

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Biochemijos ir biofizikos katedra

Biochemijos studijų programos IV kurso studentė

Dovilė Makarevičiūtė

Bakalaurinis darbas

Cisteino proteazių apsauga nuo rūgštinio streso matriciniais
ligandais

Darbo vadovas

Dr. Daumantas Matulis

Vilnius 2006

Cisteino proteazių apsauga nuo rūgštinio streso matriciniais ligandais

Darbas atliktas Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje

Dovilė Makarevičiūtė

Darbo vadovas

Dr. Daumantas Matulis

TURINYS

SANTRUMPOS.....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	7
1.1 Cisteino proteazės	7
1.1.1 Cisteino proteazių aptikimas ir reikšmė.....	7
1.1.2 Cisteino proteazių veikimo mechanizmas.....	8
1.2 Papaino šeima.....	10
1.2.1 Papainas (EC 3.4.22.2), ir jo struktūriniai analogai	10
1.2.2 Augalų cisteino proteazių struktūros.....	11
1.2.3 Papaino praktinis panaudojimas.....	12
1.3 Baltymų denatūracija.....	12
1.3.1 Apsauga nuo denatūracijos.....	13
1.4 MCC ligandai, dažai.....	15
1.4.1 MCC ligandų ir dažų apibūdinimas.....	15
1.4.2. Panaudojimas ne dažymo tikslais.....	15
1.5 Ligandų-makromolekulių jungimosi energetika.....	16
1.5.1. Jungimosi entalpija ir entropija.....	17
1.5.2. Sąveikos jėgos.....	18
1.6 Biomolekulių izoterminės titracijos kalorimetrija	20
2. MEDŽIAGOS IR METODAI.....	22
2.1 Medžiagos.....	22
2.2 Metodai.....	24
2.2.1 kunitz'o fermentinio aktyvumo nustatymo metodas.....	24
2.2.1 Fermentų išsodinimas dažais.....	25
2.2.3 Fermentų valymas nuo dažų Dowex reagentu.....	25
2.2.2 Rūgštinis stresas.....	26
2.2.2 Baltymų koncentracijos nustatymo metodas pagal tirozino kiekį.....	26
2.2.3 Baltymų koncentracijos nustatymas spektrofotometriškai.....	27
2.2.4 Izoterminis kalorimetrinis titravimas.....	28
2.2.7 Programinė įranga.....	28
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	29
3.1 Fermentų aktyvumo priklausomybė nuo koncentracijos ir laiko.....	29
3.2 Papaino ir bromelaino grynumas	30
3.3 Papaino ir bromelaino išsodinimas dažais, aktyvumas nuosėdose ir supernatante, ne visiškas aktyvumo atsistatymas.....	30
3.4 Papaino ir bromelaino denatūracija rūgštimi.....	32
3.5 Papaino ir bromelaino apsauga nuo rūgštinio streso dažais.....	33
3.5.1 Apsaugos efektyvumo priklausomybė nuo dažo struktūros.....	37
3.5.2 Galimas jungimosi modelis.....	38
3.6 Termodinaminės LRO micelių susiformavimo charakteristikos.....	39
3.7 Papaino ir LRO ligando komplekso susidarymo termodinamika.....	41
IŠVADOS.....	45
Summary.....	46

SANTRUMPOS

AU – (*absorption unit*) – sugerties vienetai

AB - Azo Blue dažas

BP4B - Benzopurin 4B

CCG - Congo Corinth G

CI - colour index – Spalvinis indeksas

COG - Crocein Orange G

EC – enzyme commission. Fermentų komisija, sutrumpinimas rašomas prieš fermento numerį, suteiktą šios komisijos.

EDTA –etilen diamino tetraacto rūgštis

ET – endoplazminis tinklas

ITK – izoterminės titracijos kalorimetrija

JR - Jurgos raudonasis (Jurga's red)

KMC – kritinė micelių koncentracija

LRO – Little rock orange

MCC ligandai – (*matrix coprecipitating and cocrystalizing ligands*) – matricą formuojantys nusodinatys ir kristalinantys ligandai, trumpiau – matriciniai ligandai

OII - Orange II

OIV - Orange IV

PDB – (*Protein Database*) – baltymų duomenų bazė

IVADAS

Baltymų struktūros ir funkcijos ryšys, baltymų savybių, prie jų prisijungus ligandams, pokyčiai yra vienos iš svarbiausių šių dienų biochemijos mokslo krypčių: tyrimų rezultatai turi reikšmę tiek fundamentalaus mokslo vystymuisi, tiek praktiniam technologiniam pritaikymui. Vienas praktinio pritaikymo pavyzdžių – kryptingas farmaciškai veiklių medžiagų struktūros kūrimas, galint iš anksto prognozuoti jų poveikį fermentams. Tokiems tyrimams būtinas fundamentalių makromolekulių – ligandų sąveikos dėsnių supratimas ir apibrėžimas.

