

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო  
უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი  
ფიზიკის მიმართულება

თამარ ფარცხალაძე

*pH-ის გაგვლენა დნმ-ის სტრუქტურულ ლაბილობაზე და მისი როლი  
ცილის მიერ დნმ-ის უბნების ამოცნობაში*

ს ა დ ო ქ ტ ო რ ო დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

პროგრამის ხელმძღვანელი:  
თსუ ასოცირებული პროფესორი,  
ფიზ. მათ. მეცნ. დოქტორი

თამაზ მძინარაშვილი

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:  
თსუ ასოცირებული პროფესორი,  
ფიზ. მათ. მეცნ. დოქტორი

თამაზ მძინარაშვილი

თსუ ასისტ. პროფესორი,  
ბიოლოგიის მეცნ. დოქტორი

მარიამ ხვედელიძე



2010 წელი

# შინაარსი

	88
შესავალი	2
<b>I. თავი. ლიტერატურის მიმოხილვა</b>	
1.1. დნმ-ის სტრუქტურა და გენის ფუნქციონირების მოლეკულური მექანიზმი	5
1.2. დნმ-ის ორმაგ-სპირალური სტრუქტურის მასტაბილიზირებელი ძალები	14
1.3. დნმ-ის სპირალ-გორგალური გადასვლა	17
1.4. დნმ-ის ორმაგი სპირალის პროტონიზაცია/დეპროტონიზაცია	21
1.5. სპეციფიური და არასპეციფიური ურთიერთქმედების სახეები (ტიპები) დნმ-ის მოლეკულასთან	24
<b>II. თავი. ექსპერიმენტული ნაწილი</b>	
2.1. საკვლევი მასალები	29
2.2. ნაშრომში გამოყენებული მეთოდების აღწერა	
2.2.1. ცენტრიფუგირების და სპექტროფოტომეტრული მეთოდები	30
2.2.2. დიფერენციალური მიკროკალორიმეტრული მეთოდი	31
2.2.3. მიკროკალორიმეტრული მრუდების დამუშავება	35
2.3. მიღებული ექსპერიმენტალური შედეგები	38
2.4. ექსპერიმენტული შედეგების განხილვა	54
<b>დასკვნები</b>	59
<b>გამოყენებული ლიტერატურა</b>	61

## შესავალი

პრობლემის აქტუალობა. მოლეკულური ბიოლოგიის ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს ამოცანას წარმოადგენს – ცილა-დნმ-ის ურთიერთქმედების შესწავლა. განსაკუთრებით დიდ ყურადღებას იპყრობს ცილების მიერ დნმ-ის სპეციფიური ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობების ამოცნობის მექანიზმის დადგენა. ეს ფუნდამენტური პრობლემაა, რომელიც მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ისეთ სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან უჯრედულ პროცესებში, როგორებიცაა დნმ-ის ტრანსკრიფცია, რეპლიკაცია, დნმ-ის რეპარაცია და რეკომბინაცია. ცნობილია, რომ მრავალი დაავადების საფუძველს წარმოადგენს დეფექტები დნმ-ის ამომცნობ ცილებში ან მუტაციები, რომელთაც შეიძლება ადგილი ჰქონდეს გენის პრომოტორულ უბანზე, საიდანაც ხორციელდება ტრანსკრიფციის ინიცირება, რის შედეგადაც არასწორად წარიმართება გენური ექსპრესია უჯრედის ბირთვში.

მსოფლიოს მრავალ ლაბორატორიულ ცენტრში წლების მანძილზე მიმდინარეობდა კვლევები, რომლებიც დაკავშირებული იყო დნმ-ის მოლეკულის ფიზიკო-ქიმიური თვისებების სრულყოფილად შესწავლასთან და ეს კვლევები დღესაც გრძელდება. ამ მოლეკულის შესახებ დაგროვდა მნიშვნელოვანი ინფორმაცია, თუმცა ჯერ კიდევ გასარკვევია იმ მექანიზმების ბუნება, რომლითაც დნმ-ის მოლეკულა ფუნქციონირებს უჯრედის ბირთვში. ბოლომდე შესწავლილი არ არის ასევე, მოლეკულურ დონეზე თუ როგორ ხდება ბირთვში დნმ-ის გენეტიკური ინფორმაციის ჩაკეტვა/შენახვა და საჭიროების შემთხვევაში როგორ ხორციელდება დნმ-ის შესაბამისი მონაკვეთიდან ინფორმაციის ტრანსკრიფცია, რაც მეტად აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს თანამედროვე გენური ინჟინერიის და სამედიცინო გენეტიკის სფეროში მომუშავე მეცნიერთათვის. ამიტომაც, მნიშვნელოვანია დადგენილ იყოს ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები, რომლითაც ხორციელდება გენის უშეცდომო გახსნა/დახურვა. ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ დნმ-ის იმ უბნებს, საიდანაც უნდა განხორციელდეს ტრანსკრიფციის ან რეპლიკაციის პროცესი, წინ უსწრებს ფუძე წყვილების სპეციფიური თანამიმდევრობები (პრომოტორული უბანი), რომელთა ამოცნობაც ხორციელდება გარკვეული ტიპის ცილების მიერ. აღნიშნული თანამიმდევრობები წარმოადგენენ დნმ-ის ორმაგი სპირალის განცალკევების ინიციაციის ადგილს. როგორც წესი, ასეთი თანამიმდევრობები გამოირჩევიან AT-წყვილების მაღალი შემცველობით (TATA-box - ტრანსკრიფციის შემთხვევაში, I3-ფუძე წყვილის შემცველი უბანი - რეპლიკაციის შემთხვევაში). ეს ფაქტი შესაძლებელია აიხსნას იმით, რომ შესაბამისი ჰელიკაზური აქტივობის მქონე ფერმენტის მიერ დნმ-ის ორმაგი სპირალის გასწვრივ პირველადი დესტაბილიზაციის ადგილს უნდა წარმოადგენდეს ენერგეტიკულად შედარებით დაბალი სტაბილობის უბნები (თ-წყვილებით მდიდარი უბანი), სადაც მოხდება ჯაჭვების განცალკევება, ცილა-დნმ-ის ღია კომპლექსის წარმოქმნა და ამგვარად ცილის მიერ ამ უბნის ამოცნობა.

დღეისათვის ბოლომდე არ არის ცნობილი ჩამონათვალი იმ ძალებისა, რომლებიც მონაწილეობენ ცილა-დნმ-ის სპეციფიური კომპლექსის წარმოქმნაში, ასევე უცნობია მოლეკულურ დონეზე თუ რა ურთიერთქმედებები განაპირობებს დნმ-ის უბნების დესპირალიზაციას და რა როლი შეიძლება ეკისრობდეს დნმ-თან კომპლექსში მყოფ კონკრეტულ ცილას ამ პროცესში. უცნობია ასევე ზუსტი მოლეკულური მექანიზმები ამ უბნებიდან ინფორმაციის “წაკითხვისა”. თუმცა ლიტერატურულ მონაცემებში გამოთქმულია გარკვეული მოსაზრებები თითოეულ პრობლემასთან დაკავშირებით, მაგრამ როგორც ავლნიშნეთ უტყუარი პასუხი ამ კითხვებზე ჯერ კიდევ არ არსებობს.

თანამედროვე მედიცინის და ფარმაკოლოგიისათვის ერთ-ერთ აქტუალურ

საკითხს წარმოადგენს გენის (დნმ) გადამტანი, უსაფრთხო და ეფექტური პოლიმერული ნანონაწილაკების შექმნა, რომელთა საშუალებით შესაძლებელი გახდება განხორციელდეს ცოცხალ ორგანიზმში დანიშნულების ადგილამდე (სამიზნე უჯრედებამდე) საჭირო გენური მასალის დაუზიანებლად გადატანა და მის უჯრედში შეტანა. ამ შემთხვევისთვის შესაძლებელია გამოყენებული იყოს ისეთი ნანონაწილაკები, რომლებიც დნმ-ის გენურ მონაკვეთთან წარმოქმნის არასპეციფიურ ურთიერთქმედებას (მაგალითად ელექტროსტატიკური სახის) და რაც მთავარია ამ კომპლექსს ექნება უნარი შეაღწიოს უჯრედის შიგნით, სადაც უჯრედის ფერმენტული სისტემის მიერ მოხდება მხოლოდ ნანონაწილაკების დაშლა.

კვლევის მიზანი. ჩვენი კვლევების მიზანს წარმოადგენდა: დნმ-ის სტრუქტურული შესაძლებლობების კვლევა სხვადასხვა მუავიანობის (pH 2.6-10.0) გარემო პირობებში; მუდმივი იონური ძალის პირობებში განსაზღვრული ყოფილიყო დნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრების მნიშვნელობები pH-ის ფართე ინტერვალში, რომლებიც დამოკიდებულია დნმ-ის სტრუქტურაზე; დადგენა მუავიანობით გამოწვეული დნმ-ის სტრუქტურული ცვლილებების შექცევადობისა, ვთვლით რა რომ შექცევადობის უნარი უშუალოდ კავშირშია დნმ-ის ფუნქციონირებასთან ბირთვში, მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების საფუძველზე ჩამოყალიბდეს მოსაზრებანი (მოდელი) ცილის მიერ დნმ-ის უბნების ამოცნობის მოლეკულური მექანიზმების შესახებ.

ასევე, კვლევის მიზანს წარმოადგენდა დნმ-თან არასპეციფიური ურთიერთქმედების საშუალებით ორი ტიპის ნანონაწილაკის (Np-PLGA და cNp-ხიტოსან შალითიანი PLGA) დაკავშირების შესაძლებლობის კვლევა და წარმოქმნილ კომპლექსში დნმ/ნანონაწილაკის მაქსიმალური თანაფარდობის განსაზღვრა, ვინაიდან არსებითად მნიშვნელოვანია ნაწილაკმა მოახერხოს მთლიანი გენის გადატანა ორგანიზმში დანიშნულების ადგილამდე (სამიზნე უჯრედებამდე).

მეცნიერული სიახლე. ჩატარებული ექსპერიმენტული კვლევების საფუძველზე მიღებულია შედეგები, რომლის საფუძველზეც ყალიბდება პრინციპულად ახალი ხედვა ცილა-დნმ-ის სპეციფიური უთიერთქმედების მექანიზმის შესახებ. ხაზი უნდა გაესვას იმ გარემოებას, რომ მუავე არე უნდა თამაშობდეს გადამწყვეტ როლს ცილის მიერ დნმ-ის გარკვეული უბნების ამოცნობის პროცესში, რაც დამყარებულია ჩვენს მიერ მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების ანალიზზე, რომელთა მიხედვითაც, თუ დნმ-ის უბანი მოხვედება მუავე გარემოში, ხდება ამ უბნის სტაბილობის მნიშვნელოვანი შემცირება, რაც გამოიწვევს უბნის დესპირალიზაციას (გახსნას). ამგვარად, დნმ-ის ამომცნობი ცილის მიერ ხელმისაწვდომი ხდება ფუძე წყვილში ის უბნები, რომლებიც მანამდე წყალბადურ კავშირში მონაწილეობდნენ და შესაძლებელი ხდება ცილის მიერთება ამ გახსნილ ჯაჭვებთან.

ცილის მიერ დნმ-ის სპეციფიური უბნების ამოცნობის ასეთი მექანიზმი სრულიად ახალია და მიგვაჩნია, რომ სრულიად ლოგიკური, რაც ჯამში ემიჯნება ლიტერატურაში აქამდე არსებულ შეხედულებებს. რაც შეეხება დნმ-ის ამომცნობი ცილის სტრუქტურის თავისებურებებს, ჩვენი აზრით ლოგიკური იქნებოდა, რომ ცილები თავის სტრუქტურაში შეიცავდნენ მუავე ამინომუავეებით კონცენტრირებულ უბნებს, რასაც ადასტურებს ლიტერატურაში არსებული მონაცემები ასეთი ცილების შესახებ. ეს უკანასკნელი კიდევ უფრო აძლიერებენ ჩვენს მიერ ჩამოყალიბებულ მოსაზრებებს ცილის მიერ დნმ-ის უბნების ამოცნობის მექანიზმების შესახებ.

ექსპერიმენტული კვლევებით ნაჩვენებია ხიტოსან-შალითიანი PLGA ნანონაწილაკის (cNp) დნმ-თან დაკავშირების შესაძლებლობა და განსაზღვრულია ის მაქსიმალური რაოდენობა გენური მასალისა, რომელიც შესაძლებელია

ადსორბირებულ იქნას გადამტანი ნაწილაკის ზედაპირზე. საპირისპირო შედეგია მიღებული უშალითო PLGA ნანონაწილაკის (Np) შემთხვევაში, სადაც დნმ-თან კომპლექსის წარმოქმნა არ დაფიქსირდა. აღნიშნული კვლევები მიუთითებს სიტოსან-შალითიანი PLGA-ნანონაწილაკის, როგორც ორგანიზმში გენის გადამტანი საშუალების გამოყენების ეფექტურობაზე, განსხვავებით სუფთა სახის PLGA ნანონაწილაკისაგან.

ნაშრომის პრაქტიკული მნიშვნელობა. მიღებული შედეგები, რომლებიც ეხება მოლეკულური ბიოლოგიისა და ფარმაკოლოგიის უმნიშვნელოვანეს პრობლემებს, კერძოდ, ცილა-დნმ-ის სპეციფიური ურთიერთქმედების და გენის გადამტანი PLGA-ნანონაწილაკების და დნმ-ის არასპეციფიური ურთიერთქმედების მექანიზმის დადგენას, მნიშვნელოვნად შეუწყობს ხელს გადაიჭრას მრავალი პრობლემა, რომელიც არსებობს, როგორც ჯანმრთელობის დაცვის სფეროში, ასევე ბიოტექნოლოგიაში, ეკოლოგიაში, სოფლისმეურნეობაში და სხვა მომიჯნავე სფეროებში, რაც ნაშრომის პრაქტიკულ მნიშვნელობის შესახებ ყველანაირ კითხვებს ხსნის.

# I. თავი.

## ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1. დნმ-ის სტრუქტურა და ბენის ფუნქციონირების მოლეკულური მექანიზმი

დნმ ცოცხალ ორგანიზმში არსებული ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მაკრომოლეკულაა, რომლის ფუნქციას გენეტიკური ინფორმაციის შენახვა და საჭიროების შემთხვევაში მისი გამოყენება წარმოადგენს.

პირველად დნმ აღწერილ იქნა 1869 წელს ფ. მიშერის მიერ. თუმცა მისი ფუნქციის შესახებ უჯრედში, როგორც მემკვიდრეობითი ინფორმაციის მატარებელი მაკრომოლეკულის შესახებ, ცნობილი გახდა მოგვიანებით 1944 წელს [1].

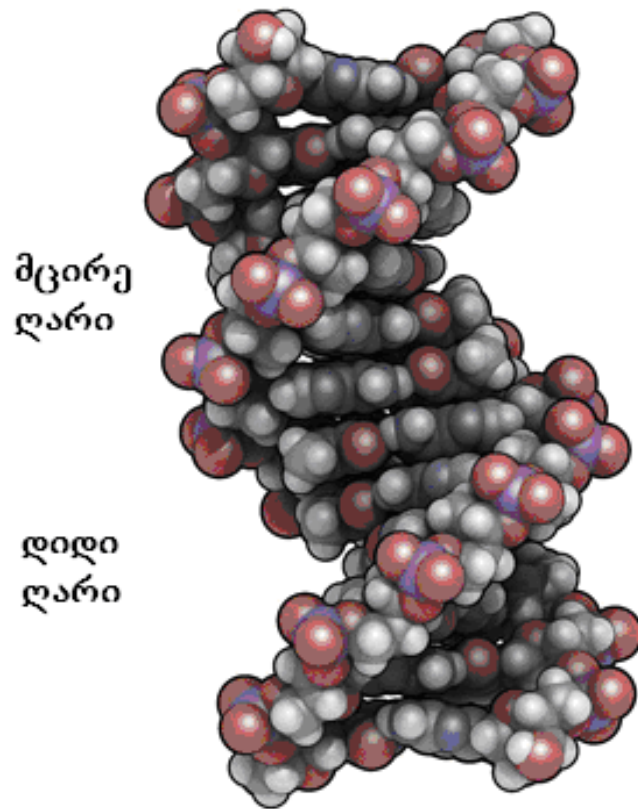
1953 წელს ჯ. ვოტსონისა და ფ. კრიკის მიერ რენტგენოსტრუქტურულ მონაცემებზე დაყრდნობით შემოთავაზებულ იქნა დნმ-ის ორჯაჭვიანი სპირალური სივრცული სტრუქტურა (სურ. 1), რომლის მიხედვით დნმ-ის მოლეკულა წარმოადგენს წრფივ პოლიმერს და რომლის მონომერს წარმოადგენს ნუკლეოტიდი (სურ. 2). ნუკლეოტიდი შედგება 5'- ან 3'- პოზიციაში ფოსფორილირებული შაქრისგან (დეზოქსირიბოზასაგან), რომლის C1- ატომი დაკავშირებულია ერთ-ერთ აზოტოვან ფუძესთან გლიკოზიდური ბმით C1-N. დნმ-ში ჰეტეროციკლურ რგოლებს წარმოადგენენ პურინები: ადენინი (A), გუანინი (G) და პირიმიდინები: ციტოზინი (C), თიმინი (T). 3'-5' ფოსფოდიეთერული კავშირებით ნუკლეოტიდების გადაბმით წარმოიქმნება დნმ-ის ნუკლეოტიდური ჯაჭვი (სურ. 2). როგორც წესი ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობას ჯაჭვში კითხულობენ 5'-დან 3'-მიმართულებით. გენეტიკურად განსაზღვრული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობა გვაძლევს ინფორმაციას დნმ-ის მოლეკულის პირველადი სტრუქტურის შესახებ.

ფიზიოლოგიურ პირობებში დნმ იმყოფება ორმაგსპირალურ მდგომარეობაში. კავშირი ჯაჭვებს შორის ხორციელდება წყალბადური კავშირების საშუალებით აზოტოვან ფუძეებს შორის კომპლემენტარობის პრინციპზე დაყრდნობით: ყოველი თიმინი კავშირს წარმოქმნის ადენინთან ორი წყალბადური კავშირის საშუალებით, ხოლო ყოველი გუანინი – ციტოზინთან სამი წყალბადური კავშირის საშუალებით (სურ. 2).

პირველი მონაცემები დნმ-ის სივრცული სტრუქტურის შესახებ მიღებული იყო დნმ-ის ბოჭკოების და თხელი ფირების რენტგენოგრაფიული კვლევებით მარილის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში [2-5]. ამ კვლევებით ნაჩვენებია იყო, რომ დნმ წარმოადგენს მარჯვენა სპირალს, თუმცა მოგვიანებით აღმოჩენილ იქნა დნმ-ის მარცხენა სპირალური კონფორმაციებიც [6]. დნმ-ის მოლეკულაში ჯაჭვების შაქარ-ფოფატური ნაწილი მოლეკულის ზედაპირზეა გამოტანილი, წარმოქმნიან რა კოაქსიალურ მარჯვენა სპირალს, ხოლო ფუძე წყვილები განლაგებულია მოლეკულის შიგნით, ერთმანეთის თავზე.

სპირალური სტრუქტურის მქონე პოლინუკლეოტიდის დახასიათება შესაძლებელია სპირალობის პარამეტრებით. სპირალის ბიჯი წარმოადგენს სპირალის ღერძის გასწვრივ მანძილს, რომელიც შეესაბამება ერთ სრულ ხვიას (სურ. 3). თუ ნუკლეოტიდების რიცხვი ერთ ხვიაში არის  $n$ , ხოლო მეზობელ ნუკლეოტიდებს შორის მანძილი სპირალის ღერძის გასწვრივ –  $h$ , მაშინ სპირალის ბიჯი იქნება  $P=n \cdot h$ .

როგორც წესი, ფუძე წყვილების ცენტრი არ ემთხვევა სპირალის ღერძს და წანაცვლებულია მისგან გარკვეული მანძილით (სურ. 4). ამასთანავე წყვილების სიბრტყეები ღერძის მიმართ ზუსტად პერპენდიკულარული არ არის. სპირალის



სურ. 1 დნმ-ის ორმაგი სპირალის სივრცული სტრუქტურა

ზედაპირი, ცილინდრის მსგავსად, გლუვ ზედაპირიანი კი არ არის, არამედ გააჩნია სხვადასხვა სივანის და სიღრმის ორი ღარი: მცირე და დიდი (სურ. 1).

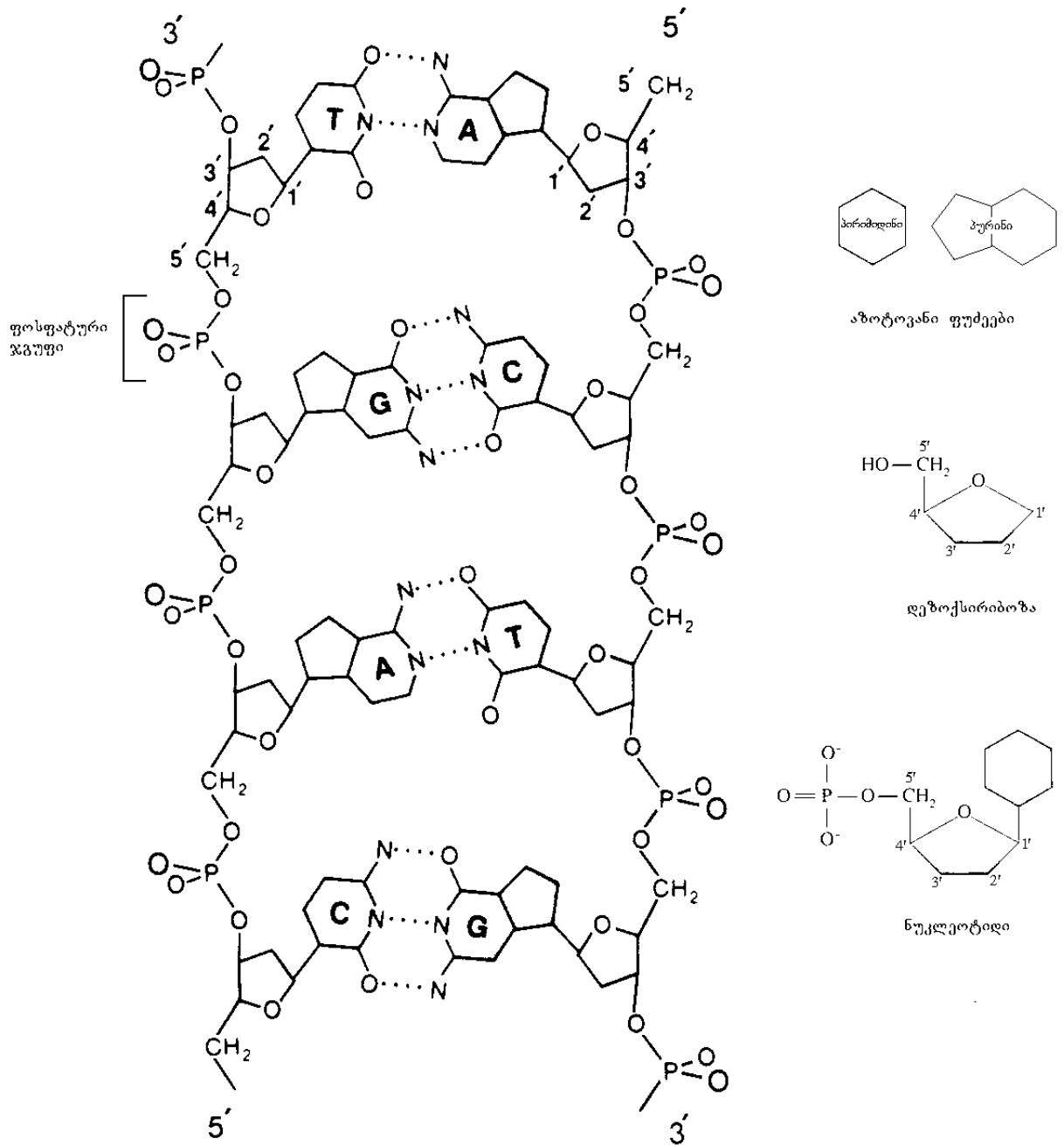
დღეისათვის დნმ-ის სამი ძირითადი ოჯახია ცნობილი: A, B და Z (სურ. 5) [7,8]. დნმ-ის B-კონფორმაცია ბუნებაში ყველაზე მეტად გავრცელებული ფორმაა. დაბალი ტენიანობის გარემო პირობებში დნმ-ს მოლეკულა -ფორმიდან - ფორმაში გადადის. ძირითადი განსხვავება A- და B-ფორმებს შორის არის დეზოქსირიბოზას ციკლური რგოლის განსხვავებული კონფორმაცია, რომელიც B-ფორმაში იმყოფება C2' ენდო კონფორმაციაში, ხოლო A-ფორმაში C3' ენდო მდგომარეობაში (სურ. 6). ამის გამო A-ფორმაში დნმ-ის ჯაჭვის გასწვრივ ნუკლეოტიდებს შორის მანძილი მცირდება 1 ანგსტრემაზე. რაც შეეხება ფუძეებს, A-ფორმაში ისინი ცენტრალური ღერძიდან უფრო მეტად დიდი ღარისაკენ არიან წანაცვლებული.

Z-ფორმა, B- და A-ფორმებისგან განსხვავებით, მარცხენა სპირალს წარმოქმნის. მსგავსი სტრუქტურები დამახასიათებელია პურინ-პირიმიდინების მონაცვლეობითი თანამიმდევრობის დროს, მაგ. როგორცაა CGCGC [9-10]. პოლინუკლეოტიდის მოთავსებით  $MgCl_2$ ,  $NaCl$  მარილების მაღალი კონცენტრაციის წყალხსნარში ან სპირტში, შესაძლებელი ხდება მარცხენა ორმაგი სპირალის მიღება. დნმ-ის ამ კონფორმაციაში გუანოზინის დეზოქსირიბოზა იმყოფება C3'-ენდო კონფორმაციაში (სურ. 6), ხოლო თვითონ გუანინის ფუძე იმყოფება სინ-კონფორმაციაში, განსხვავებით და ფორმებისაგან, სადაც გუანინი ანტი-კონფორმაციაშია (სურ. 7). დნმ-ის სხვადასხვა ფორმების მახასიათებელი პარამეტრები მოყვანილია ცხრილში 1.

