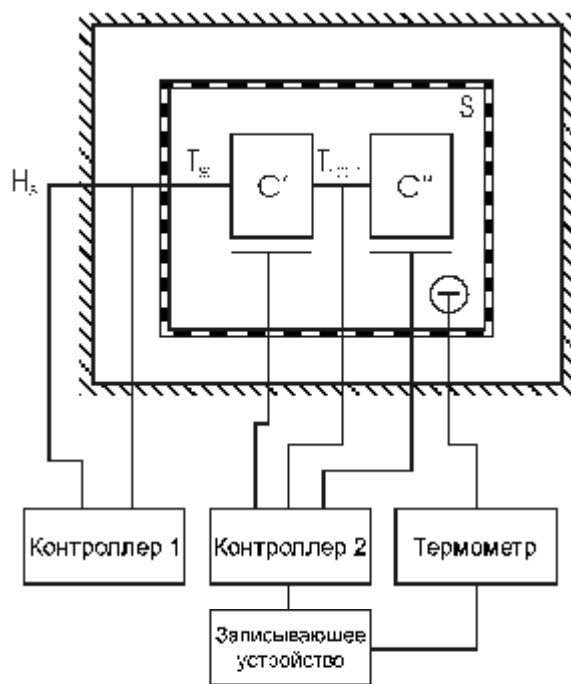


Рис. 14. Дифференциальный адиабатный сканирующий калориметр с двумя идентичными ячейками [103].

Чтобы сохранить постоянной скорость прогрева во всём диапазоне температур, в сканирующих калориметрах используется либо возрастающая с температурой мощность прогрева, которая компенсирует возрастающие с температурой тепловые потери камер [105], либо тепловые потери камер предотвращаются их теплоизоляцией. Первый способ несколько проще и имеет то преимущество, что при этом легко осуществляется сканирование в обоих направлениях по температурной шкале. Однако это может привести к ряду осложнений, повышающих шум и ухудшающих стабильность базовой (нулевой) линии. Поэтому этот способ не применяется в прецизионных сканирующих микрокалориметрах. В последних обычно используется полная или частичная адиабатизация калориметрических камер, т.е. их тепловая изоляция от окружающей среды [102].

Для исключения теплообмена со средой обе калориметрические камеры дифференциального микрокалориметра окружаются оболочкой (S), температура которой равна температуре камер (C), или отстаёт от неё на постоянную величину во всём диапазоне прогрева (в приборах, сканирующих в обоих направлениях по температурной шкале). Регулирование температуры оболочки автоматически осуществляется следящей системой (контроллер 1, см. рис.14). В наиболее

чувствительных высокопрецизионных микрокалориметрах [104, 106], к которым относятся коммерческие приборы ДАСМ-1М, ДАСМ-4, ДАСМ-4А, PDSC, DSC и др. используются несколько замкнутых оболочек, заключённых друг в друга.

Одной из наиболее сложных проблем в дифференциальной микрокалориметрии является загрузка обеих калориметрических камер равным, определённым количеством исследуемого и стандартного вещества, а также проблема свободного объёма. Легко видеть, что когда речь идёт об измерении разностной теплоёмкости с точностью порядка 10^{-5} Дж/К, точность загрузки обеих камер прибора должна быть не менее чем 10^{-5} грамм. Добиться этого взвешиванием жидкости, заливаемой в камеры, практически невозможно. Не меньше сложностей порождает свободный объём в камерах, остающийся над жидкостью. Ясно, что герметическую камеру нельзя заполнить полностью, так как коэффициент теплового расширения камеры и жидкости различны. Если же оставлять свободный объём в камере, то в процессе прогрева жидкости происходит дополнительное парообразование, на что расходуется дополнительная энергия. Хотя упругость пара над растворителем и разбавленным раствором макромолекул различается незначительно, разностный тепловой эффект парообразования оказывается ощутимым из-за огромной удельной теплоты парообразования (порядка 2300 Дж/г для воды). Этот эффект растёт с увеличением свободного объёма, снижение же свободного объёма приводит к ряду других осложнений, связанных с тепловым расширением жидкости при прогреве. Отмеченные проблемы были решены переходом от измерения теплоёмкости вещества определённой массы к измерению вещества определённого объёма [103, 106]. При этом объём измеряемой жидкости фиксируется жёстким объёмом калориметрической камеры. Основное условие, которое должно удовлетворяться, заключается в том, что камера должна быть заполнена целиком – в ней не должно оставаться даже микроскопических пузырьков воздуха. Для исключения пузырьков в калориметрических камерах прикладывается избыточное давление в несколько атмосфер, и всё измерение осуществляется под этим избыточным давлением. Поскольку давление не велико, оно само по себе никак не влияет на тепловые свойства раствора. В то же время, оно полностью исключает образование пузырьков газа при прогреве жидкости, так как давление газа, растворённого в жидкости, ниже избыточного давления, создаваемого моностабом. Кроме того, избыточное давление позволяет существенно сдвинуть температуру кипения исследуемой жидкости и, тем самым, сдвинуть верхний предел температурного диапазона сканирования.

В процессе прогрева сканирующего калориметра с полностью заполняемыми камерами, жидкость вытесняется из-за теплового расширения. Следовательно, масса жидкости в рабочем объёме камеры уменьшается с повышением температуры. Однако при работе с разбавленными растворами, которые имеют практически такой же коэффициент теплового расширения, что и растворитель, вытеснение жидкости из камер происходит почти в одинаковой степени и не влияет на результат измерения разностной теплоёмкости.

В камере ДАСМ-4А, камеры выполнены целиком из сквозной капиллярной трубки, свитой в спираль (рис.15). Для исключения пузырьков в такой камере, к внешним выводам капиллярной трубки прикладывается избыточное давление в 5 атм., достаточное для прогрева водных растворов до 150°C (что при исследовании термостабильных белков и нуклеиновых кислот, богатых G-C-парами, бывает крайне важно). Такая конструкция камер даёт целый ряд преимуществ: во-первых, их легче промывать и заполнять образцом так, чтобы не осталось пузырьков воздуха; во-вторых, из-за небольшого диаметра трубки и её высокой теплопроводности в

процессе прогрева не возникает значительных перепадов температуры в жидкости, заполняющей трубку. Следовательно, температурное поле в такой калориметрической камере более однородно и капиллярные камеры можно прогревать с большей скоростью, чем объёмные. В свою очередь, повышение скорости сканирования означает повышение реальной чувствительности прибора к изменениям объекта исследования. Наконец, капиллярные камеры выдерживают значительно большее давление, чем объёмные. Это позволяет поднять верхний предел рабочего температурного диапазона прибора. На приборе ДАСМ-4А он достигает 150°С для водных растворов.

Важным свойством сканирующих калориметров является способность сканировать в обоих направлениях по температурной шкале. Оно присуще почти всем неадиабатическим приборам, не имеющим тепловых экранов. В адиабатических приборах, в которых имеются тепловые экраны (см. рис.14) сканирование вниз по температурной шкале требует контролируемого отвода тепла. Это достигается сдвигом температуры тепловых экранов на определённую величину по отношению к температуре камер, которая поддерживается во всём интервале сканирования следящей системой.

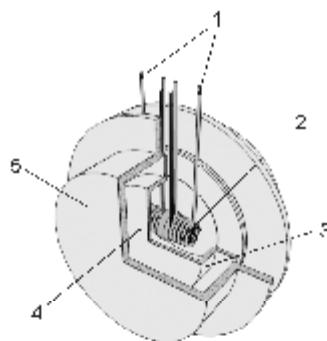


Рис.15 Калориметрический блок ДАСМ-4А

1 – капилляры заполнения. 2 – спиральная калориметрическая ячейка с нагревателем. 3 – внутренняя адиабатизирующая оболочка. 4 – Измеритель разности температур между ячейками. 5 – Внешний тепловой экран [103].

При работе со сканирующими микрокалориметрами существенное значение имеет выбор оптимальной скорости сканирования. При выборе скорости прогрева необходимо принять во внимание следующее: а) теплоёмкостная чувствительность сканирующих микрокалориметров тем выше, чем выше скорость прогрева; б) с ростом скорости прогрева растёт неоднородность температурного поля (последнее особенно сказывается при исследовании резких процессов, которые как бы расплываются в сторону высоких температур при чрезмерной скорости прогрева); в) скорость конформационного перехода макромолекул не бесконечна: для глобулярных белков она очень высока (порядка 10^3 сек⁻¹), для фибриллярных же (например, коллагена) она довольно низка (порядка 10^{-2} сек⁻¹ и ниже) [103]. Основным критерием правильности выбора скорости является неизменность формы температурной кривой зависимости разностной теплоёмкости при вариациях скорости в большую и меньшую сторону.

Хотя дифференциальный калориметр создан для измерения разностной теплоёмкости раствора и растворителя, из-за неполной идентичности камер определить эту разностную величину с высокой точностью невозможно путём лишь одного промера. Необходимо сначала обе камеры заполнить одной и той же

стандартной жидкостью (растворителем) и определить нулевую или базовую линию прибора во всём необходимом интервале температур. При последующем сканировании уже с исследуемым препаратом базисная линия вычитывается встроенным корректором, либо при последующей обработке данных.

Обработка калориметрических кривых проводится следующим образом. На рис.16 приведена типичная калориметрическая запись, наблюдаемая в прогреваемых растворах биополимеров (белков, нуклеиновых кислот и т.д.), с базисной линией (запись при сканировании “растворитель – растворитель”) и калибровочной меткой. По площади денатурационного пика, ограниченного снизу экстраполированными значениями теплоёмкости нативного и денатурированного состояний биологических структур, можно определить теплоту при денатурации биомакромолекулярной структуры. Для этого можно воспользоваться формулой $Q = k_1 S$, где Q – теплота денатурации, S – площадь под пиком теплопоглощений, а k_1 – цена единицы площади на записи в энергетических единицах ($k_1 = W_{эм}t/S_{эм}$, где $W_{эм}$ – эталонная мощность, вводимая в одну из камер за время t , а $S_{эм}$ – площадь калибровочной метки, см. рис.16). По линии записи можно определить парциальную теплоёмкость растворённого вещества при любой температуре, имея в виду, что

$$-\Delta C = [C]_p^p \cdot m_p - [C]_p^s \cdot \Delta m_s$$

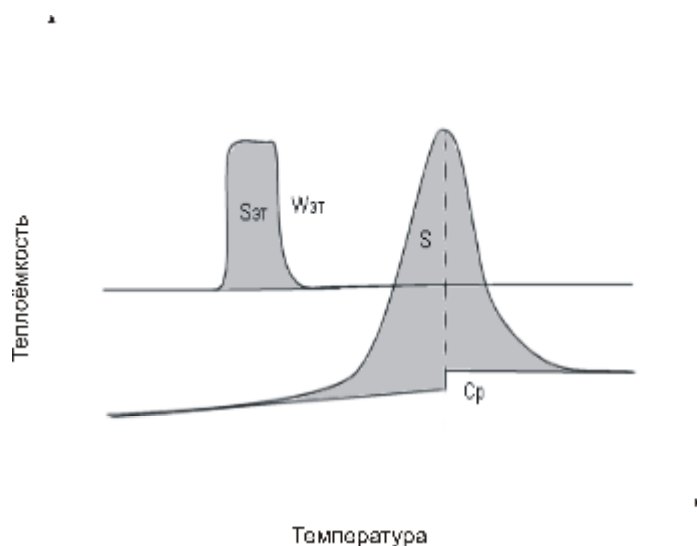


Рис.16 Типичная микрокалориметрическая запись, включающая пик теплопоглощения
1 – Базисная линия. 2 – Кривая записи для раствора.

где $[C]_p^p$ и $[C]_p^s$ – парциальные теплоёмкости растворённого вещества и растворителя; m_p – масса растворённого вещества в рабочем объеме ячейки; Δm_s – масса вытесненного им растворителя. Поскольку

$$\Delta m_s = m_p \frac{[V]^p}{[V]^s},$$

где $[V]^p$ и $[V]^s$ – парциальные объёмы вещества и растворителя, то

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{\Delta C}{m_p},$$

где $\Delta C = k_2 h$ – разность теплоёмкостей между растворителем и раствором; h – отклонение точки от базисной линии при любой температуре, а k_2 – цена единицы отклонения (от прямой), выраженной в Дж/К·см; $k_2 = W_{et}/V_{et}$, где W_{et} – калибровочная мощность, V – скорость прогрева (К/сек), V_{et} – отклонение калибровочной метки от прямой. Окончательно, формула, которой мы пользовались, имеет вид:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{W_{et} \cdot h}{V_{et} \cdot m_p}.$$

Обработка калориметрических кривых проводилась с помощью компьютера и специально написанной программы, созданной на нашей кафедре.

В настоящей диссертационной работе применялся микрокалориметр ДАСМ-4А (выпуск СКБ БП АН Россия). Основные технические данные этого калориметра приведены в таблице 2. Связь микрокалориметра ДАСМ-4А с ЭВМ осуществляется с помощью интерфейсной схемы, созданной в лаборатории биофизики Тбилисского Государственного Университета. Обработка калориметрических кривых проводилась с помощью компьютера и специально написанной программы.

Таблица 2:

Измерение разности теплоёмкостей – **От максимальной (-0,32 Дж/К до +0,32 Дж/К) до минимальной (-0,005 Дж/К до +0,005 Дж/К)**
 Диапазон изменений температуры камер – **От -10 до +150°С**
 Уровень шумов при скорости прогрева 1,0 К/мин – **не более 12 мкДж/К (0,2 мкВт)**
 Отклонение базовой линии от прямой при скорости прогрева 1,0 К/мин – **не более 100 мкДж/К (1,66 мкВт)**
 Среднее квадратическое отклонение, характеризующее воспроизводимость базовой линии при пяти перезаправках и скорости прогрева 1,0 К/мин - **не более 180 мкДж/К (3 мкВт)**
 Время установления показаний разности теплоёмкостей – **не более 40 с**
 Абсолютная погрешность измерений температуры – **0,1°С**
 Скорость прогрева камер – **0,03; 0,06; 0,125; 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 4,00 К/мин**
 Относительная погрешность установки скорости – **2%**
 Время установления скорости прогрева – **не более 8 мин**
 Скорость управляемого охлаждения камер – **1,0 и 0,5 К/мин**
 Давление исследуемой жидкости – **от 500 до 600 кПа**
 Рабочий объём камеры – **0,46 мл**
 Мощность, потребляемая от сети переменного тока при напряжении 220 В и частотой 50 Гц – **300 Вт**

Глава 3.3 Метод остановленной струи.

Для исследования быстрых реакций, а также для исследования отдельных стадий химических реакций могут быть использованы струевые методы, методы в которых два или более реагентов быстро смешиваются. Этот метод был разработан в 1934 г. Роутоном [108] и значительно усовершенствован шестью годами позже Чансом [109]. В ходе реакции возможно непосредственно наблюдать за изменением концентраций реагентов. Благодаря развитию техник смешивания и регистрации струевые методы за последние десятилетия стали одними из наиболее важных и распространённых. Среди большого числа физических методов, используемых для изучения кинетики реакций, наибольшее распространение, вероятно, получили оптические методы ввиду их универсальности, высокой чувствительности и высокого времени разрешения. Струевые методы пригодны для исследования не только равновесных, но также и необратимых реакций, и реакций, характер которых меняется под влиянием продуктов реакции.

В основе метода лежит принцип, проиллюстрированный на рис.17.

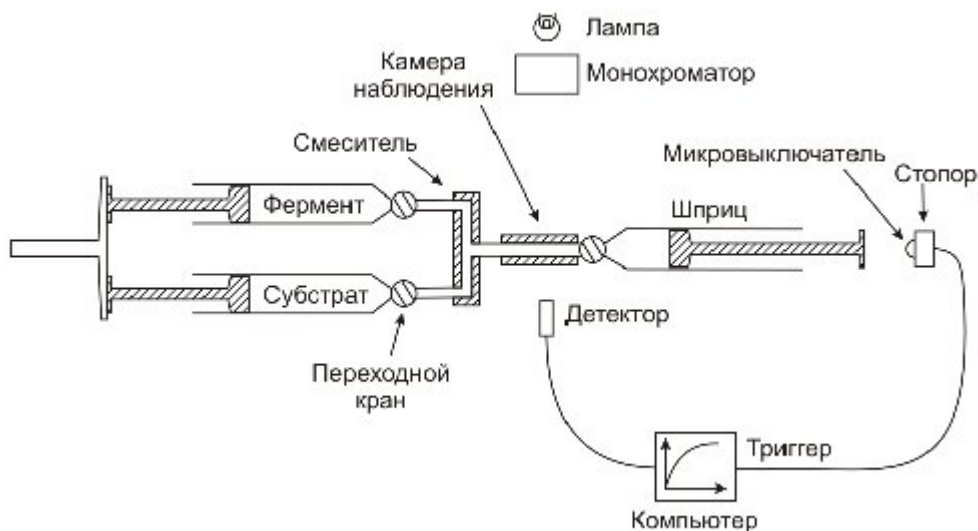


Рисунок 17. Схема устройства, используемого в методе остановленной струи

Два или более реагента быстро подаются через смеситель в камеру наблюдения, где детектором (обычно оптическим) фиксируются изменения в подаваемой смеси. В зависимости от скорости потока и времени наблюдения струевые методы делятся на три типа: а) постоянная или непрерывная струя, б) ускоренная струя и в) остановленная струя. В методе непрерывной струи скорость потока реакционной смеси поддерживается постоянной, а степень превращения реакции определяется обычно серией экспериментов на разном расстоянии от камеры смешивания вдоль камеры наблюдения. Камера смешивания представляет собой в этом случае длинную трубку, в которой при эксперименте устанавливается градиент концентраций реагентов смеси. В методе ускоренной струи неизменным остаётся расстояние от смесителя, а меняется скорость потока в ходе одного опыта. В методе остановленной струи, используемой при изучении реакций “помедленнее”, взаимодействие реагентов начинается после смешивания и заканчивается в камере наблюдения.

В данной работе был использован прибор SX-18MV от Applied Photophysics. Для регистрации изменения концентраций реагентов в этом приборе измеряется поглощение электромагнитного излучения (света). Как известно, различные вещества поглощают электромагнитное излучение в определённом диапазоне длин волн. Причём в соответствии с законом Бугера-Ламберта-Бера, поглощение пропорционально концентрации поглощающего вещества. Соответственно характер изменения поглощения в ходе реакции позволяет судить о характере самой реакции (например см. рис.18). Для регистрации поглощения используются спектрофотометры, основными частями которых являются источник света (лампа, лазер), монохроматор – устройство для разделения спектра лампы по длинам волн, кювета или камера наблюдения и регистрирующее устройство. Все эти устройства показаны на рис.17.

По сравнению с другими разновидностями метод остановленной струи является рутинным лабораторным методом, тогда как метод непрерывной струи используется только в особых случаях. Для проведения всего цикла измерений с помощью метода остановленной струи достаточно 100-400 мкл раствора, при этом мёртвое время, то есть время смешивания реагентов и доставки смеси в камеру наблюдения, составляет около 0,5 мс, а время регистрации может достигать нескольких минут (при наличии соответствующей аппаратуры). Применение метода непрерывной струи требует очень больших объёмов, а регистрация должна проводиться только в течение ~100 мс, поскольку работать с более длинными трубками очень сложно. Дополнительные трудности связаны с тем, что сканирование должно проводиться по всей длине трубки.

Помимо проблем чисто технического плана, это ставит ряд принципиальных вопросов, в частности увеличение систематической ошибки в связи с неоднородностью размеров трубки и несовершенством её термостатирования. Зато метод непрерывной струи имеет меньшее мёртвое время – всего 100-200 мкс, поскольку отсутствуют трудности, связанные с механической остановкой струи; остановка происходит за доли миллисекунды и может привести к возникновению ударных волн, если осуществляется слишком резко.