Molekulių sąveiką apibūdina energijos pokyčiai, atsirandantys dėl ryšių susidarymo, išrimo, poslinkio erdvėje į energetiškai palankesnę ar mažiau palankią būseną. Šiuos pokyčius tiria biofizikos sritis biotermodinamika. Šiuo metu ypatingas dėmesys skiriamas silpnajai nekovalentinei sąveikai, vandenilinių, hidrofobinių ryšių, jonų porų formavimuisi.

Norint sėkmingai atlikti tyrimus bei gauti reikšmingus ir patikimus rezultatus, svarbus veiksnys yra tinkamos modelinės sistemos parinkimas. Šiame darbe baltymų – ligandų sąveikai tirti modeline sistema buvo pasirinktos augalų cisteino proteazės papainas, bromelainas, ir karikainas (proteazė- ω), o ligandai – matricą formuojantys išsodinantys ir kristalinantys ligandai (azoaromatiniai sulfonatai), kurių sąveika su šiomis proteazėmis jau buvo pastebėta ir aprašyta literatūroje.

Minėtos cisteino proteazės patogios tirti dėl kelių priežasčių: jų struktūros yra labai panašios, tačiau paviršiaus krūviai skirtingi, todėl patogiu nagrinėti elektrostatinės sąveikas, nesudėtinga išmatuoti šių proteazių aktyvumus; jos nesunkiai išskiriamos iš prieinamų šaltinių (papajos vaisių, ananasų vaisių ir kamieno), nebrangios įsigyti komerciškai, pakankamai stabilios kambario temperatūroje, jų denatūracija – negrįžtamas procesas.

Cisteino proteazių sąveika su azoaromatiniais sulfonatais pasižymi netirpių kompleksų susidarymu ir baltymų stabilumo rūgštinėmis ir aukštos temperatūros sąlygomis pagerinimu, todėl yra aktuali tiek baltymų gryninimui, tiek jų laikymui nepalankiomis sąlygomis. Šių baltymų tyrimo svarba padidėja dar ir todėl, kad jų klasei priklauso žinduolių lizosomų proteazės katepsinai, kurių panaši sąveika su matricą sudarančiais ligandais būtų tiesiogiai reikšminga farmaciškai veiklių medžiagų tyrimams ir kūrimui.

Šio darbo tikslas buvo praplėsti žinias apie cisteino proteazių, daugiausia papaino, sąveiką su azoaromatiniais sulfonatiniais ligandais.

Jam įgyvendinti išskelti tokie uždaviniai:

- apžvelgti literatūrinius duomenis apie cisteino proteazių ir kitų baltymų sąveiką su MCC ligandais
- pasirinkti keletą literatūroje aprašytų ir keletą netirtų MCC ligandų sąveikai su papainu ir bromelainu tirti, rezultatus palyginti su literatūroje pateikiamais
- patikrinti šių ligandų elektrostatinio jungimosi modelį, nustatyti dažų poveikį baltymo stabilumui (aktyvumo išsaugojimui) rūgštinėmis sąlygomis, susieti ligando struktūrą su jo sąveikos su baltymu ypatumais
- izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu ištirti pasirinkto dažo sąveikos su papainu termodinaminius parametrus, išanalizuoti dažo skiedimosi vandenyje procesą.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

Literatūros apžvalgoje aprašoma šiame darbe naudoti fermentai cisteino proteazės, papainas ir bromelainas, baltymų denatūracijos reiškinys ir baltymų stabilizavimas (apsauga nuo denatūracijos), matricą formuojančių nusodinančių ir kristalinančių ligandų savybės, taip pat makromolekulių – ligandų sąveikos termodinaminių parametrų tyrimo metodų esmė ir reikšmė.