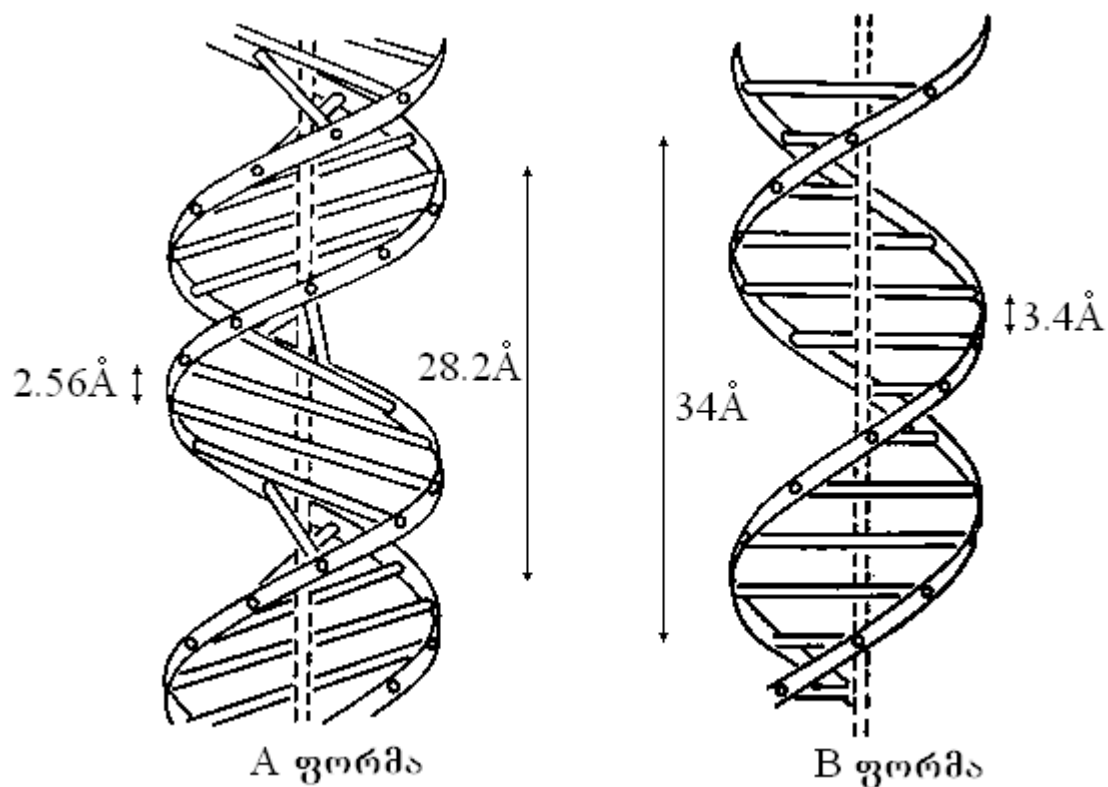
ცხრილი 1 [11]

ოჯახის ტიპი	ფორმა	სპირალის ტიპი	სპირალის მობრუნების კუთხე /გრად	ფუძე წვეილები ს რიცხვი სპირალის ერთ სვიაში	თითო სვიის სიმაღლე /Å	ფუძეების დახრის კუთხე სპირალის ღერძისადმი /გრად	განმეორებული ერთეულების პროექცია სპირალის ღერძზე /Å	ორმაგი სპირალის დიამეტრი /Å
A	A <sub>12</sub>	კანონიკური მარჯვენა სპირალი	30.0	12	28.2	-10	3.0	23
	A <sub>11</sub>	ოგივე	32.7	11		-19	2.6	
	A	ოგივე	33.6	10.7		-19	2.3	
	A	ოგივე						
B	B	ოგივე	35.9	10.5	33.2	6	3.38	20
	C	ოგივე	38.6	9.3		8	3.32	
	D	ოგივე	45.6	8		16	3.04	
Z		კანონიკური მარცხენა სპირალი	60/2	12/6	45.6		3.8	18

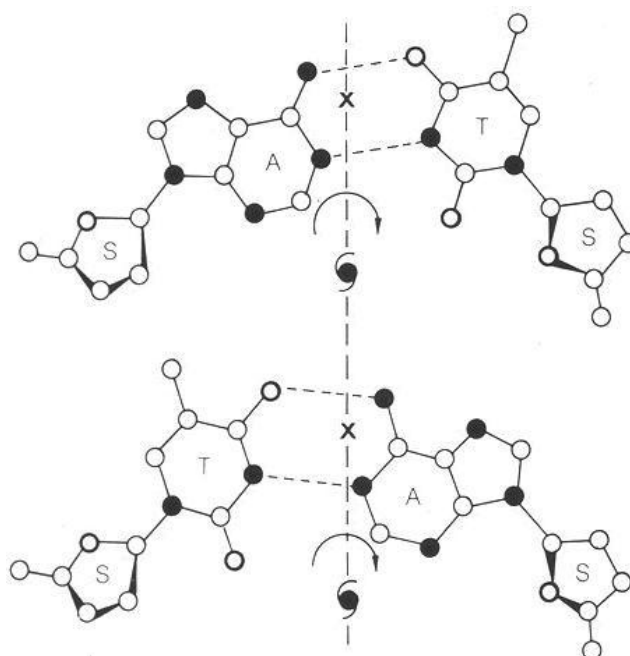




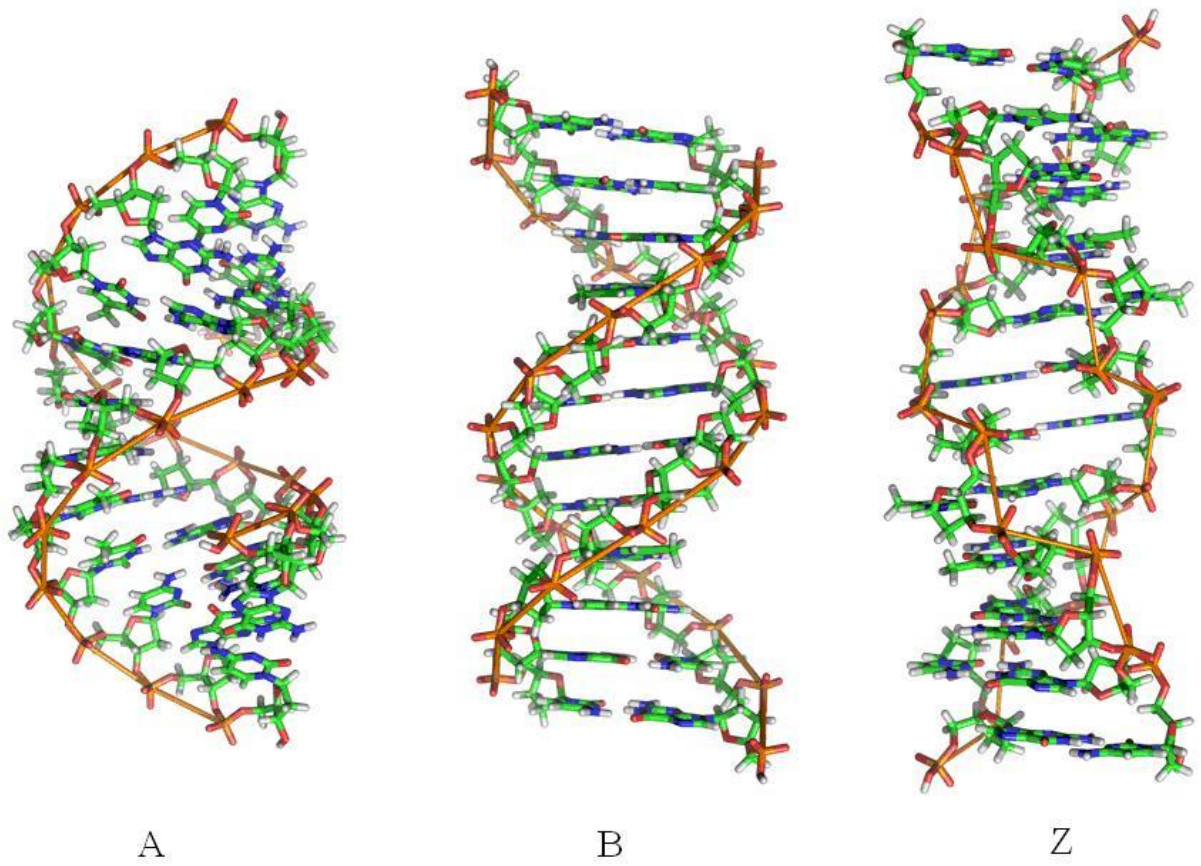
სურ. 2 დნმ-ის ორმაგი ნუკლეოტიდური ჯაჭვის სქემატური სურათი



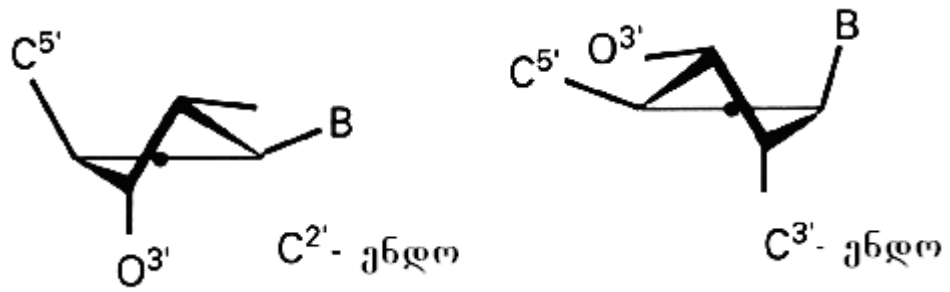
სურ. 3 დნმ-ის მეზობელ ნუკლეოტიდებს შორის მანძილი და სპირალის ბოჯის სიმაღლე



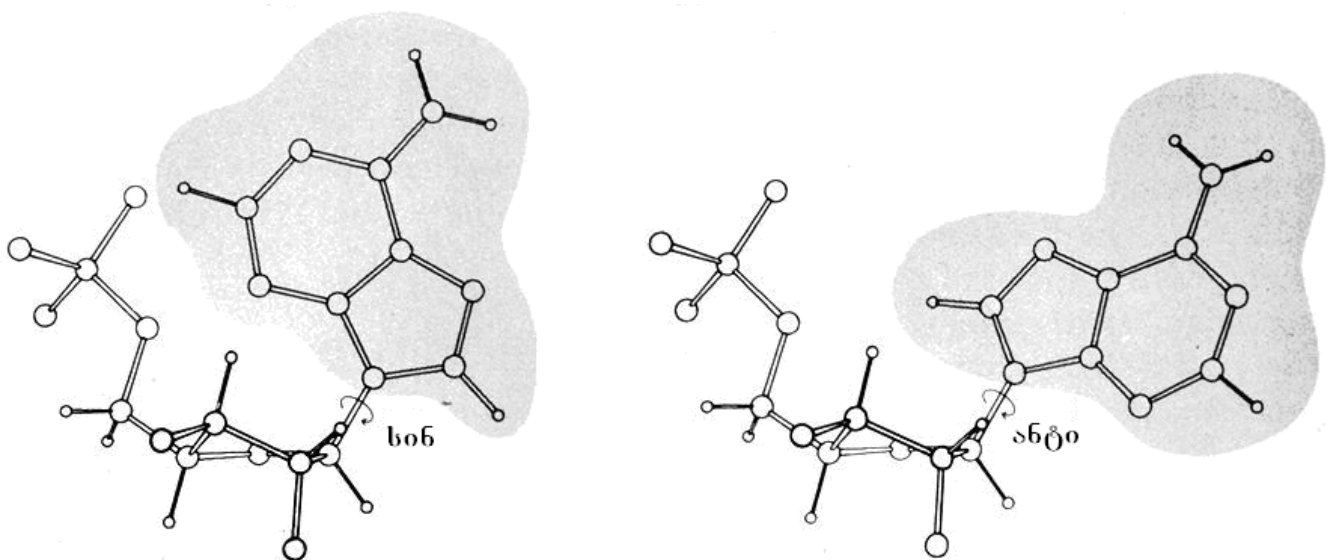
სურ. 4 ფუბე წყვილების ცენტრები წანაცვლებული სპირალის ღერძიდან



სურ. 5 დნმ-ის A, B, და Z-ფორმები



სურ. 6 დეზოქსირიბოზას ციკლურ რგოლში C2'-ენდო კონფორმაციაში და C3'-ენდო მდგომარეობაში



სურ.7 გუანინის ანტი- და სინ-კონფორმაციები

ფუნქციური თვალსაზრისით უჯრედის დნმ-ის გრძელ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში გამოყოფენ სხვადასხვა დანიშნულების მქონე უბნებს. დნმ-ის იმ მონაკვეთს, რომელიც განაპირობებს ცილების, ტ-რნმ-ის და რ-რნმ-ის სინთეზს გენი ეწოდება. განასხვავებენ ორი ტიპის გენებს: სტრუქტურულს და მარეგულირებელს. სტრუქტურული გენები განსაზღვრავენ გენის საბოლოო პროდუქტის, ცილის ან რნმ-ის, პირველად სტრუქტურას. ზოგიერთი მათგანი შედარებით უფრო ხშირად ტრანსკრიბირდება (housekeeping genes). ამასთანავე დნმ-ის მოლეკულაში გვხვდება შედარებით იშვიათად ტრანსკრიბირებადი გენებიც, რომელთა ექსპრესია სხვადასხვა ფაქტორებზეა დამოკიდებული (გარემოს ზემოქმედება, განვითარების სტადია, უჯრედის სპეციალიზაცია და ა.შ.). ყველა ასეთ მაკოდირებელ უბნებს ეგზონებს უწოდებენ. რაც შეეხება მარეგულირებელ გენებს, ისინი ხშირად წარმოადგენენ სტრუქტურული გენის დაბოლოების ან დასაწყისის სიგნალს, რომლებიც მონაწილეობენ ამ გენების ტრანსკრიფციის პროცესში, ასევე განსაზღვრავენ რეპლიკაციის ან რეკომბინაციის საწყის წერტილებს. ყოველი გენის დასაწყისში მდებარეობს ტრანსკრიფციის მაინიცირებელი ნუკლეოტიდების სპეციფიური თანამიმდევრობა, რომელსაც პრომოტორს უწოდებენ. როგორც ცნობილია E.Coli-ის პრომოტორები ე. წ. კონსენსური თანამიმდევრობებით ხასიათდებიან. ასეთ თანამიმდევრობებში გამოყოფენ სპეციფიურ: -10 უბანს -TATAAT (TATA-box) და -35 უბანს -TTGACA. თუმცა არაკონსენსური გენების შემთხვევაში ეს თანამიმდევრობა მეტნაკლებად შეიძლება განსხვავდებოდეს.

-35 უბანი			-10 უბანი		ტრანსკრიფციის სტარტი
T	T	N <sub>17</sub>	T	A	N <sub>5-9</sub>

#### E. Coli –ის პრომოტორების კონსენსური თანამიმდევრობები

ის პრომოტორები, რომელთა თანამიმდევრობა ზუსტად ემთხვევა კონსენსურ თანამიმდევრობებს, ტრანსკრიფციის ინიციაციის მაღალი სიხშირით ხასიათდებიან. ამიტომაც მუტაციები, რომლებსაც ადგილი აქვთ პრომოტორულ უბნებზე, იწვევენ ამ უბნის პრომოტორული ფუნქციის გაძლიერებას ან შესუსტებას. ცნობილია, რომ გენები, რომელთა პრომოტორებში A ან T ნუკლეოტიდის ჩვეულ პოზიციაში G ან C გვხვდება სუსტ გენებს მიეკუთვნება და ისინი ნაკლები სიხშირით ტრანსკრიბირდებიან [12]. ამავე დროს ტრანსკრიპციის სიხშირე დამოკიდებულია -35 და -10 ფრაგმენტებს შორის მანძილზე. თუ გავითვალისწინებთ დნმ-ის ორმაგსპირალურ სტრუქტურას, ამ ფრაგმენტებს შორის მანძილის ცვილების (გაზრდა ან შემცირება) შედეგად შესაძლებელია ისინი დნმ-ის ჯაჭვის ერთ მხარეს აღარ აღმოჩნდნენ და რნმ პოლიმერაზას ორივე მათგანთან ერთდროულად კონტაქტის უნარი მცირდება.

გარდა -35 და -10 უბნებისა პრომოტორული თანამიმდევრობის სხვა უბნებიც ახდენენ გავლენას ტრანსკრიპციის სიხშირეზე. ყველაზე აქტიური არიან პრომოტორები, რომლებიც წარმართავენ რიბოსომული რნმ-ის ოპერონების ტრანსკრიპციას. -35 და -10 უბნების გარდა ისინი შეიცავენ ასევე მესამე ელემენტს, AT-წყვილებით მდიდარ თანამიმდევრობებს, ე.წ. UP ელემენტები, რომლებიც 30-90-ჯერ ზრდიან ტრანსკრიპციის სიხშირეს. გარდა ამისა, პრომოტორულ აქტივობაზე გავლენას ახდენს დნმ-ის ლოკალური სტრუქტურის ცვლილება. მაგ. დნმ-ის ზესპირალიზაცია და მოხრა (მოღუნვა) გავლენას ახდენს რნმ პოლიმერაზას მიერ ორმაგი სპირალის გახსნის უნარზე.

ეუკარიოტული უჯრედების შემთხვევაში, პროკარიოტებისთვის დამახასიათებელი AT-წყვილებით მდიდარი უბნის ანალოგიურია ე.წ. TATA-box

უბანი, რომელიც მდებარეობს რნმ-ის სინთეზის ინიციაციის ადგილიდან წაკითხვის საწინააღმდეგო მიმართულებით, 19-დან 27-მდე ფუძე წყვილებს შორის ინტერვალში.

ტრანსკრიფციის სტარტი

	CCAAAT		GC-box		TATA-box		
--	--------	--	--------	--	----------	--	--

განზოგადებული ეუკარიოტული პრომოტორები.

გენის 3'- ბოლოში არსებულ სპეციფიურ უბანზე (ტერმინაციული უბანი) დნმ-ცილის კომპლექსი არასტაბილური ხდება, რისთვისაც ზოგიერთ შემთხვევაში აუცილებელი ხდება დამატებით სპეციფიური ცილების არსებობაც. ტრანსკრიფციის ტერმინაცია ხშირად ხდება შემაყოვნებელი საიტის (Pause site) ახლოს, სადაც ადგილი აქვს ტრანსკრიფციის სიჩქარის შემცირებას (10–100 ფაქტორით). ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ ასეთი უბნები მდიდარია GC - წყვილებით, რაც სავარაუდოდ განპირობებულია GC წყვილებს შორის კავშირების სიძლიერით AT- წყვილებთან შედარებით [12].

ტრანსკრიფციის მაინიცირებელი უბნის – პრომოტორის მსგავსად, როგორც პროკარიოტების, ისე ეუკარიოტების დნმ-ში გამოყოფენ რეპლიკაციის ინიციაციის ადგილს. იგი მარეგულირებელი ტიპის გენებს განეკუთვნება. E.Coli ბაქტერიის შემთხვევაში ასეთ უბანს წარმოადგენს ე. წ. oriC (Origin of replication E.Coli), რომელიც 245 ფუძე წყვილისაგან შედგება. ბაქტერიული უჯრედის დნმ-ის ამ მონაკვეთში ფუნქციურად განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ორი ტიპის ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა: პირველი მათგანი შედგება 3-ჯერ განმეორებადი 13 ფუძე წყვილისაგან, ხოლო მეორე – 4-ჯერ განმეორებადი 9 ფუძე წყვილისაგან [13,14]. როგორც ლიტერატურული მონაცემებიდან არის ცნობილი, დნმ-ის ჯაჭვების განცალკევების საწყის უბანს წარმოადგენს 13 ფუძე წყვილისაგან შემდგარი თანამიმდევრობა, რომელიც AT- წყვილებითაა მდიდარი [15,16]. თუმცა ზუსტი ბიოქიმიური მექანიზმი, რომლითაც ჯაჭვების განცალკევება მიიღწევა ჯერ-ჯერობით უცნობია.

გარდა ამისა, ეუკარიოტული უჯრედების უმრავლესობის გენში არსებობს ისეთი სეგმენტები, რომლებიც საერთოდ არ აკოდირებენ ცილებს ან რნმ და ისინი გენის წყვეტილობით ხასიათს განაპირობებენ. ასეთ არატრანსკრიბირებად სეგმენტებს ინტრონები ეწოდება. ეუკარიოტული დნმ-ის პოლიპეპტიდური ჯაჭვისთვის დამახასიათებელია ასევე სხვადასხვა სიხშირით განმეორებადი ფრაგმენტების არსებობა. ამ სეგმენტებს სატელიტურ დნმ-საც უწოდებენ. მათი ფუნქცია ბოლომდე შესწავლილი არ არის და თანამედროვე მეცნიერთათვის აქტიური კვლევის საგანს წარმოადგენს. ცნობილია, რომ ადამიანის დნმ-ის დაახლოებით 95% ცილებს ან რნმ-ს არ აკოდირებს, თუმცა მათ გააჩნიათ რეგულატორული და სხვა ფუნქციები, რომელთა შესწავლა ასევე ინტენსიურად მიმდინარეობს.

## 1.2. დნმ-ის ორმაზ-სპირალური სტრუქტურის მასტაბილიზირებელი ძალები

დნმ-ის სტრუქტურის მასტაბილიზირებელ ძალებს და ფაქტორებს მიეკუთვნება: წყალბადური კავშირები წყვილებს შორის, სტეკინგ ურთიერთქმედება ნუკლეოტიდურ ჯაჭვში მეზობელი ფუძეების სიბრტყეებს შორის [17], დნმ-ის ფოსფატური ჯგუფების ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედება გარემომცველ იონებთან [18], ფუძეების ჰიდროფობული ბუნება, ბმული წყლის გავლენა.

განვიხილოთ თითოეული მათგანი ცალ-ცალკე.

სახოგადოდ, როგორც ცნობილია წყალბადური კავშირი ხორციელდება ძლიერ ელექტროუარყოფით ატომთან კოვალენტურად დაკავშირებულ წყალბადის ატომსა და დაახლოებით 0.2 ნმ მანძილზე დაშორებულ სხვა ელექტროუარყოფით ატომს შორის, რომელსაც გააჩნია გაუწყვილებელი ელექტრონი. აზოტოვანი ფუძე წყვილების შემთხვევაში, წყალბადის ატომი კავშირს ახორციელებს ელექტრო-უარყოფით აზოტსა და ჟანგბადს, ან აზოტის ატომებს შორის. წყალბადური ბმის ენერგია, რომელიც დნმ-ში აზოტოვან ფუძე წყვილებს შორის ხორციელდება დაახლოებით 2-7.5 kcal/mol-ია [19].

დნმ-ის მოლეკულაში აზოტოვანი ფუძეების არომატული რგოლები ერთმანეთის თავზე დნმ-ის ცენტრალური ღერძის მიმართ თითქმის პერპენდიკულარულადაა განლაგებული. მათი ასეთი ურთიერთგანლაგება კი უზრუნველყოფს  $\pi$ -სტეკინგ ურთიერთქმედებას მეზობელ ფუძეებს შორის, რომელიც დამატებითი მასტაბილიზირებელი ძალაა დნმ-ის ორმაგი სპირალისათვის. ამ ტიპის ურთიერთქმედება მიეკუთვნება არაკოვალენტურ ქიმიურ ბმას. მიუხედავად იმისა, რომ არაკოვალენტური ბმები გაცილებით სუსტია, ვიდრე კოვალენტური ტიპის კავშირები, დნმ-ის ჯაჭვში განხორციელებული სტეკინგ ურთიერთქმედებების ერთობლიობა საბოლოო ჯამში ორმაგი სპირალის მნიშვნელოვან მასტაბილიზირებელ ძალას წარმოადგენს. სტეკინგ ურთიერთქმედების ენერგია სხვადასხვა აზოტოვან ფუძეებს შორის განსხვავებულია (იხ. ცხრილი 2). ამ მონაცემებიდან კარგად ჩანს, რომ ენერგეტიკულად ყველაზე სუსტ კავშირს ( $\Delta G = -0.19$  kcal mol<sup>-1</sup>) TA ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა წარმოქმნის, რაც მეტად საყურადღებოა.

ცხრილი 2

ბიჯი	სტეკინგ ურთიერთქმედების ენერგია $\Delta G$ /kcal mol <sup>-1</sup>
<b>TA</b>	-0.19
<b>TG ან CA</b>	-0.55
<b>CG</b>	-0.91
<b>AG ან CT</b>	-1.06
<b>AA ან TT</b>	-1.11
<b>AT</b>	-1.34
<b>GA ან TC</b>	-1.43
<b>CC ან GG</b>	-1.44
<b>AC ან GT</b>	-1.81
<b>GC</b>	-2.17

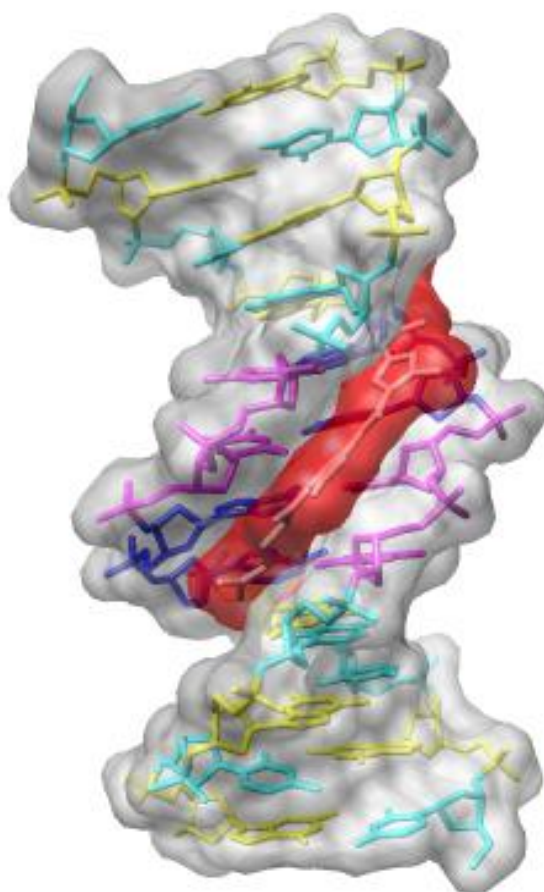
ასევე ძლიერ გავლენას ახდენს დნმ-ის ორმაგი სპირალის სტაბილობაზე მარილების კონცენტრაციის ცვლილება. დნმ-ის უარყოფითად დამუხტული ჯგუფების (ფოსფატური ნაშთები) ეკრანირება საპირისპირო მუხტის მქონე იონებით განაპირობებენ ჯაჭვებს შორის ელექტროსტატიკური განზიდვის შემცირებას და დნმ-ის ორმაგ-სპირალური სტრუქტურის წარმოქმნას [21]. ელექტროსტატიკური ეკრანირების გარდა მარილის მაღალი კონცენტრაცია მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დნმ-ის მიმართ წყლის აქტივობის შემცირებაში. მარილის მაღალი კონცენტრაციისას სპირალის დახვევის კუთხე შექცევადად იცვლება [20].

მრავალი ექსპერიმენტული მონაცემებით ნაჩვენებია წყლის განსაკუთრებული როლი ნუკლეინის მუკლების კონფორმაციის ფორმირებაში (სურ. 8) [22-28]. მნიშვნელოვანია, ასევე, ცალკეული წყლის მოლეკულის სტრუქტურული როლი დნმ-ზე, რომელიც სხვადასხვა ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობისათვის სხვადასხვაგვარად ვლინდება. დნმ-ის კალორიმეტრული კვლევების მიხედვით აღმოჩნდა, რომ AT- წყვილები მეტადაა ჰიდრატირებული, ვიდრე – GC წყვილები [29,30].

გამსხნელში დნმ-ის მოლეკულა არამდგრადია და მისი სტრუქტურა მუდმივად განიცდის გარკვეულ ფლუქტუაციურ ცვლილებებს. ცნობილია, რომ ასეთ პირობებში დნმ-ში ადგილი აქვს ორმაგი ჯაჭვის დროებით ლოკალურ განცალკევებებს [31]. დნმ-ის მოლეკულა ასევე განიცდის ბრუნვით რხევებსაც, კერძოდ, სუპერსპირალური დნმ-ის კვლევების თეორიულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ჯაჭვის გასწვრივ ორ მეზობელ წყვილებს შორის კუთხის ამპლიტუდის ფლუქტუაცია  $5^{\circ}$ -ს აღწევს [32].

დნმ-ის მოწესრიგებული სტრუქტურის სტაბილობა შეიძლება განსაზღვრული იყოს თავისუფალი ენერგიის ცვლილებით სპირალ-გორგალური გადასვლისას. კალორიმეტრულად გაზომილი ენთალპიის და ენტროპიის ცვლილება დნმ-ის ასეთი კონფორმაციული გადასვლებისას [33], საშუალებას იძლევა თავისუფალი ენერგიის ცვლილების განსაზღვრისა, ამის გამო ნაშრომში კალორიმეტრია ერთ-ერთ ძირითად მეთოდად არის წარმოდგენილი.





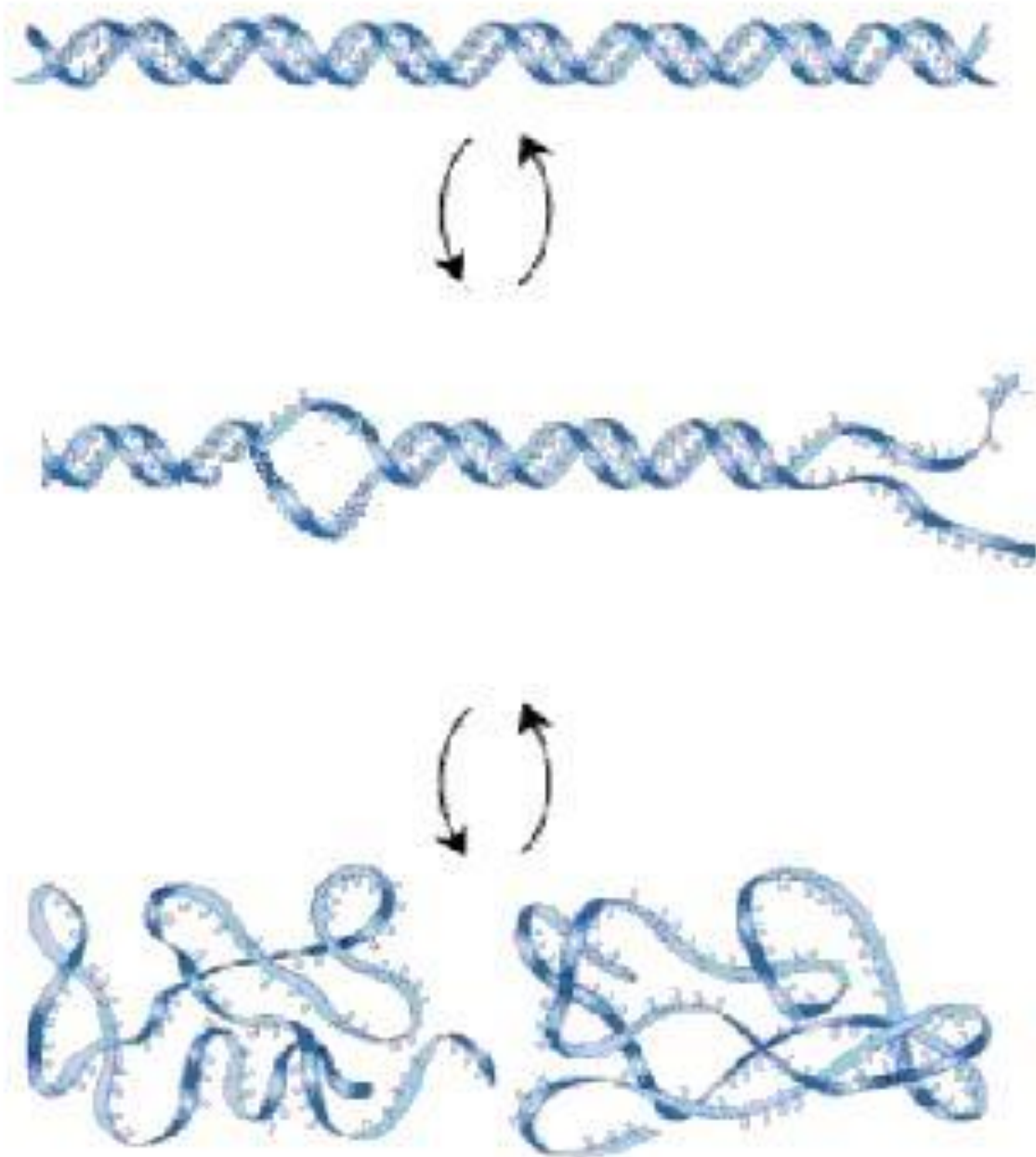
სურ. 8 დნმ-ის მცირე ღარში არსებული ბმული წყალი

### 1.3. დნმ-ის სპირალ-გორგალური ბადასვლა

ცნობილია, რომ სხვადასხვა გარეშე ფაქტორების (ტემპერატურა, ერთვალენტური და ორვალენტური იონების არსებობა, გარემოს pH, სხვადასხვა მეტალების გავლენა და ა.შ.) ზემოქმედებისას დნმ-ის ორმაგსპირალური სტრუქტურა განიცდის კონფორმაციულ ცვლილებებს [34-39]. მადესტაბილიზირებელი ზემოქმედების გაძლიერებასთან ერთად დნმ-ის ჯაჭვები იწყებენ ჯერ ნაწილობრივ, ხოლო შემდეგ მთლიანად განცალკევებას (დენატურაცია). ამ პროცესს, ხშირად, სპირალ-გორგალურ ფაზურ გადასვლასაც უწოდებენ (სურ. 9) [40]. გამომდინარე იქიდან, რომ AT და GC წყვილები სხვადასხვა თერმოსტაბილობით ხასიათდებიან (ფიზიოლოგიურ პირობებში), კერძოდ AT- წყვილები ნაკლებად სტაბილურია (ორი წყალბადური კავშირი), ვიდრე - GC (სამი წყალბადური კავშირი), დნმ-ის ღლობა AT- წყვილებით მდიდარი უბნებიდან დაიწყება. შედეგად დნმ-ის დენატურაციული გადასვლის პროცესში ნაწილი მოლეკულისა იმყოფება სპირალურ და ნაწილი დენატურირებულ მდგომარეობაში [41]. თუკი დნმ-ის ორმაგი სპირალი წარმოადგენს საკმაოდ ხისტ სტრუქტურას, პერსისტენტული სიგრძით – 150 ფუძე წყვილი, გაღლობილი (განცალკევებული ჯაჭვები) უბნები დნმ-სა, პირიქით, საკმაოდ მაღალი დრეკადობით გამოირჩევიან (პერსისტენტული სიგრძით – 4 ფუძე წყვილი). გარემოს პარამეტრების მცირე შეცვლა, რომლის დროსაც ხდება წყალბადური კავშირების გარკვეულ ადგილებში დარღვევა ფუძეებს შორის და ამის შემდეგ თუ მოლეკულას ისევ საწყის პირობებში დავაბრუნებთ, მოხდება მოლეკულის კომპლემენტარულ წყვილებს შორის დარღვეული წყალბადური კავშირების ხელახლა აღდგენა, ანუ დნმ-ის მოლეკულა აღიდგენს პირვანდელ ორმაგ-სპირალურ სტრუქტურას. ზოგადად, დნმ-ის სპირალ-გორგალური გადასვლა გარკვეულ გარემო პირობებში ("სუსტი" დესტაბილიზაცია) შექცევადი ხასიათისაა.