В методе остановленной струи начало реакции не соответствует моменту, когда реакционная смесь достигает камеры наблюдения. Сразу после остановки потока регистрируется целиком вся кинетическая кривая (рис.18)

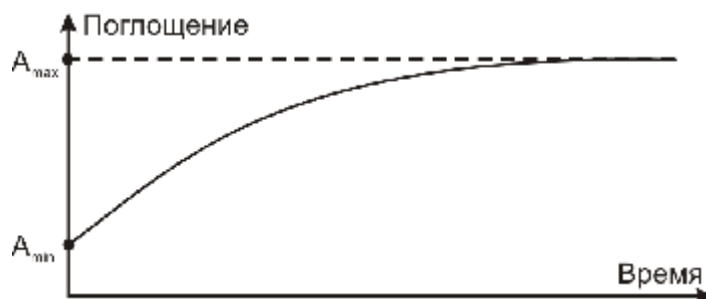


Рисунок 18 Кривая поглощения, полученная методом остановленной струи

В идеальном случае времени разрешения метода остановленной струи хватает и на то, чтобы канал наблюдения заполнился раствором смеси реагентов, ещё не вступивших в реакцию, и на то, чтобы была отснята вся кинетическая кривая. Однако, в действительности за мёртвое время, которое включает время, необходимое для смешивания двух растворов реагентов, время достижения реакционной смесью точки наблюдения и время остановки реакционной смеси,

степень превращения может оказаться значительной. В этом случае разумнее применить аппаратуру, представляющую собой комбинацию методов ускоренной и остановленной струи. Проблема мёртвого времени пока ещё далека от разрешения, и единственное, что можно предложить, - это относиться с осторожностью к интерпретации данных, полученных при исследовании реакций, проходящих в заметной степени в мёртвое время. За тем, насколько прошла реакция, можно следить при помощи довольно простой процедуры. Если перед началом экспериментов смешать растворы реагентов с водой, то результирующая величина оптической плотности будет служить нулевой линией отсчёта ($t=0$). Эта оптическая плотность должна совпадать с оптической плотностью в начальный момент после смешивания растворов реагентов, если они ещё не начали взаимодействовать. Если это не так, необходимо увеличить скорость потока или разбавить растворы реагентов, или понизить их температуру [107].

Мёртвое время прибора и, таким образом, время его разрешения есть функция эффективности смешивания, а также множества других факторов. В частности, кавитация лимитирует максимальную скорость струи. Кроме того кавитация может стать проблемой для оптических систем регистрации. Краны и соединения различных частей прибора должны быть как можно короче. Эти факторы являются обязательными, потому как они напрямую влияют на величину мёртвого времени. В то же время важными являются системы, предназначенные для хранения растворов и достижения равновесия, что немаловажно для исследования влияния температуры на кинетику реакций.

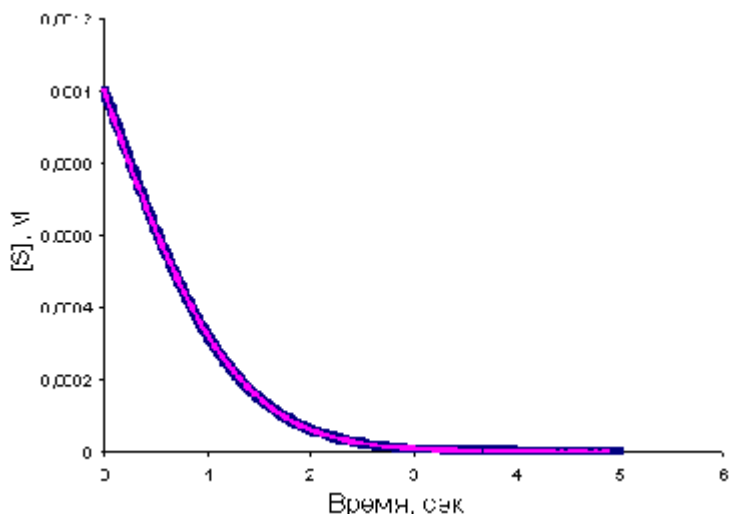


Рис. 19 Кривая изменения концентрации субстрата O-Hip-L-Phe в ходе гидролиза Карбоксипептидазой А.

Кривая синего цвета получена экспериментально, розовая кривая – теоретическая.

В ходе измерений были получены данные, общий вид которых представлен на рис.18. Изменение поглощения от A_{min} до A_{max} соответствовало изменению концентрации одного из продуктов реакции (который и поглощал свет), от нулевой концентрации до конечной, равной количественно изначальной концентрации субстрата. При этом A_{min} соответствовало некоторому изначальному поглощению света. Также подразумевалось, что весь субстрат полностью перерабатывался в продукты реакции (область плато на рис.18). После простого пересчёта в программе

Ms Excel изначальные данные (см. рис.18) были приведены к виду, представленному на рис.19

С другой стороны, имеется теоретическое описание ферментативного катализа, а именно уравнение Михаэлиса-Ментен (1).

$$V = -\frac{dS}{dt} = \frac{V_M S}{K_M + S} \quad (41),$$

где V – скорость реакции, S – концентрация субстрата, K_M – константа Михаэлиса, а V_M – максимальная скорость реакции. Путём интегрирования (41) можно получить простую зависимость концентрации субстрата S от времени t .

$$t = -\frac{K_M \ln(S/S_0) + S - S_0}{V_M} \quad (42),$$

где S_0 - начальная концентрация субстрата. Меняя K_M и V_M как параметры, можно менять форму теоретической кривой. Путём подгонки теоретической кривой Михаэлиса-Ментен можно добиться её совпадения с экспериментальной кривой (см. рис.19). В случае совпадения K_M и V_M для теоретической кривой будут соответствовать константам K_M и V_M для экспериментальной кривой. Таким образом, сравнительно простая процедура позволяет непосредственно получать константы, характеризующие ферментативный катализ. Этот алгоритм реализован в стандартной программе Ms Excel при помощи дополнительного модуля Solver, что позволяет использовать подгонку объективно и с заданной точностью.

По сравнению с некоторыми методами исследования реакций, например методом автоматического титрования, метод остановленной струи позволяет за меньший период времени провести больше измерений. Даже с учётом проведения нескольких измерений на SX-18MV для получения одной статистически средней кривой эксперименты могут быть проведены в значительно более короткие сроки. Однако этот метод позволяет провести измерения только с оптически активными реагентами. Концентрации таких реагентов должны быть достаточны для ощутимого изменения оптических свойств смеси в результате реакции, но не должны быть слишком высокими, чтобы прибор мог записать кривую изменения. К тому же существуют ограничения и по времени измерения, возможно не больше 1000 секунд на одно измерение.

Характеристики используемого в данной работе спектрофотометра SX-18MV показаны в таблице 3:

Таблица 3:

Мёртвое время – до 1.37 мс
Время смешивания – 0.2 мс
Время измерения – от 15 мс до 1000 с
Рабочее давление – до 8 бар
Лампа – 150 Вт, ксеноновая
Длина волны – от 200 нм до 800 нм
Полоса пропускания монохроматора – от 0.5 до 37 нм
Объём камеры наблюдения – 20 мкл

Файлы конечных данных представляются в текстовом формате. Возможна их обработка в программах Origin или Ms Excell.

Глава 3.4 Циклическая сканирующая вольтаметрия

Электрохимические методы являются одними из самых очевидных и простых в применении экспериментальных методов. Существуют четыре основных вида электрохимических метода, в зависимости от измеряемой величины: потенциометрия, вольтамперметрия, кулонометрия и измерение проводимости. Потенциометрия и измерение проводимости используются для получения сведений о концентрации определённых ионов. При этом в потенциометрии используется уравнение Нернста (например см. главу 3.1). Вольтамперметрия представляет собой получение зависимости силы тока от приложенной разницы потенциалов – вольтамперная характеристика исследуемой системы. Кулонометрия используется в исследовании переноса вещества (по уравнению Фарадея).

На рис.20 показана одна из принципиальных схем, применяемых в вольтамперметрии. При этом разность потенциалов замеряется через электрод сравнения, а ток – через основной электрод. Трёхэлектродная схема используется для уменьшения влияния падения напряжения на основном электроде. Через электрод сравнения протекает пренебрежимо малый ток, почти нулевой. Тем самым понижается уровень помех и повышается чувствительность метода.

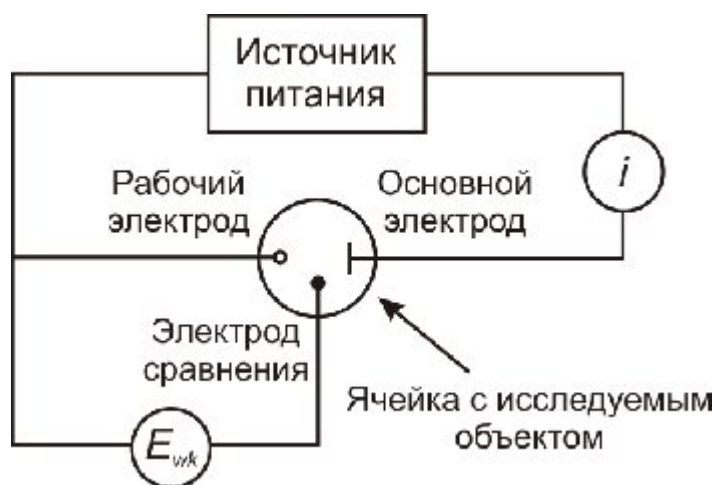


Рисунок 20. Принципиальная схема цепи с тремя электродами, используемая в циклической вольтамперметрии.

Продолжительное измерение, состоящее из множества повторяющихся циклов изменения разности потенциалов в сторону повышения и понижения (сканирование), при соответствующих измерениях силы тока, составляют суть метода циклической вольтамперметрии. Этот метод особенно важен для количественной оценки происходящих в системе процессах.

Особую значимость имеют исследования с применением самоорганизующихся монослоев (Self Assembled Monolayers) на основе алканэтиолов и других. Такие слои легко можно создать на поверхности основного электрода, причём с заданной толщиной (количеством повторяющихся групп). В случае алканэтиолов на поверхности металла электрода получаются цепочки структур такого вида: $\text{Au-S-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$.

Исследовать вещества, например белки, можно в свободно диффундирующем режиме, либо в закреплённом (иммобилизованном) на электроде режиме. В случае редокс-молекул, необратимо связанных с покрытым монослоем

электродом, на малом отдалении реактант-электрод и низких скоростях сканирования, вольтамограммы имеют симметрично расположенные анодный и катодный пики (рис.21), которые возникают из Фарадеевского процесса обмена электронами [111,112]. Покрытие поверхности элеткрода электрохимически активными молекулами может быть определено при рассмотрении площадей θ вольтамметрических пиков, используя уравнение 43 [113]:

$$\Gamma = \theta / (n F S v) \quad (43)$$

где n является числом перенесённых электронов, F константа Фарадея, S геометрическая площадь электрода, а v скорость сканирования. Увеличение расстояния переноса электрона (с увеличением толщины монослоя) и/или скорости сканирования вызывают разделение местоположений пиков, рис.21 а, б. В этом случае скорректированные по фону графики тока от скорости сканирования потенциала должны иметь вид прямых, пересекающихся начало (рис.23б). Эта линейная зависимость может быть использована, чтобы проверить степень связанности редокс-молекул с электродом, однако нужно иметь в виду, что и просто со временем редокс-молекулы могут отсоединяться от поверхности электрода и диффундировать в раствор. Такая потеря покрытия может исказить картину создать помеху интерпретации.

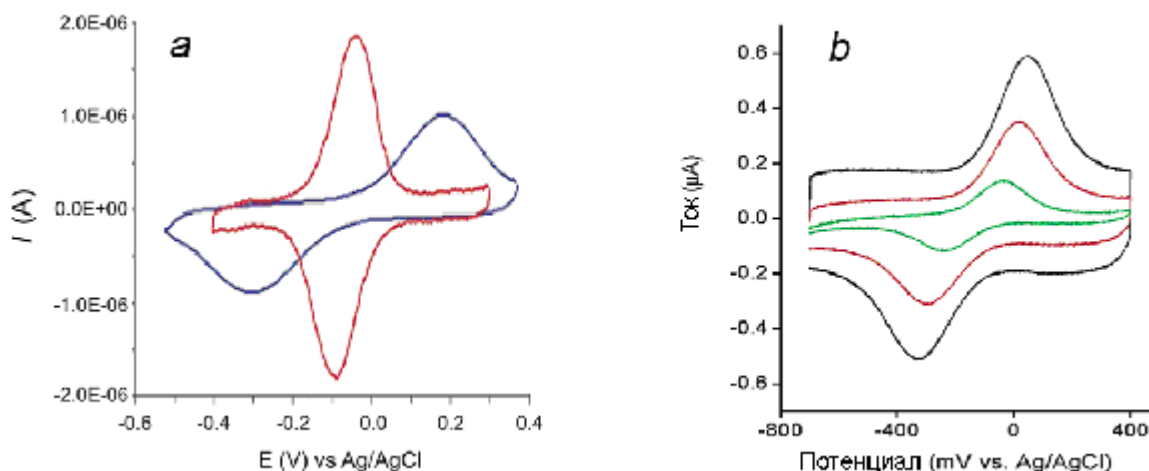


Рисунок 21. (а) Циклические вольтамограммы обмена электронами между азурином и золотым электродом, модифицированном алканэтиол-монослоем с переменным числом групп n и с концевой CH_3 -группой. (а) Красная кривая – 1-пентанэтиол ($n = 4$); синяя кривая – n -гексадеканэтиол ($n = 15$), скорость сканирования: 5 V s^{-1} [52]. (б) Характерные вольтамограммы мутантного K13A крысиного цитохрома С, иммобилизованного на модифицированном смешанном монослоем С20Ру/С19 золотом электроде [115]. Скорости сканирования: 0.2 V/s (зелёная), 0.6 V/s (красная), and 1.0 V/s (чёрная).

Для случая редокс-молекул, необратимо связанных с покрытым монослоем электродом, Лавирон [112] разработал формализм для вычисления константы скорости переноса электрона, исходя из связи между расположением пиков и скоростью сканирования. В этой модели, также как и в предыдущем случае, перенапряжение подразумевается меньшим, чем энергия реорганизации растворителя (расстояние между пиками менее 200 mV). В этом пределе константа скорости реакции может быть определена из уравнения:

$$\log k_{ET}^0 = \alpha \log(1 - \alpha) + (1 - \alpha) \log \alpha - \log\left(\frac{RT}{n_a F v}\right) - \frac{\alpha(1 - \alpha)n_a F \Delta E_p}{2.3RT} \quad (44)$$

где ΔE_p расстояние между катодным и анодным пиками. Эта модель вытекает из более общей теории переноса электрона Маркуса при следующих условиях: $e\xi \ll \lambda$, $k_B T \ll \lambda$ (где λ реорганизационная энергия, ξ перенапряжение) [111,118]. Вебер, Кригер и Мюррей с сотрудниками [118] разработали численный подход, который основан на уравнении Маркуса (см. выше уравнение 25 в главе 1.5). Таким образом стало возможным одновременно определять значения одномолекулярных стандартных констант скорости и энергии реорганизации из зависимости потенциалов катодного и анодного пиков от скорости сканирования. В рамках этой модели также возможно определение распределения электронных состояний в металлическом электроде в близости от уровня Ферми [49,119]:

$$k_{ET} \propto \int_{-\infty}^{\infty} f(\varepsilon) \exp\left[-\frac{(e\xi + \varepsilon_F \pm \lambda)^2}{4\lambda RT}\right] d\varepsilon \quad (45)$$

где функция $f(\varepsilon)$ распределения Ферми-Дирака, а ε_F энергия Ферми. Численно сгенерированные модельные кривые подгонки, соответствующие различным значениям λ и T , представлены на рис.22 (К. Davis and D. H. Waldeck, неопубликованные данные) [52].

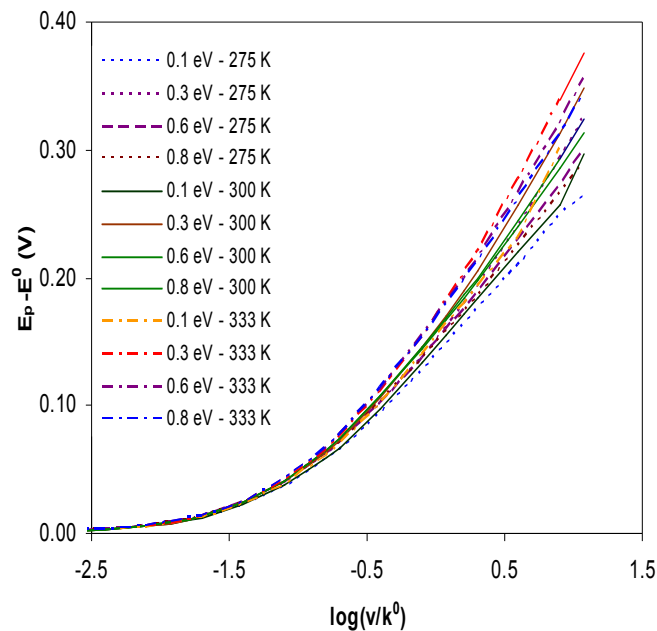


Рисунок 22. Модельная кривая подгонки, соответствующая разным значениям λ и T (К. Девис и Д. Валдек, неопубликованные данные).

Рисунок 23 представляет типичные данные и подгонки для обмена электронами азурина на золотых электродах, покрытых монослоем (с $n=10$), что показывает хорошее поверхностное покрытие (приблизительно с 10% погрешности

для ΔE , при высоких скоростях сканирования) [52]. Рисунок также демонстрирует влияние постизмерительных IR_S коррекций на процедуру подгонки данных и даёт представление о том, насколько такие коррекции необходимы для подходящего определения действительных (неискажённых) значений k_{ET}^o и λ [111,116,117]. В добавок к сказанному нужно отметить, что для случая редокс молекул необратимо прикреплённых к голому или покрытому монослоем электроду, и теория Лавирона [112], и основанные на теории Маркуса расширения [118] предсказывают линейную зависимость пиковых токов от скорости сканирования потенциалов (см. рис.23б), в отличие от случая со свободно диффундирующими молекулами. Эта особое отличие в экспериментальных проявлениях может быть использовано для разделения двух режимов в неясных случаях с хорошо исследованными редокс реагентами [111].