1.1 Cisteino proteazės

1.1.1 Cisteino proteazių aptikimas ir reikšmė

Cisteino proteazės (EC 3.4.22), dar vadinamos tiolinėmis, sulfhidrilinėmis proteazėmis, pagal EC klasifikavimą priklauso hidrolazių (3) klasei, peptidazių (4) poklasiui, cisteino endopeptidazių (22) popoklasiui (Enzyme nomenclature database, 2006). Žinoma apie 20 proteazių šeimų aktyviame centre turinčių cisteino amino rūgštį. Jos randamos virusuose, bakterijose, protistuose, augaluose ir žinduoliuose. Tiriant virusų cisteino proteazes nustatyta, kad jų tretinė struktūra ir katalitinis mechanizmas panašus į serino proteazių, ir šie fermentai turėjo bendrą protėvį (Rawlings ir Barret, 1994). Cisteino proteazių reikšmė įvairi: bakterijų patogeninis faktorius, virulentinis faktorius periodontinėse ligose, gyvybiškai svarbus parazitams maitintis ir patekti į šeimininko ląstelę, apsisaugoti nuo šeimininko antikūnų degraduojant IgG, reikšmingas specifinei baltymų hidrolizei. Tai augalų vakuolių ir ekstraląstelinio skysčio fermentai, pagrindiniai žinduolių lizosomų fermentai (daugiausiai katepsinai). Manoma, kad citozolinės žinduolių ir paukščių proteazės kalpainai (aktyvuojami kalciu) dalyvauja specifinėse proteolizės reakcijose, tokiose kaip kinazių aktyvacija, miofibrilinių ir citoskeleto baltymų skaidymas, receptorių degradavimas. Šių fermentų padidintas aktyvumas gali sukelti tokias patologijas kaip smegenų trauma, priepuoliai, subarachnoidinė hemoragija (kraujavimas), Alzheimer'io liga, stuburo trauma, širdies išemija, raumenų distrofija, katarakta, trombocitų agregacija, restenozė, artritas, osteoporozė (Otto ir Schirmeister, 1997).

Cisteino proteazės pagal evoliucinį giminingumą skirstomos į klanus, dar smulkiau - į šeimas, priklausomai nuo katalitinės diados arba triados struktūros.

1.1 lentelė. Cisteino proteazių klanai ir šeimos (Barret ir Rawlings, 2001).

Klanas	Šeimos
CA	Papaino (C1), kalpaino (C2), streptopaino (C10), ubikvitino specifinių peptidazių (C12, C19), virusinių cisteino endopeptidazių šeimos.
CD	Klostripaino (C11), gingipaino R (C25), lengumaino (C13), kaspazės-1 (C14), separino (C50) šeimos.
CE	Adenaino iš adenovirusų (C5), eukariotų Ulp1 proteazės (C48), bakterijų YopJ proteazės (C55)
CF	Proglutamil peptidazė I (C15)
PA	Pikornainai (C3)
PB, CH	Autolitinės cisteino peptidazės

Cisteino proteazės augaluose reikalingos baltymų brendimui, degradacijai, pervyniojimui, taip pat šalina nenormalius, blogai susisukusius baltymus. Cisteino proteazių prekursoriai (su papildomomis trumpa N-galine ir ilga C-galine sekomis) sintetunami citoplazmoje, surištos su membrana polisomose. Neaktyvūs profermentai patenka į endoplazminio tinklo liumeną ir yra pernešami į vakuolę ar ląstelės sienelę, kuriuose aktyvuojami (Otto ir Schirmeister, 1997). Kad fermentas taptų aktyvus, propeptidinė seka proteolitiškai skaldoma. Pašalintos propeptidinės sekos turi keletą funkcijų in vivo ir in vitro: reikalingos naujai susintetintam fermentui teisingai susisukti, peptidazinio domeno inaktyvacijai ir fermento stabilizacijai neutralioje ir šarminėje terpėje, jungimuisi prie membranos ir transportui į lizosomas, fermento, nuo kurio atskilo ši seka, inhibavimui (EMBL-EBI, 2006).

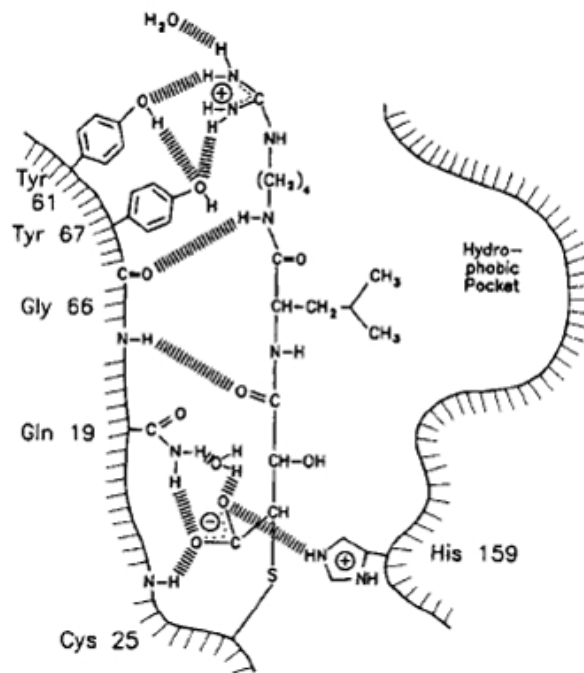
1.1.2 Cisteino proteazių veikimo mechanizmas