ვინაიდან დნმ-ის სპირალ-გორგალური (დენატურაცია) გადასვლის პროცესს თან სდევს დნმ-ის მახასიათებელი მრავალი ფიზიკური პარამეტრების ცვლილება, მისი შესწავლა სხვადასხვა მეთოდებითაა შესაძლებელი. ცნობილია, რომ თუ ტემპერატურის ზემოქმედებით ვახდენთ სპირალ-გორგალურ (დენატურაცია) გადასვლას, ამ პროცესს თან ახლავს სითბოს შთანთქმა, რომელიც ხასიათდება გადასვლის ენთალპიის და ენტროპიის გარკვეული მნიშვნელობებით. დნმ-ის გაღლობილი ნაწილის (1-მ) ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მრუდი ნაჩვენებია ნახ. 1-ზე. მის ერთ-ერთ მახასიათებელს წარმოადგენს დენატურაციული გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალი ( $\Delta T_m$ ), რომლის მიხედვითაც შეიძლება ვიმსჯელოთ ამ პროცესის კოოპერატულობაზე. დნმ-ის ღლობის ტიპური მიკროკალორიმეტრული ჩანაწერი მოყვანილია ნახ. 2-ზე, სადაც საკვლევი ნიმუშის სითბოტევადობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულებაა მოცემული. ამ შემთხვევაში დნმ-ის ღლობის ტემპერატურულ ინტერვალს განსაზღვრავენ, როგორც სითბოს შთანთქმის პიკის სიგანეს ნახევარსიმაღლეზე, ხოლო გადასვლის ენთალპია განისაზღვრება პიკის ქვეშ მიღებული ფართით. მრავალი ექსპერიმენტული შედეგებით ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის ღლობის ტემპერატურა დამოკიდებულია გარემო პირობებზე [42,43]. ასევე ნაჩვენებია [44,45], რომ ფაზური გადასვლის (ღლობის) ტემპერატურა დამოკიდებულია დნმ-ში GC წყვილების შემცველობაზე და წარმოადგენს წრფივ ფუნქციას, რომელიც განისაზღვრება ფორმულით:

$$\%GC=(T_m-69,3)\cdot 2,44$$

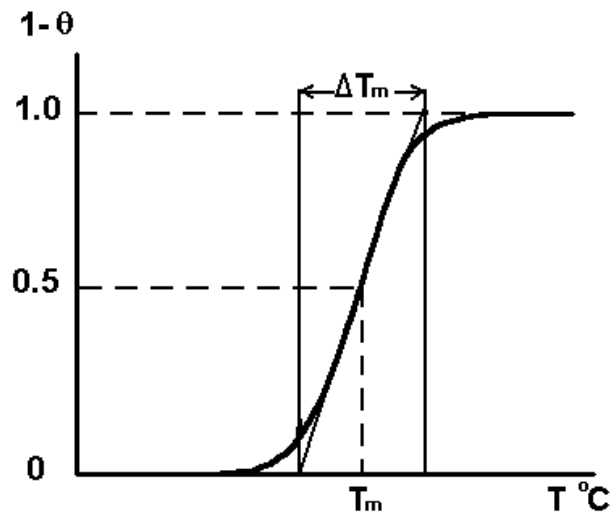


სურ. 9 დნმ-ის სპირალ-გორგალური გადასვლა

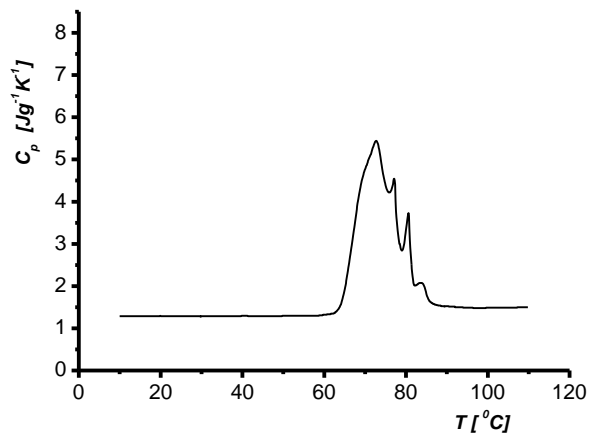
ექსპერიმენტულად განსაზღვრულია, რომ დნმ-ის ლღობის ტემპერატურა მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული გარემო პირობებზე [46], კერძოდ ნეიტრალური pH-ის გამსწნელის და Na-ის კონცენტრაციის  $10^{-2}M$ -დან  $1M$ -მდე ინტერვალის პირობებში ეს დამოკიდებულება განისაზღვრება როგორც

$$T_0=176.0-(2.6-X_0)\cdot(36.0-7.04 \lg[Na^+])$$

სადაც  $X_0$  – GC წყვილების წილია.



ნახ. 1 დნმ-ის ჭლობის მრუდი



ნახ. 2 ორმაგსპირალური დნმ-ის ჭლობის კალორიმეტრული მრუდი

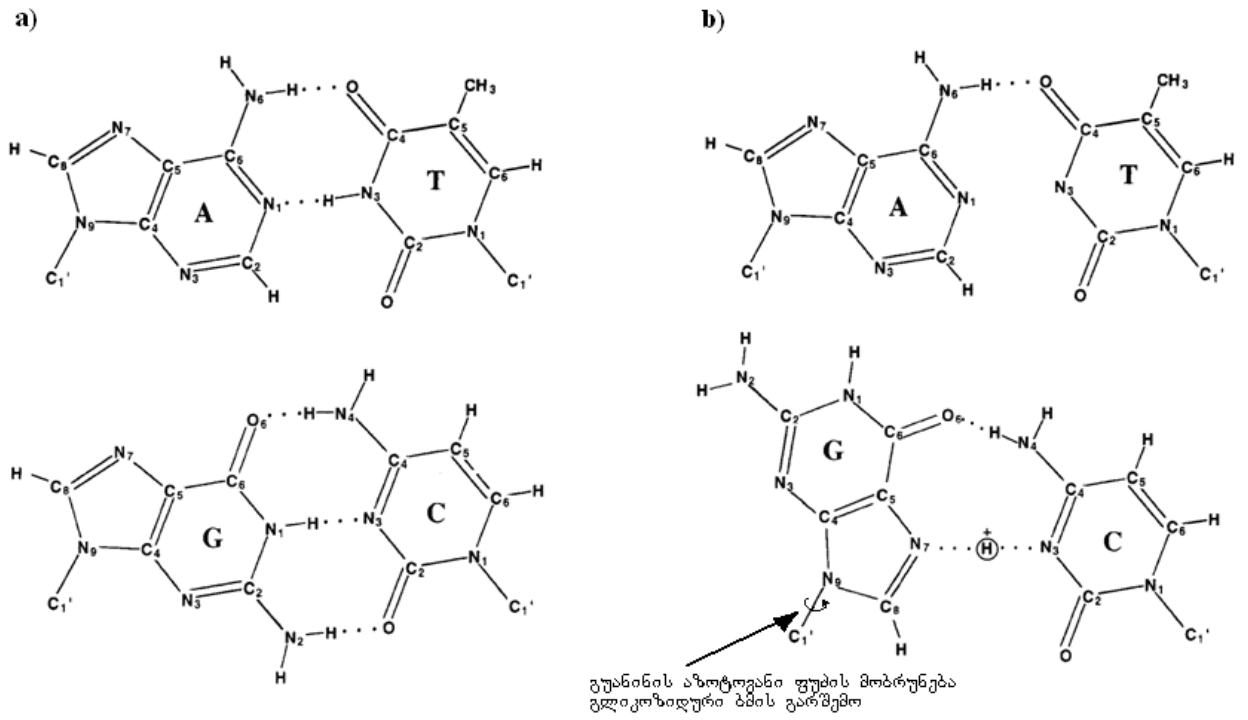
#### 1.4. დნმ-ის ორმაგი სპირალის პროტონიზაცია/დეპროტონიზაცია

ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ pH~7.0 -ის პირობებში დნმ-ის ფუძე წყვილები იონიზებული არ არიან [47]. ამავე პირობებში პროტონიზაციას ასევე არ განიცდის ფოსფატური ჯგუფები, რომელთათვისაც  $pK \sim 1$ , და დეზოქსირიბოზა, რომლის  $pK \sim 12-13$ .

pH-ის შემცირებით, ანუ პროტონიზაციის გაზრდით, პროტონის მიერთება ხდება აზოტოვანი ფუძეების იმ ატომებთან, სადაც მეტი უარყოფითი მუხტია კონცენტრირებული და რასაც  $\pi$ -ელექტრონები განაპირობებენ. ამ ატომებს გააჩნიათ გაუწყვილებელ ელექტრონები, რაც თავის მხრივ აადვილებს პროტონის მიერთებას. ამ მოსაზრებებზე დაყრდნობით პროტონიზაციის შესაძლო ადგილებს წარმოადგენს ციტოზინის N3, გუანინის N7 და ადენინის N1, თუმცა როგორც ექსპერიმენტული მონაცემებით დასტურდება დნმ-ის ორმაგსპირალურ სტრუქტურაში პროტონიზაციას განიცდის მხოლოდ N7 გუანინი და N1 ადენინი [48-57]. ეს შეიძლება განპირობებული იყოს იმ ფაქტით, რომ დნმ-ის ორმაგ სპირალში, ვოტსონ-კრიკის ფუძე წყვილში, გუანინის N7 მდებარეობს ორმაგი სპირალის დიდ ღარში და იგი ხელმისაწვდომია პროტონისთვის, მაშინ როცა ციტოზინის N3 ჩართულია GC ფუძეებს შორის განხორციელებულ ერთ-ერთ წყალბადურ ბმაში [58], რის გამოც მისი პროტონირება არ ხდება. ლიტერატურული მონაცემების მიხედვით [57] ციტოზინის პროტონიზაციას ადგილი აქვს GC წყვილის პროტონ-ინდუცირებული კონფორმაციული ცვლილებების განხორციელების შემდეგ, რაც გულისხმობს გუანინის N7-დან ციტოზინის N3-ზე პროტონის გადატანას. ამას ადასტურებს ის ფაქტიც, რომ ციტოზინის პროტონიზაცია შეუძლებელია განხორციელდეს, როცა გუანინის N7 ცენტრი ბლოკირებულია რომელიმე ლიგანდით. ამრიგად, GC ფუძეების სამი შესაძლო პროტონიზაციის ცენტრიდან დნმ-ის ორმაგ სპირალში რეალური პროტონიზაციის ადგილებად მიჩნეულია N7 გუანინი და N1 ადენინი.

ლიტერატურაში არსებული მონაცემების თანახმად pH-ის შემცირებით შესაძლებელია მოხდეს დნმ-ში GC წყვილებით მდიდარი ადგილების ახალ კონფორმაციაში გადასვლა [59-62], რომელიც ავტორების მიერ ინტერპრეტირებული იქნა როგორც B-დან C-კონფორმაციაში გადასვლა. გუანინის N7-ის პროტონირება იწვევს ჰეტერო-ციკლურ რგოლზე უარყოფითი მუხტის შემცირებას, რაც თავის მხრივ ასუსტებს წყალბადურ კავშირებს აზოტოვან ფუძეებს შორის (G და C). როგორც ლიტერატურული მონაცემებიდან არის ცნობილი [63-65], ამ დროს ხდება GC წყვილს შორის არსებული  $N_1-H \cdots N_3$  და  $N_2-H \cdots O$  წყალბადური ბმების გაწყვეტა, გლიკოზიდური ბმის გარშემო მობრუნების ხარჯზე გუანინის აზოტოვანი ფუძის ანტი-დან სინ-კონფორმაციაში გადასვლა, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ე. წ. ჰუესტინის GC წყვილები ორი წყალბადური კავშირით (იხ. სურ. 10). პროტონიზაციის შედეგად მიღებული ახალი ტიპის GC წყვილი ნაკლებად სტაბილურია, მაგრამ მიუხედავად ამისა დნმ-ის მეორადი სტრუქტურა ჯერ კიდევ შენარჩუნებული რჩება. ავტორების [58] მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ AT- წყვილების პროტონიზაცია, ხდება უშუალოდ დნმ-ის დენატურაციის დაწყების წინ, რომლის დროსაც AT- წყვილებს (ადენინის N6-სა და თიმინის C4-ს) შორის მხოლოდ ერთი წყალბადური კავშირია შენარჩუნებული. ეს წყვილი უფრო არასტაბილური უნდა იყოს, ვიდრე პროტონირებული GC წყვილი, სადაც ორი წყალბადური კავშირი რჩება. ლოგიკურია ვივარაუდოთ, რომ მუავათი დენატურაციისას დნმ-ში ყველაზე ნაკლებად სტაბილური AT- წყვილებით მდიდარი უბნებია.

ფლუორესცენციული კვლევების მიხედვით [58], AT-ფუძე წყვილების პროტონიზაცია იწყება pH~6.0-დან, ხოლო მუავათი ინდუცირებული დნმ-ის კონფორმაციული ცვლილებები pH<5.0. რამანის სპექტროსკოპით მიღებული



სურ. 10 ვოტსონ-კრიკისა და ე.წ. ჰუგსტინის ფუძე წყვილები

მონაცემების მიხედვით [64], კვლევების თანახმად, GC- წყვილების პროტონიზაცია უფრო დაბალ pH-ზე (~3.8) აღენინის პროტონიზაცია შესამჩნევი ხდება pH 4.4 და გრძელდება pH 3.45-მდე, რაც დაკავშირებულია AT- წყვილებს შორის კავშირების რღვევასთან. ამავე იწყება და გრძელდება pH 3.45-მდე.

წრიული დიქროიზმის და კინეტიკური მეთოდით კვლევების მიხედვით ნაჩვენებია, რომ მუავე გარემოში წარმოიქმნება დნმ-ის სტაბილური პროტონირებული ე.წ. "S" სტრუქტურა, სადაც აზოტოვანი ფუძეები მთლიანად მოწესრიგებულია [67-69]. ამ დროს ადგილი აქვს გუანინის შექცევად გადასვლას ანტი-დან სინ-კონფორმაციაში, ანუ არასტაბილურ ე.წ. "L" მდგომარეობაში, რომლის დროსაც როგორც ვარაუდობენ დნმ-ს გააჩნია ორმაგსპირალური სტრუქტურა ლოკალურად დენატურირებული (განცალკევებული) უბნებით [68,69]. თუმცა ამ სტრუქტურის ბუნება ჯერ კიდევ ბოლომდე გარკვეული არ არის.

ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ მუავე არეში ადგილი აქვს AT და GC წყვილების თერმოსტაბილობის შემცირებას და ერთმანეთთან დაახლოვებას [71], თუმცა ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის ხსნარში ტუტე მეტალების კონცენტრაციის გაზრდით დაბალი pH-ის პირობებში, ისევე როგორც ნეიტრალური pH-ის პირობებში, მაკრომოლეკულის სტაბილობა იზრდება. თეორიულად და ექსპერიმენტულად (ძირითადად სპექტროფოტომეტრული მეთოდით) ნაჩვენები იქნა [72,73], რომ ტუტე არეში, რაც უფრო დიდია გამსხნელის იონური ძალა, მით ნაკლებია დნმ-ის ღლობის ტემპერატურა. უნდა აღინიშნოს, რომ ნეიტრალური pH-ის პირობების მსგავსად, დნმ-ის ორმაგი სპირალის თერმული სტაბილობა მუავე გარემო პირობებში იონური ძალის გაზრდისას ასევე მატულობს. ამას ხსნიან იმ ფაქტით, რომ ხსნარში მეტალის იონების არსებობა მკვეთრად ამცირებს იმ ჯგუფების (გუანინის N1 და თიმინის N3) pK-ს მნიშვნელობას, რომლებიც ტუტე არეში დეპროტონიზაციას განიცდიან. რაც შეეხება წყვილების პროტონიზაციის უნარს, ნაჩვენებია რომ იონური ძალა სუსტ გავლენას ახდენს ამ პროცესზე [48].

მუავე არესაგან განსხვავებით შედარებით მწირია ინფორმაცია დნმ-ის თვისებების შესახებ ტუტე არეში, განსაკუთრებით კი სუსტ ტუტე გარემოში (pH 8.0-10.0). ლიტერატურული მონაცემების თანახმად [48], დნმ-ის მოლეკულაში აზოტოვანი ფუძეების დეპროტონიზაციას (pH>7) ადგილი აქვს გუანინის N1-ზე და თიმინის N3-ზე.

სპექტროფოტომეტრული გაზომვებით ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის ტიტრაციისას ტუტე არისკენ, სანამ დნმ-ს ჯერ კიდევ შენარჩუნებული აქვს ორმაგ-სპირალური სტრუქტურა, ფუძეების დეპროტონიზაცია არ ხდება ან ძალიან მცირეა [74-76]. ამავე კვლევების თანახმად, ტუტეთი ინდუცირებული დნმ-ის მეორეული სტრუქტურის კონფორმაციული ცვლილებები ძირითადად თავს იჩენს pH>11.6 დროს [74]. ამ ცვლილებებისას უკვე იწყება ფუძეების იონიზაცია და მათ შორის წყალბადური კავშირების შემცირება, რასაც თან სდევს დნმ-ის მეორეული სტრუქტურის რღვევა [77]. ავტორების [77] მიხედვით, დნმ-ის ტუტე დენატურაცია უნდა ხორციელდებოდეს ჰიდროქსიდის იონების მიერ ფუძე წყვილებს შორის წყალბადურ კავშირში მონაწილე წყალბადის ატომის მოწყვეტით და მასთან კავშირით წყლის მოლეკულის წარმოქმნით. დნმ-ის ვისკოზიმეტრული შესწავლით ტუტე არეში (pH>8.0) ნაჩვენებია [79], რომ მაღალი იონური ძალის პირობებშიც დნმ-ის სიხისტე იზრდება, რაც მიუთითებს ასეთ გარემოში დნმ-ის სტრუქტურულ სტაბილობაზე. ასევე ცნობილია, რომ ~pH 12.5 ტუტიანობის პირობებში დნმ-ის მოლეკულა მთლიანად დენატურირებულ მდგომარეობაში იმყოფება.



## 1.5. სპეციფიური და არასპეციფიური ურთიერთქმედების სახეები (ტიპები) დნმ-ის ჯაჭვთან

გენეტიკური ინფორმაციის ხელმისაწვდომობა დამოკიდებულია ცილების უნარზე ამოიცნონ დნმ-ის გარკვეული უბანი და მოხდეს მათ შორის ურთიერთქმედება ისეთნაირად, რომ შესაძლებელი გახდეს დნმ-ის ნუკლეოტიდურ ჯაჭვში კოდირებული ინფორმაციის კოპირება დნმ-ით (რეპლიკაცია), ან რნმ-ით (ტრანსკრიფცია). უმარტივესი “ნაბიჯებიც” კი ამ პროცესისა მოითხოვს მრავალ სპეციფიურ ცილას, რომლებიც ურთიერთქმედებენ ერთმანეთთან და ნუკლეინის მუავებთან (სპეციფიურ უბნებთან). ამასთანავე ორგანიზმს შეუძლია არეგულიროს გენების უმეტესობის ექსპრესია, რომელიც კიდევ სხვა ტიპის ცილების არსებობასაც საჭიროებს და მოქმედებენ როგორც ტრანსკრიფციის აქტივატორები ან რეპრესორები.

მრავალი ცილა, მაგალითად ჰისტონები, არასპეციფიურად უკავშირდება დნმ-ს, ანუ განურჩევლად იმისა თუ როგორია ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობა. დადგენილია ასევე, რომ დნმ-ის რეპლიკაციაში მონაწილე ზოგიერთი ტიპის ცილა, ფუნქციონალურ ჯგუფების მეშვეობით ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედების საშუალებით კავშირს წარმოქმნიან დნმ-ის ფოსფატურ ჯგუფებთან (არასპეციფიური ურთიერთქმედება). ცილები, რომლებმაც უნდა ამოიცნოს დნმ-ის სპეციფიური ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა, თავდაპირველად, სავარაუდოდ ასევე არასპეციფიურად და სუსტად უკავშირდებიან დნმ-ს, რათა პოლინუკლეოტიდური ჯაჭვის გასწვრივ “მოძრაობით” შეძლონ შესაბამისი სპეციფიური უბნის პოვნა. ძირითადი მაინიცირებელი ძალა სხვადასხვა მაკრომოლეკულების დნმ-თან არასპეციფიური ურთიერთქმედებისა ელექტროსტატიკური ხასიათისაა და ემყარება დნმ-ის უარყოფითად დამუხტულ ფოსფატურ ჯგუფებსა და მასთან ურთიერთქმედ მაკრომოლეკულის დადებითად დამუხტულ ჯგუფებს შორის კავშირის წარმოქმნას. ურთიერთქმედების მსგავსი მექანიზმი უდევს საფუძვლად გენის გადამტანი სხვადასხვა ბიოპოლიმერული ნაწილაკისა და შესაბამისი გენური მასალის კომპლექსის წარმოქმნას. ეს სისტემები (ნაწი ზომის ნაწილაკისა და დნმ (გენის) კომპლექსი) უკვე გამოიყენება გენურ თერაპიაში, თუმცა ჯერ კიდევ აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები ამ მიმართულებით [80,81,82]. გენოთერაპია გულისხმობს ცოცხალი ორგანიზმის უჯრედში ოლიგო- ან პოლინუკლეოტიდური მასალის შეყვანას არასასურველი გენების ფუნქციების დასათრგუნად, ან შესაბამისი გენების ექსპრესიის მიზნით, იმისათვის, რომ მოხდეს გამომუშავება არ არსებული, ან არასაკმარისი რაოდენობით მყოფი პროდუქტებისა. ამიტომ საჭირო ოლიგონუკლეოტიდმა უნდა მიაღწიოს განსაზღვრულ ქსოვილებს, ან ორგანოებს, გადააკვეთოს პლაზმატური მემბრანა იმისათვის, რომ უჯრედის შიგნით განსაზღვრულ სამიზნე უბანში (ბირთვში) მოხდნენ და იპოვნონ ის მ-რნმ-ის, ან ქრომოსომული დნმ-ის უბანი, რომლის წინააღმდეგაც ისინი არიან მიმართულნი. შეყვანილი გენი უნდა შევიდეს მისი პროდუქტის ექსპრესიის უნარის მქონე კონსტრუქციის შემადგენლობაში. რადგანაც გენს, ან ოლიგონუკლეოტიდს თავისთავად ეს თვისებები არ გააჩნიათ, ორგანიზმში შეყვანისას მხოლოდ მათი მცირე რაოდენობა მიაღწევს საჭირო ადგილს. უჯრედში მოხვედრისას უცხო დნმ-მა შეიძლება არ მოახდინოს ლოკალიზაცია საჭიროების ადგილზე და უფრო მეტიც, შეიძლება აღმოჩნდეს ლიზოსომებში, სადაც ნუკლეაზების ზემოქმედებით შეიძლება მოხდეს მათი დაშლა. დნმ-ის მოლეკულის ჩართვა სხვადასხვა ტიპის ნაწი ზომის პოლიმერულ ნაწილაკში იცავს მას ორგანიზმში არსებული ნუკლეაზებისაგან [83].

დღეისათვის დამკვიდრებული მოსაზრებით ცილა-დნმ-ს შორის სპეციფიური ურთიერთქმედება ძირითადად კონფორმაციულ შესაბამისობას ემყარება. სხვა ავტორების თანახმად [84-87] დნმ-თან სპეციფიურად დაკავშირებული ცილები, საზოგადოდ, არ არღვევენ დნმ-ის ორმაგი სპირალის

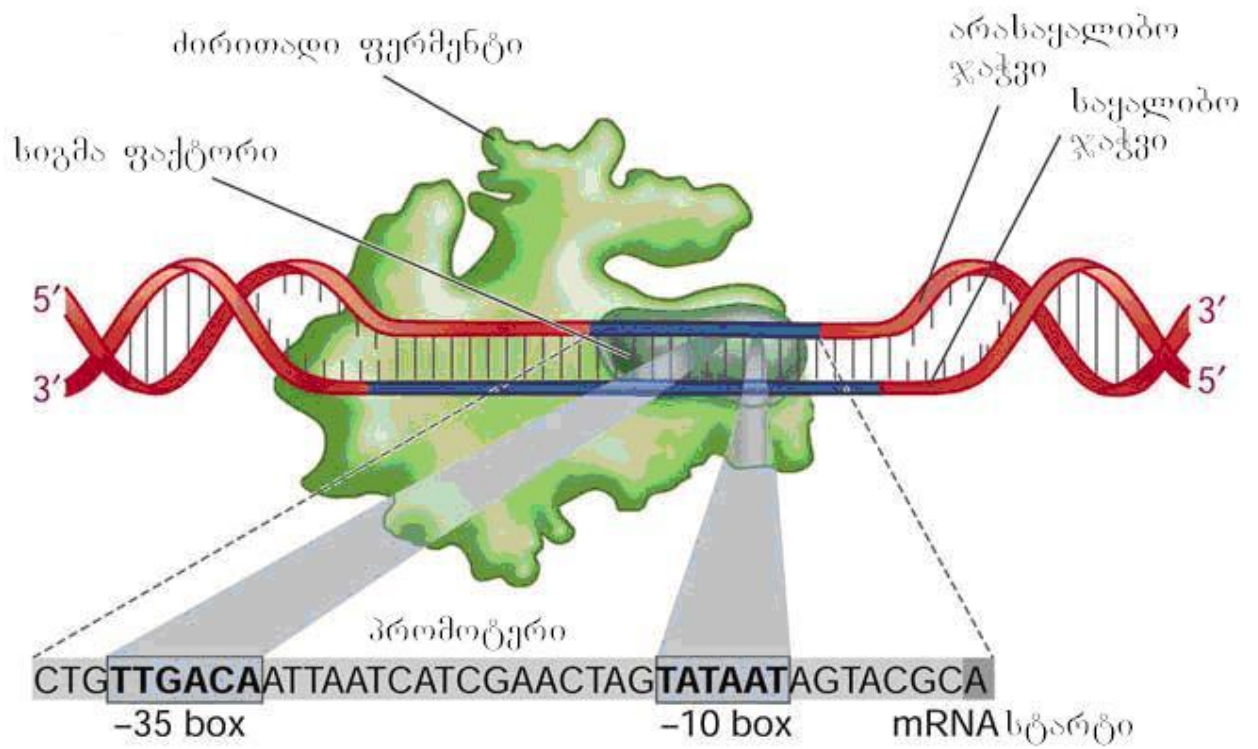
ბაზისურ წყვილებს შორის კავშირს და ოთხი ბაზისური წყვილის (AT, TA, GC და CG) კომბინაციით შედგენილი სპეციფიური უბნის ამოცნობა ხდება ამ უკანასკნელთა ფუნქციონალური ჯგუფების მიხედვით, რომლებიც გამოტანილი არიან დნმ-ის დიდ ან მცირე დარში. ამის შემდეგ ცილა ურთიერთქმედებს დიდ და მცირე დარში ექსპონირებული ფუძე წყვილების ფუნქციონალურ ჯგუფებთან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ცილა-დნმ-ის ჩაკეტილი კომპლექსი (დნმ-ის ჯაჭვებს შორის კავშირი არაა დარღვეული) [88,89]. მიღებული ცილა-დნმ-ის კომპლექსში განხორციელებული კონფორმაციული ცვლილებების შედეგად დნმ-ის ჯაჭვები განცალკევდება და მიიღება ღია კომპლექსი [88]. ცილის მიერ დნმ-ის უბნის ამოცნობის ასეთ სცენარს იზიარებს მრავალი მეცნიერი, თუმცა, როგორც ზემოთ ავლინებთ, პროცესის ასეთი თანმიმდევრობით განხორციელების შესახებ უტყუარი დამადასტურებელი მონაცემები დღეს-დღეობით არ არსებობს. ამავე დროს გაუგებარია თუ რაში მდგომარეობს დნმ-ის ამათუ იმ ბაზისური წყვილის უნიკალურობა, ფუნქციონალური ჯგუფების თვალსაზრისით, ვინაიდან დნმ-ის ამომცნობი ცილა იგივე წარმატებით შეიძლება დაუკავშირდეს სხვა მცირე ან დიდ დარში ექსპონირებულ იგივე ტიპის აზოტოვანი ფუძის ფუნქციონალურ ჯგუფს დნმ-ის ჯაჭვის გასწვრივ.

ჯერ-ჯერობით ზუსტად დადგენილი არ არის იმ ურთიერთქმედების ძალების ბუნება, რომლებიც საფუძვლად უდევს ცილის მიერ დნმ-ის უბანთან სპეციფიური კომპლექსის წარმოქმნას. გაზომილი იქნა ასეთი ურთიერთქმედების (დნმ-ცილის კომპლექსი) დისოციაციის კონსტანტის მნიშვნელობა, რომელიც აღმოჩნდა  $10^{-9}$ - $10^{-12}$   $M^{-1}$  რიგის, რომელიც დნმ-ცილის არასპეციფიური ურთიერთქმედების კონსტანტის მნიშვნელობაზე  $10^3$ - $10^7$  ჯერ მეტია.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ არაჰისტონური ცილები (მუავე ცილები) შეიცავენ ისეთ დომენებს, რომლითაც სპეციფიურად უკავშირდებიან დნმ-ის გარკვეულ უბნებს, რითიც ხელს უწყობენ ტრანსკრიფციის პროცესის აქტივაციას, ანუ ასეთი ცილები მონაწილეობენ რნმ-ის სინთეზის პოზიტიურ კონტროლში [90-95].