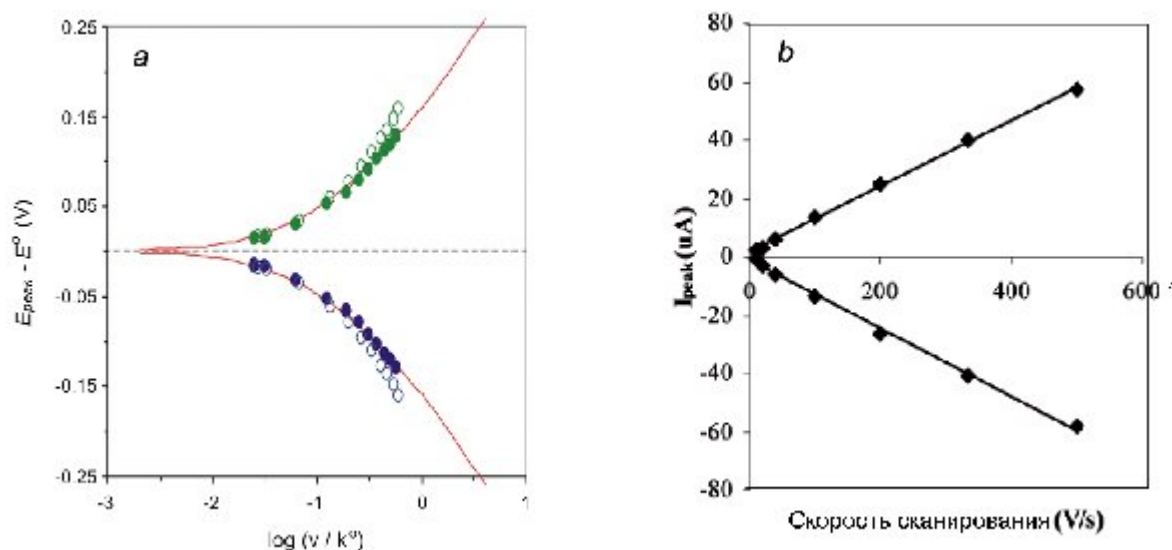


Рисунок 23. (а) Процедура подгонки для обмена электронами между азурином и золотым электродом, покрытым монослоем ($n=10$), что говорит о большом поверхностном покрытии (приблизительно 10% ошибки в ΔE , при высоких скоростях сканирования). Этот рисунок показывает влияние постизмерительной IR_S коррекции (в соответствии с уравнением 46) на процедуру подгонки. Стандартные ошибки для экспериментальных точек овладают с их размерами. Закрашенные символы: ΔE_{CO} после должной IR_S коррекции, давшей значения $k^o = 170 \pm 5 \text{ s}^{-1}$ и $\lambda_o = 0.3 \pm 0.06 \text{ eV}$ (при 25°C). Примечательно, что неоткорректированные значения ΔE_{UC} (незакрашенные символы) не могут быть подогнаны должным образом ни одной из теоретических кривых на рисунке 22 [52]. (б) Линейная зависимость пикового тока от скорости сканирования для СуТ-с на золотом электроде, модифицированном $\text{RuC}_{11}/\text{C}_{10}$ монослоем при скоростях сканирования в 10, 20, 40, 100, 200, 300 и 500 V/s, при температуре 298 K [116]. И справа, и слева продемонстрированы катодный и анодный пики.

Вольтамперия для случаев с низкими концентрациями электролитов (менее 0.05M), высоких концентраций реагентов (выше $5 \times 10^{-4} \text{ M}$, в режиме свободной диффузии), высоких покрытий поверхности (более 10 pmol cm^{-2} , режим с иммобилизацией на электроде), больших расстояниях рабочего электрода и электрода сравнения может быть значительно искажена, особенно при высоких скоростях сканирования, вызывая значительное разделение пиков, и соответственно приводя к заниженным значениям констант скорости k_{het}^o или k_{ET}^o [111]. Когда неизбежны условия, приводящие к большим искажениям вольтамограмм, могут быть успешно применены постэкспериментальные IR_S коррекции (где R_S сопротивление

раствора между поверхностью рабочего электрода и кончиком электрода сравнения) через стандартные электрохимические программы, для исключения ошибок от искажения вольтаммограмм (рис.23а) [52]. Для электродов с дисковой формой сопротивление раствора может быть вычислено по формуле 46 [114]:

$$R_S = \frac{\arctan(r_r/r_w)}{2\pi r_w \kappa} \quad (46)$$

где r_w радиус рабочего электрода, κ проводимость среды, а r_r расстояние между рабочим электродом и электродом сравнения. Как можно заметить из формулы выше, сопротивление раствора в основном определяется проводимостью раствора и площадью электрода.

Одна из главных сложностей этого метода – подготовка электрода, и, в частности, качество поверхности электрода. Поскольку в этом случае чаще всего используются твёрдые электроды (обычно углеродные либо из благородных металлов), для таких целей стараются использовать электроды из цельного кристалла, причём со строго определённой ориентацией кристаллической решётки. Кроме того, в значительной степени играет роль качество обработки поверхности электрода. Дело в том, что неоднородности поверхности электрода приводят к некачественному сигналу в силу неоднородности абсорбции веществ и, соответственно, электрических свойств электрода. Ориентация кристаллов электрода при контакте с электролитом также, очевидно, влияет на электрические свойства системы.

Вольтаметрические методы с использованием модифицированных электродов находят широкое применение не только в науке, но и в промышленности, в медицине. Относительная дешевизна, чувствительность и универсальность метода способствуют такому широкому распространению.

В данной работе использовался электрохимический анализатор Autolab PGSTAT 302, оборудованный программным обеспечением General Purpose Electrochemical System (GPES) и обладающий характеристиками, показанными в таблице 4:

Таблица 4:

Выходное напряжение – **до 30В**

Диапазон задания и измерения потенциала – **10 В**

Погрешность установленного напряжения – **0.2%**

Минимальный регистрируемый ток - **30фА**

Измеряемый ток – **до 2А**

Погрешность измерения тока – **0.2%**

Ширина полосы частот – **1МГц**

Входной импеданс электрометра – **> 1 ТОм / < 8 пФ**

Мощность, потребляемая от сети переменного тока при напряжении 220 В и частотой 50 Гц – **250 Вт**

Глава 2.4 Препараты и растворы.

В кинетических и калориметрических исследованиях химотрипсина были использованы препараты фермента, коммерчески полученные от Fluka Chemie. Субстрат, ацетилтирозиловый эфир (АТЭЕ) получен от Reanal. Остальные реактивы – от Реахим. Рабочие растворы фермента для кинетических исследований готовились перед каждым измерением в растворах 10^{-3} М HCl. Раствор субстрата (АТЭЕ) готовился в ацетонитриле. При проведении опыта в рабочей ячейке прибора устанавливалась концентрация субстрата от 10^{-3} до $2 \cdot 10^{-2}$ М, и концентрация фермента – 10^{-7} М. В рабочий раствор также был добавлен хлорид натрия (NaCl), концентрация которого составила 0.05М. Концентрация титранта (NaOH) составляла 10^{-2} М. Калориметрические измерения были проведены при значениях pH 3.5 и 8.5 соответственно в фосфатном (составленном Na_2HPO_4 и лимонной кислотой) и боратном (составленном $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ and H_3BO_3) буферах. В обоих случаях компоненты готовились с соответствующим содержанием мочевины (Urea) при непосредственном контроле значения pH. Несколько контрольных экспериментов, проведённых без буферов, но с использованием NaOH для доводки pH до значения 8.5, показали идентичные результаты.

Для проведения измерений кинетики карбоксипептидазы А методом остановленной струи были использованы растворы фермента и субстрата в Tris/HCl буфере с значением pH 7.5 и концентрацией $5 \cdot 10^{-2}$ М. Буферный раствор получен прямым смешиванием сухого компонента Tris в воде. Нужное значение pH достигнуто путём добавления малого количества концентрированной соляной кислоты. В растворе буфера при этом присутствовала хлорид натрия (NaCl) с концентрацией 0.5М. Для исследования влияния добавок (Urea, GuanHCl, ТМАО, Sarcosine), а также при исследовании влияния различных концентраций соли NaCl, готовились буферные растворы с соответствующими концентрациями реагентов при постоянном контроле значения pH. Все компоненты буферных растворов были коммерчески приобретены от Sigma Aldrich и использованы без предварительной очистки. Итоговые буферные растворы подвергались фильтрации для уменьшения шумов при измерении на спектрофотометре. Оптимальные для измерений концентрации фермента и субстрата в растворах составляли соответственно $1.2 \cdot 10^{-6}$ М и $2 \cdot 10^{-3}$ М. Фермент карбоксипептидаза А из бычьей панкреазы (carboxypeptidase A from bovine pancrease) и один из субстратов (Hippuryl-L-phenylalanine) были получены от Sigma Aldrich. Второй субстрат (O-Hippuryl-L- β -pheyllactic acid-sodium salt) был получен от Bachem.

В электрохимических исследованиях использовался азурин из *Pseudomonas aeruginosa*, коммерчески полученный от Sigma Aldrich (либо от Fluka). Алканэтиолы (1-pentanethiol (Acros), 1-undecanethiol (Aldrich) and 1-hexadecanethiol (Aldrich)) использовались как есть. Буферные компоненты, 5М ацетат аммония (NH_4Ac) и HClO_4 (70%) получены от Fluka. Монослой готовился прямым погружением свежеччищенного электрода в спиртовой 5×10^{-3} М раствор алканэтиола на 24 часа. Перед осаждением белка, электрод промывался спиртом, водой и затем буферным раствором. После этого электрод помещался в 140 μM раствор азурина с 5mM NH_4Ac (pH 4.6) на 2 минуты. Было замечено, что даже несколько десятков секунд достаточно для подходящего осаждения азурина на электроде с монослоем.

Часть 4. Полученные результаты и их обсуждение

Глава 4.1 Результаты исследования α -химотрипсина.

В данной работе α -химотрипсин был исследован одновременно двумя разными методами, что дало более полную картину происходящего. Метод автоматической титрации дал сведения о кинетических свойствах фермента в условиях различных концентраций мочевины. Что дало представление о состоянии каталитического центра при соответствующих условиях. Калориметрия, в свою очередь, дала представление об общем состоянии белка, о степени кооперативности перехода из нативного в денатурированное состояние. И главное о степени влияния денатуранта на третичную структуру.

Часть кинетических кривых представлена на рис.24

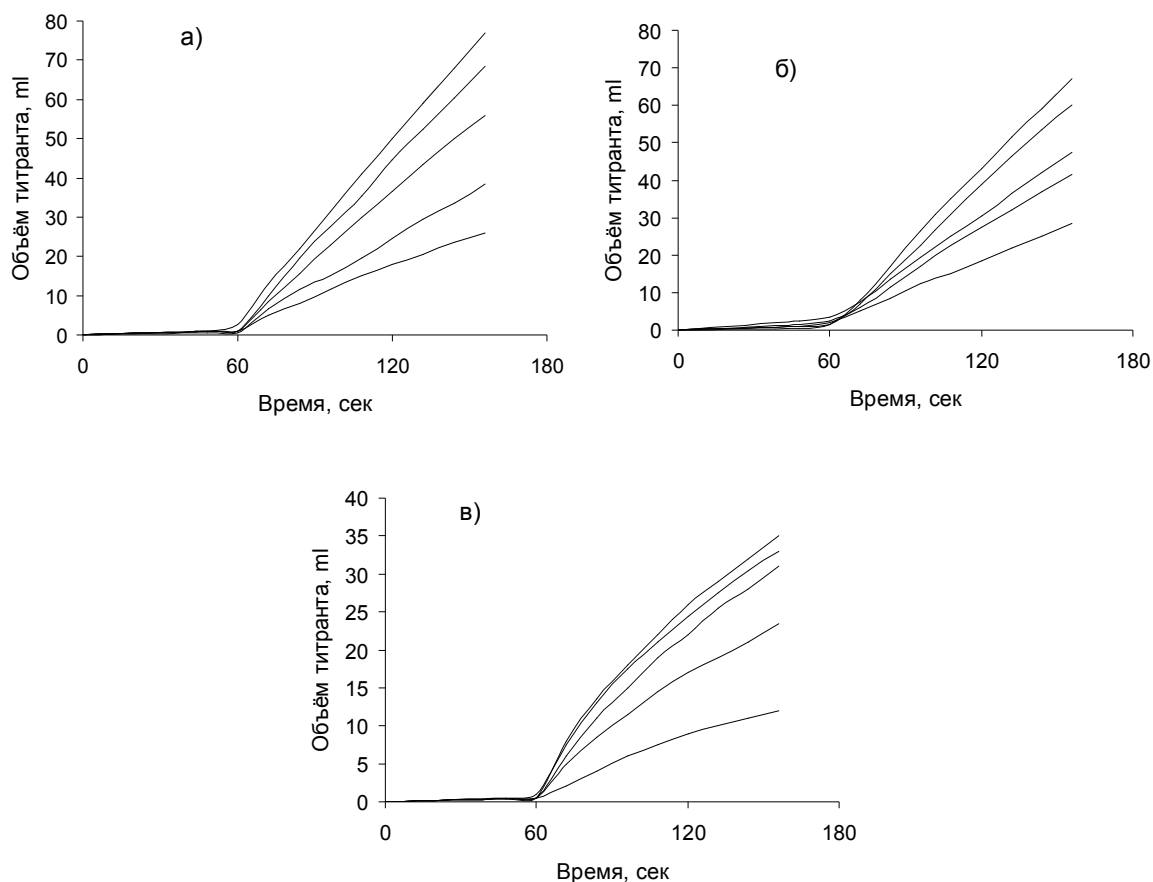


Рисунок 24. Кинетические кривые гидролиза АТЭЕ α -химотрипсином в присутствии а) 4М мочевины, б) 5М и в) 6М; концентрация субстрата 0.0125М, 0.025М, 0.05М, 0.1М и 0.2М (снизу вверх на каждом из графиков)

Начальные, почти горизонтальные участки кривых (первые 60 секунд), представляют собой фоновые записи, и исключались из расчётов. Перед каждым экспериментом готовился раствор свежего фермента в 10^{-3} М растворе HCl, который порциями в 5 мкл непосредственно вводился в рабочую ячейку объёмом 5мл. Точка перегиба на кинетических кривых соответствует моменту ввода фермента в ячейку

после записи начального фонового участка. Рабочие растворы в ячейке готовились с разными концентрациями субстрата, а именно 0.0125M, 0.025M, 0.05M, 0.1M и 0.2M. Замеры кинетики проводились при значении pH 8.5.

Выбор денатуранта в данном случае был определён тем, что молекулы мочевины, будучи довольно полярными, но незаряженными [136], не взаимодействуют именно с поверхностными группами глобулярных белков, а скорее образуют сеть водородных связей молекул воды и групп доноров и акцепторов водородных связей на поверхности белка во всех конформационных состояниях [126,132,137]. Кроме того, денатурирующее действие мочевины включает в себя и то, что она разрушает специфические и энергетически предпочтительные взаимодействия типа вода-вода сети граничных водородных связей, возможных в нативном состоянии [129], поэтому она прямо не изменяет гидрофобные взаимодействия кармана α -химотрипсина с группами тирозина АТЭЕ.

Ферментативная активность α -химотрипсина в отношении эфирного субстрата АТЭЕ была проверена в присутствии 0, 2, 4, 5, 6 и 7M мочевины, во вспомогательном электролите 0.05 M NaCl, используемом в большинстве случаев. Для сравнения также получены результаты в присутствии 0.5M CaCl₂ (соли, которая, как известно, стабилизирует α -СТ [134,135]). Наклон кривой титрования является мерой скорости реакции. Как видно из них, максимальная скорость реакции достигается в начале. Потом идёт уменьшение скорости по мере расходования субстрата и разбавления его титрантом.

Для получения кинетических характеристик измерялись наклоны начальных участков кривых, на основе которых строились графики в координатах Лайнуивера-Берка (см. рис.25)

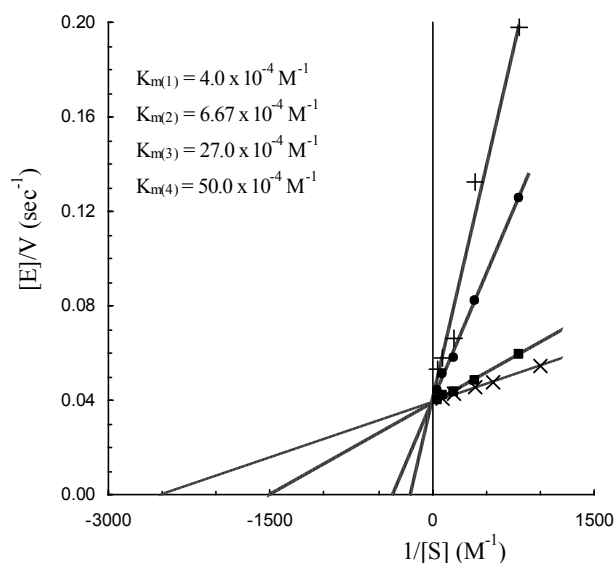


Рисунок 25. График катализа α -химотрипсином гидролиза АТЭЕ в присутствии (справа, снизу вверх) 0 (в 0.5 M CaCl₂), 0, 4 и 6 M мочевины, в 0.05 NaCl, pH 8.5 во всех случаях.

Полученные значения кинетических констант показаны в таблице 5. В диапазоне концентраций мочевины от 0 до 6 M реакция протекала по кинетической схеме Михаэлиса-Ментен, что выражается в следующих фактах:

1. Кривизна кинетических кривых определялась главным образом уменьшением концентрации субстрата непосредственно в ходе гидролиза и инструментально контролируемом разбавлении из-за добавления титранта (NaOH).
2. Увеличение кривизны кинетических кривых было связано с увеличением константы Михаэлиса, которая для данной исследуемой системы представляет собой константу равновесия для диссоциации нековалентного, “предшествующего” фермент-субстратного комплекса и пропорциональна ей [69, 133-135].

Таблица 5. Кинетические константы гидролиза АТЭЕ α -химотрипсином в присутствии различных концентраций мочевины.

Концентрация мочевины, М/л	k_M, M^{-1}	k_{cat}, s^{-1}
0 (CaCl ₂ 0.5 М)	4.0×10^{-4}	26
0 (NaCl 0.05 М)	6.67×10^{-4}	25
4 (NaCl 0.05 М)	2.7×10^{-3}	25
6 (NaCl 0.05 М)	5.0×10^{-3}	24

В итоге, результаты наших кинетических исследований в пределах концентрации мочевины от 0 до 6 М указали на постепенное повышение $K_{M(каж)}$, приближающейся к значению 5×10^{-3} М без нарушения кинетической схемы Михаэлиса-Ментен. Для сравнения, при более высоких концентрациях мочевины (7М) имелось нарушение этой схемы, выявляющееся в слишком высокой кривизне кинетических кривых, что являлось следствием растянутой во времени инактивации (в результате денатурации) α -химотрипсина после переноса его из хранимого запаса раствора (не содержащего мочевины) в рабочий, содержащий 7М мочевины. Однако, при данной температуре в нашем эксперименте (25 °С) описанная выше инактивация (полная денатурация) оказалась, по крайней мере частично, обратимой. Это видно в другом эксперименте, при инкубации α -химотрипсина в растворе 7 М мочевины с последующим переносом в рабочий раствор без мочевины обнаружилось почти полное (хотя и растянутое на несколько минут) восстановление каталитической активности α -химотрипсина. При этом кинетические кривые имели общий вид, показанный на рис.26.

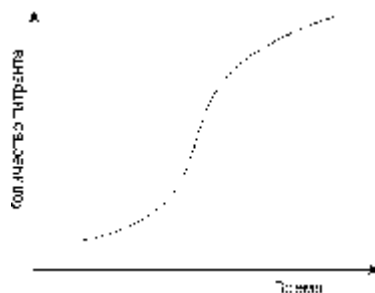


Рисунок 26. Восстановление ферментативной активности α -химотрипсина

Калориметрические эксперименты проводились при максимальной скорости прогрева 2 °С/мин, доступной на приборе ДАСМ-4А. Это делалось для того, чтобы максимально избежать “уменьшения” тепла денатурации из-за сопровождающих необратимых процессов агрегации [138,139]. Концентрация белка во всех калориметрических экспериментах была 1мг/мл, концентрация соли NaCl была 0.05

М. Нужное значение рН устанавливалось при помощи фосфатного (рН 3) или боратного (рН 8,5) буферов.