ცნობილია, რომ დნმ-თან სპეციფიური ურთიერთქმედებით გამოირჩევა რნმ პოლიმერაზა, რომელიც წარმოადგენს ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს ბიომაკრომოლეკულას და რომელიც მთავარ როლს თამაშობს როგორც ეუკარიოტული, ისე პროკარიოტული უჯრედის გენური ტრანსკრიფციის პროცესში. ნაჩვენებია, რომ ეუკარიოტულ უჯრედში რნმ პოლიმერაზა პრომოტორებთან (AT-წყვილებით მდიდარი უბნები დნმ-ის პოლინუკლეოტიდურ ჯაჭვში, ე.წ. TATA-box) ერთად წარმოქმნის სტაბილურ კომპლექსს, რომელიც უზრუნველყოფს ტრანსკრიფციის ზუსტ და ეფექტურ დაწყების ადგილის განსაზღვრას (სურ. 11) [96-101]. რნმ-პოლიმერაზა უკავშირდება ნუკლეოზიდ ტრიფოსფატის სუბსტრატს და აკატალიზებს რნმ-ის სინთეზს, ხოლო სპეციფიურ ადგილას ახდენს რნმ-ის სინთეზის ტერმინაციას, როგორც ვარაუდობენ ტერმინაციულ ფაქტორებთან ურთიერთქმედებით. დადგენილია, რომ რნმ პოლიმერაზას მოდიფიკაცია პასუხისმგებელია გენური ექსპრესიის რეგულაციაზეც [102-104]. ვინაიდან რნმ-პოლიმერაზას ფუნქციური შესაძლებლობები განპირობებულია მისი შემადგენელი სუბერთეულების სტრუქტურით, ამ სტრუქტურების დეტალური კვლევა და ცალკეული სუბერთეულის სტრუქტურის ცოდნა საშუალებას მოგვცემს ტრანსკრიფციის პროცესის და მისი რეგულაციის მექანიზმების უკეთ გარკვევაში.

როგორც ცნობილია, პროკარიოტულ უჯრედებში ერთი ტიპის რნმ-პოლიმერაზა ახორციელებს ყველა რნმ-ის სინთეზს. იგი შედგება ძირითადი ფერმენტისა ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\beta'$ ,  $\omega$ -სუბერთეულები) და სპეციფიური  $\sigma$  ფაქტორისაგან, რომელთა კომბინაციაც (პოლიენზიმი) განსაზღვრავს თუ რომელი პრომოტორი უნდა ტრანსკრიბირდეს დნმ-ის ჯაჭვში. ცნობილია, რომ  $\beta$  (151 kDa) და  $\beta'$  (156 kDa) სუბერთეულები მნიშვნელოვნად დიდია ვიდრე  $\alpha$  (37 kDa) და  $\omega$  (11 kDa).



სურ. 11 რნმ პოლიმერაზა-დნმ-ის ურთიერთქმედება და ტრანსკრიფციის პროცესის წარმართვა

ბაქტერიულ უჯრედებში რამოდენიმე სხვადასხვა ფორმის  $\sigma$  სუბერთეული იქნა იდენტიფიცირებული, მოლეკულური წონით 28 kDa-დან 70 kDa-მდე. ისინი დროებით უკავშირდებიან ძირითად ფერმენტს ( $\alpha_2, \beta, \beta', \omega$ ), მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ტრანსკრიფციის ინიციაციის ადგილის ამოცნობაში და ასევე გააჩნიათ ჰელიკაზა აქტივობა დნმ-ის ორმაგი სპირალის გაშლისა. ცნობილია, რომ იმ შემთხვევაში თუ ძირითადი ფერმენტი არაა დაკავშირებული  $\sigma$ -სთან, იგი არასპეციფიურად უკავშირდება დნმ-ს, ანუ მისი სწრაფვა პრომოტორისკენ ივივა რაც დნმ-ის სხვა თანამიმდევრობებისკენ ( $K_{\text{assoc.}} \approx 10^{-10} \text{M}^{-1}$ ), ხოლო ცილა-დნმ-ის კომპლექსის დისოციაციის დრო  $\sim 60$ წთ-ია. როცა ძირითადი ფერმენტი დაკავშირებულია  $\sigma$ -ფაქტორთან, მისი სწრაფვა დნმ-ის პრომოტორული უბნისკენ მნიშვნელოვნად იზრდება ( $K_{\text{assoc.}} \approx 2 \cdot 10^{-11} \text{M}^{-1}$ ) და წარმოქმნის უფრო სტაბილურ კომპლექსს ( $t_{1/2} \approx 2-3 \text{ h}$ )[12].

ტრანსკრიფციის ინიციაციის პროცესი, რომელიც გენის ექსპრესიის საწყის ეტაპს წარმოადგენს, გულისხმობს პრომოტორის "ღლობას" (ჯაჭვების განცალკევებას) ისე, რომ რნმ პოლიმერაზასთვის ხელმისაწვდომი გახდეს დნმ-ის ორმაგი სპირალის ის ჯაჭვი (ე.წ. საყალიბო ჯაჭვი), საიდანაც საჭიროა ინფორმაციის წაკითხვა. აღსანიშნავია, რომ პრომოტორის "ღლობის" მექანიზმი ჯერ-ჯერობით უცნობია. ამ საკითხთან დაკავშირებით სამი ურთიერთ არაგამომრიცხავი მოდელი იქნა შემოთავაზებული: დნმ-ს განხვევის (untwisting), დნმ-ს მოხრის (bending) და აზოტოვანი ფუძეების მობრუნება გლიკოზიდური ბმის ირგვლივ (base flipping) (ფუძეების დნმ-ის სპირალში ჩაჭერა ან სპირალის გარეთ ექსპონირება)[105]. იუნგის და სხვების მიერ ნაჩვენები იქნა, რომ *Escherichia coli*-ის რნმ პოლიმერაზას მოლეკულის მხოლოდ მცირე ნაწილს ( $<1/5$ ), გააჩნია უნარი ბაქტერიულ ინიციაციურ ფაქტორ  $\sigma$ -სთან ერთად პრომოტორის გაღლობისა.

ტრანსკრიფციის რეგულაცია ეუკარიოტული უჯრედის ბირთვში შედარებით რთული მულტიკომპონენტური ცილა-დნმ-ის კომპლექსის წარმოქმნას მოითხოვს [106]. ამ შემთხვევაში ცილების კომპლექსი, რომელიც რნმ პოლიმერაზასთან ერთად მოიცავს მრავალ ტრანსკრიფციულ ფაქტორს, მნიშვნელოვანი სპეციფიურობით ცნობს დნმ-ის მოკლე უბნებს. საზოგადოდ, ცილების ამ რთული კომპლექსის წარმოქმნა განისაზღვრება ტრანსკრიფციული ფაქტორებით, რომელიც დნმ-ის გარეშე არ მიმდინარეობს. უფრო მეტიც, ზოგიერთი ინდივიდუალური ფაქტორის სწრაფვა დნმ-თან დაკავშირებისა სხვა ცილის კომპონენტების გარეშე შეიძლება საკმაოდ სუსტი იყოს. ამ კომპლექსის წარმოქმნა სავარაუდოდ მიმდინარეობს კომპლექტირების მოდელით, რომლის მიხედვითაც დნმ მოქმედებს, როგორც ყალიბი, სადაც კომპონენტები თანამიმდევრობით უკავშირდებიან ერთმანეთს და წარმოქმნიან აგრეგატებს.

გარკვეული ტიპის ცილების მიერ დნმ-ის სპეციფიური თანამიმდევრობების ამოცნობა ხდება ასევე რეპლიკაციის დროს. როგორც წინა თავში ავლნიშნეთ, *E. Coli* -ის შემთხვევაში დნმ-ის ამოცნობის და რეპლიკაციის დაწყების (ჯაჭვების განცალკევება) ადგილს წარმოადგენს *oriC*, სადაც მოთავსებულია ნუკლეოტიდების რამოდენიმეჯერ განმეორებადი 9-ფუძე წყვილის (*DnaA*-box) და 13-ფუძე წყვილის შემცველი სპეციფიური თანამიმდევრობა. *E. Coli* ბაქტერიაში რეპლიკაციის ინიციაციის მთავარ კომპონენტს *DnaA*-ცილა წარმოადგენს, რომელიც ოლიგომერის წარმოქმნის შედეგად ATP-დამოკიდებულ რეაქციაში ამოიცნობს 13 ფუძე წყვილიან განმეორებებს (AT-ფუძე წყვილებით მდიდარი უბანი). *DnaA*-ცილების კომპლექსი იწვევს დნმ-ის ამ მონაკვეთზე ორმაგი ჯაჭვის განხვევას და განცალკევებას [107-110]. ამის შემდეგ, *DnaB* ცილა *DnaC*-ის დახმარებით უკავშირდება ამ უბანს და იწვევს დნმ-ის ორმაგი სპირალის ორივე მიმართულებით გაშლას. რაც შეეხება ეუკარიოტულ უჯრედებს, მაგ. ადამიანის ქრომოსომის შემთხვევაში, რეპლიკაცია მიმდინარეობს მრავალი საწყისი წერტილიდან ორივე მიმართულებით. ცნობილია, რომ *DnaA* ცილის სტრუქტურა

ჰომოლოგიურია იმ ცილებისა, რომლებიც არქი-ბაქტერიების და ეუკარიოტული უჯრედის დნმ-ის რეპლიკაციის ინიციატორ ცილებს განეკუთვნებიან [111,112], ამიტომაც ნა ცილის სტრუქტურის და მისი დნმ-თან კომპლექსის შესწავლა, როგორც მოდელი ეუკარიოტულ უჯრედებში მიმდინარე ანალოგიური პროცესებისა, აქტიურად მიმდინარეობს მსოფლიოს წამყვან ლაბორატორიულ ცენტრებში.

DnaA ცილა შედგება ოთხი ფუნქციურად დამოუკიდებელი დომენისაგან [113,114]. III და IV დომენები ამჟღავნებენ ATP-აზა (III დომენი) და დნმ-თან სპეციფიურად დაკავშირების (IV დომენი) აქტივობას. ეს დომენები უფრო კონსერვატულეები არიან, ვიდრე I და II დომენები, რომლებიც როგორც ჩანს ჩართული არიან ოლიგომერიზაციის და DnaB-თან დაკავშირების პროცესში. ცნობილია, რომ DnaA ცილა ამოიცნობს ხუთ 9-ფუძე წყვილიან თანამიმდევრობას OriC-ში, C-ტერმინალური სპირალი-მარყუეი-სპირალის (IV დომენი) საშუალებით [115,116]. რაც შეეხება N-ტერმინალურ დომენს, იგი საჭიროა DnaA ცილების კოოპერატიული დაკავშირებისათვის მეზობელ DnaA box-ებთან. ჩატარებული მუტაციური ანალიზის მიხედვით, ცილის ამ უბანში (I დომენი) განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია Leu5, Trp6, Glu8 და Cys9 ამინომჟავას ნაშთები [117,118]. ტ. ლოუერისა და სხვების მიერ [119,120] ნაჩვენებია, რომ DnaA ცილის N-ტერმინალურ დომენის სტრუქტურაში არსებობს მჟავა ამინომჟავების კონცენტრირების ორი უბანი: Asp23 და Asp28, რომელიც მდებარეობს ჰიდროფობული ღარის ზედა მხარეს, ხოლო ცილის მეორე მხარეს განლაგებულია მჟავა ამინომჟავების მთელი რიგი Glu 46-დან Glu 67-მდე III და IV სპირალების ღერძის გასწვრივ. თუმცა მათი როლი ცილის ფუნქციაში დღეისათვის გარკვეული არ არის.

დღემდე არსებული სამ განზომილებიანი სტრუქტურა ცილა-დნმ-ის კომპლექსისა აჩვენებს, რომ ამოცნობი ცილების დნმ-თან კომპლექსი შეიცავს ურთიერთქმედებების დახლართულ ქსელს, რომელიც აკავშირებს პარტნიორ ცილებს ერთმანეთთან და დნმ-თან. ინდივიდუალური ურთიერთქმედებების წვლილის განსაზღვრა ამოცნობის პროცესში საკმარისად რთულია. საბოლოო ჯამში შეგვიძლია ვთქვათ, რომ ნუკლეინის მჟავასთან დაკავშირების სპეციფიურობა ძლიერ უნდა იყოს დამოკიდებული ამ მნიშვნელოვნად მცირე განსხვავებაზე კავშირებს შორის, ანუ იმ სუსტ კავშირებზე რომელთა ერთობლიობა წარმოქმნის ურთიერთქმედებების მტკიცე ქსელს [121].

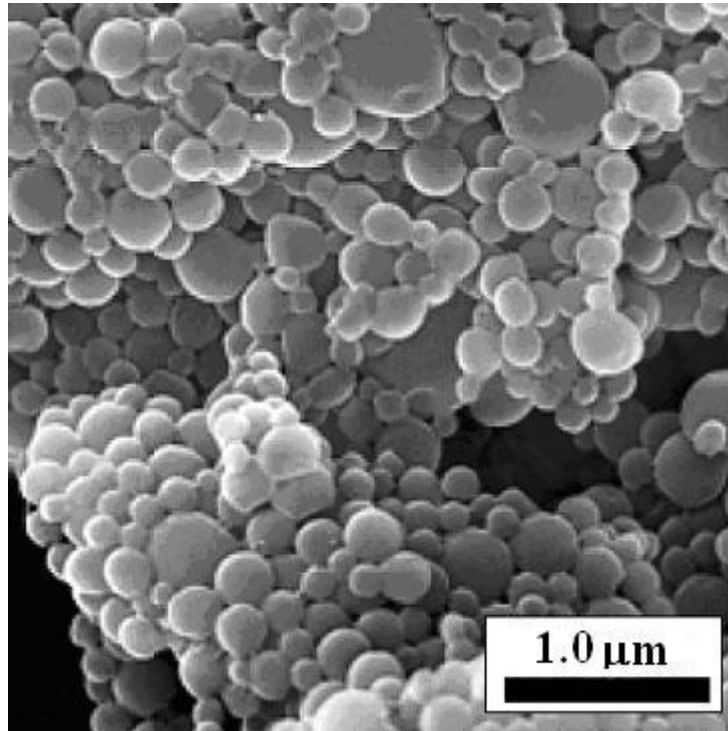
## II. თაზო. ექსპერიმენტული ნაწილი

### 2.1 საკვლევი მასალები

ექსპერიმენტული კვლევის ობიექტად გამოყენებული იყო ხბოს ელენთიდან გამოყოფილი ლიოფილიზირებული დნმ-ი 42 GC % წყვილების შემცველობით, სადაც ცილების შემცველობა არ აღემატებოდა 0.1% და რნმ-ის კონცენტრაცია იყო 5% - ზე ნაკლები (დნმ-ი მოწოდებული იქნა პროფ. დ. ლანდოს მიერ, რისთვისაც მას დიდ მადლობას ვუხდით). დნმ-ის ხსნარის დასამზადებლად ანალიზური სასწორით (BJP-20 სიზუსტე~ $5 \cdot 10^{-5}$ გრამი) ხდებოდა ლიოფილიზირებული ნიმუშის აწონვა. დნმ-ის თემოდინამიკური კვლევებისათვის გამოყენებული იყო ორი ტიპის ბუფერული ხსნარი - მუავე არეში შერჩეული იყო ფოსფატ-ლიმონმუავეს ბუფერი ( $0.02M Na_2HPO_4 + 0.01M$  ლიმონმუავეს ბუფერი, pH 7.5), ხოლო ტუტე არეში კვლევებისათვის ბორისმუავე-ტუტე ბუფერი ( $0.02M H_3BO_3 + 0.02M NaOH$ , pH 9.9). დნმ-ის საკვლევი ნიმუშის კონცენტრაციის შემოწმება ხდებოდა სპექტროფოტომეტრულად, რისთვისაც ვიყენებდით HELIOS β, Thermo Spectronic (Thermo Fisher Scientific, აშშ) და Speqtromom 204 (უნგრეთი) სპექტროფოტომეტრებს. დნმ-ის კონცენტრაცია ითვლებოდა იმის გათვალისწინებით, რომ 50 მკგ/მლ კონცენტრაციის დნმ-ის ხსნარის შთანთქმა  $\lambda=260$ ნმ სინათლის ტალღის სიგრძის დროს ერთ სანტიმეტრის სისქის კიუვეტაში (ექსტინციის კოეფიციენტი) შეადგენს შთანთქმის ერთ ერთეულს ( $\epsilon_{260}=10D$ ).

სასურველი მუავიანობის დნმ-ის ხსნარის მისაღებად გამოყენებული იყო წონასწორული დიალიზის მეთოდი, რათა დაცული ყოფილიყო გამხსნელის იონური ძალის მუდმივობის პირობა, თერმოდინამიკურ პარამეტრებზე მისი გავლენის გამოსარიცხად. როგორც ტუტე, ასევე მუავე არეებში განხორციელებულ ექსპერიმენტებში იონური ძალის მუდმივობა მიიღწეოდა ბუფერის ტიტრირებით 1% HCl -ის განზავებული ხსნარით, ისევე როგორც იგივე მუავის ხსნარს ვიყენებდით ტუტე ბუფერის ტიტრირებისას, სადაც ბუფერის pH-ი დიალიზის მეთოდის გამოყენებით იცვლებოდა მაქსიმალური pH10-დან ნეიტრალურ pH7 –მდე მიმართულებით.

დნმ-თან არასპეციფიური ურთიერთქმედების შესასწავლად გამოყენებული იყო PLGA (poly(D,L-lactitide-co-glycolic acid)) ნანონაწილაკები, რომელიც დღესაც ინტენსიურად გამოიყენება ფარმაცევტების მიერ როგორც წამლის გადამტანი ნაწილაკები. ექსპერიმენტების მიზანი, გარდა არასპეციფიური ურთიერთქმედების შესწავლისა, იყო დაგვედგინა თუ რა სიგრძის დნმ-ი შეიძლება იყოს მოთავსებული ნაწილაკის ზედაპირზე (ან შიგნით) და შესაძლებელია თუ არა ნაწილაკის მეშვეობით მოხდეს საშუალო ზომის გენის გადატანა. როგორც ავლნიშნეთ ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო PLGA-ნანონაწილაკები, რომლებიც დამზადებული იყო საარბრუკენის უნივერსიტეტის ფარმაციის დეპარტამენტში პოლიგლიკოლის მუავესა (PGA) და პოლილაქტიდის მუავეს (PLA) ბლოკებისგან (70:30 პროცენტული თანაფარდობით), რომლებიც შემდგომ იგზავნებოდა თვითმფრინავით თბილისში. ექსპერიმენტები ტარდებოდა ორი განსხვავებული ტიპის (ორივე წარმოადგენს PLGA-ნანონაწილაკს) ხიტოსან-შალითიანი (cNp) და უშალითო (Np) ნანონაწილაკებზე, რომელთაც გააჩნიათ სფეროს ფორმა ზომებით ~ 148 ნმ (სურ. 12). განსხვავება ამ ნაწილაკებს შორის მდგომარეობს ზედაპირული მუხტის სიდიდეში და ნიშანში. კერძოდ, უშალითო ნანონაწილაკების (Np) ზედაპირული მუხტი იყო -8.6mV-ი, ხოლო ხიტოსან-შალითიანის (cNp) ზედაპირული მუხტის მნიშვნელობა შეადგენდა +39.98mV-ს.



სურ. 12 PLGA-ნანონაწილაკის სურათი

## 2.2. ნაშრომში გამოყენებული მეთოდების აღწერა

### 2.2.1. ცენტრიფუგირების და სპექტროფოტომეტრული მეთოდები

დნმ- PLGA ნანონაწილაკების ურთიერთქმედების კვლევებში გამოყენებული იქნა ულტრაცენტრიფუგირების მეთოდი. ამისათვის ვიყენებდით Beckman Coulter™, Allegra™ 64R (აშშ) ფირმის ცენტრიფუგას, რომლის მაქსიმალური ბრუნვის სიჩქარე 25 000 ბრ/წთ-ია.

სპექტროფოტომეტრული კვლევებისთვის ვიყენებდით HELIOS β-ს (Thermospectronic, Thermo Fisher Scientific, აშშ), რომლის გაზომვის სიზუსტე შეადგენს  $\pm 0.01$  OD.

ექსპერიმენტებში გამოყენებული იქნა ელექტრონული მიკრო pH-მეტრები (მოდელები: HI98103 და HI98107; გერმანია), რომელთა გაზომვის სიზუსტე  $\pm 0.1$  pH-ის ტოლია.

## 2.2.2. დიფერენციალური მიკროკალორიმეტრიული მეთოდი

დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრია გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის ბიოპოლიმერთა შესწავლისათვის, ისეთები როგორებიცაა: გლობულური და ფიბრილარული ცილები, ნუკლეინის მჟავები, ფოსფოლიპიდები ბიოლოგიური მემბრანები და სხვა.

სხვადასხვა ფაქტორების (ტემპერატურა, pH, იონური ძალა და ა.შ) მოქმედების შედეგად ბიოლოგიური სტრუქტურების დაშლის პროცესის კალორიმეტრული კვლევა განპირობებულია იმით, რომ ეს ერთადერთი პირდაპირი მეთოდია ამ პროცესების ენერგეტიკული პარამეტრების განსასაზღვრავად. ტემპერატურა, როგორც ბიოპოლიმერულ სტრუქტურაზე ზემოქმედების ფაქტორი განსხვავდება სხვა ფაქტორებისაგან იმით, რომ ის წარმოადგენს ინტენსიურ პარამეტრს, რომელიც თერმოდინამიკურად შეუღლებულია ენთალპიასთან, რომელიც წარმოადგენს სისტემის ექსტენსიურ პარამეტრს. ეს ნიშნავს, რომ სისტემის მდგომარეობის ყველა ცვლილებას, რომელიც განპირობებულია ტემპერატურის ზემოქმედებით, თან უნდა ახლდეს ენთალპიის ცვლილება. ასე რომ, სისტემის ენთალპიასა და ტემპერატურას შორის ფუნქციონალური დამოკიდებულება გულისხმობს თერმოდინამიკურ ინფორმაციას იმ მდგომარეობებზე, რომლებიც დასაშვებია სისტემისათვის ტემპერატურათა განხილულ უბანში [122,123].

ტემპერატურათა ფართო ინტერვალში ბიომაკრომოლეკულების სითბოტევადობის გასაზომად დღესდღეობით იყენებენ სითბოტევადურ კალორიმეტრებს. არსებობს ბევრი განსხვავებული მოდიფიკაცია ამ ხელსაწყოებისა, რომლებიც განკუთვნილია სხვადასხვა აგრეგატულ მდგომარეობაში ნივთიერებათა სითბოტევადური კვლევებისათვის სხვადასხვა ტემპერატურულ ინტერვალში [124-126].

ექსპერიმენტებს ატარებენ მოლეკულის განზავებულ ხსნარებში, რის გამოც შესაძლებელია მოლეკულათა შორის ურთიერთქმედების უგულებელყოფა, მაგრამ ასეთ ხსნარებში მაკრომოლეკულების მცირე კონცენტრაციის გამო გაზომილი სითბური ეფექტები საკმარისად მცირეა. მცირე სითბური ეფექტების საკმარისი სიზუსტით განსაზღვრა მოითხოვდა ზეპრეციზიულ ხელსაწყოს შექმნას, რაც შესაძლო გახდა მხოლოდ დიფერენციალური ადიაბატური მიკროკალორიმეტრის შექმნით.

ექსპერიმენტულ კვლევებში გამოყენებული იყო რუსული წარმოების დიფერენციალური მიკროკალორიმეტრი DACM-4A, რომლის ძირითადი ტექნიკური მონაცემები მოყვანილია ცხრილში 3. ამ ხელსაწყოს უნიკალური მგრძობიარობა მიიღწეული იქნა სამი მეთოდური პრინციპის ერთობლიობით: გაზომვის დიფერენციალური სქემით, უწყვეტი გათბობით (სკანირებით) ზუსტად მოცემული სიჩქარით და გასაზომი კამერების სრული ადიაბატიზაციით.

კალორიმეტრული ამპულები გაკეთებულია სრულიად გამჭოლი კაპილარებისაგან, რომლებიც დახვეულია სპირალურად (სურ. 13). ამპულების ასეთი კონსტრუქცია იძლევა რიგ უპირატესობებს: პირველ რიგში, გაადვილებულია მათი გარეცხვა და ავსება ნიმუშით ისე, რომ ამ პროცედურების ჩატარება არ საჭიროებს მათ დაშლას და ასევე იძლევა შესაძლებლობას ამპულებზე განხორციელდეს გარკვეული წნევა. რათა ჩასხმულ სითხეში არ მოხდეს ჰაერის ბუშტუკების გაჩენა; მეორე – კაპილარის მცირე დიამეტრის და მისი მაღალი სითბოგამტარობის გამო (პლატინის კაპილარი) არ ხდება სითხეში ტემპერატურის გრანტიების წარმოქმნა, აქედან გამომდინარე ასეთ კალორიმეტრულ კამერაში ტემპერატურათა ველი ერთგვაროვანია და შეიძლება მათი გახურება უფრო დიდი სიჩქარით, ვიდრე



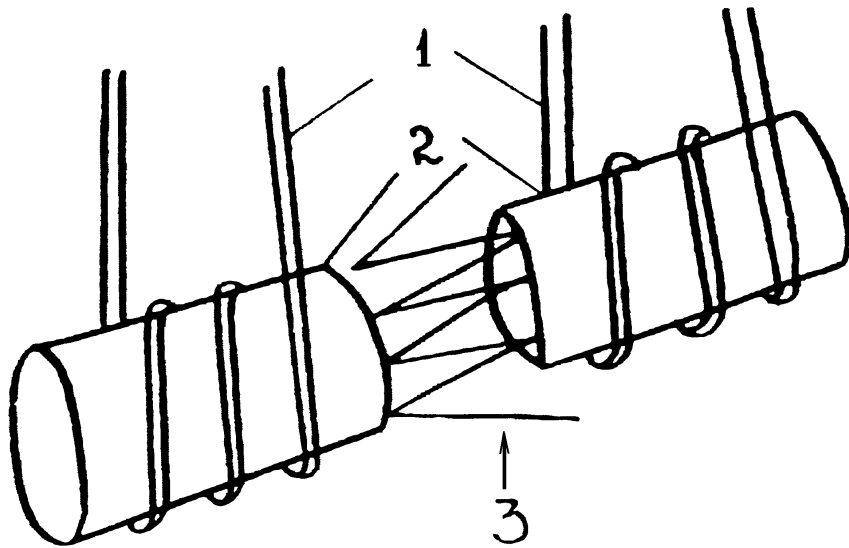
მოცულობითი (დიდი ზომების) ამპულების შემთხვევაში. თავის მხრივ, სკანირების სიჩქარის გაზრდა ნიშნავს მოწყობილობის რეალური მგრძობიარობის გაზრდას.

როგორც ავლნიშნეთ კაპილარული ამპულები უძლებენ მაღალ წნევას და ჩასხმულ ხსნარებზე არსებული წნევა (4-5 ატმოსფერო) საშუალებას იძლევა გაიზარდოს კალორიმეტრის სამუშაო მაქსიმალური ტემპერატურა 150<sup>0</sup>C ნიშნულამდე, რაც მნიშვნელოვნად ზრდის ბევრ ექსპერიმენტების ჩატარების შესაძლებლობას.

ДАСМ-4А კალორიმეტრის ბლოკ-სქემა მოცემულია სურ. 14-ზე, ხოლო კალორიმეტრის ტექნიკური მონაცემები მოყვანილია ცხრილ 3-ში

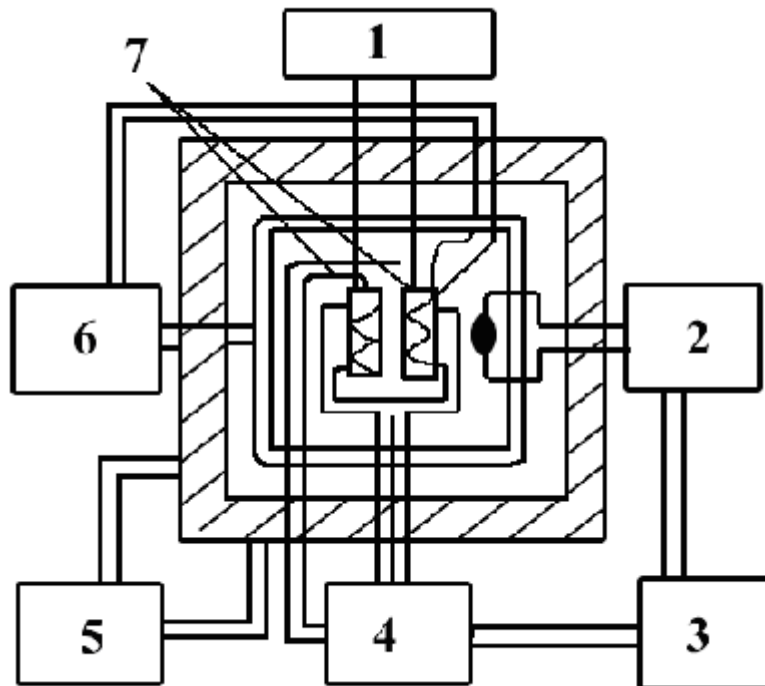
ცხრილი 3

ხმაურის დონე	$5 \cdot 10^{-7} \text{ W}$
ბაზისური ხაზის განმეორებადობა	$3 \cdot 10^{-6} \text{ W}$
ბაზისური ხაზის გადახრა სწორი ხაზიდან	$15 \cdot 10^{-6} \text{ W}$
სამუშაო ტემპერატურული ინტერვალი	$0 \div 150^{\circ}\text{C}$
ტემპერატურის გაზომვის აბსოლუტური ცდომილება	$\pm 0.1^{\circ}\text{C}$
კალორიმეტრული უჯრების გაცხელების სიჩქარე	0.125; 0.25; 0.1; 1.0; 2.0 ; 4.0 °/min
სკანირების სიჩქარის ფარდობითი ცდომილება	$\pm 2 \%$
წნევა ამპულის თავზე	500-600კპა
თითოეული კამერის მოცულობა	0.8 ml
სამუშაო მოცულობა	0.46 ml
კალიბრების სიმძლავრე	25; 50; 100 $\mu\text{W}$



სურ. 13 DACM-4A ტიპის მიკროკალორიმეტრის კალორიმეტრული კამერა:

- 1 – პლატინის კაპილარები
- 2 – უჟანგავი ფოლადის თხელი მილები
- 3 – თერმობატარეა



სურ. 14 ДАСМ-4А ტიპის მიკროკალორიმეტრის ბლოკ-სქემა:

1. მონოსტატი
2. თერმომეტრი
3. თვითმწერი
4. სითბური ეფექტის გამზომი მოწყობილობა
5. თერმოსტატი
6. ადიაბატიზირებული გარსის თერმორეგულატორი მოწყობილობა
7. მიკროკალორიმეტრის გამზომი კამერები

### 2.2.3. მიკროკალორიმეტრული მრუდების დამუშავება

ნახ. 3-ზე მოცემულია ტიპური კალორიმეტრული ჩანაწერი, რომელიც დაიმზირება ბიოპოლიმერების (ცილები, ნუკლეინის მუცხები და ა.შ) ხსნარების გაცხელებისას, თავისი ბაზისური ხაზითა (ჩანაწერი სკანირებისას გამსხნელი-გამსხნელი) და საკალიბრო (რომელიც შეესაბამება განსაზღვრულ საკალიბრო ენერგიას) ნიშნულით.

დენატურაციული პიკის მიერ შემოფარგლული ფართის მიხედვით შეიძლება განისაზღვროს ბიომაკრომოლეკულური სტრუქტურის დენატურაციის სიბო. ამისათვის შეიძლება ვიხელმძღვანელოთ ფორმულით:

$$Q = K_1 \cdot S \quad (1)$$

სადაც  $Q$  დენატურაციის სიბოა,  $S$  შთანთქმის პიკის ქვეშ მდებარე ფართია,  $K_1$  კი ენერგეტიკულ ერთეულებში ჩანაწერის დანაყოფის ფასი ( $K_1 = W_{\text{ეტი}} / S_{\text{ეტი}}$ ,  $W_{\text{ეტი}}$ - ეტალონური სიმძლავრე, რომელიც მიეწოდება ერთ-ერთ კამერას  $t$  დროის განმავლობაში,  $S_{\text{ეტი}}$  კი კალიბრული ნიშნულის ფართია). სიბოტევადობების სხვაობა ამჟღავნებს შორის  $\Delta C_p$  ნებისმიერ ტემპერატურაზე შეიძლება განისაზღვროს ფორმულით:

$$-\Delta C_p = [C]_p^p m_p - [C]_p^s \Delta m_s \quad (2)$$

სადაც  $[C]_p^p$  და  $[C]_p^s$  - გახსნილი და გამსხნელი ნივთიერებების პარციალური სიბოტევადობებია შესაბამისად,  $m_p$  -ამჟღავნის მუშა მოცულობაში გახსნილი ნივთიერების მასა,  $\Delta m_s$ -გახსნილი ნივთიერების მიერ გამოდევნილი გამსხნელის მასა. რადგანაც

$$\Delta m_s = m_p \frac{[V]^p}{[V]^s} \quad (3)$$

სადაც  $[V]^p$  და  $[V]^s$  არის პარციალური მოცულობები ნივთიერებისა და გამსხნელისა შესაბამისად, ამიტომაც საბოლოოდ ვღებულობთ:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{\Delta C_p}{m_p} \quad (4)$$

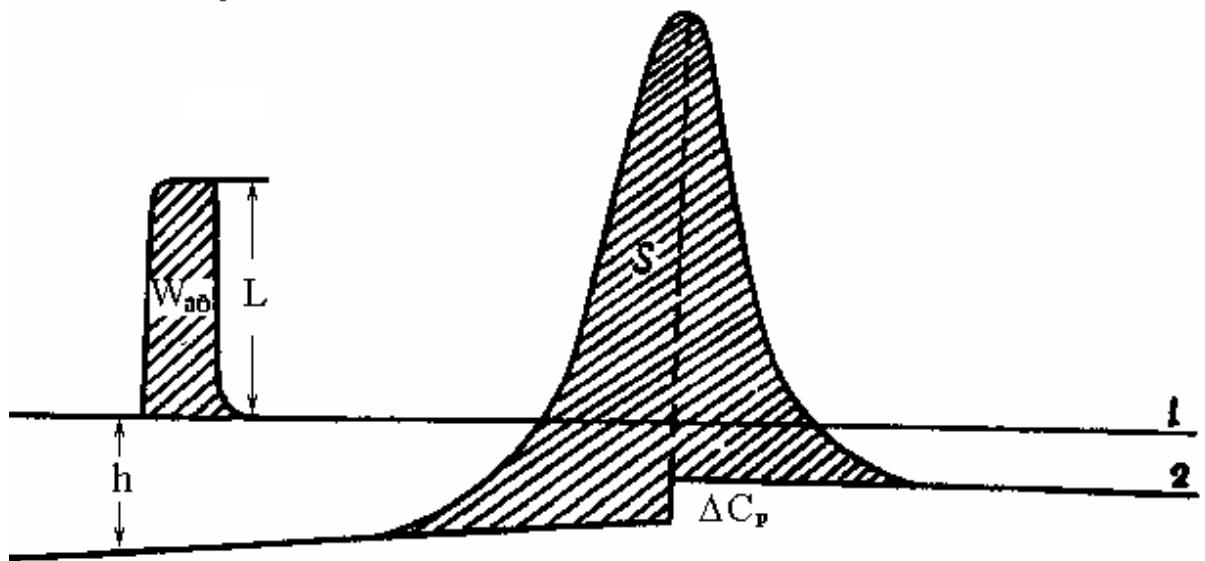
სადაც ამჟღავნებს შორის სიბოტევადობების სხვაობა  $\Delta C_p = k_2 h$ , სადაც  $h$  არის წერტილის გადახრა ბაზისური ხაზიდან ნებისმიერ ტემპერატურაზე, ხოლო  $k_2$  არის გადახრის ერთეულის ფასი (სანტიმეტრებით გაზომილი გადახრა წრფიდან; იხ. ნახ. 3 ), გამოსახული ჯ/კ-ში;

$$k_2 = W_{\text{ეტი}} / v L_{\text{ეტი}} \quad (5)$$

სადაც  $W_{\text{ეტი}}$  -კალიბრული სიმძლავრეა,  $v$  -გახურების სიჩქარე კ/წმ-ში,  $L_{\text{ეტი}}$  - კი კალიბრული ნიშნულის გადახრა წრფიდან.

საბოლოოდ, სიბოტევადობის გამოსათვლელად ვიყენებდით ფორმულას:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{W \cdot h}{v \cdot L \cdot m_p} \quad (6)$$



ნახ. 3 ბიომაკრომოლეკულების ღლობის მახასიათებელი ტიპური კალორიმეტრული მრუდი

ექსპერიმენტალურად, სისტემის ენთალპიის ტემპერატურაზე დამოკიდებულება განისაზღვრება მისი სითბოტევადობის გაზომვით. აღსანიშნავია, რომ სითბოტევადობა წარმოადგენს ენთალპიის წარმოებულს ტემპერატურით მუდმივი წნევის პირობებში ( $C_p=dH/dT$ ). თუ ცნობილია როგორ იცვლება საკვლევი მაკრომოლეკულის პარციალური სითბოტევადობა ტემპერატურაზე, შეგვიძლია განვსაზღვროთ ენთალპიათა, ენტროპიათა და თავისუფალ ენერჯიათა სხვაობა მაკრომოლეკულის ნატიურ და დენატურირებულ მდგომარეობათა შორის გაზომვის მთლიან ტემპერატურულ ინტერვალში, რადგან:

$$\Delta H(T_0) = \int_{T_0}^{T_d} [C]_p^n dT + \Delta H_d + \int_{T_d}^{T_0} [C]_p^d dT = \Delta H_d - \int_{T_0}^{T_d} \Delta C_p dT ,$$

$$\Delta S(T_0) = \int_{T_0}^{T_d} \{ [C]_p^n / T \} dT + \Delta H_d / T_d + \int_{T_d}^{T_0} \{ [C]_p^d / T \} dT = \Delta H_d / T_d - \int_{T_0}^{T_d} \{ \Delta C_p / T \} dT ,$$

$$\Delta G(T_0) = \Delta H(T_0) - T_0 \Delta S(T_0) = \Delta H_d - T_0 \{ \Delta H_d / T_d \} - T_0 \int_{T_0}^{T_d} \Delta C_p dT + \int_{T_0}^{T_d} \{ \Delta C_p / T \} dT =$$

$$= \Delta H_d (T_d - T_0) / T_d - \int_{T_0}^{T_d} \{ (T - T_0) / T \} \Delta C_p dT$$

$\Delta C_p = [C]_p^d - [C]_p^n$  არის გამხსნელში გახსნილი მოლეკულების პარციალურ სითბოტევადობათა სხვაობა დენატურირებულ და ნატიურ მდგომარეობებს შორის, ხოლო  $T_0$  და  $T_d$  არის დენატურაციის პროცესის დაწყების და ღლობის პიკის შესაბამისი ტემპერატურები, ხოლო  $\Delta H_d$  - დენატურაციის ენთალპიაა.

კალორიმეტრული მრუდების დამუშავება ხორციელდება სპეციალურად შექმნილი პროგრამით [127] ზემოთ მოყვანილი (6) ფორმულის გამოყენებით, რომელიც გვაძლევს დამოკიდებულებას საკვლევი ობიექტის კუთრის სითბოტევადობისა ტემპერატურაზე.

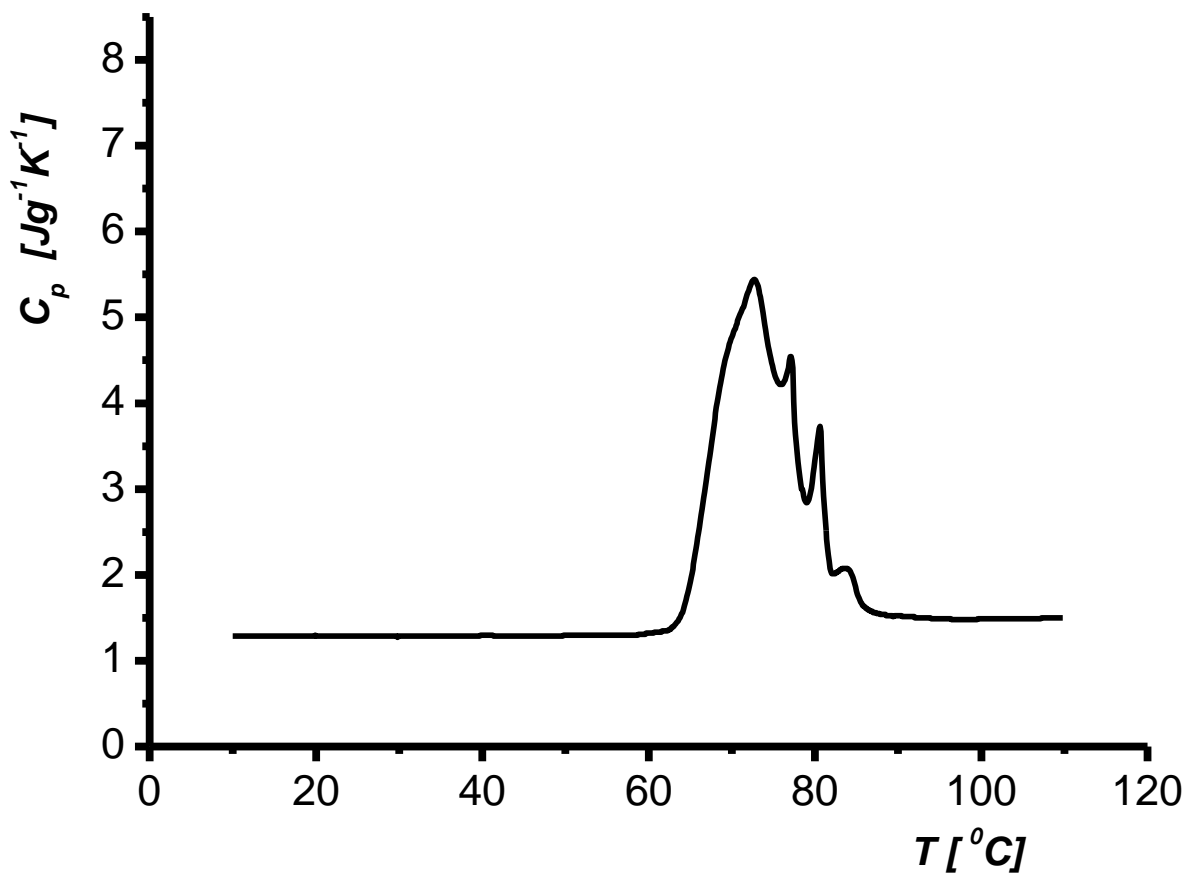
### 2.3. მიღებული ექსპერიმენტალური შედეგები

ნახ. 4-ზე ნაჩვენებია დნმ-ის კუთრი სითბოტევადობის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე ნეიტრალური pH7.0-ის პირობებში. ნახაზიდან ჩანს, რომ დნმ-ის დენატურაციის მრუდი ხასიათდება ე.წ. ღღობის ნაზი სტრუქტურით (სითბოსშთანთქმის პიკი შეიცავს მცირე პიკებს (ნახ. 4)). უნდა ავლნიშნოთ, რომ მიღებული მრუდის ე.წ. ნაზი სტრუქტურა, რომელიც განპირობებულია დნმ-ის მოლეკულაში მსგავსი თერმოსტაბილობის უბნების (ე.წ. სატელიტური უბნები) ღღობის შედეგად, შესაძლებელია გამოყენებული იყოს იმისათვის, რომ ჩვენს ექსპერიმენტებში განისაზღვროს დნმ-ის რენატურირების ხარისხი, რაც ჩვენს ექსპერიმენტებში მნიშვნელოვანია, რაც გულისხმობს იმას, რომ თუ დნმ-ი დენატურაციის მერე მთლიანად აღიდგენს თავის სივრცულ სტრუქტურას, მაშინ ტემპერატურული ღღობის ნაზი სტრუქტურაც იქნება დამზერილი. ზოგადად, შეგვიძლია ვთქვათ, რომ დნმ-ის კალორიმეტრული ექსპერიმენტებიდან მიღებული თერმოდინამიკური პარამეტრების მნიშვნელობებით და მრუდის ფორმით შესაძლებელია ვიმსჯელოთ მაკრომოლეკულის სტრუქტურის მოწესრიგებულობის ხარისხზე (მაგ. დნმ-ი სპირალის ხარისხი) და მის თერმოსტაბილობაზე, რასაც წარმოდგენილ ნაშრომში გადამწვევტი მნიშვნელობა აქვს დნმ-ის სტრუქტურული დინამიზმის თვალსაზრისით.

ნახ. 5-ზე მოცემულია დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდები მუავე არეში, რომლის მიხედვით ნათლად ჩანს, რომ მუავიანობის მომატებით (pH-ის შემცირებით) ხდება დნმ-ის ღღობის ტემპერატურის მკვეთრი შემცირება. ამასთანავე, ტემპერატურის შემცირების პარალელურად მცირდება დნმ-ის ღღობის პიკის ფართიც, ანუ ენთალპიაც. ცხრილი 4-ში მოცემულია ჩატარებული ექსპერიმენტების შეჯამებული მონაცემები, რომელიც გვიჩვენებს, რომ მუავიანობის მომატებით თუ როგორ იცვლება დნმ-ის სპირალი-გორგალი გადასვლის (დენატურაციის) ტემპერატურა და ენთალპია. მიღებული მრუდებიდან ასევე კარგად ჩანს, რომ მუავიანობის მომატებით დნმ-ის (pH 7.0) ტიპური კალორიმეტრული მრუდისთვის დამახასიათებელი პატარა პიკები (ღღობის ნაზი სტრუქტურა) თანდათან ქრება, რაც შეიძლება იმით აიხსნას, რომ გარემოს გარკვეული მუავიანობის პირობებში დნმ იმყოფება ნაწილობრივ დენატურირებულ მდგომარეობაში, სადაც შედარებით ნაკლებად თერმოსტაბილობილური (AT-წყვილებით მდიდარი) უბნები უკვე განცალკევებულია, ღღობისას შთანთქმული სითბოც ( $\Delta H$ ) შესაბამისად ნაკლებია და ასეთ პირობებში დნმ-ის ღღობის ნაზი სტრუქტურაც იწყებს გაქრობას (იხ. ნახ. 5).

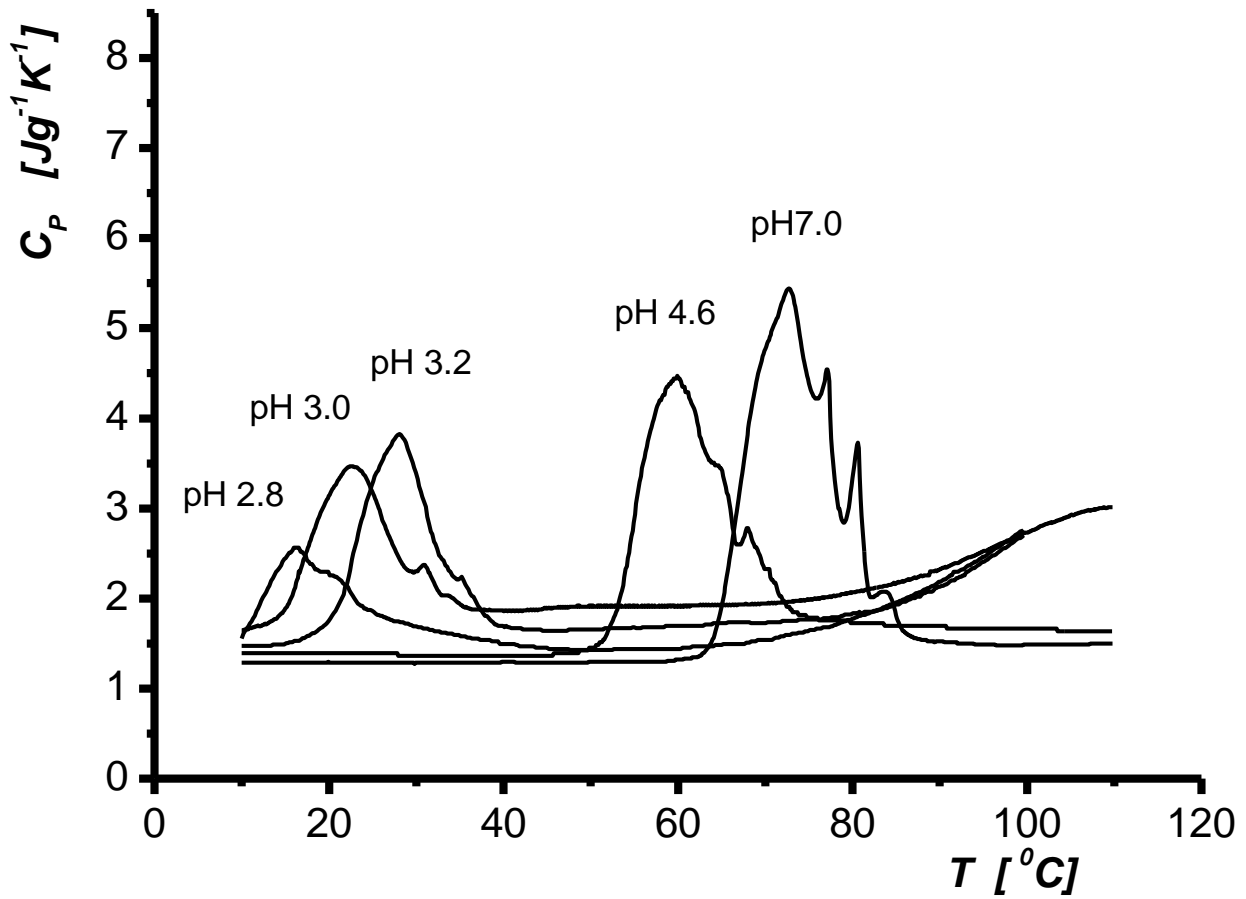
ჩატარებული ექსპერიმენტებიდან ჩანს, რომ მოცემული იონური ძალის პირობებში, გამსხნელის pH 2.6 მნიშვნელობამდე დნმ-ის მოლეკულა ინარჩუნებს ორ ჯაჭვიან სპირალურ უბნებს, რაც ჩანს კალორიმეტრულ მრუდზე სითბოსშთანთქმის პიკების არსებობით, ხოლო უფრო დაბალი მუავიანობის პირობებში (pH $\leq$ 2.6) დნმ-ი სრულად დენატურირებულია (ნახ. 6, II-მრუდი) და სითბოსშთანთქმის პიკი აღარ დაიმზირება.

მუავე არესაგან განსხვავებით დნმ-ის მოლეკულას სრულიად განსხვავებული ყოფაქცევა ახასიათებს ტუტე არეში. ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა მუდმივი იონური ძალის პირობებში დნმ-ის კონფორმაციული ცვლილებები ტუტე არეში (pH 7.0-10.0). ნახ. 7-ზე მოცემულია დნმ-ის მიკროკალორიმეტრული მრუდები, რომლის მიხედვითაც ტუტიანობის მომატებით (7.0<pH<10.0 ინტერვალში) ადგილი აქვს ღღობის ტემპერატურის ( $T_m$ ) ჯერ გაზრდას და შემდეგ თანდათან შემცირებას, ხოლო რაც შეეხება ენტალპიის ცვლილებას ( $\Delta H$ ) – იგი მონოტონურად იზრდება

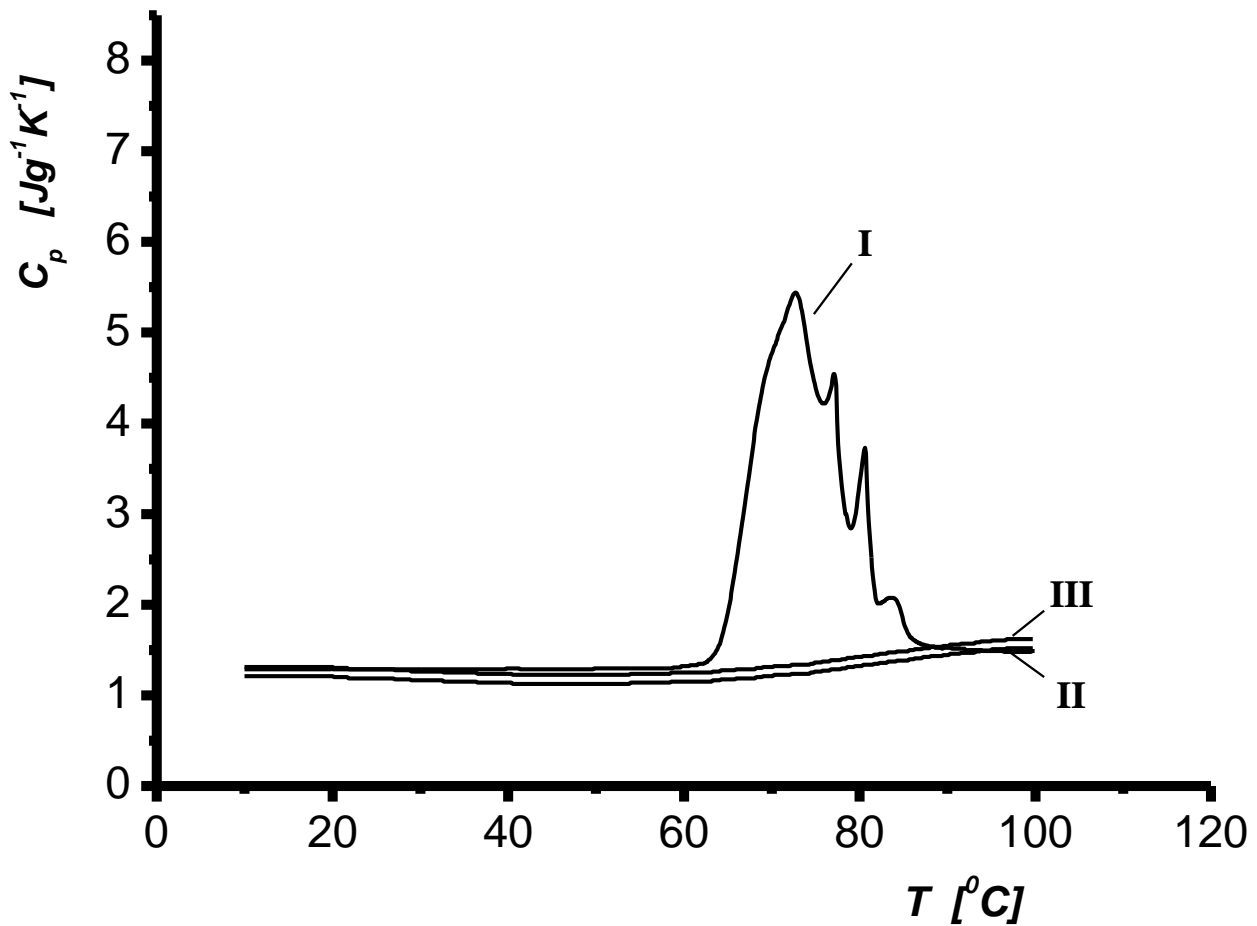


ნახ. 4 ღნმ-ის კუთრისითბოტევალობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მიკროკალორიმეტრული მრუდი, 0.02M ნატრიუმის ფოსფატი + 0.01M ლიმონმუავას ბუფერი pH 7.0, გაცხელების სიჩქარე 2 K/min



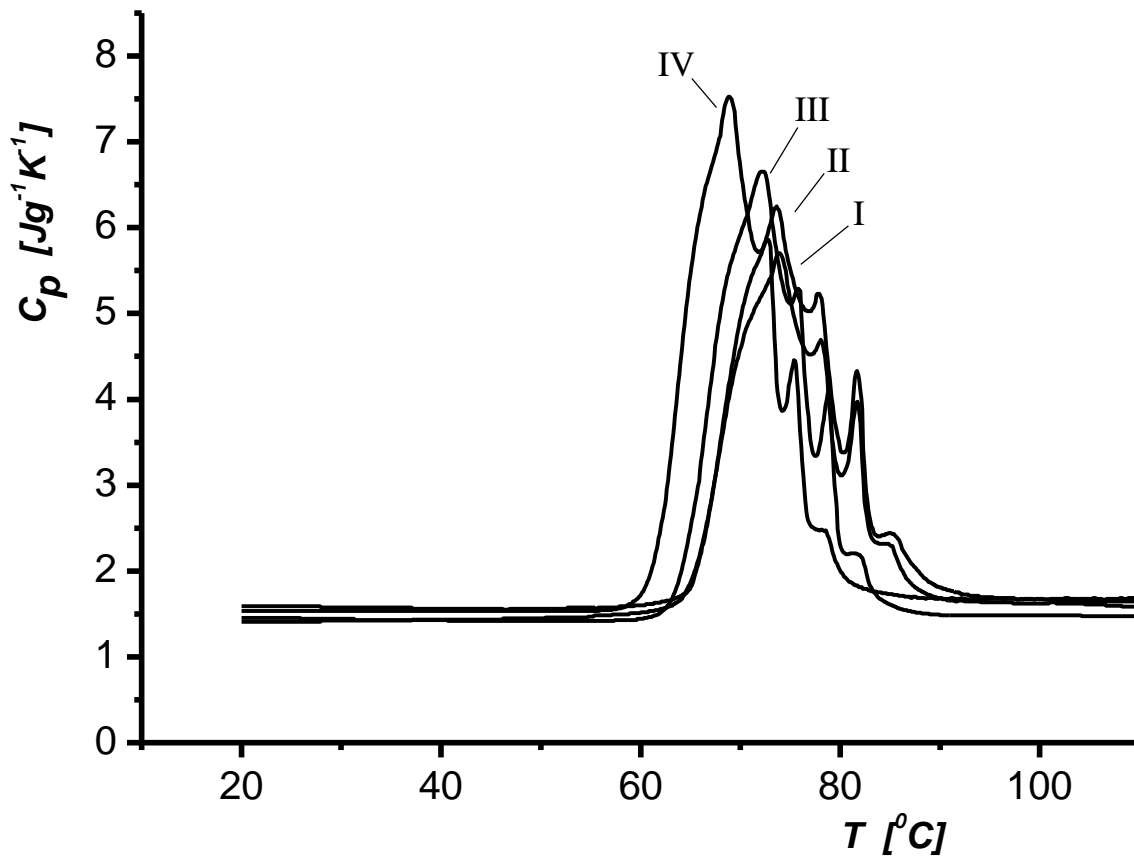


ნახ. 5 დნმ-ის კუთრისითბოტევადობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მრუდები გარემოს სხვადასხვა მუავიანობის პირობებში (pH 7.0-2.8). გამხსნელი – 0.02M ნატრიუმის ფოსფატი+0.01M ლიმონმუავას ბუფერი

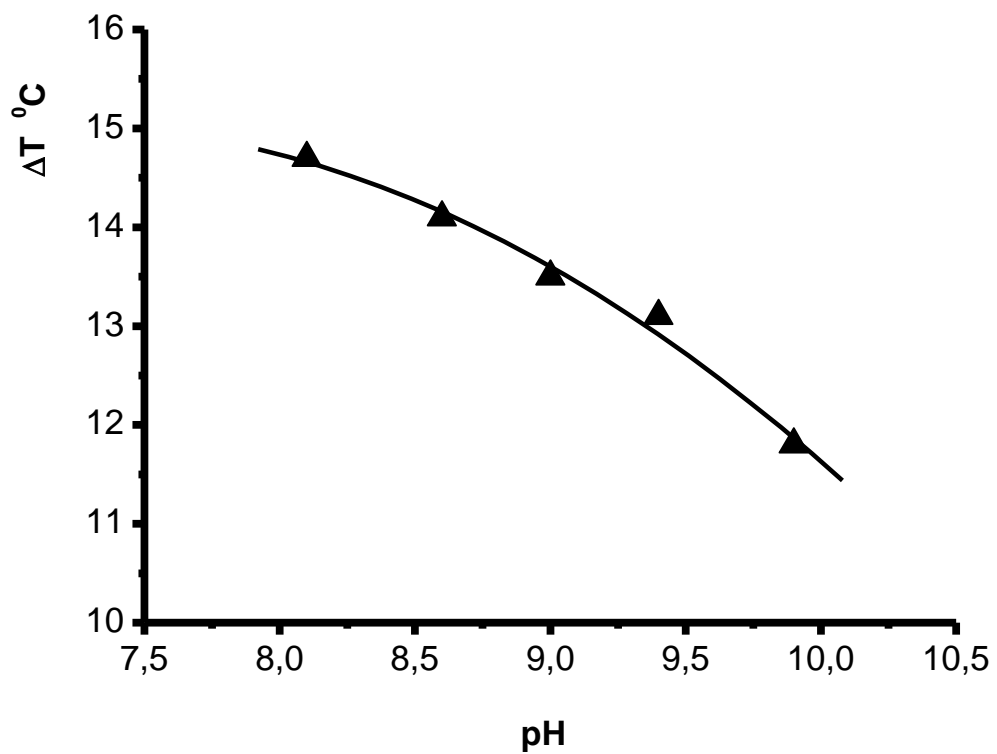


ნახ.6 დნმ-ის ლღობის კალორიმეტრული ჩანაწერები.