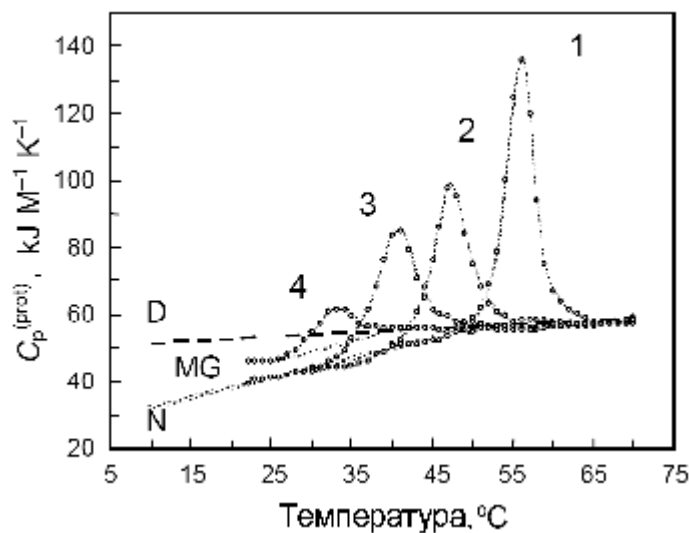


Рисунок 27. Термограммы тепловой денатурации α -химотрипсина в присутствии 0 (1), 2 (2), 3 (3) и 5 (4) М мочевины, в 0.05 М NaCl, рН 3.5 (фосфатный буфер, для объяснения см. текст и таблицу 6). Символами обозначены N – нативное, MG – молтен глобула, D – денатурированное состояние.

Кроме этого, были проведены и контрольные эксперименты без добавки буферов (перед заполнением камеры калориметра рН раствора подгонялось к 8,5). На рис.27 показаны термограммы, полученные при рН 3.5 (в фосфатном буфере). Результаты, полученные при рН 8.5 (в боратном буфере) показали похожее поведение (не показано), хотя и были искажены из-за, предположительно, явлений агрегации молекул белка.

Во всех изученных случаях калориметрические эндотермические пики термограмм, указывающие на кооперативную схему денатурации, расширялись при более высоких концентрациях мочевины, когда достигались некоторые критические пределы, 5-6 М, в зависимости от рН. Все эти особенности показывают о приближении к состоянию молтен-глобулы [14,15,123-126,132]. Наконец, при последующих повышении концентрации мочевины пики исчезали совсем.

Калориметрические эксперименты показали следующее: и температура перехода в денатурированное состояние T_m (положение пика поглощения), и калориметрическая энтальпия денатурации ΔH_{cal} (площадь пика) постепенно уменьшались с увеличением концентрации мочевины вплоть до полного исчезновения пика поглощения при 6М (см. рис.27). Вант-Гоффовская энтальпия, вычисленная в соответствии с равенством [121,122,127,128]:

$$\Delta H_{VN} = 2 T_m R^{1/2} (\Delta C_p)_m^{1/2} M^{1/2}$$

где R – это газовая постоянная, $(\Delta C_p)_m$ – это изменение удельной теплоёмкости при денатурации белка (взятое на максимуме), а M – это масса белка, также уменьшалась. В таблицах 6 и 7 показаны величины калориметрических параметров при разных концентрациях мочевины и при двух разных рН.

Таблица 6. Термодинамические параметры тепловой денатурации α -химотрипсина в присутствии различных концентраций мочевины (рН 3.5, фосфатный буфер).

Концентрация мочевины М/л	$T_m, K (^{\circ}C)$	$\Delta T, deg$	$\Delta C_p J/g K$	$\Delta H_{cal} kJ/M$	$\Delta H_{VH} kJ/M$	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$
0	329.4 (56.4)	4.5	3.3	421	608	0.70
2	320 (47)	6.0	1.4	307	462	0.66
3	314 (41)	6.4	1.4	263	384	0.68
3.5	310 (37)	6.7	1.35	253	368	0.68
4	307 (34)	9.4	0.66	164	271	0.60
5	303 (30)	>10	0.3	123	164	0.75

Таблица 7. Термодинамические параметры тепловой денатурации α -химотрипсина в присутствии различных концентраций мочевины (рН 8.5, боратный буфер).

Концентрация мочевины М/л	$T_m, K (^{\circ}C)$	$\Delta T, deg$	$\Delta C_p J/g K$	$\Delta H_{cal} kJ/M$	$\Delta H_{VH} kJ/M$	$\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$
0	321.5 (48.5)	7.6	4.0	671	458	1.50
2	318 (45)	7.5	3.5	630	416	1.50
4	312 (39)	7.2	1.9	359	376	0.95
5	309 (36)	7.9	1.04	182	402	0.45
6	306 (33)	10	0.24	46	356	0.13

Основываясь только на калориметрических результатах можно думать о полной денатурации α -химотрипсина уже при концентрации мочевины, равной 5-6 М. Однако, наши кинетические результаты показывают, что при этих концентрациях мочевины каталитическая активность α -химотрипсина, представленная каталитической константой, сохраняется и соответствует схеме Михаэлиса-Ментен.

Очевидно, что термограммы характеризуют поведение белковой глобулы в целом. В то время как кинетический метод даёт представление в первую очередь о каталитическом центре, об его активности. Мочевина в данном случае сравнительно мягко действует на белок в целом. И через общую структуру, естественно, и на каталитический центр. Поэтому при отсутствии пика поглощения, характеризующего кооперативный переход белка в денатурированное состояние, всё ещё наблюдается каталитическая активность. Пусть и в меньшей степени.

Возрастание K_M связано с искажением третичной структуры белка, при приближении к состоянию молтен-глобулы, характеризуя состояние каталитического центра. Очевидно, что при этом ухудшается связывание субстрата белком. В то же время, из наших результатов следует, что при концентрациях мочевины вплоть до 6 М (т.е., даже после полного исчезновения кооперативного пика на термограмме), конформационное состояние α -химотрипсина может быть рассмотрено всё ещё как состояние молтен-глобулы, несмотря на полное отсутствие кооперативности в ходе термоплавления. Наконец очевидно, что при концентрации мочевины 7 М, 25 $^{\circ}C$ достигается денатурированное состояние, которое, тем не менее, может быть обратно трансформировано в нативное путём "вымывания" мочевины (см. рис.26).

Глава 4.2 Результаты исследования карбоксипептидазы А.

Для исследования карбоксипептидазы А были выбраны условия, обсуждаемые в литературе [140]. Было использовано два субстрата, пептидный Hip-L-Phe (Hippuryl-L-phenylalanine) и эфирный O-Hip-L-Phe (O-Hippuryl-L- β -pheyllactic acid-sodium salt), что дало более полное представление о катализе карбоксипептидазой А. Как известно, гидролиз этих двух типов субстратов существенно отличаются [69], что и подтвердилось на практике. В частности было замечено, что на кинетические параметры, характеризующие реакцию, существенное влияние оказывает начальная концентрация субстрата, как пептидного, так и эфирного. Это служит препятствием для обработки полученных кривых традиционным методом начальных участков (см. например главу и рН-метрии). Этот факт проиллюстрирован на рис.28 и 29 (данные измерения проводились на спектрографе CARY 3).

Очевидно, что метод начальных участков не даст приемлемых значений кинетических постоянных, K_M и k_{cat} из-за нелинейной зависимости $1/V$ от $1/[S]$. Отсюда был сделан вывод о необходимости измерений при постоянном значении суммы концентраций субстрата и продукта, оказывающих очевидно значительное влияние на поведение данного фермента.

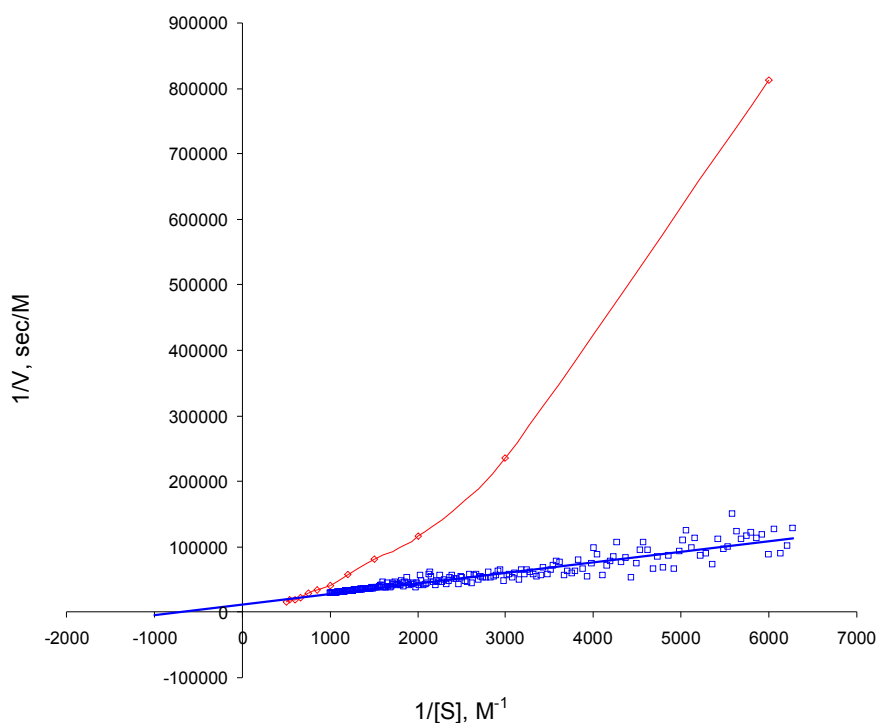


Рисунок 28. Полученные на спектрографе CARY 3 кинетические данные в координатах Лайнуивера-Берка для гидролиза Hip-L-Phe карбоксипептидазой А, обработанные методом начальных участков (красный график). Для сравнения синим показана зависимость, полученная при компьютерном анализе (подгонке).

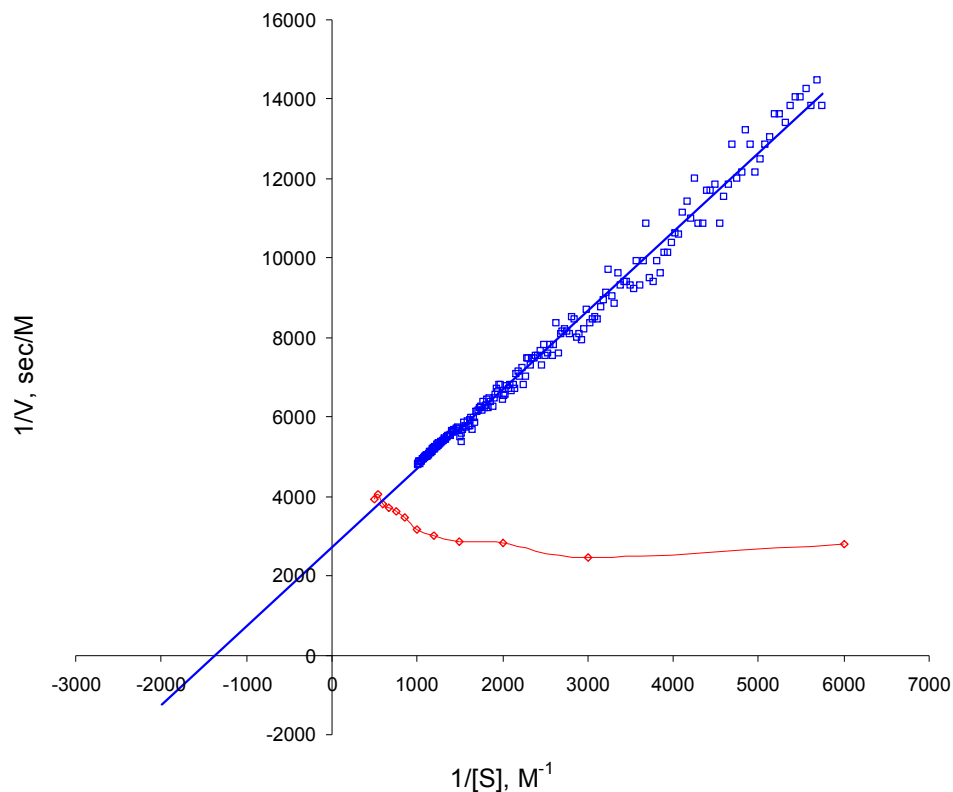


Рисунок 29. Полученные на спектрографе CARY 3 кинетические данные в координатах Лайнуивера-Берка для гидролиза O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой A, обработанные методом начальных участков (красный график). Для сравнения синим показана зависимость, полученная при компьютерном анализе (подгонке).

Кинетические измерения методом остановленной струи были проведены при длине волн 260 нм, где наблюдалось приемлемое изменение поглощения в ходе гидролиза. На рис.30 и 31 приведены графики полученных изменений концентрации продукта во времени при различных температурах.

Далее на рис.32-36 показаны кривые, иллюстрирующие влияние мочевины и гуанидингидрохлорида на кинетику гидролиза обоих субстратов.

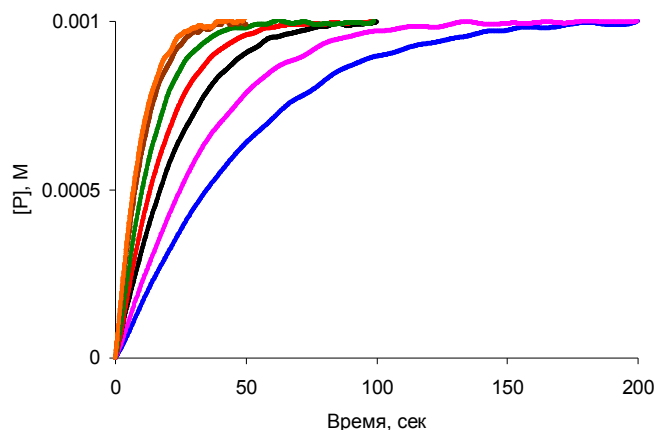


Рисунок 30. Гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой A. Зависимость концентрации продукта от времени. Кривые получены при 15°C (синяя), 20°C (розовая), 25°C (чёрная), 30°C (красная), 35°C (зелёная), 40°C (коричневая) и 45°C (оранжевая) соответственно.

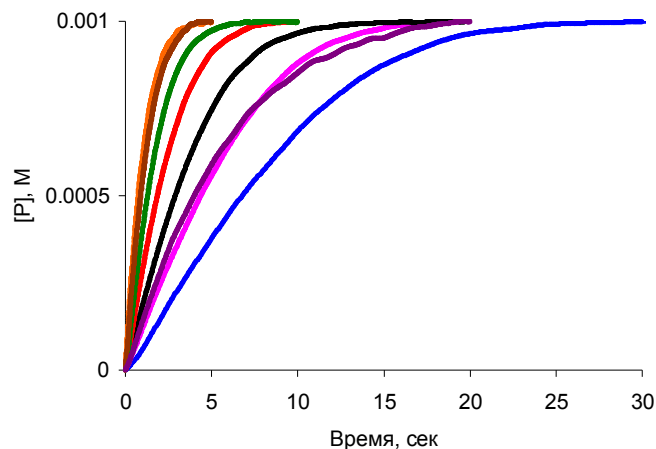


Рисунок 31. Гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой А. Зависимость концентрации продукта от времени. Кривые получены при 15°С (синяя), 20°С (розовая), 25°С (чёрная), 30°С (красная), 35°С (зелёная), 40°С (коричневая), 45°С (оранжевая) и 50°С (пурпурная) соответственно.

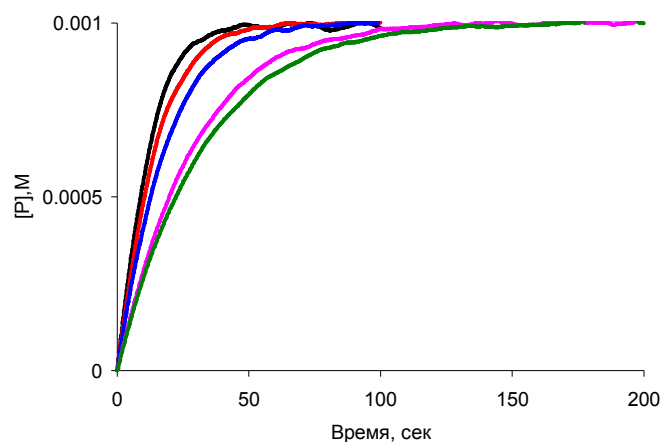


Рисунок 32. Влияние мочевины на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°С. Кривые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без мочевины (чёрная).

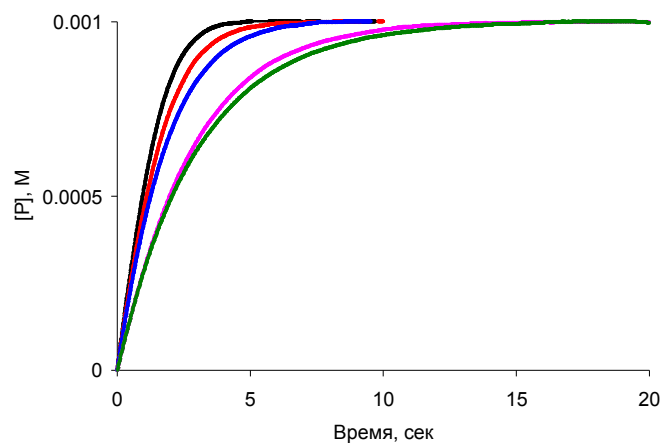


Рисунок 33. Влияние мочевины на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°С. Кривые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без мочевины (чёрная).

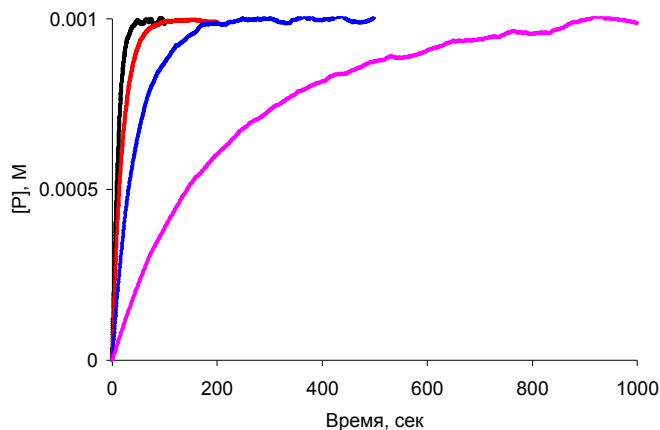


Рисунок 34. Влияние гуанидин гидрохлорида (*GuanHCl*) на гидролиз *Hip-L-Phe* карбоксипептидазой А при 25°C. Кривые получены с 1.5М (розовая), 1М (синяя), 0.5М (красная) и без *GuanHCl* (чёрная).

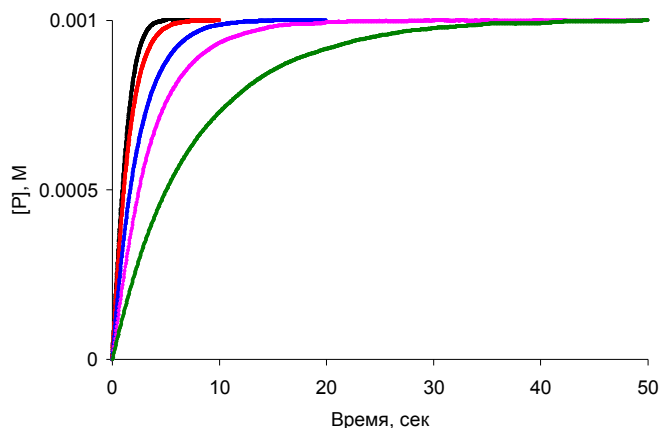


Рисунок 35. Влияние гуанидин гидрохлорида (*GuanHCl*) на гидролиз *O-Hip-L-Phe* карбоксипептидазой А при 25°C. Кривые получены с 2М (зелёная), 1.5М (розовая), 1М (синяя), 0.5М (красная) и без *GuanHCl* (чёрная).

Ясно, что гидролиз пептидного субстрата протекает значительно медленнее, чем эфирного. Кроме того, кривые гидролиза пептидного субстрата были получены с более выраженными шумами. Тем не менее, основные выводы всё же были сделаны. Судя по всему воздействие критических факторов (высоких концентраций денатурантов либо высоких температур) на гидролиз пептидного субстрата выражено сильнее. В частности, при 50°C пептидазная активность фермента принимала в значительной степени искажённую форму (здесь и далее такие “предельные” кривые не представлены).