გამსხნელი – 0.02M ნატრიუმის ფოსფატი+0.01M ლიმონმუავას ბუფერი. (I) - დნმ-ის ნიმუში pH 7.0 გარემო პირობებში, (II) - დნმ-ის ნიმუში pH7.0-დან დიალიზით გადაყვანილი pH 2.6 პირობებში, (III) - დნმ-ის ნიმუში pH2.6 -დან დიალიზით დაბრუნებული pH 7.0 პირობებში



ნახ. 7 დნმ-ის კუთრისითბოტევადობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების მრუდები ტუტე გარემო პირობებში. გამსხნელი – 0.02M ბორის მჟავა+0.02M NaOH ბუფერი, I - pH 8.1, II - pH 8.6, III - pH 9.4, IV - pH 10.0.



ნახ. 8 დნმ-ის კონფორმაციული გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალის დამოკიდებულება გარემოს pH-ზე (ტუტე არე)

(იხ. ნახ. 7). ტუტიანობის მომატებისას, ასევე შესამჩნევი იყო დნმ-ის სითბოს შთანთქმის პიკის დავიწროება, ანუ ლღობის ტემპერატურული ინტერვალის ( $\Delta T$ ) შემცირება (იხ. ნახ. 8). მიღებული ექსპერიმენტული შედეგი მეტად საყურადღებოა, რის შესახებაც ქვემოთ (შემდეგ თავში) მოყვანილია მისი ჩვენეული ანალიზი.

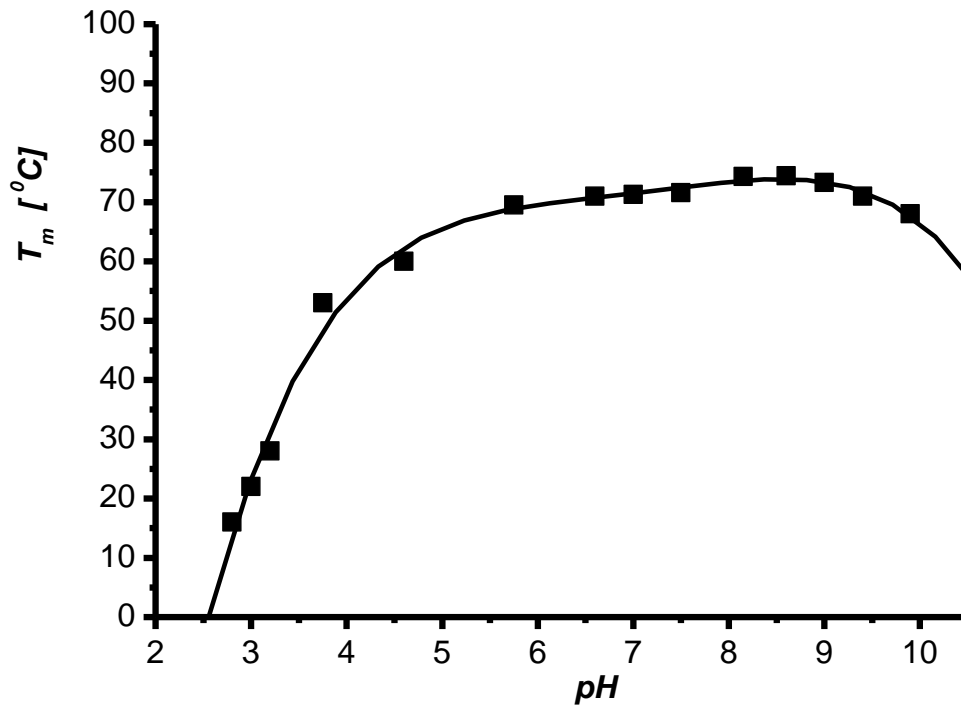
ნახ. 9 და ნახ. 10-ზე მოყვანილია შეჯამებული დნმ-ის ფაზური გადასვლის ტემპერატურის ( $T_m$ ) და ლღობის ენთალპიის ცვლილების ( $\Delta H$ ) დამოკიდებულების გრაფიკები გამხსნელების მუავიანობის ფართო ინტერვალში, რომელიც მოიცავს როგორც მუავე ასე ტუტე არეს - pH 2.8-10.0. ექსპერიმენტული შედეგებიდან მიღებული თერმოდინამიკური პარამეტრების რიცხვითი მნიშვნელობები მოყვანილია ცხრილში (იხ. ცხრილი 4).

ზემოთ მოყვანილი ექსპერიმენტული შედეგების თანახმად სრულიად ნათელია, რომ დნმ-ის მოწესრიგებული სტრუქტურა მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული გარემოს მუავიანობაზე და მისი ცვლილება მოლეკულაში განაპირობებს მნიშვნელოვან სტრუქტურულ ცვლილებებს. ბუნებრივია, ჩნდება კითხვა იმის შესახებ, თუ რამდენად შექცევადია ასეთი სტრუქტურული ცვლილებები დნმ-ში, კერძოდ, კვლევის მიზანი იყო დაგვედინა მუავე ზემოქმედებით დეტსაბილიზირებული სტრუქტურის დნმ-ის მოლეკულის მიერ საწყისი – ორმაგსპირალური სტრუქტურის აღდგენის უნარი ნეიტრალური pH 7.0 პირობებში დაბრუნებისას. როგორც ავღნიშნეთ, pH-ის ცვლილებით ხდება დნმ-ის სტრუქტურული პარამეტრების ცვლილება, რომელიც ასახულნი არიან მიღებულ თერმოდინამიკურ პარამეტრებში და მრუდის ფორმაში, მაგრამ ჩვენთვის მნიშვნელოვანი იყო დადგენილი ყოფილიყო pH-ის ის მინიმალური ზღვარი, რომლის დროსაც დნმ-ის მოლეკულა ნეიტრალური pH 7.0-ის პირობებში დაბრუნებისას მთლიანად აღიდგენდს თავის პირვანდელ ნატიურ ორმაგსპირალურ სტრუქტურას. ნახ. 11-ზე მოცემულია ამ ექსპერიმენტის შედეგები, სადაც I - მრუდი წარმოადგენს დნმ-ის სითბურ ლღობას pH 2.8 მუავიანობის გარემო პირობებში, ხოლო II - მრუდი – pH 2.8-დან წონასწორული დიალიზის მეთოდით ნეიტრალური pH 7.0 გარემოში დაბრუნებული დნმ-ის ნიმუშის კალორიმეტრულ ჩანაწერს. როგორც გრაფიკებიდან ჩანს, მუავე გარემოთი (pH 2.8) დესტაბილიზირებული დნმ-ის მოლეკულა ნეიტრალურ პირობებში დაბრუნებისას სრულად აღიდგენს ნატიურ ორმაგ-სპირალურ სტრუქტურას, რაზეც ნათლად მიუთითებს, როგორც ლღობის ტემპერატურის და ენთალპიის მნიშვნელობები ასევე ე.წ. დნობის ნახი სტრუქტურის არსებობაც (იხ. ნახ. 11-ზე II-მრუდი).

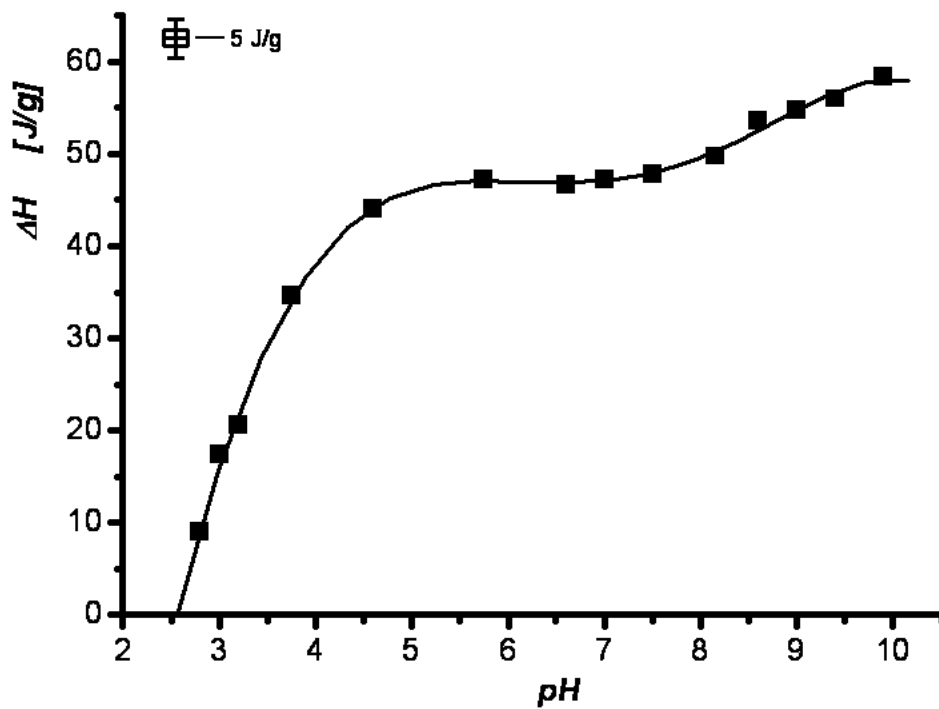
დნმ-ის მუავე არეში დესტაბილიზაციისა და ფიზიოლოგიურ პირობებში მისი დაბრუნებისას დნმ-ის მოლეკულაში კონფორმაციულ ცვლილებებზე დაკვირვება ხდებოდა ასევე ულტრაიისფერი სპექტროფოტომეტრის საშუალებით. ნახ. 12-ზე მოყვანილია დნმ-ის შთანთქმის სპექტრები სხვადასხვა pH-ის გარემო პირობებისას, კერძოდ, pH 7.0 (უწყვეტი), pH 3.0 (წერტილები), pH 2.8 (წყვეტილი) საიდანაც ჩანს, რომ ფიზიოლოგიური გარემო პირობებიდან დნმ-ის ხსნარის მუავე არეში გადაყვანისას ადგილი აქვს სპექტრების წანაცვლებას წითელ არეში. მნიშვნელოვანია, რომ თუ მოვახდეთ ხსნარის მუავე არედან წონასწორული დიალიზის მეთოდით ნეიტრალურ pH 7.0 დაბრუნებას, დნმ-ის სპექტრი უბრუნდება ფიზიოლოგიურ პირობებში მიღებულ სპექტრს (იხ. ნახ. 13), რომელიც ასევე მიუთითებს სტრუქტურის შექცევად ხასიათზე.

pH	ღღობის ტემპერატურა $T_m$ °C $\pm 0.1$ °C	სითბოს შნთანთქმა $\Delta H$ J/g $\pm 5\%$	კონფორმაციული გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალი $\Delta T$ °C $\pm 10\%$
2.8	16.0	9.0	–
3.0	22.0	17.4	12.3
3.2	28.0	20.6	12.3
4.6	60.0	44.2	14.7
5.7	69.0	47.2	13.5
6.6	71.0	46.7	13.7
7.0	71.3	47.3	14.1
7.5	71.6	47.8	13.5
8.1	74.3	49.0	14.7
8.6	74.5	53.6	14.1
9.0	73.3	54.8	12.5
9.4	71.0	56.0	13.5
10.0	68.5	58.4	11.8

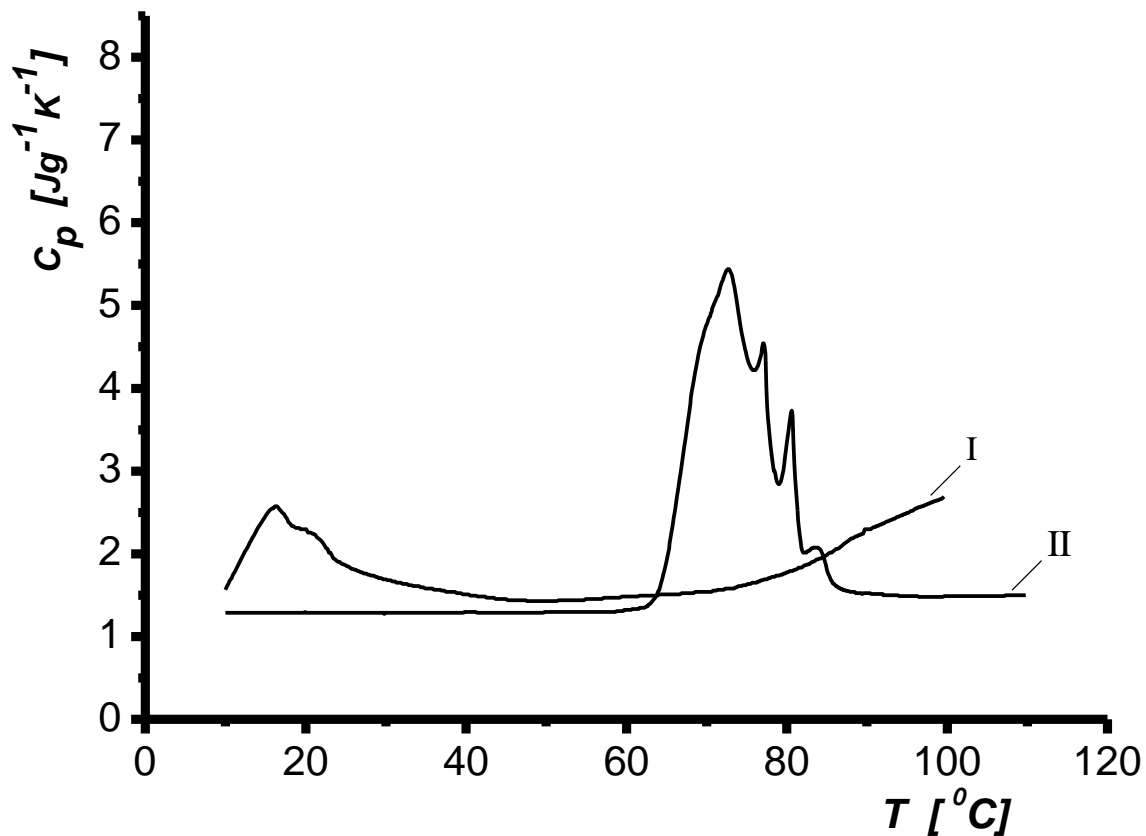
ცხრილი 4 ღნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრები 0.02 M Na<sup>+</sup>-ის პირობებში



ნახ. 9 დნმ-ის ღღობის ტემპერატურის გარემოს pH-ზე დამოკიდებულება

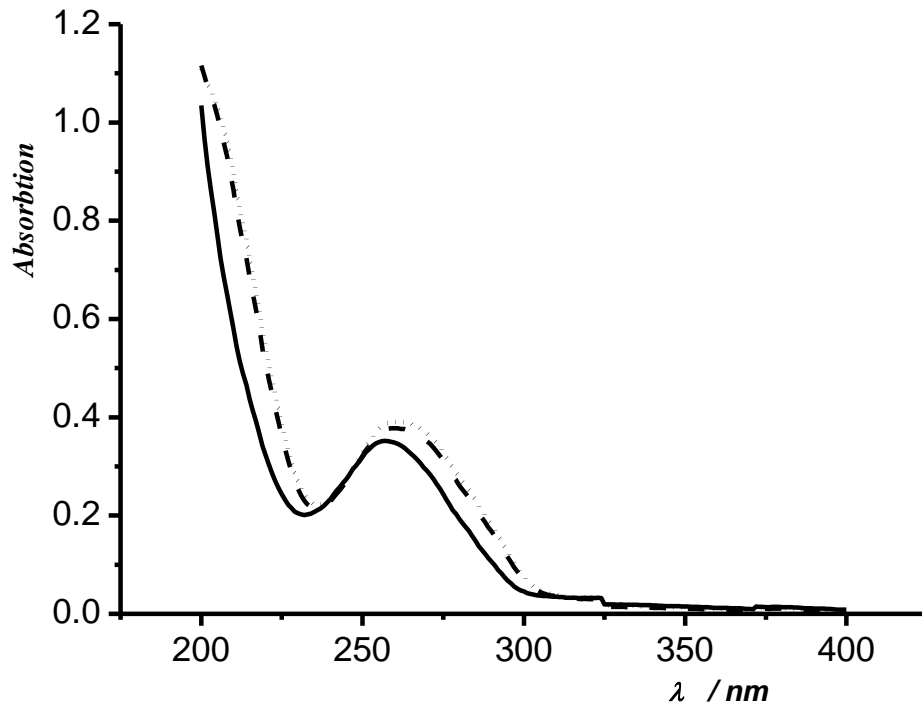


ნახ. 10 დნმ-ის ფაზური გადასვლისას ენთალპიის ცვლილების გარემოს pH-ზე დამოკიდებულება

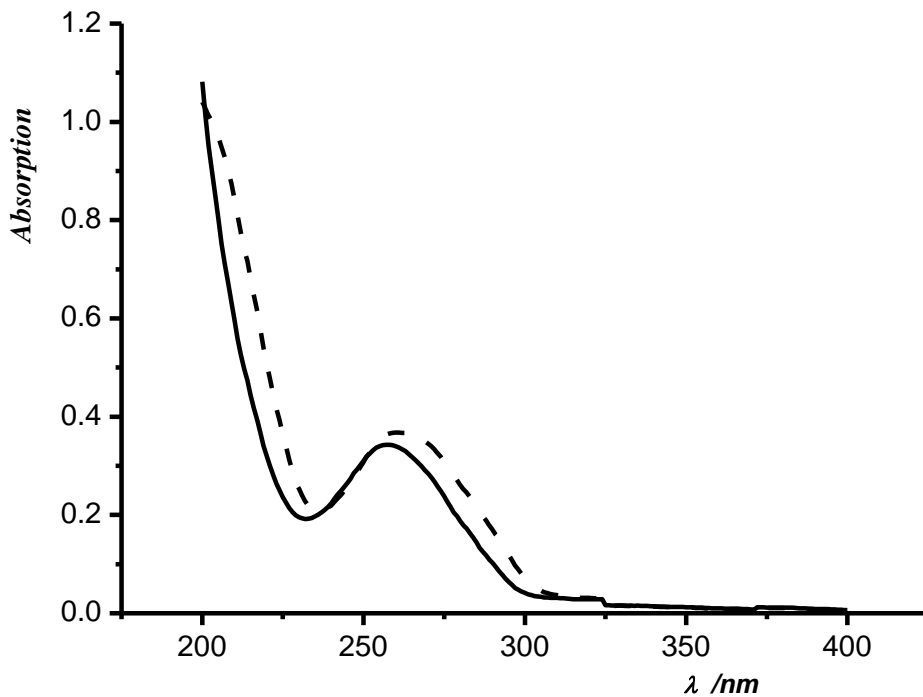


ნახ. 11 მჟავათი დესტაბილიზირებული დნმ-ის შექცევადი ხასიათი მისი ფიზიოლოგიურ პირობებში დაბრუნებისას. I – დნმ-ის ნიმუში 0.02M ნატრიუმის ფოსფატი + 0.01M ლიმონმჟავას ბუფერში pH 2.8, II – დნმ-ის ნიმუში pH 2.8-დან წონასწორული დიალიზის მეთოდით გადაყვანილი ნეიტრალური pH-ის პირობებში.





ნახ. 12 დნმ-ის შთანთქმის სპექტრი ულტრაიისფერ უბანში.  
 წყვეტილი ხაზი – დნმ-ის ნიმუში pH 3.0 მუავიანობის გარემო პირობებში.  
 წერტილები – დნმ-ის ნიმუში pH 2.8, უწყვეტი ხაზი – დნმ-ის ნიმუში pH 7.0



ნახ. 13 დნმ-ის შთანთქმის სპექტრი ულტრაიისფერ უბანში.  
 წყვეტილი ხაზი – დნმ-ის ნიმუში pH 2.8 მუავიანობის გარემო პირობებში  
 უწყვეტი ხაზი – დნმ-ის ნიმუში pH 2.8 -დან დიალიზის მეთოდით  
 გადაყვანილი ნეიტრალური pH გარემოში

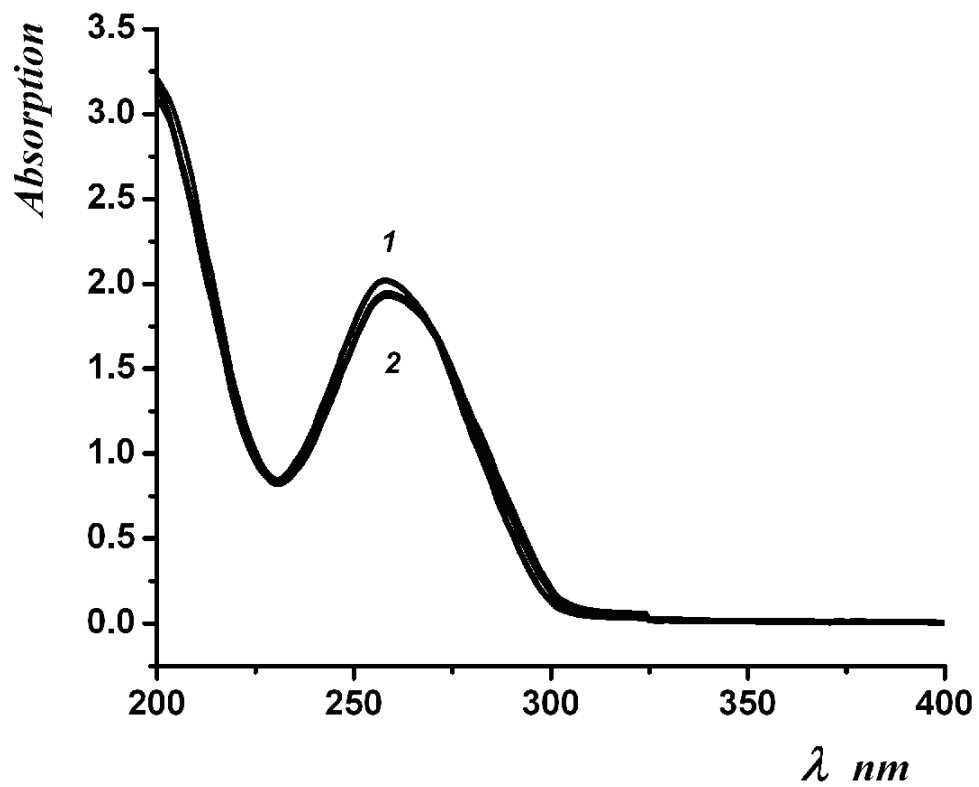
იმისათვის, რომ დაგვედგინა წარმოქმნის თუ არა PLGA ნანონაწილაკები კომპლექსს დნმ-თან და განსაზღვრული ყოფილიყო დნმ-ის (ბაზისური წყვილების) ის რაოდენობა, რომელიც მოდის ერთ ნანონაწილაკზე, შევიმუშავეთ საიმედო და სწრაფი მეთოდი. ეს მეთოდითა მოიცავს სპექტროფოტომეტრული და ცენტრიფუგირების მეთოდების კომპლექსურ გამოყენებას.

დაკვირვება წარმოებდა დნმ-ის ბუფერული ხსნარის შთანთქმის სპექტრის ცვლილებაზე. თავდაპირველად აღნიშნულ ნიმუშს ვამატებდით სუფთა (უშალითო) Np-PLGA-ნანონაწილაკების მცირე პორციებს (Np-PLGA/დნმ-ის მაქსიმალური წონითი თანაფარდობა 10/1), მორვეის შემდეგ ვაცენტრიფუგირებდით 13 500 rpm სიჩქარით 10წთ-ის განმავლობაში, ვიღებდით ხსნარის სუპერნატანტს (ზედა ხსნარი) და ხდებოდა მისი შთანთქმის სპექტრის ჩაწერა. როტორის ასეთი სიჩქარით ბრუნვის დროს დნმ-ის სედიმენტაცია არ ხდება, თუმცა დნმ-ის სხვა მაკრომოლეკულებთან (PLGA ნანონაწილაკებთან) კომპლექსის წარმოქმნის შემთხვევაში დნმ-ის ნალექი უნდა წარმოქმნილიყო, შედეგად კი ზედა ხსნარში დნმ-ის კონცენტრაცია შემცირდებოდა.

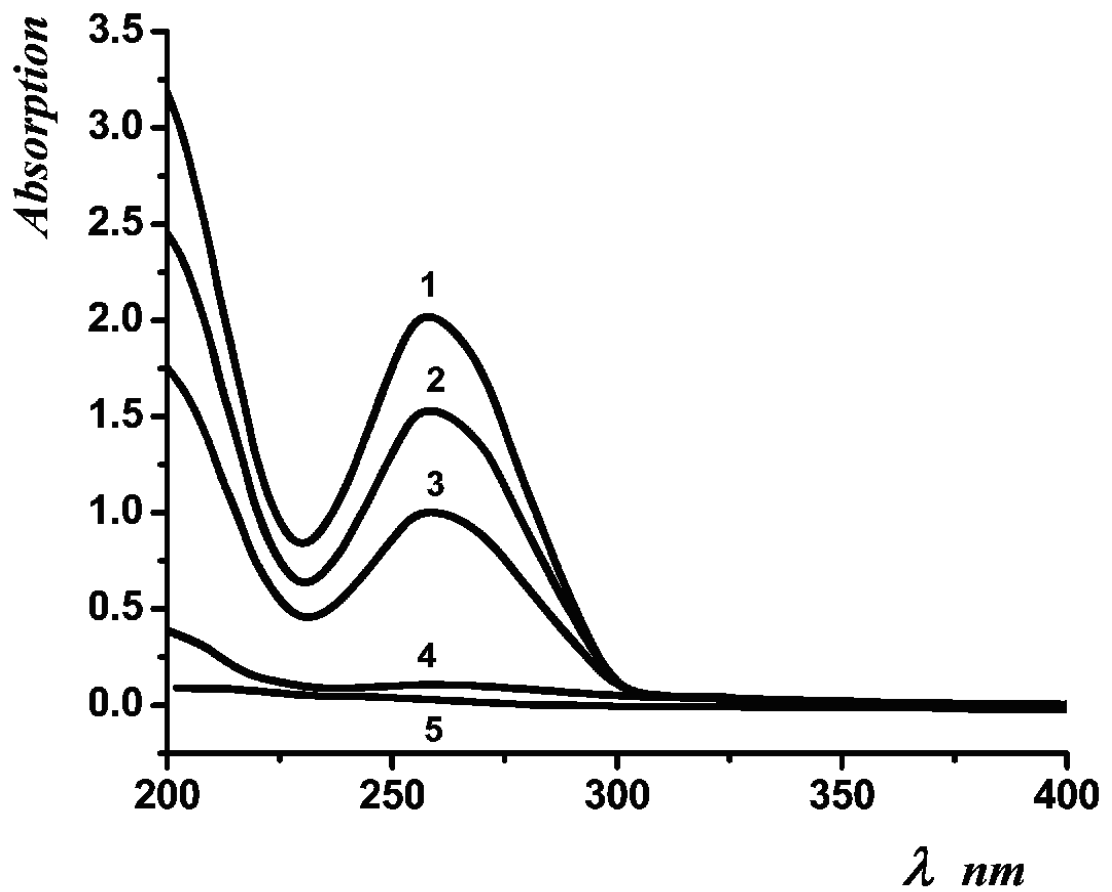
ანალოგიური ექსპერიმენტული მეთოდი იქნა გამოყენებული ხიტოსან-შალითიანი cNp-PLGA ნანონაწილაკების დნმ-თან ურთიერთქმედების შესასწავლად, სადაც ნანონაწილაკების პორციების დამატება ხდებოდა საფეხურეობრივად მიღებით: 1.685; 4.045; 6.726; 11.37. მაქსიმალური რაოდენობა დამატებული cNp-PLGA-ნანონაწილაკისა, რომელიც დაკავშირებული იყო დნმ-თან განსაზღვრულ იქნა გარკვეულ ეტაპზე ცენტრიფუგირების შედეგად მიღებულ სუპერნატანტში დნმ-ის საწყისი შთანთქმის სპექტრის სრული გაქრობით.

ჩატარებული სპექტროფოტომეტრული ექსპერიმენტების შედეგები მოცემულია ნახ. 14-ზე და ნახ. 15-ზე, სადაც ნაჩვენებია Np-უშალითო (მცირე უარყოფითი მუხტის მატარებელი) და cNp-ხიტოსან-შალითიანი (დადებითი მუხტის მატარებელი) PLGA-ნანონაწილაკების დნმ-ის დამატებით მიღებული ხსნარების დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული სუპერნატანტების შთანთქმის სპექტრები ულტრაიისფერ არეში.

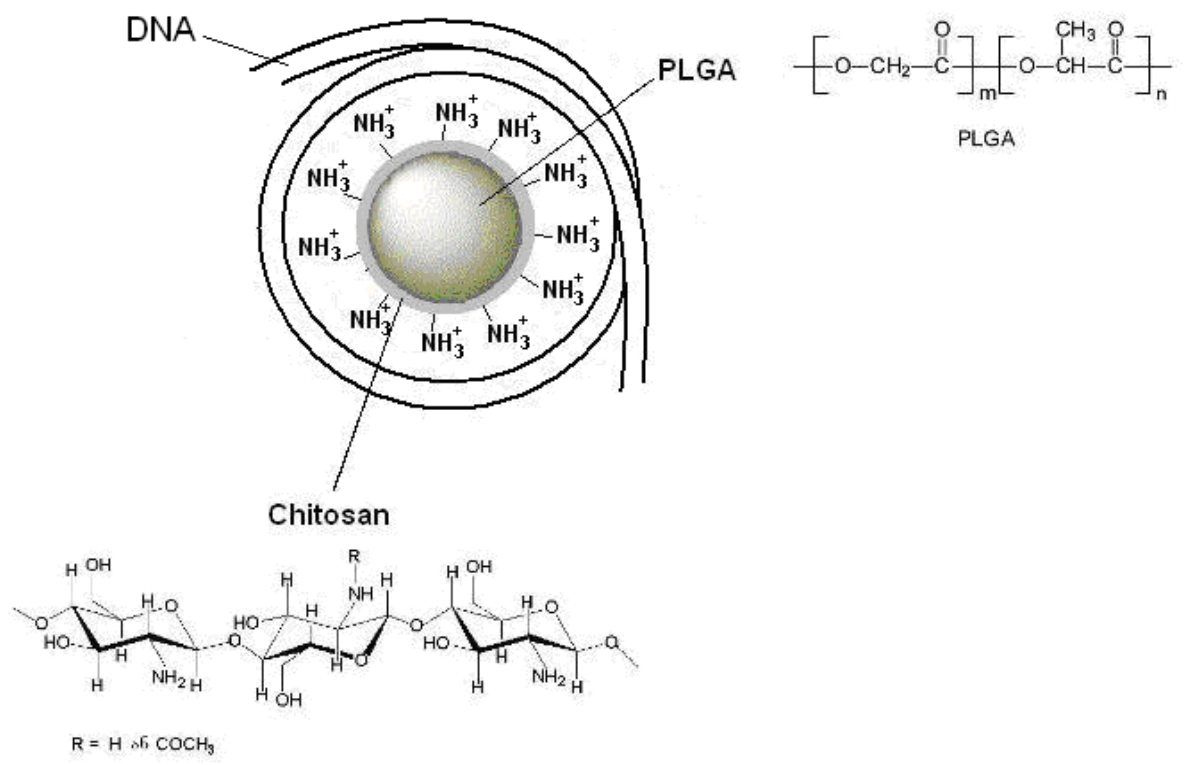
როგორც გრაფიკებიდან ჩანს, პირველი მათგანი (cNp) აქტიურად ურთიერთქმედებს დნმ-თან და შედეგად წარმოქმნილი კომპლექსის დაცენტრიფუგირებით სუპერნატანტის შთანთქმა მნიშვნელოვნად მცირდება. ნათელია, რომ ხიტოსან-შალითიანი (cNp) PLGA-ნანონაწილაკის დადებითი ზედაპირული მუხტი უზრუნველყოფს დნმ-ის ელექტროუარყოფით ფოსფატურ ჯგუფებთან არასპეციფიური, ელექტროსტატიკური კავშირების წარმოქმნას (სურ. 15). მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების (ცხრილი 5) მიხედვით აგებული გრაფიკის (იხ. ნახ. 16) თანახმად cNp/დნმ-ის დაკავშირების მაქსიმალური წონითი თანაფარდობაა cNp/DNA=7:1 (w/w). რაც შეეხება სუფთა ნანონაწილაკს (Np), როგორც ჩანს იგი სუსტად ან საერთოდ არ ურთიერთქმედებს დნმ-თან, რის გამოც ცენტრიფუგირების შედეგად დნმ/Np-ს სუპერნატანტის შთანთქმა თითქმის არ იცვლება (იხ. ნახ. 14).



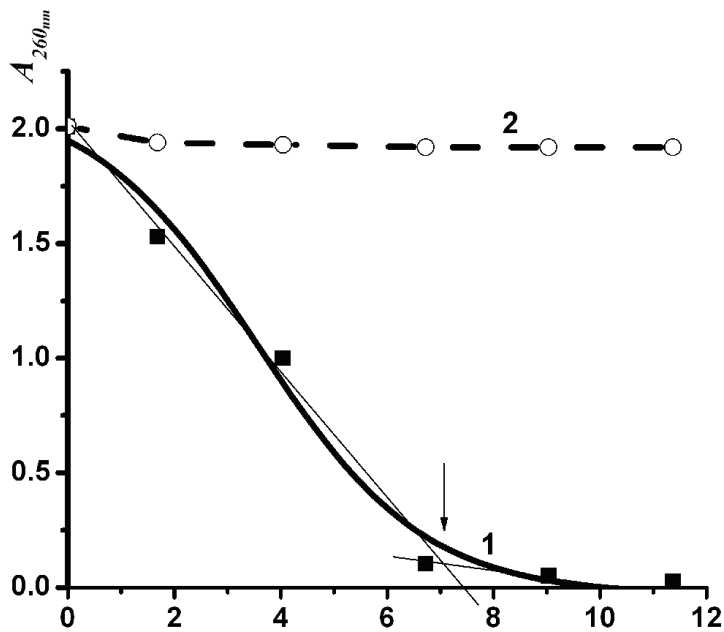
ნახ. 14 დნმ-ის ბუფერული ხსნარის (1) და Np-დნმ-ის სისტემის (2) (Np/DNA 10:1) დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული სუპერნატანტის შთანთქმის სპექტრი ულტრაიისფერ არეში.



ნახ. 15 დნმ-სა ბუფერული ხსნარის (1) და cNp-დნმ-ის სისტემის (2, 3, 4, 5) (cNp/DNA თანაფარდობები – 1.685; 4.045; 6.726; 11.37) დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული სუპერნატანტის შთანთქმის სპექტრი ულტრაიისფერ არეში



სურ. 15 დნმ-ის ორმაგსპირალური პოლინუკლეოტიდური ჯაჭვის cNp-PLGA-ნანონაწილაკზე დახვევის მოდელური სურათი



ნახ. 16 cNp-PLGA/დნმ-ის (1) და Np-PLGA/დნმ (2) სისტემების დაცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული სუპარნატანტების შთანთქმის ( $\lambda=260nm$ ) შესაბამის წონით თანაფარდობებზე დამოკიდებულების გრაფიკი

ცხრილი 5

№	Np (Np)/DNA w/w	$A_{260}$	
		Np	cNp
1	0	2.00	2.00
2	1.7	1.93	1.53
3	4.0	1.93	1.00
4	6.7	1.92	0.10
5	9.0	1.92	0.05
6	11.4	1.92	0.02

## 2.4. მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების განხილვა

როგორც ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენეს, დნმ-ის ფიზიკურ თვისებებს მნიშვნელოვნად განსაზღვრავს გამსხნელების pH, რაც ასახულია მოლეკულის იმ თერმოდინამიკურ პარამეტრებზე დამზერით, რომელიც კალორიმეტრული ექსპერიმენტებით იყო დადგენილი. ჩატარებული ექსპერიმენტებიდან ცალსახად ჩანს, რომ მუავე არეში (pH 7.0-pH 2.8) დნმ-ის სტრუქტურა განიცდის მნიშვნელოვან დესტაბილიზაციას, მაშინ როცა ტუტე არეში მოლეკულა ინარჩუნებს სტაბილურ ორმაგსპირალურ სტრუქტურას (pH 7.0-pH 10.0). ზოგიერთი ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, როგორც ზემოთ აღნიშნულ ძლიერ მუავე არეში (pH<4.6) ხდება დნმ-ის წყვილების პროტონიზაცია, რის შედეგადაც წყალბადური კავშირების რიცხვი ნუკლეოტიდურ ნაშთებს, როგორც AT ისე GC წყვილებს შორის ერთით მცირდება [59]. ჩვენს მიერ მიღებული შედეგები სრულ თანხვედრაშია ლიტერატურაში არსებულ ამ მონაცემებთან, ხოლო დამატებით შეიძლება ითქვას, რომ pH 2.6-ის პირობებში დნმ-ის მოლეკულის ჯაჭვები ერთმანეთისგან მთლიანად არიან დაცილებულნი, ანუ დნმ სრულად დენატურირებულია.

მნიშვნელოვანი შედეგია მიღებული დნმ-ის სტრუქტურული ლაბილობის შესახებ, რაც იმაში გამოიხატება რომ მოლეკულის ძლიერი დესტაბილიზაციის მიუხედავად (მაგალითად pH 2.8-მდე), ჯაჭვებს შორის ჯერ კიდევ შენარჩუნებულია წყალბადური კავშირები ის მინიმალური რაოდენობა, რომელიც საკმარისია რათა გარემოს pH-ის ამ ექსტრემალური მნიშვნელობიდან ნორმალურ, ფიზიოლოგიურ პირობებში დაბრუნებისას მოლეკულამ სრულად აღიდგინოს ნატიური, ორმაგსპირალური სტრუქტურა. განსაკუთრებით საყურადღებოა ის ფაქტი, რომ ჯაჭვებს შორის კავშირების აღდგენა ხდება ფაქიზი სტრუქტურების დონეზეც, რაზეც მიუთითებს მუავათი ძლიერ დესტაბილიზირებული დნმ-ის ნეიტრალური pH-ის პირობებში გადაყვანისას მისი სითბოს შთანთქმის მრუდზე პატარა პიკების კვლავ გამოჩენა (ნახ. 11-ზე II-მრუდი).

როგორც ექსპერიმენტებიდან ჩანს საკმარისია დნმ-ის ჯაჭვები გარემოს კრიტიკული მუავიანობის გავლენით, კერძოდ  $\text{pH} \leq 2.6$ , მთლიანად დაცილებულნი იყვნენ ერთმანეთისგან, რომ შესაძლებლობა იმისა, რომ კომპლემენტარულ ფუძეებს შორის კვლავ მოხდეს კავშირების სწორად განხორციელება (ორმაგსპირალური სტრუქტურის აღდგენა) აღარ არსებობს. ამ შემთხვევაში ( $\text{pH} \leq 2.6$ ), მოლეკულას უკვე აღარ აქვს უნარი მისი ფიზიოლოგიურ გარემო პირობებში დაბრუნების შემთხვევაშიც კი დაუბრუნდეს საწყის, ნატიურ კონფორმაციულ მდგომარეობას (ნახ. 6-ზე III-მრუდი).

საინტერესო შედეგია მიღებული დნმ-ის ტუტე არეში კვლევებისასაც. ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ ტუტე არეში (pH 7.0-10.0), განსხვავებით მუავე არესაგან, დნმ-ის მოლეკულა გამოირჩევა მაღალი სტაბილობით. ექსპერიმენტულად მიღებული ჩანაწერებიდან ნათლად ჩანს, რომ ტუტიანობის გაზრდით მცირდება დნმ-ის კონფორმაციული გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალი, ანუ დნმ-ის სითბური ღღობა ხდება უფრო კოოპერატიული (ნახ. 7, იხ. ცხრილი 4). ამავე დროს, ტუტიანობის გაზრდით pH 7.0-10.0 ინტერვალში დაიმაჩნება დენატურაციის შთანთქმის ენთალპიის არა თუ შემცირება არამედ ადგილი აქვს მის მონოტონურად მომატებასაც კი (იხ. ნახ. 10 და ცხრილი 4). ლიტერატურაში არსებობს მონაცემები [48] ტუტე არეში დნმ-ის დენატურაციის ტემპერატურული ინტერვალის შემცირების შესახებ, თუმცა ინფორმაცია ღღობის ენთალპიის მნიშვნელობების შესახებ (მითუმეტეს მის გაზრდაზე) pH-ის აღნიშნულ ინტერვალში ლიტერატურულ წყაროებში არ მოიძიება. ჩვენი აზრით მიღებული ექსპერიმენტული შედეგის მიზეზი (ენთალპიის გაზრდის ტენდენცია) არის ჯაჭვებს შორის არსებული კავშირების ენერჯიის გაზრდა, რაც

თავისთავად მეტად საყურადღებო შედეგად შეიძლება ჩაითვალოს. მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების ხასიათიდან გამომდინარე ერთერთი ყველაზე მისაღები ახსნა შეიძლება იყოს AT წყვილებს ურთიერთქმედების გაზრდა უფრო მეტად ვიდრე GC წყვილებს შორის (მხოლოდ ძლიერ ტუტე არეს პირობებში). თუ ამ მოსაზრებას გაითვალისწინებთ, მაშინ შესაძლებელია აიხსნას, როგორც დნმ-ის ღლობის ენტალპიის გაზრდა ასევე მიღებული სითბოსშთანთქმის პიკის დავიწროებაც. იმისათვის, რომ გავრკვეულიყავით, თუ რამდენად მართებული იყო ჩვენი მოსაზრებანი, ჩატარებული იქნა თეორიული გათვლები სისტემისათვის, რომელიც შედგებოდა ადენინის, თიმიინის და NaOH მოლეკულებისაგან. აღნიშნული გამოთვლები ჩატარებულ იქნა თსუ-ს ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის ქიმიის მიმართულების პროფესორების: ჯუმბერ კერესელიძის და თამაზ ფარცვანიას მიერ. ადენინ-თიმიინის კომპლემენტარულ წყვილზე NaOH მოლეკულის გავლენის რაოდენობრივი აღწერის მიზნით გამოყენებულ იქნა ქვანტური ქიმიის თანამედროვე მეთოდი – სიმკვრივის ფუნქციონალის თეორია (DFT) [128,129]. გამოთვლები სრულდებოდა “Nature” პროგრამის მიხედვით [130], PBE მიახლოების გამოყენებით. გარდა ამისა, შედარების მიზნით გამოიყენებოდა BLYP ფუნქციონალი [131,132] და ლოკალური სიმკვრივის მიახლოება [133].

ენერჯიის ოპტიმიზაციის შესრულებული გათვლების შედეგად დადგინდა იქნა, რომ AT წყვილის და NaOH-ის მოლეკულის ცალ ცალკე სრული ენერჯია ტოლია, შესაბამისად, 920.7917 და 237.9693 ჰარტრის (ენერჯიის ატომური ერთეული 1 ჰარტი = 2625.5 კჯ/მოლ). ანუ მოლეკულური სისტემის ჯამური ენერჯია არის  $E_1 = -1158.7610$  ჰარტი.

შემდეგ გამოთვლილი იქნა AT წყვილის სრული ენერჯია NaOH-ის თანაობისას (გამოთვლები კომპიუტერზე მიმდინარეობდა დაახლოებით 24 საათის განმავლობაში), რომელიც აღმოჩნდა  $E_2 = -1158.7824$  ჰარტი.

თუ შევადარებთ  $E_1$  და  $E_2$  ენერჯიების მნიშვნელობებს, ვნახავთ, რომ უკანასკნელის თავისუფალი ენერჯია არის შემცირებული, ანუ მოლეკულური სისტემა მდგრადია 56.2 კჯ/მოლით ანუ 13.4 კკალ/მოლით:

$-\Delta E = -1158.7842 - (-1158.7610) = -0.0214$  ჰარტი =  $-56.2$  კჯ/მოლ =  $-13.4$  კკალ/მოლ. ამავე დროს ამ გათვლებით იქნა მიღებული, რომ ენერჯიის შემცირება განხორციელდა AT წყვილებში დამატებითი კავშირის გაჩენით, რასაც ჩვენი ექსპერიმენტული შედეგებით ვვარაუდობდით.

ქვემოთ მოყვანილია AT და GC წყვილებს შორის დნმ-ში წყალბადური კავშირებით წარმოქმნილი ენერჯიების რიცხვითი მნიშვნელობები. გამოთვლილ იქნა ამ სისტემის სრული ენერჯია და ცალ ცალკე A და T ფუძეების სრული ენერჯიები:

$E_h(A+T) = -453.8025 + (-466.9659) = -920.7684$  ჰარტი – ცალ-ცალკე A და T ნუკლეოტიდების ენერჯიების ჯამი.

$E_h(AT) = -920.7914$  ჰარტი - წყალბადური ბმებით დაკავშირებული A და T ნუკლეოტიდური წყვილის ენერჯია.

მაშინ,

$E(HB) = E(AT) - E(A+T) = -920.7914 - (-920.7684) = -0.023$  ჰარტი =  $-60.4$  კჯ/მოლ =  $-14.4$  კკალ/მოლ

რომელიც შეესაბამება AT წყვილს შორის განხორციელებული წყალბადური კავშირების ენერჯიას.

ანალოგიური მიდგომით გამოთვლილ იქნა სამი წყალბადური ბმის ენერჯიის სიდიდე GC წყვილებში:

$E_h(G+C) = -542.1648 + (-394.6416) = -936.8064$  ჰარტი – ცალ-ცალკე G და C ნუკლეოტიდების ენერჯიების ჯამი.

$E_h(GC) = -936.8500$  ჰარტი – GC კომპლექსის ენერჯია



$E_h(HB) = E(GC) - E(G+C) = -936.8500 - (-936.8064) = -0.0436$  ჰარტრი =  $-114.6$  კჯ/მოლ =  $-27.4$  კკალ/მოლ, რომელიც წარმოადგენს GC წყვილს შორის განხორციელებული წყალბადური კავშირების ენერჯიას.

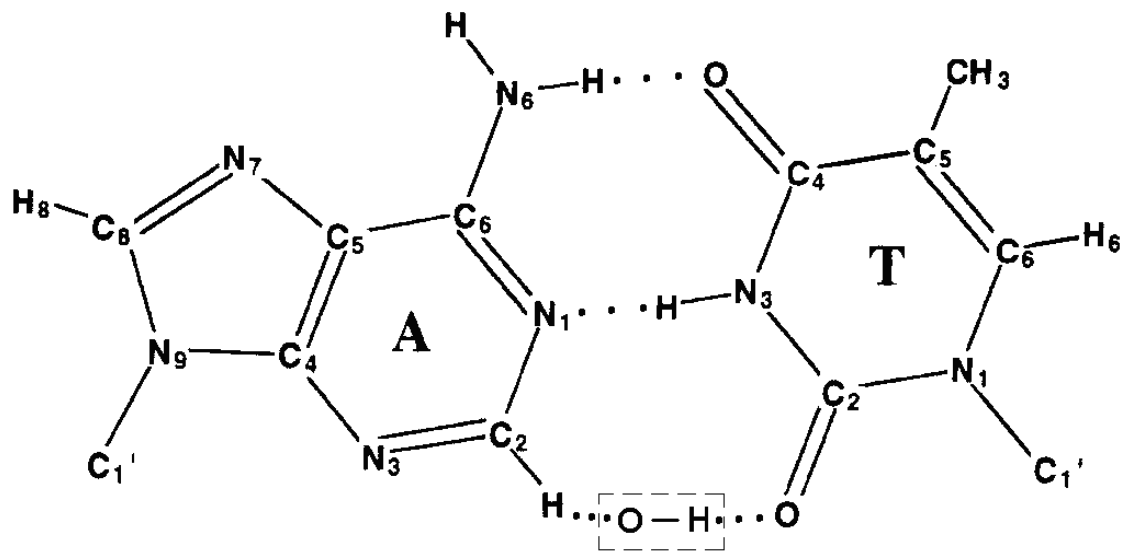
სურ. 17-ზე ნაჩვენებია ზემოთ მოყვანილი გათვლებით პროგრამის მიერ დაფიქსირებული NaOH მოლეკულის მეშვეობით AT წყვილებს შორის დამატებითი კავშირის წარმოქმნის ადგილი.

ამრიგად, თუ დავეყრდნობით ზემოთ მოყვანილ ექსპერიმენტულ შედეგებს, მათი ანალიზის საფუძველზე შეიძლება გაკეთდეს ზოგიერთი შეფასება იმის შესახებ, თუ როგორ შეიძლება გამოყენებულ იქნას მუავე არეში დნმ-ის მოლეკულის სტრუქტურული შესაძლებლობები უჯრედში მისი ფუნქციონირების თვალსაზრისით.

მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები მიუთითებს იმაზე, რომ მუავე გარემო უჯრედში შეიძლება “გამოიყენოს” იმისთვის, რომ მოლეკულის ჯაჭვების გახსნა განხორციელდეს მცირე ენერჯიის დანახარჯით. ლოგიკურია, რომ თუ შესაძლებელია უჯრედში დნმ-ის ფუნქციური უბნის (გენის) გახსნაში დაიხარჯოს მცირე ენერჯია, უჯრედი ასეთ შესაძლებლობას აუცილებლად გამოიყენებს, მითუმეტეს, როგორც მიღებული ექსპერიმენტული შედეგები (მუავათი დესტაბილიზირებული დნმ-ის უნარი მთლიანად აღიდგინოს საწყისი ორმაგსპირალური სტრუქტურა) ცხადყოფს, რომ ასეთ შემთხვევაში დნმ-ის ჯაჭვების გახსნა/დახურვა უნდა იყოს სრულიად შექცევადი პროცესი. ამას დაემატება ის გარემოებაც, რომ ლიტერატურული მონაცემების თანახმად ცილები, რომლებიც ჩართულნი არიან დნმ-ის ფუნქციონირების პროცესში გამოირჩევიან ჭარბი რაოდენობის მუავე ბუნების ამინომუავეების შემცველობით [134-146], რაც ჩვენი აზრით არ უნდა იყოს შემთხვევითი. კერძოდ გამოვთქვამთ მოსაზრებას, რომ ის ცილები, რომლებიც მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ გენების აქტივაციაში, რისთვისაც ისინი წარმოქმნიან სპეციფიურ კომპლექსს დნმ-ის მოლეკულის გარკვეულ ნუკლეოტიდურ თანამიმდევრობებთან, თავიანთ სტრუქტურაში უნდა მოიცავდნენ ისეთ უბანს, სადაც თავმოყრილი იქნება ცილაში შემავალი მუავე ბუნების ამინომუავეები, რომელიც მოახდენს დნმ-ის უბნის (პრომოტორული უბანი) დესტაბილიზაციას ან მთლიანად ჯაჭვების ლოკალურ, დროებით, განცალკევებას. ამ მიდგომით შეიძლება გაკეთდეს გარკვეული შეფასებაც, რომელიც იმაში მდგომარეობს, რომ ცილები, რომლებიც ცნობენ დნმ-ის სპეციფიურ უბნებს და წარმოქმნიან კომპლექსს მასთან, უნდა ხასიათდებოდნენ ორი საერთო თვისებით: ამ ცილის შემადგენლობაში უნდა შედიოდეს გარკვეული (შედარებით ჭარბი) რაოდენობა მუავე ბუნების ამინომუავეებისა და ცილის მესამეული სტრუქტურა უნდა უზრუნველყოფდეს მათი ჭარბი რაოდენობის გარკვეულ უბანში თავმოყრას.

მნიშვნელოვანი იყო PLGA-ნანონაწილაკების, როგორც გენის გადამტანი ნაწილაკების დნმ-თან ურთიერთქმედების შესწავლა, რომელსაც დიდი პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს ფარმაკოლოგიასა და გენურ თერაპიაში. ხიტოსან-შალითიანი PLGA-ნანონაწილაკისა და დნმ-ის არასპეციფიური ურთიერთქმედების სპექტროფოტომეტრულმა კვლევებმა ცხადყო მათი სტაბილური კომპლექსის წარმოქმნის შესაძლებლობა. ამასთანავე აგებულ იქნა cNp-PLGA/დნმ-ის სისტემის ცენტრიფუგირების შედეგად მიღებული სუპარნატანტების შთანთქმის შესაბამის წონით თანაფარდობებზე დამოკიდებულების გრაფიკი (იხ. ნახ. 16), რომლის თანახმადაც თითო cNp-PLGA ნაწილაკს შეუძლია მიიერთოს დნმ წონითი თანაფარდობით 7:1 (cNp-PLGA:DNA, w/w). თუ გავითვალისწინებთ ნანონაწილაკის მასას, რომელიც შეადგენს  $M \sim 3 \cdot 10^{15}$  გ -ს და დნმ-ის თითო ფუძე წყვილის მოლურ მასას ( $\sim 700$  Da), მაშინ შეგვიძლია ვიანგარიშოთ თუ რა რაოდენობის ფუძე წყვილის მიერთება (და გადატანა) შეუძლია ასეთი ტიპის ერთ ნაწილაკს. ეს რიცხვი აღმოჩნდა  $3.68 \cdot 10^5$ -ის ტოლი, რაც სავსებით საკმარისია სამიზნე უჯრედში საჭირო გენის გადასატანად

(საშუალოდ გენი შეიცავს 10-15 ათასამდე ფუძე წყვილს [147]). განსხვავებულია სურათი უშალითო Np-PLGA ნანონაწილაკის შემთხვევაში, სადაც არავითარი ურთიერთქმედება დნმ-თან არ დაფიქსირდა, რაც ადვილად შეიძლება აიხნას მისი უარყოფითი ზედაპირული მუხტის არსებობით, რომელიც გამოიწვევდა განზიდვას დნმ-ის უარყოფითი მუხტის მატარებელ ფოსფატურ ჯგუფებთან ურთიერთქმედებისას. ამრიგად, გამოიკვეთა ხიტოსან-შალითიანი PLGA-ნანონაწილაკის, როგორც გენის გადამტანი ნაწილაკის უდავო უპირატესობა სუფთა სახის PLGA-ნანონაწილაკთან შედარებით.



სურ. 17 თეორიული გათვლების შედეგად AT წყვილებს შორის დამატებითი კავშირის წარმოქმნის ადგილი.

## დასკვნები

1. დადგენილია გარემოს მუავიანობის გავლენა დნმ-ის მოწესრიგებულ სტრუქტურის ენერგეტიკულ პარამეტრებზე, რომლის მიხედვითაც დნმ-ის სტრუქტურული ლაბილობა და მისი სტაბილობა მნიშვნელოვნად განისაზღვრება გარემოს pH-ის მნიშვნელობით. ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის თერმოდინამიკური თვისებები მუავე გარემოში (pH 2.8-7.0), განსხვავებით ტუტე გარემოსგან (pH 7.0-10.0), მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული გამსნელების მუავიანობაზე. რაც უფრო მაღალია გარემოს მუავიანობის ხარისხი, მით უფრო ნაკლებია დნმ-ის დენატურაციის ტემპერატურა და შთანთქმული კუთრი სითბო (ენტალპიის ცვლილება).
2. ნაჩვენებია (მოცემული იონური ძალის პირობებში) დნმ-ის სრული დენატურაციისთვის საჭირო გარემოს pH-ის კრიტიკული მნიშვნელობები – მუავე არეში ეს მნიშვნელობა შეადგენს pH 2.6-ს და ტუტე არესთვის pH 12.0 -ს.
3. ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის სტრუქტურის მუავე გარემოთი დესტაბილიზაციის პროცესი არის სრულიად შექცევადი pH 2.8 მნიშვნელობიდან დაწყებული, ხოლო pH 2.6 პირობებში გადაყვანისას დნმ შეუქცევადად დენატურირდება.
4. ნაჩვენებია, რომ ტუტე გარემოში (pH 7.0-10.0) დნმ-ის ღლობის ტემპერატურული ინტერვალი (პიკის ნახევარსიმაღლის ნიშნულზე) ტუტიანობის მომატებით იწყებს შემცირებას, იზრდება დენატურაციის შთანთქმის სითბო (კუთრი ენტალპია) და გადასვლის ტემპერატურა (pH 9.0-მდე). მიღებული შედეგი აშკარად მიანიშნებს AT და GC ფუძე წყვილების თერმული სტაბილობის დაახლოებაზე და საბოლოო ჯამში, დნმ-ის სტაბილობის გაზრდაზე. ღლობის ენთალპიის გაზრდა განპირობებული უნდა იყოს AT წყვილებს შორის დამატებითი კავშირის წარმოქმნით, რასაც ადასტურებს თეორიული გათვლები NaOH-ის გარემოში AT წყვილებს შორის დამატებით მესამე კავშირის წარმოქმნის შესაძლებლობის შესახებ, რაც სრულიად ახალი შედეგია.
5. მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების საფუძველზე ჩამოყალიბებულია მოდელი, რომლის მიხედვით ცილების მიერ დნმ-ის სპეციფიური უბნების ამოცნობაში მნიშვნელოვან როლს უნდა თამაშობდეს ცილის სტრუქტურაში არსებული მუავე ამინომუავეებით მდიდარი უბნები. კერძოდ, ცილა-დნმ-ის სპეციფიური კომპლექსის წარმოქმნას განაპირობებს ცილის მუავე უბნის მიერ დნმ-ის ამ მონაკვეთის (შედარებით ნაკლებად სტაბილური AT-წყვილებით მდიდარი უბანი) დესპირალიზაცია (ჯაჭვების განცალკევება), რის შემდეგაც ადგილი აქვს დნმ-თან ცილის უფრო მჭიდრო ურთიერთქმედებას და ე.წ. ჩაკეტილი კომპლექსის წარმოქმნას.
6. ორი ტიპის (უშალითო და ხიტოსან-შალითიანი) PLGA ნანონაწილაკის დნმ-თან ურთიერთქმედების შესწავლის საფუძველზე ნაჩვენებია, რომ მცირე უარყოფითი მუხტის მქონე უშალითო PLGA ნანონაწილაკი არ ურთიერთქმედებს დნმ-ის ორმაგსპირალურ სტრუქტურასთან, მაშინ როცა დადებითი მუხტის მატარებელი ხიტოსან-შალითიანი ნაწილაკი საკმაოდ ინტენსიურად იკავშირებს მას, კერძოდ, 1 ნანონაწილაკს უნარი აქვს მიიერთოს  $3.68 \cdot 10^5$  ცალი ბაზისური წყვილი, რაც სრულიად საკმარისია უჯრედში ერთი გენის გადასატანად.

აღნიშნულ სადისერტაციო თემაზე მომზადებულ იქნა სამეცნიერო სტატიები, რომლებიც დასაბუქდად მიღებულ იქნა შემდეგ ჟურნალებში:

1. M. Khvedelidze, T. Mdzinarashvili, T.Partskhaldze, N. nafee, U.F. Schaefer, C-M. Lehr, M. Schneider, Calorimetric and spectrophotometric investigation of PLGA nanoparticles and their complex with DNA, J. Thermal Analysis and Calorimetry, 2009. (in press)

DOI: 10.1007/s10973-009-0137-x

2. T. Mdzinarashvili, T. Partskhaladze, M. Khvedelidze, T. Lomidze, Possible role of acidic environment for the structural and functional abilities of DNA, 2009, J. Boil. Phys. Chem. Vol. 9, pp.77-82.