Дестабилизирующее влияние мочевины (рис.32, 33) и гуанидингидрохлорида (рис.34, 35) на кинетику гидролиза обоих субстратов очевидно. Причём степень деструктивного влияния денатурантов, особенно гуанидингидрохлорида, на гидролиз пептидного субстрата также выше, как и в случае влияния высоких температур (см. рис.30, 31). Данные денатуранты по-видимому влияют на структуру белка в целом, не оказывая непосредственного влияния на каталитический центр. Разница в поведении карбоксипептидазы А по отношению к пептидному и эфирному субстратам ещё больше проявляется при исследовании влияния агентов, таких как триметиламин-N-оксида (ТМАО) (рис.36, 37), саркозин (рис.38, 39). Следует ещё раз

отметить, что все серии были проведены в присутствии 0.5M NaCl. Отдельно было изучено влияние различных концентраций NaCl на кинетику данных реакций (рис.40, 41).

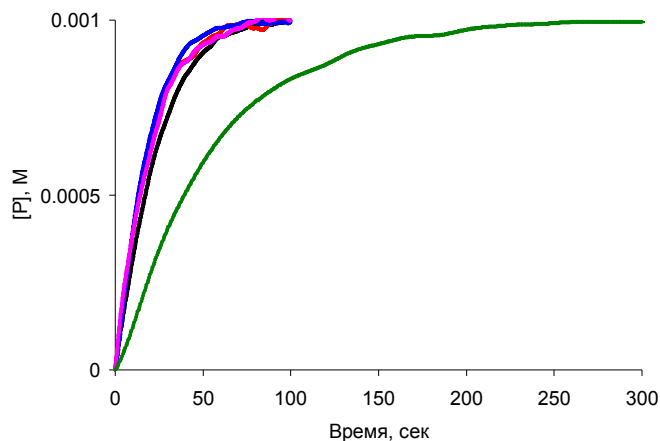


Рисунок 36. Влияние ТМАО на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Кривые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без ТМАО (чёрная).

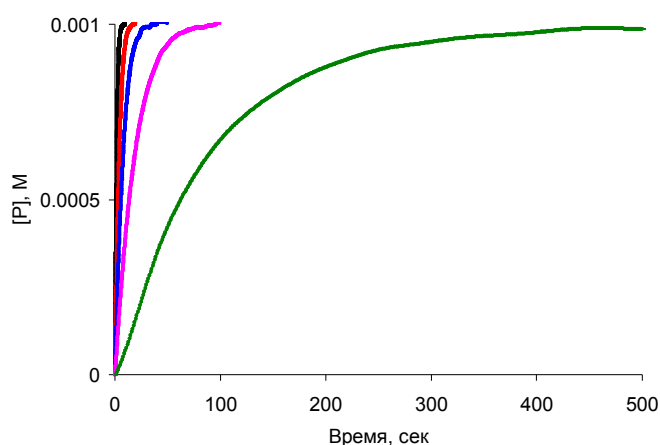


Рисунок 37. Влияние ТМАО на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Кривые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без ТМАО (чёрная).

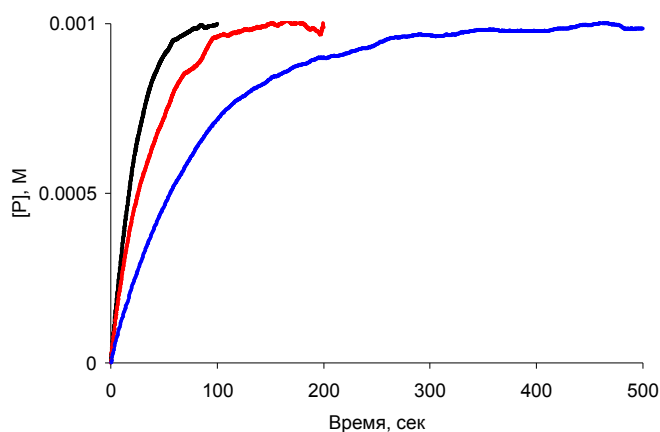


Рисунок 38. Влияние саркозина на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Кривые получены с 2М (синяя), 1М (красная) и без саркозина (чёрная).

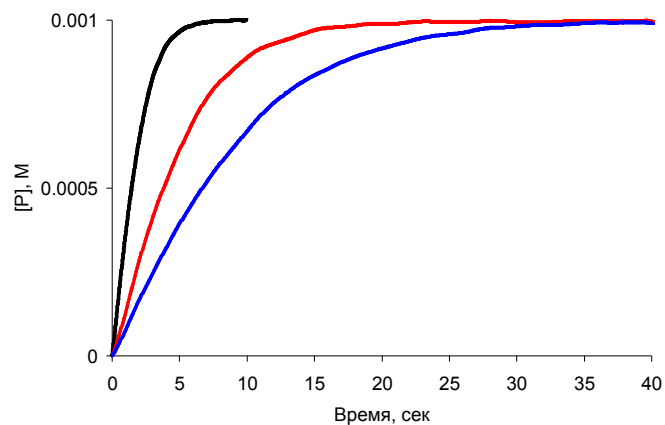


Рисунок 39. Влияние саркозина на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой A при 25°C. Кривые получены с 2M (синяя), 1M (красная) и без саркозина (чёрная).

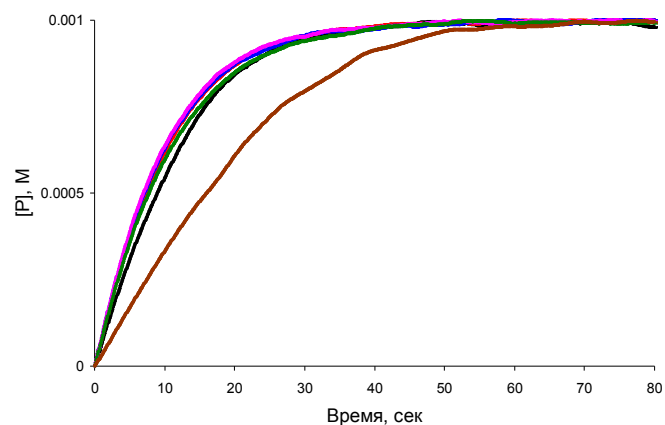


Рисунок 40. Влияние NaCl на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой A при 25°C. Кривые получены с 2.5M (зелёная), 2M (розовая), 1.5M (синяя), 1M (красная), 0.5M (чёрная) и с 0.01M NaCl (коричневая).

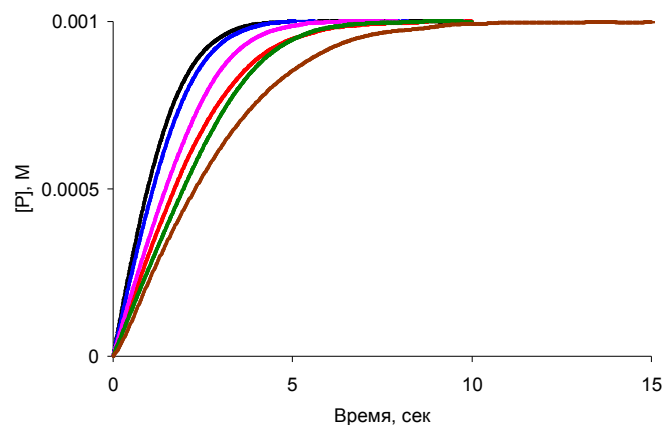


Рисунок 41. Влияние NaCl на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой A при 25°C. Кривые получены с 2.5M (зелёная), 2M (розовая), 1.5M (синяя), 1M (красная), 0.5M (чёрная) и с 0.01M NaCl (коричневая).

Для наглядности данные по всем сериям (рис.30-41) представлены ниже в координатах Лайнуивера-Берка. На рисунках 42, 43 представлены результаты температурных экспериментов.

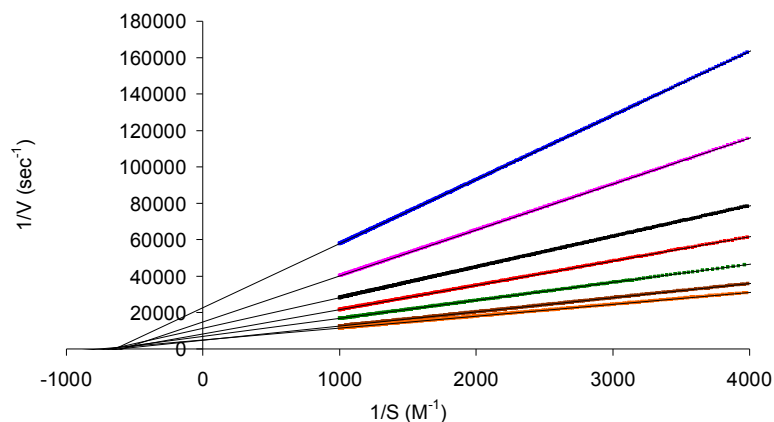


Рисунок 42. Гидролиз *Nip-L-Phe* карбоксипептидазой А в координатах Лайнуивера-Берка. Прямые получены при 15°C (синяя), 20°C (розовая), 25°C (чёрная), 30°C (красная), 35°C (зелёная), 40°C (коричневая) и 45°C (оранжевая) соответственно.

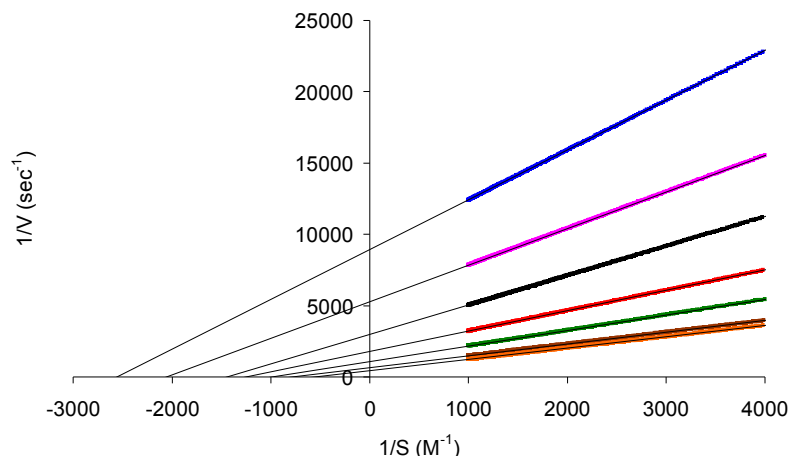


Рисунок 43. Гидролиз *O-Nip-L-Phe* карбоксипептидазой А в координатах Лайнуивера-Берка. Прямые получены при 15°C (синяя), 20°C (розовая), 25°C (чёрная), 30°C (красная), 35°C (зелёная), 40°C (коричневая) и 45°C (оранжевая) соответственно.

Гидролиз пептидного субстрата (рис.42) характеризуется практически постоянным значением константы Михаэлиса K_M , которую находят из пересечения прямой с осью $1/S$. Константа Михаэлиса в случае эфирного субстрата с повышением температуры увеличивается, причём в значительной степени, что говорит о том, что связывание этого субстрата ферментом при повышении температуры улучшается. Пересечение прямой с осью $1/V$ даёт представление о максимальной скорости реакции, а значит о каталитической константе k_{cat} . В свете представлений об увеличении лабильности белковой глобулы с повышением температуры заметное увеличение скорости реакции с обоими субстратами выглядит вполне логично. Однако следует иметь в виду, что отклонения от такого ожидаемого поведения также вполне оправданы при неких критических значениях

температуры, имея в виду температурное разрушение третичной структуры белка. Неактивное состояние белка наступает уже при $\sim 50^{\circ}\text{C}$.

Влияние добавочных агентов на катализ проиллюстрировано в координатах Лайнуивера-Берка на рис.44-53.

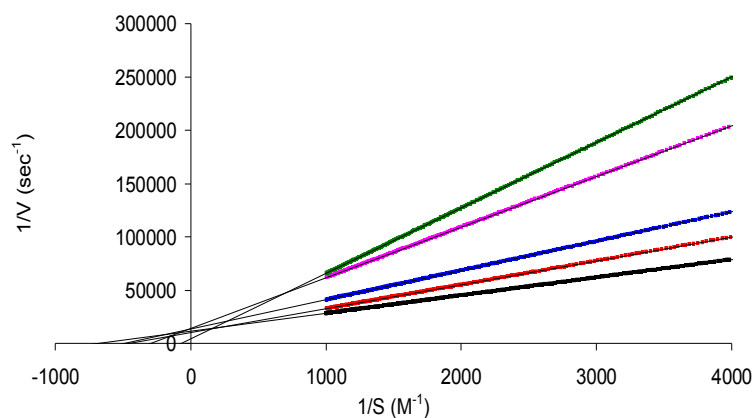


Рисунок 44. Влияние мочевины на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без мочевины (чёрная).

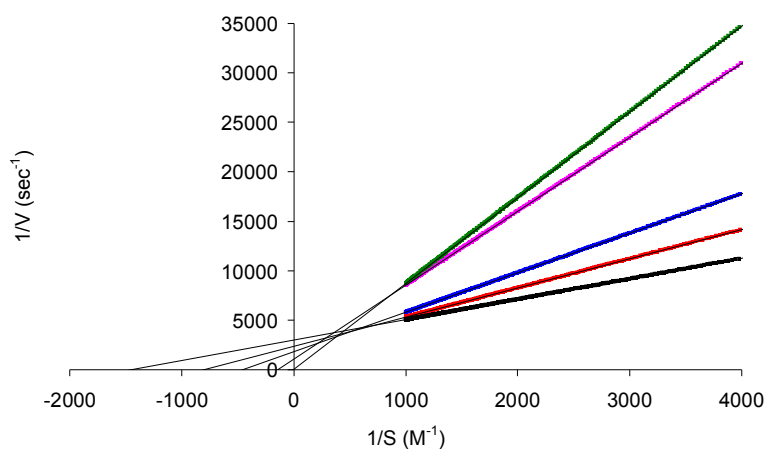


Рисунок 45. Влияние мочевины на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без мочевины (чёрная).

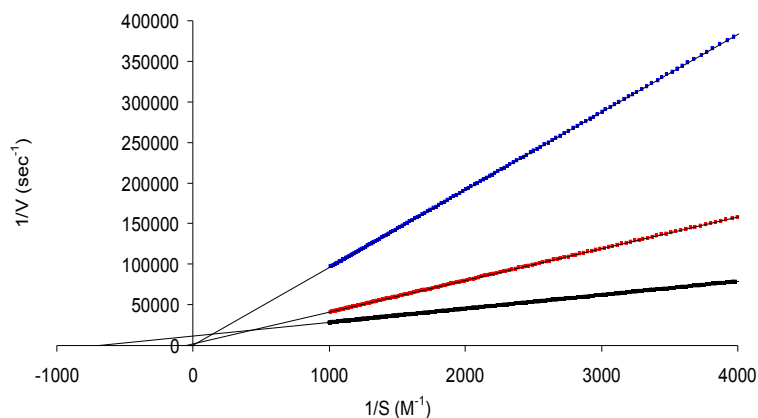


Рисунок 46. Влияние гуанидин гидрохлорида (GuanHCl) на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 1М (синяя), 0.5М (красная) и без GuanHCl (чёрная).

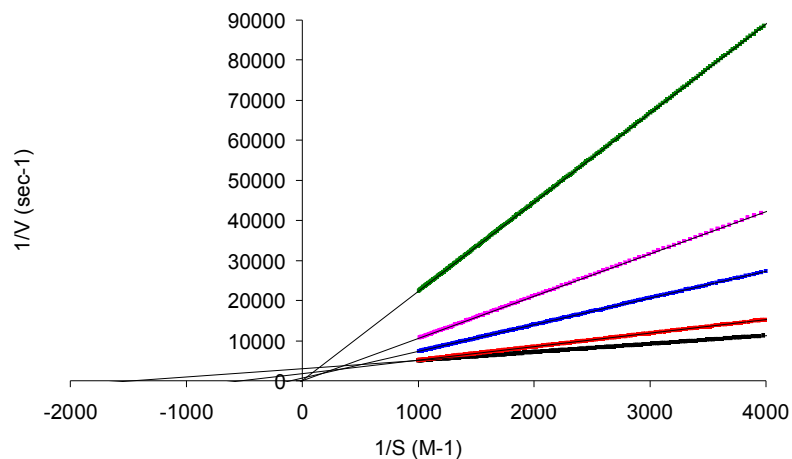


Рисунок 47. Влияние гуанидин гидрохлорида (GuaHCl) на гидролиз O-Nip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 2М (зелёная), 1.5М (розовая), 1М (синяя), 0.5М (красная) и без GuaHCl (чёрная).

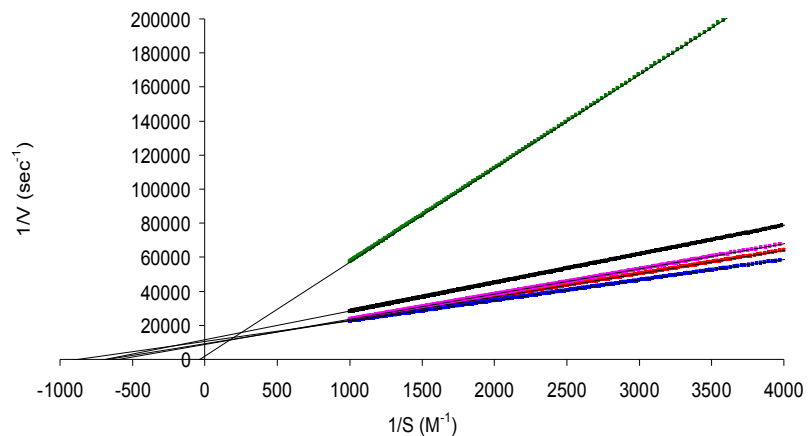


Рисунок 48. Влияние ТМАО на гидролиз Nip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без ТМАО (чёрная).

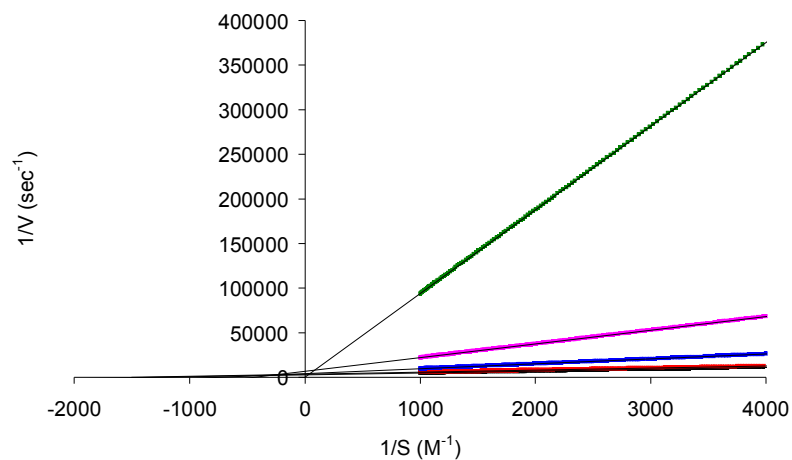


Рисунок 49. Влияние ТМАО на гидролиз O-Nip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C . Прямые получены с 4М (зелёная), 3М (розовая), 2М (синяя), 1М (красная) и без ТМАО (чёрная).