3. T. Mdzinarashvili, M. Khvedelidze, T. Partskhaladze, N. Nafee, U. F. Schaefer, C.-M. Lehr, M. Schneider, Biophysical approach to evaluate DNA transfer by PLGA nanoparticles, 2009, J. Boil. Phys. Chem. Vol. 9, pp. 83-87.

4. "European Human Genetics Conference 2008", ( Barcelona, Spain)

T. Partskhaladze, T.Mdzinarashvili, T. Lomidze, "The acidic environment as essential attribute for the DNA functioning" (Abstract), Journal of European Human Genetics, Vol. 16 supplement, May 2008, p. 400.

## გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, *Journal of Experimental Medicine*, 1944, Vol. 79, pp. 137-158.
2. Watson J., Crick F., Molecular structure of nucleic acids, *Nature*, 1953, Vol. 171, pp. 737-738.
3. Langrige R., Wilson H., Hooper C., Wilkins M., Hamilton L., The molecular configuration of DNA. I. X-ray diffraction study of acrySTALLINE form of the lithium salt, *J. Mol. Biol.*, 1960, N 12, pp. 19-33.
4. Fuller W., Wilkins M., Wilson H., Hamilton L., The molecular configuration of desoxyribonucleic acid. IV. X-ray diffraction study of the A-form, *J. Mol. Biol.*, 1965, N 12, pp. 60-80.
5. Arnott S., Selsing E., The conformation C-DNA, *J. Mol. Biol.*, 1975, N 98, pp. 265-269.
6. Wang A., Quilgley G., Kalpak F., Marel G., Boom J., Rich A., Left-handed double helical DNA: Variations in the backbone conformation, *Science*, 1980, N 211, pp. 171-176.
7. Иванов В.И., Двойная спираль ДНК, Молекул. биология, 1983, Т. 17, № 3. ст. 616-621.
8. "Принципы структурной организации нуклеиновых кислот", Зенгер В.В., В кн. Под ред. Вайнштейна М., Мир, 1987.
9. Pohl F., Joojin Y., Salt-induced cooperative conformational change of a synthetic DNA: Equilibrium and kinetic studies with poly d(G-C), *J. Mol. Biol.*, 1972, Vol. 67, pp. 375-396.
10. Drew H., Takano T., Tapaka S., Itikura K., Dickerson R., High-salt d(CpCpCpCp):A Left-handed Z-DNA double helix, *Nature*, 1980, Vol. 286, pp. 567-573.
11. Sinden R.R., *DNA structure and function* (1st ed.), Academic Press, 1994, p. 398. [ISBN 0-12-645750-6](#).
12. "Principles of Biochemistry" (book), Horton H. R., Moran L. A., Ochs R. S., Rawn J. D., Scrimgeour K. G., 1996.
13. Fuller R. S., Funnell B. E., Kornberg A., The dnaA protein complex with the *E. coli* chromosomal replication origin (*oriC*) and other DNA sites, *Cell*, 1984, Vol. 38, pp. 889-900.
14. Matsui M., Oka A., Takanami M., Yasuda S., Hirota Y., Sites of dnaA protein-binding in the replication origin of the Escherichia coli K-12 chromosome, *J. Mol. Biol.*, 1985, Vol.184, pp. 529-533.
15. Baker T. A., Bell S. P., Polymerases and the replisome: machines within machines, *Cell*, 1998, Vol. 92, pp. 295-305.
16. Messer W., The bacterial replication initiator DnaA. DnaA and oriC, the bacterial mode to initiate DNA replication, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2002, Vol. 26, pp. 355-374.
17. Well R.D., Larson J.E., Grant R.G., Cantor C.R., Shorlete B., Physicochemical studies on polydesoxyribonucleotides containing defined repeating nucleotide sequence, *J. Mol.Biol.*, 1970, Vol. 54, N3, pp. 465-497.
18. Семенов М.А., Сухоруков Б.И., Малеев В.Я., Гидратируются ли азотистые основания в ДНК при низких влажностях?, *Биофизика*, 1981, т. 26, с. 979-984.
19. Fersht A.R., The hydrogen bond in molecular recognition, *Trends Biochem. Sci.*, 1987, Vol.12, pp. 301-304
20. Tunis M.-J.B., Hearst J.E., Optical rotatory dispersion of DNA in concentrated salt solutions, *J. Biopolymers*, 1968, Vol. 6, N 8 pp. 1218-1223.
21. Ivanov V. I., Minchenkova L. E., Schyolkina A.K., Poletayev A.I., Different conformation of double stranded nucleic acid in solution as revealed by circular dichroism, *Biopolymers*, 1973, Vol. 12, N1, pp. 89-110.
22. Drew H.R., Dickerson R. E., Structure of a DNA dodecamer. III. Geometry of hydration, *J.Mol.Biol.*, 1981, Vol. 151, pp. 535-556.

23. Falk H., Hartman K., Lord R., Hydration of desoxyribonucleic acids. II. An infrared study, *J. Am. Chem. Soc.*, 1963, Vol. 85, pp. 387-394.
24. Falk H., Pode A., Goymour C., Infrared study of water in the hydration shell of DNA, *Can. J. Chem.*, 1970, Vol. 48, pp. 1536-1542.
25. Привалов П.Л., Мревлишвили Г.М., Гидратация молекул в нативном и денатурированном состоянии, *Биофизика*, 1967, т. 12, с. 22-29.
26. Мревлишвили Г.М., Низкотемпературная калориметрия биологических макромолекул, *УФН*, 1979, т.128, с. 273-312.
27. Букин В.А., Экспериментальные исследования гидратации ДНК, 1987, т. 21, вып. 3, с. 615-629.
28. Pal S. K., Zhao L., Zewail A. H., Water at DNA surfaces: Ultrafast dynamics in minor groove recognition, *PNAS*, 2003, Vol. 100, No. 14, pp. 8113-8118.
29. Мревлишвили Г.М., Зависимость гидратации природных ДНК от GC-содержания, *ДАН СССР*, 1981, т. 260, с. 761-764.
30. Leslie A. G. W., Arnott S., Chandrasekaran R., Ratliff R.L., Polymorphism of DNA double helices, *J. Mol. Biol.*, 1980, Vol.143, pp. 49-72.
31. Франк-Каменецкий М.Д., Флуктуационная подвижность ДНК, *Молекул. биология*, 1983, т. 17, N 3, ст. 639-652.
32. Volodarskii A.V., Anshelevich V.V., Lukashin A.V., Frank-Kamenetskii M.D., Statistical mechanism of supercoils and the torsional stiffness of the DNA double helix, *Nature*, 1979, Vol. 280, No 5720, pp. 294-298.
33. Привалов П.Л., Теплота плавления двойной спирали ДНК, *Молекул. биология*, 1969, Т. 3, N 5, ст. 690-695.
34. Duguid J. G., Bloomfield V. A., Benevides J. M., Thomas G. J., DNA Melting Investigated by Differential Scanning Calorimetry and Raman Spectroscopy, *Biophys. Jour.*, 1996, Vol. 71, pp. 3350-3360.
35. Bregadze V.G., Gelashvili E.S., Tsakadze K.J., Melikishvili S.Z., Metal-induced Point Defects in DNA: Model and Mechanisms, *Chem. & Biodiversity*, 2008, Vol. 5, pp. 1980-1989.
36. Bregadze V. G., Chkhaberidze J. G., Khutsishvili I. G., "Effect of metal ions on the fluoresce of dyes bound to DNA", *Metal ions in biological systems (book series)*, 1996, Vol. 33, pp. 253-267
37. D.R. Monaselidze, Mgeladze G. N., Thermal properties of DNA and polydeoxyribonucleotides in a wide range of ionic concentration of neutral salts and a polymer, *Биофизика*, 1977, Vol. 22, pp. 950-958.
38. Muntean C. M., Segers-Nolten G. M. J., Raman microspectroscopic study of effects of Na(I) and Mg(II) ions on low pH induced DNA structural changes, *J. Biopolymers*, 2002, Vol.72, pp. 225 – 229
39. Thomas G. J. Jr., Tsuboi M., Raman spectroscopy of nucleic acids and their complexes, *Adv. Biophys. Chem.*, 1993, Vol. 3, pp. 1-70.
40. Веденев А.М., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д., Переход спираль-клубок в ДНК. *УФН*, 1971, т. 105, N 3, с. 479-519.
41. Шугалий А.Б., Франк-Каменецкий М.Д., Лазурин Ю.С., Вискозиметрические исследование перехода спираль-клубок в ДНК фага T2, *Молекулярная биология*, 1983, т. 17, N3, с. 639-652.
42. Сухоруков Б.И., Мошковский Ю.Б., Бирштейн Т.М., Лисцов В. И., Спектроскопические исследования перехода спираль-клубок в ДНК при различных температурах, *Биофизика*, 1963, т. 8, N 3, ст. 294-301.
43. Hiai S., Effect of cupric ions on thermal denaturation of nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 1965, Vol.11, N4, pp. 672-691.
44. Marmur J., Doty P., Determination of the base composition of DNA from its denaturation temperature, *J. Mol. Biol.*, 1962, Vol. 5, N1, pp. 109-118.
45. Mandel M., Marmur J., Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA, *Methods in enzymol.*, XII B, 1968, Vol. 109, pp. 195-206.

46. Owen R. J., Hill L.R., Lepage S.P., Determination of DNA base composition from melting profiles in dilute buffers, *Biopolymers*, 1969, Vol. 7, N4, pp. 503-516.
47. Lando D. Yu., "Helix-coil transition of DNA in complex with ligands", Ph.D. Thesis (In Russian), Minsk, 1988.
48. Кочетков Н.К., Будовский Э.И., Свердлов Е.Д. и др., "Органическая химия нуклеиновых кислот", М.: Химия, 1970.
49. Zimmer C., Venner H., Research on nucleic acids. V. Concerning the pH-dependence of the thermal denaturation of deoxyribonucleic acids of different guanine-cytosine content, *J. Mol. Biol.*, 1963, Vol. 7, pp. 603-609.
50. Bunville L.G., Gelduschek, E.P., Rawitscher M.A. and Sturtevant J.M., Kinetics and equilibria in the acid denaturation of deoxyribonucleic acids from various sources, *Biopolymers*, 1965, Vol. 3, pp. 213-240.
51. Zimmer Ch., Luck G., Venner H., Fric I., Studies on the conformation of protonated DNA, *Biopolymers*, 1968, Vol. 6, pp. 563-574.
52. Michelson A.M., Pochon F., Polynucleotides. XII. Further studies on poly G. poly C and DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, Vol. 174, pp. 604-613.
53. Löwdin P. O., Proton Tunneling in DNA and its Biological Implications *Reviews of Modern Physics*, 1963, Vol. 35, pp. 724-732.
54. Courtois Y., Fromageot P., Guschlbauer W., Protonated polynucleotide structures. 3. An optical rotatory dispersion study of the protonation of DNA, *Eur. J. Biochem.*, 1968, Vol. 6, pp. 493-501.
55. Studier F. M., Sedimentation studies of the size and shape of DNA, *J. Mol. Biol.*, 1965, Vol. 11, pp. 373-390.
56. Tran-Dinh S., Guschlbauer W., Gueron M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1972, Vol. 94, pp. 7903-7911.
57. Smol'janinova T. I., Zhidkov V. A., Sokolov G. V., Analysis of difference spectra of protonated DNA: determination of degree of protonation of nitrogen bases and the fractions of disordered nucleotide pairs, *Nucleic Acids Research J.*, 1982, Vol. 10, pp. 2121-2134.
58. Hermann Ph., Fredericq E., The role of the AT pairs in the acid denaturation of DNA, *Nucleic Acids Research J.*, 1977, Vol. 4, No 8, pp. 2939-2047.
59. Zavriev S.K., Minchenkova L.E., Vorlíčková M., Kolchinsky A. M., Volkenstein M. V., Ivanov V. I., Circular dichroism anisotropy of DNA with different modifications at N7 of guanine, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, Vol. 564, No 2, pp. 212-224.
60. O'Connor T., Mansy S., Bina M. et al., The pH-dependent structure of calf thymus DNA studied by Raman spectroscopy, *J. Biophys. Chem.*, 1981, Vol. 15, No 1, pp. 53-64.
61. Luck G., Zimmer Ch., Shatzke G., Circular dichroism protonated of DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, Vol. 169, No 2, pp. 548-549.
62. Michelson A.M., Pochon F., Polynucleotides. XII. Farther studies on poly G, poly C and DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, Vol. 174, No 2, pp. 604-613.
63. Сухоруков Б.И., Монтрель М.М., Опанасенко В.К., Золотарева Е.К., Изучение взаимодействия ДНК с протонами среды методом буферной ёмкости, *Молекул. биология*, 1983, Т. 17, № 5, ст. 1009-1016.
64. Сухоруков Б.И., Козлова Л.А., Шабарчина Л.И., Оптические свойства и молекулярное строение нуклеиновых кислот и их компонентов. XI. Исследование ИК-спектров, построение и анализ диаграммы состояний системы ДНК-вода при различных содержаниях воды и степенях протонирования, *Биофизика*, 1974, Т. 19, № 6, ст. 963-968.
65. Courtois Y., Fromageot P., Guschlbauer W., Protonated polynucleotide structure. 3. An optical rotatory dispersion study of the protonation of DNA, *Eur. J. Biochem.*, 1968, Vol. 6, No 4, pp. 593-601.
66. Muntean C. M., Dostál L., Misselwitz R., Welfle H., DNA structure at low pH values, in the presence of  $Mn^{2+}$  ions: a Raman study, *J. Raman Spectroscopy*, 2005, Vol. 36, pp. 1047 – 1051.
67. Guschlbauer W., Courtois Y., pH induced changes in optical activity of guanine nucleosides, *FEBS Letters*, 1968, Vol. 1, pp. 183-186.
68. Trojanovskaja M.L., Smol'janinova T.I., Sukhorukov B.I., *Studia biophys.*, 1973, Vol. 40, pp. 235-240.



69. Smol'janinova T.I., Sukhorukov B. I., Kinetics and mechanism of conformational transformations of DNA, caused by acid, Dokl. Akad. Nauk USSR, 1971, Vol. 199, pp. 1185-1188.
70. Smol'janinova T.I., Trojanovskaja M.L., *Studia biophys.*, 1977, Vol. 64, pp. 111-116.
71. Woodbury C.P., Record M.T., A range of GC-independent denaturation solvents for DNA, *Biopolymers*, 1975, Vol. 14, N 11, pp. 2417-2420.
72. Hirai T., Hamori E., Comparison of the helix coil conformational changes of poly(deoxyguanylate-deoxycytidylate) and poly(deoxyadenylate-deoxythymidylate) induced by variations of hydrogen-ion concentrations, *Biopolymers*, 1978, Vol. 17, No 11, pp. 2633-2642.
73. Morelli S., Frontali C., L'effetto della concentrazione salina sulla stabilità della molecola del DNA in soluzione, *Ann. Ist. Super. Sunita*, 1971, Vol. 7, No 4, pp. 525-532.
74. Zimmer. Ch., Alkaline denaturation of DNA's from various sources, *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, Vol. 161, p. 584.
75. Ageno M., Dore E., Frontali C., *Rend. Acad. Naz. Lincei*, 1967, Vol. 42, p. 580.
76. Ageno M., Dore E., Frontali C., Still open problems on the structure of the deoxyribonucleic acid molecule, *Ann. Ist. Super. Sanita*, 1966, Vol. 2, pp. 629-647.
77. Ageno M., Dore E., Frontali C., An analysis of the hyperchromic spectra of alkali-melted DNA, *Biopolymers*, 1970, pp. 116-123.
78. Ageno M., Dore E., Frontali C., The alkaline denaturation of DNA, *Biophys. J.*, 1969, Vol. 9, No 11, pp. 1281-1311.
79. Kasjanenko N.A., Bartoshevich S. F., Frisman E.V., Effect of the pH of the medium on DNA conformation, *Molekuljarnaja Biologija*, 1985, Vol. 19, pp.1386-1393.
80. Bala I., Haribaran S., Kumar R.MNV. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21 (5): 387-422, 2004
81. J. Panyam, V. Labhasetwar, &quot; Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, &quot;*Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 55, Issue 3, 2003, pp. 329-347.
82. M. Khvedelidze, T. Mdzinarashvili, T. Partskhaldze, N. nafee, U.F. Schaefer, C-M. Lehr, M. Schneider, Calorimetric and spectrophotometric investigation of PLGA nanoparticles and their complex with DNA, *J. Thermal Analysis and Calorimetry*, 2009. (in press) DOI: [10.1007/s10973-009-0137-x](https://doi.org/10.1007/s10973-009-0137-x)
83. Г.Е. Помозгова, Д.Г. Кнорре Белковые и пептидные конструкции для доставки в клетку олигонуклеотидов и ДНК, *Вопросы медицинской химии*, № 6 1999.
84. Seeman N.C., Rosenberg J.M., Rich A., Sequence-specific recognition of helical nucleic acids by proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 1976, Vol. 73, pp. 804-808.
85. Temiz N. A. and C. J. Camacho, Experimentally based contact energies decode interactions responsible for protein-DNA affinity and the role of molecular waters at the binding interface, *Nucl. Acids Res.*, 2009, Vol. 37, No. 12, pp. 4076-4088.
86. Luscombe N. M., Laskowski R. A., Thornton J. M., Amino acid-base interactions: a three-dimension analysis of protein-DNA interactions at an atomic level, *Nucleic Acids Research J.*, 2001, Vol. 29, No 13, pp. 2860-2874.
87. Wolfe S.A., Grant R.A., Elrod-Erickson M., Pabo C.O., Beyond the "recognition code": structures of two Cys2His2 zinc finger/TATA box complexes, *Structure (Camb.)*, 2001, Vol. 9, pp. 717-723.
88. Lewin B., *Genes V*, New York, Oxford University Press, 1994.
89. Privalov P. L., Dragan A. I., Crane-Robinson C., Breslauer K. J., Remeta D. P., Minetti C.A.S.A., What drives proteins into the major or minor grooves of DNA?, *J. Mol.Biol.*, 2007, Vol. 365, pp. 1-9.
90. Dingman C.W., Sporn M.B., Studies on chromatin, *J. Biol.Chem.*, 1964, Vol. 239, pp. 3483-3492.
91. Mirsky A.E., Ris H., The composition and structure of isolated chromosomes, *J. Gen. Physiol.*, 1951, Vol. 34, pp. 475-492.
92. Marushige K., Osaki H., Properties of isolated chromatin from sea urchin embryo, *Develop. Biol.*, 1967, Vol. 16, pp. 474-488.

93. Marushige K., Dixon H., Developmental changes in chromosomal composition and template activity during spermatogenesis in trout testis, *Develop. Biol.*, 1969, Vol. 19, pp. 397-414.
94. Paoletti R. A., Huang R. C., Characterization of sea urchin sperm chromatin and its basic proteins, *Biochemistry*, 1969, Vol. 8, pp.1615-1625.
95. Seligy V., Miyagi M., Studies of template activity of chromatin isolated from metabolically active and inactive cells, *Exp. Cell Res.*, 1969, Vol. 58, pp. 27-34.
96. Fire A., Samuels M., Sharp P.A., Interaction between RNA polymerase II, factors, and template leading to accurate transcription. *J. Biol. Chem.*, 1984, Vol. 259, pp. 2509-2516.
97. Carcamo J., Maldonado E., Cortes P., Ahn M., Ha I., Kasai Y., Flint J., Reinberg D., *Genes and Development*, 1990, Vol. 4, pp. 1611-1622.
98. Saltzman A.G., Weinmann R., Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription, *FASEB J.*, 1989, Vol 3, pp. 1723-1728.
99. Gross C. A., C. Chan, A. Dromboski, T. Gruber, M. Sharp, J. Tupy, B. Young, The Functional and Regulatory Roles of Sigma Factors in Transcription, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1998, Vol. 63, pp.141-156.
100. Bateman E., Paule M.R., Regulation of eukaryotic ribosomal RNA transcription by RNA polymerase modification, *Cell*, 1986, Vol. 47, pp. 445-450.
101. Tower J., Sollner-Webb B., Transcription of mouse rDNA is regulated by an Activated Subform of RNA Polymerase I, *Cell*, 1987, Vol 50, pp. 873-883.
102. Voet D., Voet J. G., Pratt Ch. W., *Fundamentals of Biochemistry* (book), p. 910.
103. Tijan R., Maniatis T., Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell*, 1994, Vol. 77, pp. 5-8.
104. Beckett D., Regulated assembly of transcription factors and control of transcription initiation. *J. Mol. Biol.*, 2001, Vol. 314, pp. 335-352.
105. Helmann D., deHaseth P.L., Protein-nucleic acid interactions during open complex formation investigated by systematic alteration of the protein and DNA binding partners, *Biochemistry*, 1999, Vol. 38, pp. 5959-5967.
106. Ptashne M., Gann A., Imposing specificity by localization: mechanism and evolvability, *Curr. Biol.*, 1998, Vol. 8, pp. 812-822.
107. Sekimizu K., Bramhill D., Kornberg A., ATP activates dnaA protein in initiating replication of plasmids bearing the origin of the *E. coli* chromosome, *Cell*, 1987, Vol. 50, pp. 259-265.
108. Yung B. Y. M., Crooke E., A. Kornberg, Fate of the DnaA initiator protein in replication at the origin of the *Escherichia coli* chromosome *in vitro*, *J. Biol. Chem.*, 1990, Vol. 265, pp.1282-1285.
109. McGarry K. C., Ryan V. T., Grimwade J. E., Leonard A. C., Two discriminatory binding sites in the *Escherichia coli* replication origin are required for DNA strand opening by initiator DnaA-ATP, *PNAS*, 2004, Vol. 101, pp. 2811-2816.
110. Marszalek J., Kaguni J. M., [The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation](#), *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, pp. 2883-2890.
111. Liu J., Smith C. L., DeRyckere D., DeAngelis K., Martin G. S., Berger J. M., [Structure and Function of Cdc6/Cdc18: Implications for Origin Recognition and Checkpoint Control](#), *Mol. Cell*, 2000, Vol. 6, pp. 637-648.
112. Erzberger J. P., Pirruccello M. M., Berger J. M., The structure of bacterial DnaA: implications for general mechanisms underlying DNA replication initiation, *EMBO J.*, 2002, Vol. 21, pp. 4763-4773.
113. Messer W., Blaesing F., Majika J., Nardmann J., Schaper S., Schmidt A., Seitz H., Speck C., Tuengler D., Wegrzyn G., Weigel C., Welzeck M., Zakrzewska-Czerwinska J., Functional domains of DnaA proteins, *Biochemie*, 1999, Vol. 81, pp. 819-825.
114. Sutton, M. D., and Kaguni, J. M., The *Escherichia coli* dnaA gene: four functional domains, *J. Mol. Biol.*, 1997, Vol. 274, pp. 546-561.
115. Speck C., Messer W., Mechanism of origin unwinding: sequential binding of DnaA to double- and single-stranded DNA, *EMBO J.*, 2001, Vol. 20, pp. 1469-1476.

116. Speck C., Weigel C., Messer W., ATP- and ADP-dnaA protein, a molecular switch in gene regulation, *EMBO J.*, 1999, Vol. 18, pp. 6169-6176.
117. Felczak M., Simmons L. A., Kaguni J. M., An essential tryptophan of Escherichia coli DnaA protein functions in oligomerization at the E. coli replication origin, *J. Biol. Chem.*, 2005, Vol. 280, pp. 24627-24633.
118. Simmons L. A., Felczak M., Kaguni J. M., DnaA Protein of Escherichia coli: oligomerization at the E. coli chromosomal origin is required for initiation and involves specific N-terminal amino acids, *Mol. Microbiol.*, 2003, Vol. 49, pp. 849-858.
119. Lowery T. J., Pelton J. G., Chandonia J., Kim R., Yokota H., Wemmer D. E., NMR Structure of the N-terminal domain of the replication initiator protein DnaA, Paper LBNL '497E, 2008.
120. Mott M. L., Berger J. M., DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria, *Nature Reviews*, 2007, Vol. 5, pp. 343-353.
121. Guarnaccia C., Raman B., Zahariev S., Simoncsits A., Pongor S., DNA-mediated assembly of weakly interacting DNA-binding protein subunits: in vitro recruitment of phage 434 repressor and yeast GCN4 DNA-binding domains, *Nucleic Acids Research*, 2004, Vol. 32, No.17, pp. 4992-5002.
122. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М., "Стат. физика", Наука, 1964, Москва.
123. Privalov P.L., Plotnikov V.V., Filimonov V.V., Precision Scanning Microcalorimetry for the Study of Liquids., *J.Chem.Them.*, 1975, Vol. 7, No 1, pp. 41-47.
124. Sturtevant J.M., Some Applications of Calorimetry in Biochemistry and Biology., *Ann. Rev. Bioeng.*, 1974, Vol. 31, pp. 35-51.
125. Privalov P.L., Khechinashvili N.N., A Thermodynamic Approach to the Problem of Stabilization of Globular Protein. Structure: A Calorimetric Study., *J. Mol. Biol.*, 1974, Vol. 86, No 3, pp. 665-684.
126. Бакрадзе Н. Р. Монаселидзе Дж. Р., Прецезионный Дифференциальный микрокалориметр, *Измерительная техника*, 1971, Т.2, ст. 58.
127. Какабадзе Г. Р., Денатурационный инкремент теплоемкости водных растворах ДНК, Дис. на соиск. ученой степени физ. мат. наук., Тбилиси, 1993.
128. Hohenberg P., Kohn W., Inhomogeneous Electron Gas, *Phys. Rev. B*, 1964, Vol. 136, p. 864.
129. Kohn W., Sham L. J., Self-Consistent Equations Including Exchange and Correlation Effects, *Phys. Rev. A*, 1965, Vol. 140, pp. 1133-1138.
130. Perdew J. P., Burke K., Ernzerhof M., Generalized Gradient Approximation Made Simple, *Phys. Rev. Lett.*, 1996, Vol. 77, pp. 3865-3868.
131. Becke A. D., Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys.Rev. A*, 1988, Vol. 38, pp. 3098-3100.
132. Lee C., Yang W., Parr R. G., Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B*, 1988, Vol. 37, pp. 785-789.
133. Perdew I. P., Wang Y., Accurate and simple analytic representation of the electron-gas correlation energy, *Phys. Rev. B*, 1992, Vol. 45, pp. 13244-13249.
134. Teng C.S., Teng C.T., Allfrey V.G., Study of Nuclear Acidic Proteins Study of Nuclear Acidic Proteins, *J. Biol.Chem.*, 1971, Vol. 246, No. 11, pp. 3597-3609.
135. Van Holde K. E., "Chromatin", New York, Springer, 1988.
136. Stein G. S., Spelsberg T. C., Kleinsmith L. J., Nonhistone Chromosomal Proteins and Gene Regulation, *Science*, 1974, Vol. 183, No. 4127, pp. 817-824.
137. DeLange R. J., Smith E. L., in *Annual Review of Biochemistry*, ed. Snell E. E. (Annual Reviews, Inc., Palo Alto, Calif.), 1971, Vol. 40, pp. 279-314.
138. Wagner C. R., Hamana K., Elgin S.C.R., A high mobility group protein and its cDNAs from *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell Biol.*, 1992, Vol. 12, pp. 1915-1923.
139. Ner S.S., Travers A.A., HMG-D the *Drosophila melanogaster* homologue of HMG 1 protein is associated with early embryonic chromatin in the absence of histone H1, *EMBO J.*, 1994, Vol. 13, pp.1817-1822.

140. Churchill M. E. A., Jones D. N. M., Glaser T., Hefner H., Searles M. A., Travers A. A., *EMBO J.*, 1995, Vol.14, pp. 1264-1275.
141. Bustin M., Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins, *Mol. Cell Biol.*, 1999, Vol. 19, pp. 5237-5246.
142. MacGillivray A. J., Cameron A., Krauze R.J., Rickwood D., Paul J., The non-histone proteins of chromatin, their isolation and composition in a number of tissues, *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, Vol. 277, pp. 384-402.
143. Umansky S. A., Kovalev Y. I., and Tokarskaya V. I., Specific Interaction of Chromatin Non-Histone Proteins with DNA, *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, Vol. 383, pp. 242-254.
144. Wang S., Chiu J-F., Klyszuko-Stefanowicz L., Fujitani H., Hnilica L. S., Tissue-specific Chromosomal Non-histone Protein Interactions with DNA, *J. Biol. Chem.*, 1976, Vol. 251, No. 5, pp. 1471-1475.
145. Patel G. L., Thomas T. L., Some Binding Parameters of Chromatin Affinity for Deoxyribonucleic Acid, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1973, Vol. 70, No. 9, pp. 2524-2528.
146. Barrett T., Maryanka D., Harrlyn P. H., Gould H. J., Non-Histone Proteins Control Gene Expression in Reconstituted Chromatin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 1974, Vol. 71, pp. 5057-5061.
147. *Human Molecular Genetics*, Third Edition, Tom Strachan and Andrew Read, 2003, 696 pages.

## მადლობა

დიდ მადლობას ვუხდი ჩემს პირველ სამეცნიერო ხელმძღვანელს და მასწავლებელს, აწ განსვენებულ, პროფ. გიორგი მრეველიშვილს. უდიდეს მადლობას ვუხდი ჩემი სადოქტორო დისერტაციის ხელმძღვანელებს პროფ. თამაზ მძინარაშვილს და პროფ. მარიამ ხვედელიძეს გაწეული ყოველმხრივი დახმარებისა და მხარდაჭერისათვის. მადლობას ვუხდი მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებული თეორიული ინტერპრეტაციისათვის თსუ-ს ორგანული ქიმიის მიმართულების პროფესორებს: ბნ. ჯუმბერ კერესელიძეს და ბნ. თამაზ ფარცვანიას. ნაშრომის მომზადებისას მიღებული სასარგებლო კონსულტაციებისათვის მადლობას ვუხდი თსუ-ს ბიოფიზიკის ლაბორატორიის გამგეს ბნ. დიმიტრი ხოშტარიას, ქბ. ნინო შენგელიას, ბნ. ედუარდ ჩიკვაიძეს. ასევე გაწეული დახმარებისათვის დიდ მადლობას ვუხდი ჩემს მეგობარს ტატიანა ტრეტიაკოვას.

უღრმესი მადლობა ჩემს მშობლებს, რომლებმაც ყოველმხრივ შეუწყვეს ხელი წარმოდგენილი სადოქტორო ნაშრომის წარმატებით შესრულებას.