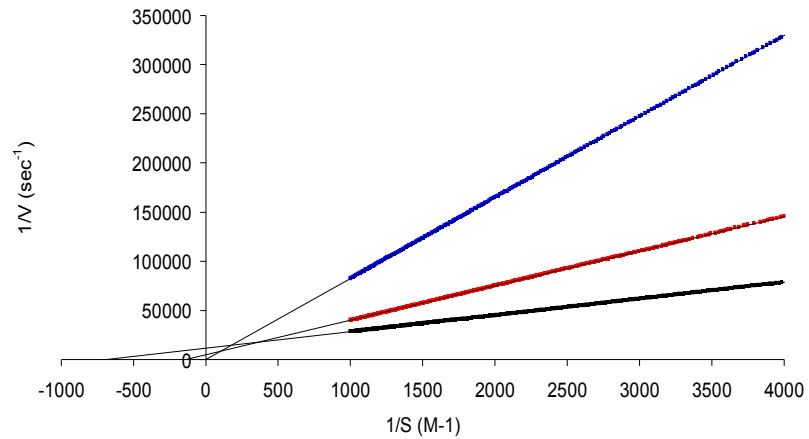


Рисунок 50. Влияние саркозина на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Прямые получены с 2М (синяя), 1М (красная) и без саркозина (чёрная).

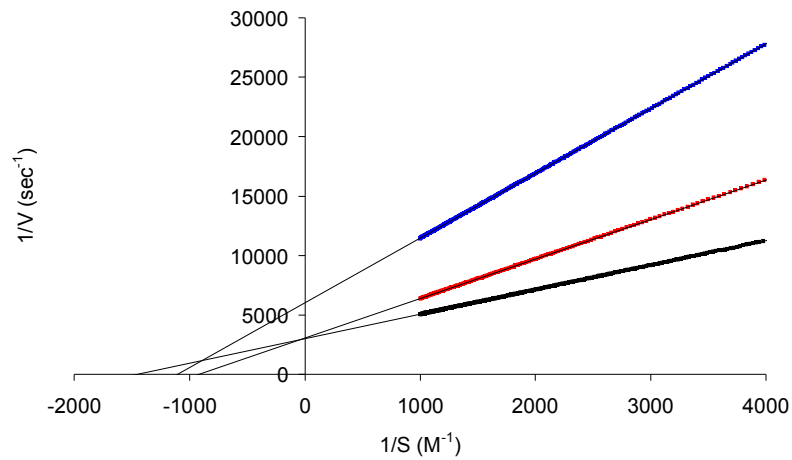


Рисунок 51. Влияние саркозина на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Прямые получены с 2М (синяя), 1М (красная) и без саркозина (чёрная).

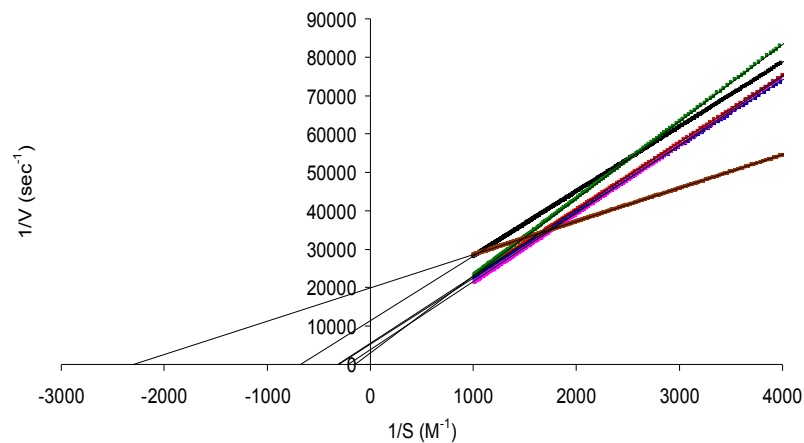


Рисунок 52. Влияние NaCl на гидролиз Hip-L-Phe карбоксипептидазой А при 25°C. Прямые получены с 2.5М (зелёная), 2М (розовая), 1.5М (синяя), 1М (красная), 0.5М (чёрная) и с 0.01М NaCl (коричневая).

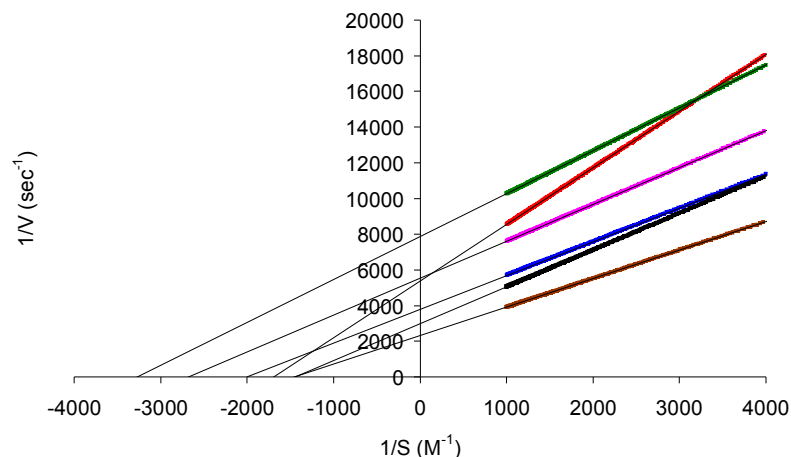


Рисунок 53. Влияние NaCl на гидролиз O-Hip-L-Phe карбоксипептидазой A при 25°C. Прямые получены с 2.5M (зелёная), 2M (розовая), 1M (синяя), 0.5M (чёрная) и с 0.01M NaCl (коричневая).

Воздействие гуанидингидрохлорида на пептидазную активность носит более деструктивный характер (см. рис.46, 47). В свою очередь, влияние ТМАО на эстеразную активность во всём диапазоне концентраций носит явно ухудшающий характер. В отличие от пептидазной активности, которая только лишь при 4M ТМАО стала ослабленной, а при более низких концентрациях ТМАО скорость гидролиза слегка увеличилась. Это, скорее всего, объясняется повышением жёсткости структуры глобулы фермента с повышением концентрации ТМАО. Следует отметить важную вещь, исходя из графиков в координатах Лайнуивера-Берка, при ухудшении связывания субстрата (при воздействии, например мочевины) ферментом одновременно увеличивается скорость реакции. Складывается ощущение, что глобула фермента “подстраивается” к новым условиям, стараясь поддерживать свою эффективную активность на нормальном уровне.

Используя компьютерный алгоритм, были получены кинетические константы, характеризующие катализ карбоксипептидазой A. Кроме того, были получены значения энергии активации и энтропии. Для этого использовались формула (47):

$$k_{cat} = A \exp\left(-\frac{G_a}{RT}\right) = -A \exp\left(\frac{E_a}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right) \quad (47)$$

Эти данные представлены в таблицах 8-17:

Таблица 8. Влияние мочевины на гидролиз пептидного субстрата карбоксипептидазой A при 25°C.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M , (sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	165.8	1.47E-03	1.13E+05	44.8	-50.1896
Buffer + 1M Urea	182.0	2.14E-03	8.51E+04	46.5	-53.723
Buffer + 2M Urea	140.6	2.03E-03	6.92E+04	36.6	-55.8702
Buffer + 3M Urea	133.0	3.32E-03	4.00E+04	40.7	-56.33
Buffer + 4M Urea	463.2	1.50E-02	3.09E+04	43.6	-45.9553

Таблица 9. Влияние мочевины на гидролиз эфирного субстрата карбоксипептидазой A при 25°C.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M , (sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	635.5	6.90E-04	9.21E+05	77.3	69.99933

Buffer + 1M Urea	798.0	1.24E-03	6.46E+05	78.2	74.70985
Buffer + 2M Urea	1046.1	2.20E-03	4.76E+05	77.8	75.7412
Buffer + 3M Urea	1746.0	6.86E-03	2.54E+05	106.7	177.028
Buffer + 4M Urea	34553.7	1.58E-01	2.19E+05	290.3	818.0354

Таблица 10. Влияние гуанидингидрохлорида на гидролиз пептидного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	165.8	1.47E-03	1.13E+05	44.8	-50.1896
Buffer + 0.5M Guanidinium	1074.7	2.21E-02	4.87E+04	35.8	-64.9715
Buffer + 1M Guanidinium	34750.1	1.75E+00	1.99E+04	55.1	28.5344

Таблица 11. Влияние гуанидингидрохлорида на гидролиз эфирного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	S_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	635.5	6.90E-04	9.21E+05	77.3	69.99933
Buffer + 0.5M Guanidinium	1092.0	1.94E-03	5.64E+05	79.4	81.33288
Buffer + 1M Guanidinium	3126.6	1.10E-02	2.85E+05	77.9	85.07357
Buffer + 1.5M Guanidinium	267018.0	1.48E+00	1.80E+05	56.4	50.15359

Таблица 12. Влияние ТМАО на гидролиз пептидного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	165.8	1.47E-03	1.13E+05	44.8	-50.1896
Buffer + 1M ТМАО	203.6	1.47E-03	1.38E+05	47.7	-38.7909
Buffer + 2M ТМАО	178.0	1.12E-03	1.58E+05	50.8	-29.6203
Buffer + 3M ТМАО	215.7	1.68E-03	1.28E+05	56.1	-10.1348
Buffer + 4M ТМАО	728.7	2.11E-02	3.46E+04	61.2	17.08432

Таблица 13. Влияние ТМАО на гидролиз эфирного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	635.5	6.90E-04	9.21E+05	77.3	69.99933
Buffer + 1M ТМАО	556.5	6.78E-04	8.20E+05	75.2	61.67134
Buffer + 2M ТМАО	457.3	1.32E-03	3.46E+05	77.3	67.10106
Buffer + 3M ТМАО	280.0	2.26E-03	1.24E+05	79.4	70.27865
Buffer + 4M ТМАО	35990.4	1.77E+00	2.03E+04	65.5	63.92786

Таблица 14. Влияние саркозина на гидролиз пептидного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	165.8	1.47E-03	1.13E+05	44.8	-50.1896
Buffer + 1M Sarcosine	409.8	7.61E-03	5.38E+04	46.2	-38.0622
Buffer + 2M Sarcosine	44757.7	1.94E+00	2.30E+04	46.1	0.701168

Таблица 15. Влияние саркозина на гидролиз эфирного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Buffer	635.5	6.90E-04	9.21E+05	77.3	69.99933
Buffer + 1M Sarcosine	620.1	1.08E-03	5.73E+05	75.9	64.87849
Buffer + 2M Sarcosine	316.1	9.07E-04	3.49E+05	76.7	62.10326

Таблица 16. Влияние NaCl на гидролиз пептидного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M ,(sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Tris + 0.01M NaCl	94.9	4.32E-04	2.20E+05	44.8	-31.5941
Tris + 0.5M NaCl (Buffer)	165.8	1.47E-03	1.13E+05	51.8	-50.1896

Tris + 1M NaCl	348.9	3.20E-03	1.09E+05	52.8	-17.2098
Tris + 1.5M NaCl	374.7	3.39E-03	1.10E+05	55.3	-8.38078
Tris + 2M NaCl	543.1	5.08E-03	1.07E+05	70.3	45.10255
Tris + 2.5M NaCl	593.2	6.25E-03	9.49E+04	77.0	68.32094

Таблица 17. Влияние NaCl на гидролиз эфирного субстрата карбоксипептидазой А при 25°С.

Solution	k_{cat} , sec ⁻¹	K_M , M	k_{cat} / K_M , (sec*M) ⁻¹	E_a , kJ·mol ⁻¹	ΔS_a , J·K ⁻¹ ·M ⁻¹
Tris + 0.01M NaCl	818.5	6.87E-04	1.19E+06	77.4	72.22022
Tris + 0.5M NaCl (Buffer)	635.5	6.90E-04	9.21E+05	77.3	69.99933
Tris + 1M NaCl	352.9	5.90E-04	5.98E+05	78.2	68.04922
Tris + 1.5M NaCl	496.2	4.91E-04	1.01E+06	76.7	65.99162
Tris + 2M NaCl	341.9	3.70E-04	9.22E+05	77.9	66.77854
Tris + 2.5M NaCl	240.9	3.05E-04	7.91E+05	78.4	65.46776

Полученные каталитические константы показали Аррениусовскую зависимость от температуры, в частности на рис.54-56 показаны некоторые аррениусовские графики в случае гидролиза эфирного субстрата.

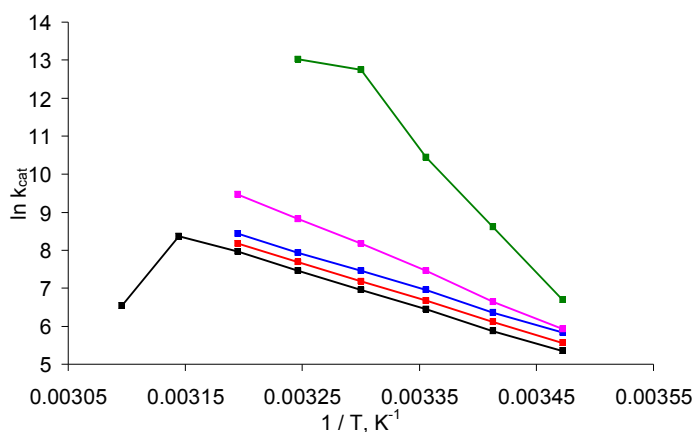


Рисунок 54. Зависимость $\ln k_{cat}$ от $1/T$ (Аррениусовская зависимость от температуры) в случае гидролиза эфирного субстрата O-Hip-L-Phe и в присутствии различных концентраций мочевины. А именно 4M (зелёная), 3M (розовая), 2M (синяя), 1M (красная) и без мочевины (чёрная).

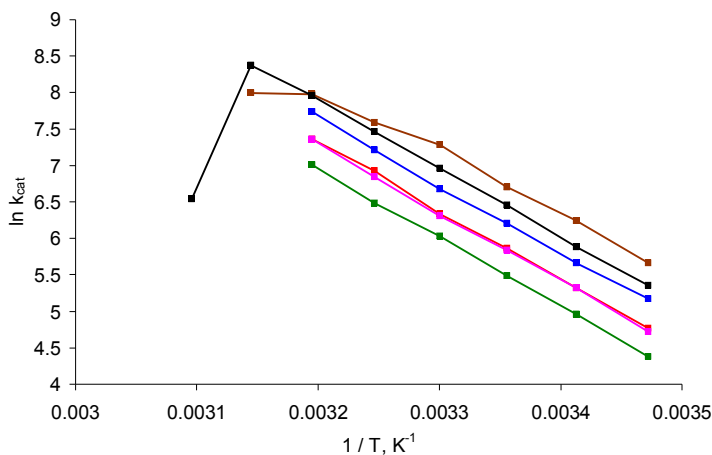


Рисунок 55. Зависимость $\ln k_{cat}$ от $1/T$ (Аррениусовская зависимость от температуры) в случае гидролиза эфирного субстрата O-Hip-L-Phe и в присутствии различных концентраций NaCl. А именно 2.5M (зелёная), 2M (розовая), 1.5M (синяя), 1M (красная), стандартной концентрации 0.5M (чёрная) и 0.01M (коричневая)

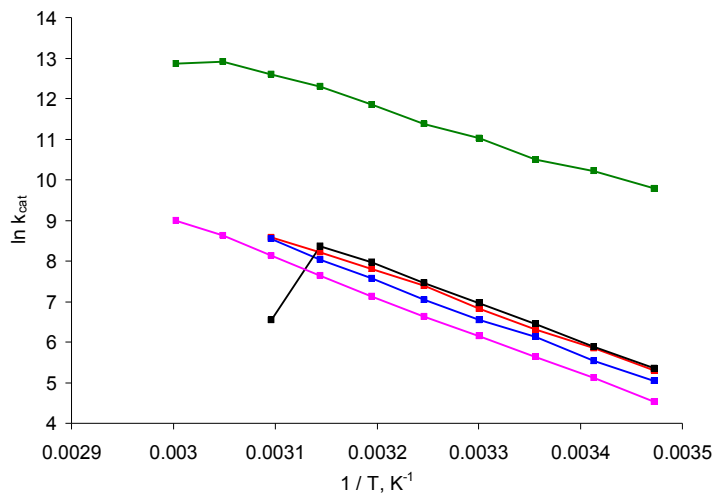


Рисунок 56. Зависимость $\ln k_{cat}$ от $1/T$ (Аррениусовская зависимость от температуры) в случае гидролиза эфирного субстрата *O-Nip-L-Phe* и в присутствии различных концентраций ТМАО. А именно 4M (зелёная), 3M (розовая), 2M (синяя), 1M (красная) и без ТМАО (чёрная).

На первый взгляд, влияние такого денатуранта как мочевины и влияние ТМАО качественно не особо отличаются (сравните рис.44, 45 и рис.48, 49), особенно в случае эфирного субстрата. Положение прямой зависимости по мере повышения концентраций добавок меняется в одинаковую сторону, характеризуя на первый взгляд похожее изменение кинетических констант. Например, в случае эфирного субстрата ухудшается связывание ферментом субстрата при одновременном увеличении скорости. Однако причины такого поведения совершенно разные. В отличие от разрушающего действия мочевины, воздействие ТМАО носит “укрепляющий” характер. Это проявилось хотя бы в том, что фермент под воздействием ТМАО вплоть до 55-60°C осуществлял каталитические функции (см. рис.54). В то время как в отсутствие этого стабилизатора фермент принимал неактивные формы уже при 45-50°C. Судя по графикам 44-53, а также сравнив значения констант из таблиц 7-17 между собой, можно сделать следующие выводы. Влияние таких агентов как мочевины или ТМАО на пептидазную активность карбоксипептидазы А не так сильно выражено, чем на эстеразную (каталитическая константа в случае пептидного субстрата меняется не столь сильно, как в случае эстеразного). Гуанидингидрохлорид, по-видимому, действует более деструктивно, чем мочевины. Более низкие концентрации этого вещества разрушают белковую глобулу, чем в случае мочевины. Причём в случае пептидного субстрата это влияние выражено больше. При этом следует принимать во внимание, что молекула мочевины не является полярной, а молекула гуанидингидрохлорида несёт заряд. Отсутствие NaCl в растворе ухудшает работоспособность молекул фермента. Эстеразная активность более чувствительна по отношению к этой соли.

Очевидны различия в поведении фермента по отношению к этим двум субстратам. Это является подтверждением того, что скорость определяющие стадии при гидролизе пептидов и эфиров разные. Что находится в соответствии со сказанным выше (см. главу 2.2). В противном случае было бы логично ожидать идентичности значений энтропии или энергии активации реакции расщепления пептидных или эфирных связей при прочих равных условиях. Это может быть подтверждением того, что пептидазный и эстеразный гидролиз протекают по-разному. Принимая во внимание данные о том, что химическая модификация

фермента или вытеснение иона металла по-разному сказываются на активности эстеразы и пептидазы [78, 144], можно предположить, что гидролиз эфиров протекает через образование ацилфермента, тогда как гидролиз пептидов – по механизму общего основного катализа, в котором роль катализатора выполняет остаток Glu270 [141-143]. В случае гидролиза пептидов карбонильная группа ориентирована к цинку, а вытесненная вода воздействует на субстрат когда Glu270 действует как основание. Tyr248 образует водородные связи с субстратом, помогая расщеплению пептидной связи. В случае связывания эфиров вода не вытесняется и Glu270 действует с помощью нуклеофильного механизма, при этом получается ангидрид, в то время как $Zn-H_2O$ действует как кислота. Роль Tyr248 в этом случае незначительна.

Глава 4.3 Результаты исследования азурина

Исследование азурина электрохимическим методом дало важные результаты в понимании электронно-конформационных взаимодействий. Эксперименты проводились с применением модифицированных золотых электродов. На поверхности электрода осаждались так называемые самоорганизующиеся монослои, состоявшие из цепочек вида $\text{Au-S-(CH}_2)_n\text{-CH}_3$ (n равнялось 4, 10 и 15). Азурин связывался с монослоями посредством гидрофобных взаимодействий, образуя связь с терминальными CH_3 группами.

В экспериментах использовалась циклическая сканирующая вольтамметрия с последующей программной обработкой сигнала. Типичные сигналы, полученные в результате сканирования, показаны на рис 57. Для определения константы переноса электрона сканирование проводилось с различными скоростями, от 5 до $60 \text{ V}\cdot\text{сек}^{-1}$.

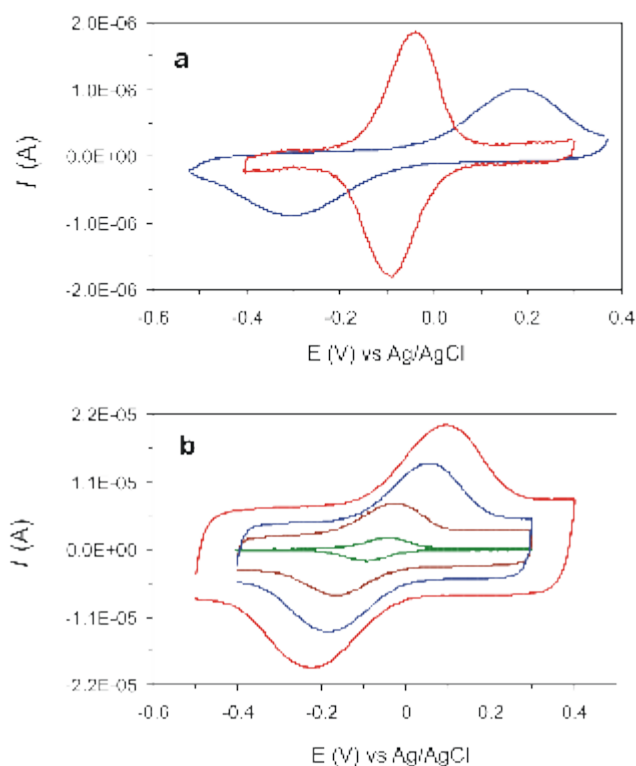


Рисунок 57. Экспериментальные вольтамограммы обмена электроном между азурином и модифицированным алканэтиольным монослоем золотым электродом с терминальной CH_3 группой. (А) (красная кривая) 1-пентанэтиол ($n=4$); (синяя кривая) n -гексадеканэтиол ($n=15$), скорость сканирования 5Vs^{-1} . (В) Типичные вольтамограммы обмена электронами между азурином и электродом с 1-унидеканэтиолом ($n=10$), скорости сканирования: 5, 20, 40 и 60Vs^{-1} (соответственно с повышением пиковых токов).

В дальнейшем полученные вольтамограммы были обработаны с помощью программы General Purpose Electrochemical System (GPES) и отдельно созданного алгоритма подгонки [149, 150].

Зависимость константы k^0 переноса электрона от расстояния (количества CH_2 групп) показала двойственный характер, а именно наличие адиабатического и неадиабатического механизма переноса электрона (см. рис.58), в согласии с опубликованными данными [145-148].

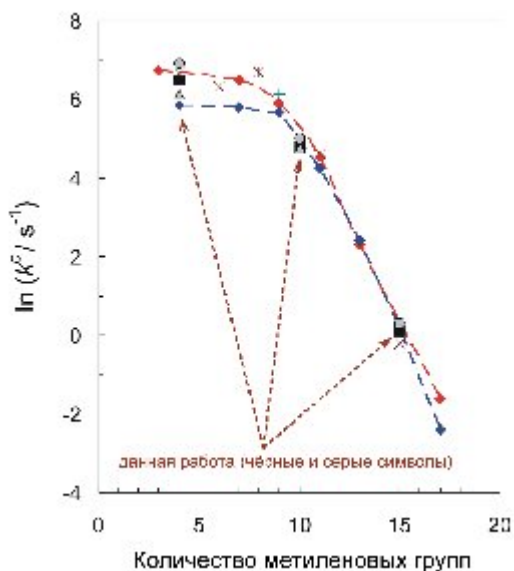


Рисунок 58. Зависимость одномолекулярной стандартной константы обмена электроном между азурином и золотым электродом от количества метиленовых групп на поверхности электрода (расстояние между азурином и металлом электрода): (красные ромбики) данные Гуо и сотр. [148]; (синие ромбики) Чи с сотр. [146]; (*) Йокояма и сотр. [147]; (+) Йокен и сотр. [145]; (•) нами полученные данные с азурином от Sigma при 2°С; (серые кружочки) то же самое при 25°С; (серые треугольники) азурин от Fluka.

Температурные исследования зависимости констант переноса от приложенных температур, а также больших давлений проиллюстрированы рисунками 59 и 60.

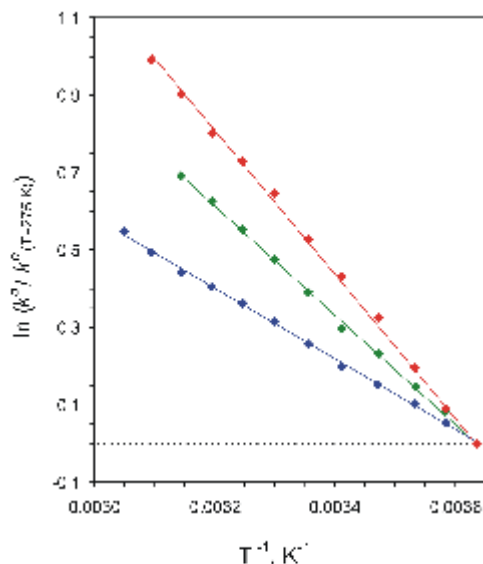


Рисунок 59. Аррениусовская зависимость одномолекулярной константы, нормированной по стандартному значению при 2°С для обмена электроном между азурином и покрытым монослоем золотым электродом: (красная прямая) $n=4$, (зелёная прямая) $n=10$, (синяя прямая) $n=15$. Погрешность совпадает по размеру с размерами символов.

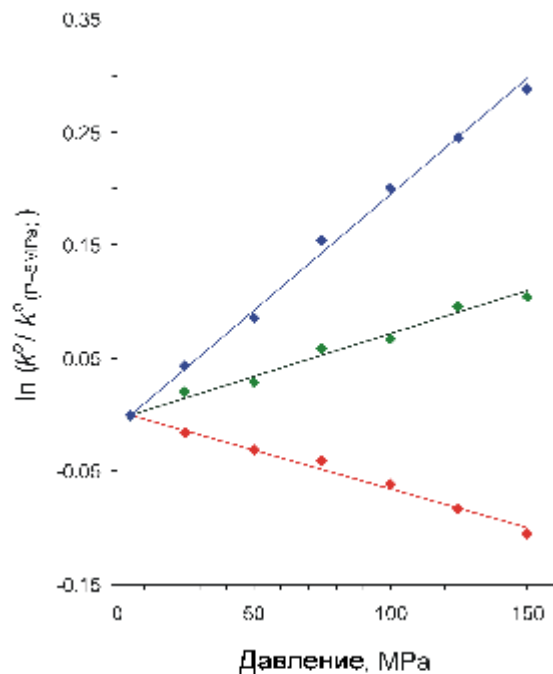


Рисунок 60. Зависимость одномолекулярной константы, нормированной по стандартному значению при 5 МПа от давления для обмена электроном между азурином и покрытым монослоем золотым электродом: (красная прямая) $n=4$, (зелёная прямая) $n=10$, (синяя прямая) $n=15$. Погрешность совпадает по размеру с размерами символов.

Полученные параметры приведены в таблице 18.

Таблица 18. Параметры, характеризующие перенос электрона между азурином и модифицированным золотым электродом.

n	$k^0, \text{s}^{-1} (25^\circ\text{C})$ $\pm 2\%$	$\Delta G_a^*(\lambda_0/4),$ kJ mol^{-1}	$\Delta H_{a(\text{EXP})},$ kJ mol^{-1}	$\Delta H_{a(n)},$ kJ mol^{-1}	$\Delta V_{a(\text{EXP})},$ $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$	$\Delta V_{a(n)},$ $\text{cm}^3 \text{mol}^{-1}$
4	1,098	7.2 ± 0.7	15.4 ± 2	7.8 ± 3.0	$+1.7 \pm 0.3$	$+4.2 \pm 0.6$
10	171	7.2 ± 0.7	11.7 ± 1.3	4.1 ± 1.5	-1.9 ± 0.3	$+2.1 \pm 0.6$
15	1.42	7.2 ± 0.7	7.6 ± 0.6	≈ 0	-5.1 ± 0.6	≈ 0

Итоги работы:

1. С помощью ряда кинетических методов, с целью изучения физической природы электронно-конформационных переходов в глобулярных белках с различными функциями было изучено влияние изменяемых реакционных сред на характерные кинетические параметры соответствующих процессов.
2. В случае глобулярного белка α -химотрипсина, обладающего эндопептидазной ферментативной активностью, методом рН-метрической титрации было исследовано влияние дестабилизирующей добавки мочевины на кинетические параметры, характеризующие гидролиз эфирного субстрата, и было проведено сравнение полученных результатов с результатами температурного влияния на тот же процесс.
3. Также методом дифференциальной сканирующей калориметрии было исследовано влияние мочевины на термическую стабильность α -химотрипсина, и было проведено сравнение полученных данных с результатами кинетических исследований.
4. В случае α -химотрипсина полученные результаты указывают на то, что увеличении концентрации мочевины в пределах от 0 до 5 М, в общем вызывают последовательную термодинамическую дестабилизацию белка, что также выражается в уменьшении стабильности фермент-субстратного комплекса (увеличении константы Михаэлиса). Эта среда не влияет на каталитическую константу процесса, что указывает на дестабилизированное, но всё ещё функционально активное состояние активного центра белка. Это состояние может быть охарактеризовано, как приближённое к состоянию молтен-глобулы.
5. Последующий комплексный анализ экспериментальных данных показал, что умеренное повышение температуры (в интервале, предшествующем денатурации), также как и значительное увеличение концентрации мочевины, вызывает состояние типа молтен-глобулы (температурно индуцированная молтен-глобула), что предположительно должно быть явлением, характерным для большинства глобулярных белков.
6. В случае обладающего экзопептидазной ферментативной активностью белка карбоксипептидазы А, кинетическим методом быстрого смешивания и с применением двух различных субстратов было изучено влияние стабилизирующих и дестабилизирующих добавок, а также влияние температуры на каталитическую и Михаэлиса константы.
7. Кинетические исследования с применением пептидного и эфирного субстратов выявили различия в механизмах тонкого подстраивания на начальном этапе процессов фермент-субстратных конформационных взаимодействий, что далее определяет различия в механизмах химических преобразований, то есть отличающихся электронно-конформационных преобразований
8. Кинетические исследования карбоксипептидазы А показали, что в случае гидролиза пептидного субстрата скорость катализа в основном определена преобразованиями химических степеней свободы (слабое электронно-конформационное сопряжение), в то же время каталитический процесс гидролиза эфирного субстрата связан как с химическими, так и с конформационными преобразованиями (сильное электронно-конформационное сопряжение).

9. В случае переносчика электрона, белка азурина, была применена техника самоорганизующихся на поверхности золотого электрода органических плёнок (монослоёв) и биоэлектрохимический метод.
10. В условиях варьирования температуры и давления было установлено, что в случае тонких органических плёнок энергия активации обмена электроном вблизи от электрода включает в себя компоненту, напрямую определяемую температурным фактором конформационной динамики белка, а объём активации процесса положительный. В случае плёной относительно средней толщины энергия активации процесса определяется только Франк-Кондоновским членом, а объём активации отрицателен. Этот результат указывает на два различных механизма электронного обмена и на характер различий электронно-конформационных взаимодействий при этом.

Использованная литература:

1. Kauzmann W., In: The Mechanism of Enzyme Action (McElroy W.D., Glass B., Eds), Baltimore, MD, 1954, p.70-120.
2. Брандтс Д., Структура и стабильность биологических макромолекул, 1973, Москва, "Мир" с. 174-254.
3. Лим В., Биофизика, 1974, т. 19, с.366.
4. Птицын О.Б., ДАН СССР, 1973, т.210, с.1213.
5. Georgopoulos C., Welch W.J., Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones, *Annu Rev. Cell Biol.*, 1993, v.9, p.601-634.
6. Hartl F.U., Hlodan R., Langer T., Molecular chaperones in protein folding: the art of avoiding sticky situations, *Trends. Biochem. Sci.*, 1994, v.19, p.20-26.
7. Neupert W., Hartl F.U., Craig E.A., Pfanner N., How do polypeptides cross the mitochondrial membranes?, *Cell*, 1990, v.63, p.447-450.
8. Baldwin R.L., *Chemtracts: Biochem. Mol. Biol.*, 1991, v.2, p.379-389.
9. Snape.K.W., Tjian r., Blake C.C., Koshland D.E., Crystallographic study of the interaction of the urea with lysozyme, *Nature*, 1974, v.250, p.295-298.
10. Mottonen J, Strand A, Symersky J, Sweet RM, Danley DE, Geoghegan KF, Gerard RD, Goldsmith EJ. Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1. *Nature*. 1992 Jan 16; 355(6357):270-273.
11. Baker D., Agard D.A., Kinetics versus thermodynamics in protein folding, *Biochemistry*, 1994, v.33, p.7505-7509.
12. Baker D., Sohl J.L., Agard D.A., A protein-folding reaction under kinetic control, *Nature*, 1992, v.356, p.263-265.
13. Kuwajima K., Nitta K., Yoneyama M., Sugai S., Three-state denaturation of α -lactalbumin by guanidine hydrochloride, *J. Mol. Biol.*, 1976, v.106, p.359-373.
14. Ohgushi M., Wada A., Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains, *FEBS Lett.*, 1983, v.164, p.21-24.
15. Ptitsyn O.B. The molten globule state, In:Protein Folding (Greighton T.E. Ed.), Freeman, New York, 1992, p.243-300.
16. Bychkova V.E., Berni R., Rossi G.L., Kutysenko V. P., Ptitsyn O.B., Retinol-binding protein is in the molten globule state at low pH, *Biochemistry*, 1992, v.31, p.7566-7571.
17. Ptitsyn O.B., *J. Protein. Chem.*, 1987, v.6, p.273-293.
18. Чернавский Д.С., Хургин, Ю.Н., Шполь С.Э., Биофизика, 1987, т.5, с.775.
19. Haynil D.T., Freire E., *Struct. Funct. Genet.*, 1993, v.3, p.237-246.
20. Бычкова В.Е., Птицын О.Б., Биофизика, 1993, т.38, с.58-65.
21. Griko Y.V., Energetic basis of structural stability in the molten globule state: α -lactalbumin, *J. Mol. Biol.*, 2000, v.297, p.1259-1268.
22. Matthews B.W., Structural and genetic analysis of protein stability, *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, v.62, p.139-160.
23. Dill K.A., Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, 1990, v.29, p.7133-7155.
24. Shirley B.A., Stanssens P., Hahn U., Pace C.N., Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1, *Biochemistry*, 1992, v.31, p.725-732.
25. Jeffrey D. G., Saenger W., *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, New York, 1991.
26. Pauling L., Corey R.B., The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains, *Roc. Natl. Acad. Sci USA*, 1951, v.37, p.252-256.
27. Stickle D.F., Presta L.G., Dill K.A., Rose G.D., Hydrogen bonding in globular proteins, *J. Mol. Biol.*, 1992, v.226, p.1143-1159.
28. Alber T., In: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman G. Ed), Plenum, New York, 1989, p.161-192.
29. Privalov P.L., Khechinashvili N.N., Thermodynamic analysis of thermal transitions in globular proteins. I. Calorimetric study of chymotrypsinogen, ribonuclease and myoglobin., *Atanasov B.P., Biopolymers*, 1971, v.10, p.1865-1890.
30. J. Schonbrun, Dill K.A., Fast protein folding kinetics, *PNAS*, October 28, 2003, 12678-12682, vol. 100, no. 22
31. Lin T. Y., Timasheff S. N., Why do some organisms use a urea-methylamine mixture as osmolyte? Thermodynamic compensation of urea and trimethylamine N-oxide interactions with protein *Biochemistry*, 1994, 33, 12695-12701
32. Wang A., Bolen D. W., A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation *Biochemistry*, 1997, 36, 9101-9108

33. Mukaiyama A., Haruki M., Ota M., Koga Y., Takano K., Kanaya S., A hyperthermophilic protein acquires function at the cost of stability, *Biochemistry* 2006, 45, 12673-12679
34. Левич В. Г., Догонадзе Р. Р., ДАН, 124, 123, 1959; *Coll. Czechosl. Chem. Comm.*, 26, 193, 1961
35. Hush N. S., *Electrochim. Acta*, 13, 1005, 1968
36. Догонадзе Р. Р., Кузнецов А. М., Итоги науки и техники, Физическая химия, Кинетика, т. 2, ВИНТИ, 1973; *Progr. Surface Sci.*, 6, 3, 1975; *J. Res. Inst. Catal. Hokk. University*, 22, 93, 1975
37. R. A. Marcus and N. Sutin, *Electron transfers in chemistry and biology*, *Biochim. Biophys. Acta*, 811 (1985) 265-322.
38. L. I. Krishtalik, *Charge Transfer Reactions in Electrochemical and Chemical Processes*, Plenum, New York, 1986.
39. A. M. Kuznetsov, *Charge Transfer in Physics, Chemistry and Biology*, Gordon and Beach: Reading, MA, 1995.
40. P. F. Barbara, T. J. Meyer and M. A. Ratner, *Contemporary Issues in Electron Transfer Research*, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 13148-13168.
41. J. Jortner and M. Bixon, Eds., *Electron Transfer from Isolated Molecules to Biomolecules*. (*Advances in Chemical Physics*), Wiley, NY, 1999, Vols. 106 and 107.
42. J.-M. Savéant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry: An Electrochemical Approach to Electron Transfer Chemistry*, John Wiley, Hoboken, New Jersey, 2006.
43. Avila, B.W. Gregory, K. Niki, T.M. Cotton, *J. Phys. Chem. B*, An electrochemical approach to investigate gated electron transfer using a physiological model system: cytochrome c immobilized on carboxylic acid-terminated alkanethiol self-assembled monolayers on gold electrodes, 2000, 104, 2759-2766.
44. D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Proton-coupled electron transfer of cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 4062-4068.
45. D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Redox and redox-coupled processes of heme proteins and enzymes at electrochemical interfaces, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2005, 7, 3773-3784.
46. V. Davidson, Protein Control of True, Gated, and Coupled Electron Transfer Reactions, *Acc. Chem. Res.* 41 (2008) 730-738.
47. A. Kranich, H. K. Ly, P. Hildebrandt and D. H. Murgida, Direct observation of the gating step in protein electron transfer: Electric-field-controlled protein dynamics, *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 9844-9848.
48. S. Hammes-Schiffer and A. V. Soudackov, Proton-coupled electron transfer in solution, proteins, and electrochemistry, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 14108-14123.
49. R. R. Dogonadze and A. M. Kuznetsov, Theory of charge transfer kinetics of solid-polar liquid interfaces, *Progr. Surf. Sci.* 6 (1975) 1-41.
50. A. K. Mishra and D. H. Waldeck, A Unified Model for the Electrochemical Rate Constant That Incorporates Solvent Dynamics, *J. Phys. Chem. C*, 113 (2009) 17904-17914.
51. D. E. Khoshtariya, J. Wei, H. Liu, H. Yue and D. H. Waldeck, Charge-Transfer Mechanism for Cytochrome c Adsorbed on Nanometer Thick Films. Distinguishing Frictional Control from Conformational Gating, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 7704-7714.
52. 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, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107 (2010) 2757-2762.
53. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, D. Sarauli and R. van Eldik, High-Pressure Probing of a Changeover in the Charge-Transfer Mechanism for Intact Cytochrome c at Gold/Self-Assembled Monolayer Junctions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2006) 277-281.
54. L. D. Zusman, *Z. Phys. Chem.* 186 (1994) 1-29.
55. A. M. Kuznetsov and J. Ulstrup, *Electron Transfer in Chemistry and Biology*, Wiley, Chichester, 1999.
56. N. Sutin, Nuclear, electronic, and frequency factors in electron transfer reactions, *Acc. Chem. Res.* 15 (1982) 275-282.
57. Y. I. Kharkats and L. I. Krishtalik, Medium reorganization energy and enzymatic reaction activation energy, *J. Theor. Biol.* 112 (1985) 221-249.
58. I. Muegge, P. X. Qi, A. J. Wand, Z. T. Chu and A. Warshel, The Reorganization Energy of Cytochrome c Revisited, *J. Phys. Chem. B* 101 (1997) 825-836.
59. O. Miyashita and N. Go, Pressure dependence of protein electron transfer reactions: Theory and simulation, *J. Phys. Chem. B* 103(1999) 562-571.
60. M. Cascella, A. Magistrato, I. Tavernelli, P. Carloni and U. Rothlisberger, Role of protein frame and solvent for the redox properties of azurin from *Pseudomonas Aeruginosa*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:19641-19646 (2006)

61. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze and R. van Eldik, Unusual mechanism for the short-range electron transfer within gold–alkanethiol–ionic-liquid films of subnanometer thickness, *Phys. Rev. E* 80 (2009) 065101 (4 p.).
62. N.A. Lewis, Y.S. Obeng, D.V. Taveras, R. van Eldik, Pressure tuning spectroscopic study of electron-tunneling processes in solution, *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 924-927; b)
63. D.E. Khoshtariya, R. Billing, M. Ackermann, R. van Eldik, Temperature, pressure and solvent isotope effects on the precursor formation constant and reorganization dynamics in outer-sphere charge transfer between mobile hexacyanoferrate (II) and (III) ions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1995, 91, 1625-1629.
64. D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze & R. van Eldik, Multiple Mechanisms for Electron Transfer at Metal/Self-Assembled Monolayer/Room-Temperature Ionic Liquid Junctions: Dynamical Arrest versus Frictional Control and Non-Adiabaticity, *Chem. Eur. J.*, 2009, v.15, p.5254-5262.
65. T. D. Dolidze, D. E. Khoshtariya, D. H. Waldeck, J. Macyk and R. van Eldik, Positive activation volume for a cytochrome c electrode process: Evidence for a "protein friction" mechanism from the high pressure studies, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 7172-7179.
66. Д.Э.Хоштария. Исследование элементарного процесса переноса протона при ферментативном гидролизе методом температурной зависимости кинетического изотопного эффекта. Диссерт. канд. хим. наук (1980).
67. Horton H.R., Moran L.A., Ochs R.S., Rawn J.D., Scrimgeour K.G., *Principles of Biochemistry*, Prentice Hall, 1996
68. Hartly B. S., *Amino-acid sequence of bovine Chymotrypsinogen-A*, *Nature*, 1964, v.201, p.1284.
69. Ferscht, *Structure and Mechanism of Enzyme Action*, Freeman, New York, 1978.
70. Blow D.M., Steitz T.A., X-ray diffraction studies of enzymes, *Ann. Rev. Biochem.*, 39, 63-100, 1970
71. S.Wu, C.Zhang, D.Xu and H.Guo, Catalysis of Carboxypeptidase A: Promoted-Water versus Nucleophilic Pathways, *J.Phys.Chem. B* 2010, 114, 9259-9267
72. Wang S.H., Wang S.F., Xuan W., Zeng Z.H., Jin J.Y., Ma J., Tian G.R., Nitro as a novel zinc-binding group in the inhibition of carboxypeptidase A, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2008, Vol. 16, 3596-3601
73. Kilshtain-Vardi A., Glick M., Greenblatt H.M., Goldblum A. Shoham G., Refined structure of bovine carboxypeptidase A at 1.25 Å resolution, *Acta Cryst* 2003, D59, 323-333
74. Alvarez-Santos S., Gonzalez-Lafont A., Lluch J.M., Oliva B., Aviles F.X., Theoretical study of the role of arginine 127 in the water-promoted mechanism of peptide cleavage by carboxypeptidase A, *New J Chem*, 1998, 319-325
75. Cho J.H., Kim D.H., Kim D., Kyung J.L., Choi K.Y., The role of Tyr248 probed by mutant bovine carboxypeptidase A: insight into the catalytic mechanism of carboxypeptidase A, *Biochemistry*, 2001, 40, 10197-10203
76. Tsou C.L., The role of active site flexibility in enzyme catalysis, *Biochemistry (Mosc)* 1998 Mar., 63(3):253-8
77. Zenchenko T.A., Morozov V.N., Mechanical deformation enhances catalytic activity of crystalline carboxypeptidase A, *Protein Science* 1995, 4:251-257
78. Muszynska G., Riordan J.F., Chemical modification of CBXPA crystals, *Biochemistry* 1976, Jan 13, 15(1):46-51
79. Hartsuck J.A., Lipscomb W.N., *The Enzymes*, 3, 1 (1971)
80. Schmid M.F., Herriott J.R., Structure of carboxypeptidase B at 2.8 Å resolution, *J. Mol. Biol.*, 103, 175 (1976)
81. Reeke G.N., Hartsuck J.A., Ludwig M.L., Quioco F.A., Steitz T.A., Lipscomb W.N., The structure of Carboxypeptidase A, VI. Some results at 2.0Å resolution, and the complex with Glycyl-Tyrosine at 2.8Å resolution, *Proc. Natn. Acad. Sci., USA*, 58, 2220 (1967)
82. Lipscomb W.N., *Enzymatic Activities of Carboxypeptidase A's in Solution and in Crystals*, *Proc. Natn. Acad. Sci., USA*, 70, 3797 (1973)
83. Johansen J.T., Vallee B.L., Environment and conformation dependent sensitivity of the arsanilazotyrosine-248 carboxypeptidase A chromophore, *Biochemistry*, 14, 649 (1975)
84. Vallee B.L., Riordan J.F., Coleman J.E., Carboxypeptidase A: approaches to the chemical nature of the active center and the mechanisms of action, *Proc. Natn. Acad. Sci. USA*, 49, 109 (1963)
85. Auld D.S., Vallee B.L., Kinetics of carboxypeptidase A, pH and Temperature dependence of tripeptide hydrolysis, *Biochemistry*, 10, 2892 (1971)
86. Bunting J.W., Chu S.S.T., pH dependence of the hydrolysis of hippuric acid esters by carboxypeptidase A, *Biochemistry*, 15, 3237-3244 (1976)
87. Riordan J.F., Sokolovsky M., Vallee B.L., Environmentally sensitive tyrosyl residues. Nitration with tetranitromethane, *Biochemistry*, 6, 358, 3609 (1967)

88. Coleman J.E., Vallee B.L., Metallocoarboxypeptidases: stability constants and enzymatic characteristics, *J. Biol. Chem.*, 236, 2244 (1961)
89. Makinen M.W., Yamamura K., Kaiser E.T., Mechanism of action of carboxypeptidase A in ester hydrolysis, *Proc. Natn. Acad. Sci., USA*, 73, 3882 (1976)
90. Breslow R.E., Wernick D., On the mechanism of catalysis by carboxypeptidase, *J. Am. Soc.*, 98, 259 (1976)
91. G. Mei, A. Finazzi Agró, N. Rosato, G. Gilardi, M. Venanzi, G.W. Canters, Probing the structure and mobility of *Pseudomonas aeruginosa* azurin by circular dichroism and dynamic fluorescence anisotropy, *Protein Science*, Volume 5 Issue 11, Pages 2248 – 2254, 2008
92. Ole Farver, Jingdong Zhang, Qijin Chi, Israel Pecht and Jens Ulstrup, Deuterium Isotope Effect on the Intramolecular Electron Transfer in *Pseudomonas aeruginosa* Azurin, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 98, No. 8 (Apr. 10, 2001), pp. 4426-4430
93. Irina Pozdnyakova, Jesse Guidry and Pernilla Wittung-Stafshede, Studies of *Pseudomonas aeruginosa* Azurin Mutants: Cavities in β -Barrel Do Not Affect Refolding Speed, *Biophysical Journal*, Volume 82, Issue 5, 2645-2651, 1 May 2002
94. Loretta M. Murphy, Richard W. Strange, B. Goran Garlsson, Lennart G. Lundberg, T. Pascher, B. Reinhammar and S.Samar Hasnain, Structural Characterization of Azurin from *Pseudomonas aeruginosa* and Some of Its Methionine-121 Mutants., *Biochemistry* 1993, 32, 1965-1975.
95. Williams, R.J.P., Energised (entatic) states of groups and of secondary structures in proteins and metalloproteins, *Eur. J. Biochem.*, 234, 363-381, 1995
96. Van de Kamp. M., et. al., Complete sequential proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance assignments and solution secondary structure of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry*, 31, 10194-10207 (1992).
97. Malmstrom, B.G., Rackinduced bonding in bluecopper proteins, *Eur. J. Biochem.*, 223, 711-718, 1994
98. Marks J, Pozdnyakova I, Guidry J, Wittung-Stafshede P., Methionine-121 coordination determines metal specificity in unfolded *Pseudomonas aeruginosa* azurin., *J Biol Inorg Chem*. 2004 Apr;9(3):281-8. Epub 2004 Feb 3.
99. Silvestrini, M. C., M. Brunori, M. Tegoni, M. Gervais, and F. Labeyrie., 1986. Kinetics of electron transfer between two *Hansenula anomala* flavocytochrome b2 derivatives and two simple copper proteins (azurin and stellacyanin). *Eur. J. Biochem.* 161:465-472.
100. Cornelis M. Groeneveld and Gerard W. Canters, NMR Study of Structure and Electron Transfer Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* Azurin, *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol 263, No 1, January 5, 167-173, 1988.
101. N.Linnet, pH Measurements in Theory and Practice, Copenhagen (1970).
102. Privalov P.L. Scanning Microcalorimeters for Studying Macromolecules.//*Pure&Appl.Chem.*, v.52, 1980, p.479-497.
103. Privalov P.L., Potekchin S. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods in enzymology*, v.131, 1986, p.4-51.
104. Plotnikov V.V., Brandts J.M., Lin L.N. & Brandts J.F. A New Ultrasensitive Scanning Calorimeter, *MicroCal Incorporated*, 22 Industrial Drive East, Northampton, MA 01060 USA, 1996, Preprint.
105. Watson E.S., O'neil M.J. U.S. Patent, 3, 263, 484, 1966.
106. Мдзинарашвили Т.Дж. Определение термодинамических и кинетических параметров конформационных переходов биополимеров (глобулярных и фибриллярных белков, ДНК) и их естественных комплексов (бактериофагов) с помощью сканирующей микрокалориметрии. Диссертация на соискание научной степени доктора физико-математических наук. 1999, с10-32.
107. Методы исследования быстрых реакций, под ред. Г.Хеммис, Москва, 1977
108. Roughton F.J.W., The kinetics of haemoglobin. VI. The competition of carbon monoxide and oxygen for haemoglobin., *Proc. R. Soc.*, B115, 475 (1934).
109. Chance B., *J. Franklin Inst.*, 229, 455, 613, 637 (1904).
110. მახარაძე მ., გლობულური ცილების თერმული დენობის კალორიმეტრული კვლევა ზოგიერთი კონფორმაციული ქვემდგომარეობის გამოვლინების პირობებში, დისერტაცია ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის ხარისხის მოსაპოვებლად, 2004
111. J. Bard and L. R. Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; John Wiley, New York, 2001.
112. E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 101(1979) 19-28.
113. B. D. Fleming. S. Praporski, A. M. Bond and L. L. Martin, Electrochemical quartz crystal microbalance study of azurin adsorption onto an alkanethiol self-assembled monolayer on gold, *Langmuir* 24 (2008) 323-327.

114. W. Oelssner, F. Berthold and U. Guth, The iR drop – well-known but often underestimated in electrochemical polarization measurements and corrosion testing, *Materials and Corrosion* 57 (2006) 455-466.
115. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, S. Seyfert, D. Sarauli, G. Lee and 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.
116. R. J. D. Miller, G. L. McLendon, A. J. Nozik, W. Schmickler and F. Willig, *Surface Electron Transfer Processes*, VCH, NY, 1995.
117. T.D. Dolidze, D.E. Khoshtariya, P. Illner, L. Kulisiewicz, A. Delgado & R. van Eldik, High-pressure testing of heterogeneous charge transfer in a room-temperature ionic liquid. Evidence for solvent dynamic control, *J. Phys. Chem. B*, 2008, v.112, p.3085-3100.
118. K. Weber and S. E. Creager, Voltammetry of Redox-Active Groups Irreversibly Adsorbed onto Electrodes. Treatment Using the Marcus Relation between Rate and Overpotential, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3164-3172.
119. L. Tender, M. T. Carter and R. W. Murrey, L. Tender, M. T. Carter and R. W. Murrey, *Anal Chem* 66 (1994) 3173-3181, *Anal Chem* 66 (1994) 3173-3181.
120. D. E. Khoshtariya, M. Shushanyan, R. Sujashvili, M. Makharadze, E. Tabuashvili and G. Getashvili, Enzymatic activity of α -chymotrypsin in the urea-induced molten-globule-like state: a combined kinetic/thermodynamic study, *J. Biol. Phys. Chem.*, 3 (2003) 2.10
121. P.L. Privalov, Stability of proteins: small globular proteins, *Adv. Protein Chem.*, 33 (1979) 167-241.
122. K.P. Murphy, E.Freire, Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins, *Adv. Protein Chem.*, 43 (1992) 313-361.
123. Y. Hagihara, Y. Tan, Y. Goto, Comparison of the conformational stability of the molten globule and native states of horse cytochrome c. Effects of acetylation, heat, urea and guanidine-hydrochloride, *J. Mol. Biol.*, 237 (1994) 337-348.
124. V.E. Bychkova et al., Molten globule-like state of cytochrome c under conditions simulating those near the membrane surface, *Biochemistry*, 35 (1996) 6058-6063.
125. P.R. Davis-Searles et al., Sugar-induced molten-globule model, *Biochemistry*, 37 (1998) 17048-17053.
126. M. Jourdan, M.S. Searle, Insights into the stability of native and partially folded states of ubiquitin: effects of cosolvents and denaturants on the thermo-dynamics of protein folding, *Biochemistry*, 40 (2001) 10317-10325.
127. P.L. Privalov, Thermodynamic Investigations of Biological Macromolecules, *Pure Appl. Chem.*, 47 (1976) 293-304.
128. J.M. Sturtevant, Biochemical Applications of Differential Scanning Calorimetry, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 38 (1987) 463-488.
129. D.E. Khoshtariya et al., Liquid water (D₂O): a dynamic model emerging from near-infrared DO-D stretching overtone studies, *J. Mol. Liquids*, 96-97 (2002) 45-63.
130. M. Shushanyan, R. Sujashvili, E. Tabuashvili, M. Makharadze, G. Getashvili and D. Khoshtariya, Kinetic and thermodynamic manifestations of the thermally-induced molten-globule-like state of α -chymotrypsin, *J. Biol. Phys. Chem.*, 6 (2006) 51–55.
131. T. Kamiyama et al., Polyol-induced molten globule of cytochrome c: An evidence for stabilization by hydrophobic interaction, *Biochim. Biophys. Acta*, 1434 (1999) 44-57.
132. N. Poklar et al., Thermodynamic stability of ribonuclease A in alkylurea solutions and preferential solvation changes accompany in its thermal denaturation: A calorimetric and spectroscopic study, *Prot. Science*, 8 (1999) 832-840.
133. Д.Э.Хоштария и сотр., Изучение переноса протона при ферментативном гидролизе методом температурной зависимости кинетического изотопного эффекта, *Биоорганическая химия*, 4 (1978) 1341-1350.
134. А.А.Клесов, И.В.Березин, Ферментативный катализ, Т.1, Изд. Дом МГУ, Москва, 1980.
135. В.К.Антонов, Химия протеолиза, Наука, Москва, 1983.
136. F. Vanzi et al., Effect of the Protein Denaturants Urea and Guanidinium on Water Structure: A Structural and Thermodynamic Study, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (1998) 10748-10753.
137. A.K. Chamberlain, S. Marqusee, Molten globule unfolding monitored by hydrogen exchange in urea, *Biochemistry*, 37 (1998) 1736-1742.
138. Grasso et al., The effects of scan rate and protein concentration on DSC thermograms of bovine superoxide dismutase, *Thermochim. Acta*, 265 (1995) 163-175.

139. D.E. Khoshtariya, M. Makharadze, G. Getashvili & M.M. Zaalishvili, On the differential scanning calorimetry (DSC) rate performance for a three-state thermal denaturing process of globular proteins. *Bull. Georgian Acad. Sci.*, 2001, v.164, p.535-537
140. Myron L. Bender, John R. Whitaker.T., Fred Menger, The effect of enzyme acetylation on the kinetics of the Carboxypeptidase A-catalyzed hydrolysis of Hippuryl-L- β -Phenylallactic acid, *Chemistry*, 1965, February 23, 711-716
141. Lipscomb, W. N., Reeke, G. N., Quiocho, F. A. and Bethge, P. H., The Structure of Carboxypeptidase A. VIII. Atomic Interpretation at 2.0 Å - Resolution, a New Study of the Complex of Glycyl-L-Tyrosine with CPA, and Mechanistic Deductions, *Phil. Trans. Roy. Soc. London B*257 (1970) 177;
142. Hartsuck, J. A. and Lipscomb, W. N., in P. B. Boyer (ed.), *The Enzymes*, Vol III, 3rd edition, p. 1, New York, London and San Francisco, Academic Press (1971);
143. Breslow, R. and Wernick, D. L., Unified picture of mechanisms of catalysis by carboxypeptidase A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74 (1977) 1303
144. Lipscomb W.H., Relationship of the three-dimensional structure of carboxypeptidase A to catalysis, *Tetrahedron*, 30, 1725 (1974)
145. Jeuken LJC, McEvoy JP, Armstrong FA (2002) Insights into gated electron-transfer kinetics at the electrode-protein interface: A square wave voltammetry study of the blue copper protein azurin. *J Phys Chem B* 106:2304–2313.
146. Chi Q, Farver O, Ulstrup J (2005) Long-range protein electron transfer observed at the single-molecule level: In situ mapping of redox-gated tunnelling resonance. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16203–16208.
147. Yokoyama K, et al. (2008) Electron tunneling through *Pseudomonas aeruginosa* azurins on SAM gold electrodes. *Inorg Chim Acta* 361:1095–1099.
148. Guo Y, Zhao J, Yin X, Gao X, Tian Y (2008) Electrochemistry investigation on protein protection by alkanethiol self-assembled monolayers against urea impact. *J Phys Chem C* 112:6013–6021.
149. Weber K, Creager SE (1994) Voltammetry of redox-active groups irreversibly adsorbed onto electrodes. Treatment using the Marcus relation between rate and overpotential.. *Anal Chem* 66:3164–3172.
150. Tender L, Carter MT, Murrey RW (1994) Cyclic voltammetric analysis of ferrocene alkanethiol monolayer electrode kinetics based on Marcus theory. *Anal Chem* 66:3173–3181.

Благодарности

За проявленное внимание и наставления при подготовке данной диссертации выражаю особую благодарность моему научному руководителю Д. Хоштария. Благодарю за всестороннюю помощь и оказанную поддержку моих друзей и коллег, так или иначе принявших участие в подготовке данной диссертации, а именно Т. Долидзе, Руди ван Элдика, М. Махарадзе, Р. Суджашвили, Т. Мдзинарашвили, Н. Шенгелия, Т. Парцхаладзе, а также Т. Третьякову.

Особо благодарю моих родителей и сестру за понимание, переживания и помощь.

Выражаю благодарность фонду Volkswagen Stiftung за осуществление финансирования большей части настоящей работы.