Papaino šeimos cisteino proteazės katalizuoja peptidinių, amidinių, esterinių, tioesterinių, tionoesterinių ryšių hidrolizę. Pagrindinis mechanizmo bruožas: aktyvaus centro tiolinei grupei nukleofiliškai atakuojant amido ar esterio karbonilinę grupę susidaro kovalentinis tarpininkas (acilfermentas). Katalizės reakciją galima išskaidyti į tokius stambius žingsnius:

- 1) substrato nekovalentinis prisijungimas prie fermento (Michaelio kompleksas)
- 2) fermento acilinimas, kurio metu išsiskiria pirmas laisvas reakcijos produktas - aminos
- 3) acilfermento reakcija su vandens molekule ir deacilinimas (Storet ir Menard, 1994).

Papainas ir kitos iš augalų išskiriamos cisteino proteazės pasižymi plataus spektro proteolitinio aktyvumu peptidiniams ryšiams, tačiau pirmenybė suteikiama amino rūgštims su

didelėmis hidrofobinėmis šoninėmis grandinėmis P2 padėtyje, o ryšys nehidrolizuojamas, kai P1 padėtyje yra valino amino rūgštis (Prosite, 2006).



1.1 pav. Cisteino proteazių aktyvus centras, kuriame parodytos Cys25 ir His159 amino rūgščių liekanos (Varughese et al., 1989).

Cisteino proteazių aktyvumas priklauso nuo katalitinės cisteino ir histidino diados (1.1 pav.). Cisteino peptidazių katalitiniam aktyvumui svarbiausią reikšmę turi didelis aktyvaus centro tiolinės grupės nukleofiliskumas. Aktyvi fermento forma: tiolato–imidazolo jonų pora, kurių jonizuotos formos egzistuoja tarp pH ~4 (Cys-25) ir pH ~8.5 (His-159) (Storet ir Menard, 1994). Vėlesni duomenys parodė, kad katalizėje dalyvauja Cys25-His159-Asn175 katalitinė triada, tačiau kryptingos mutagenezės būdu įrodyta, kad Asn175 amino rūgštis svarbi, bet nėra esminė katalizėje (Vernet et al., 1995).

1.2 Papaino šeima

Papaino šeima pasižymi aktyvumu įvairovę: plataus spektro (papainas) ir siauro spektro endo-peptidazės, aminopeptidazės, dipeptidil-peptidazės ir fermentai su egzo- ir endo-peptidaziniu aktyvumu. Šie baltymai tipiniu atveju lizosominiai arba sekretuojami (tačiau bleomicino hidrolazė – citozolinis grybų ir žinduolių fermentas) (EMBL-EBI, 2006).

1.2.1 Papainas ([EC 3.4.22.2](#)), ir jo struktūriniai analogai

Papaino molekulinė masė yra 23.4 kDa, pH optimumas 6.0 – 7.0, ekstinkcijos koeficientas $\epsilon_{280} = 56185 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, izoelektrinis taškas $pI=9.6$ (. Aktyvatoriai: cisteinas, sulfidai, sulfitai; EDTA ir bromosukcinimidas pagerina jo veiklą. Inhibitoriai: medžiagos, reaguojančios su sulfhidriline grupe, įskaitant sunkiuosius metalus, karboniliniai reagentai, aldehydai, benzoilamidoacetonitrilas, kai kurie antikūnai, H_2O_2 (Worthington-biochem, 2006).

Bromelainas ([EC 3.4.22.32](#)) ir karikainas (proteazė- ω) ([EC 3.4.22.30](#)) yra papaino struktūriniai homologai, turintys labai panašias į papaino savybes (Turk et al., 1997).

Bromelaino molekulinė masė mažesnė nei papaino - 22.8 kDa, nors amino rūgščių skaičius identiškas (212). Karikaino molekulinė masė 23.3 kDa, 216 amino rūgščių.

Papainas, aktinidinas chimopapainas, ficinas ir proteazė- ω yra labai homologiški, jų polipeptidinė grandinė beveik identiška, bet skiriasi teigiamų aminorūgščių liekanų skaičius, izoelektriniai taškai (1.2 lentelė) (Matulis et al., 1999).

1.2 Lentelė. Cisteino proteazių teigiamų, neigiamų, amino rūgščių skaičiai, krūviai, bendras amino rūgščių skaičius baltymo molekulei, pI, PDB kodai, anijoninių grupių skaičius reikalingas maksimaliai apsaugai (Matulis et al., 1999).

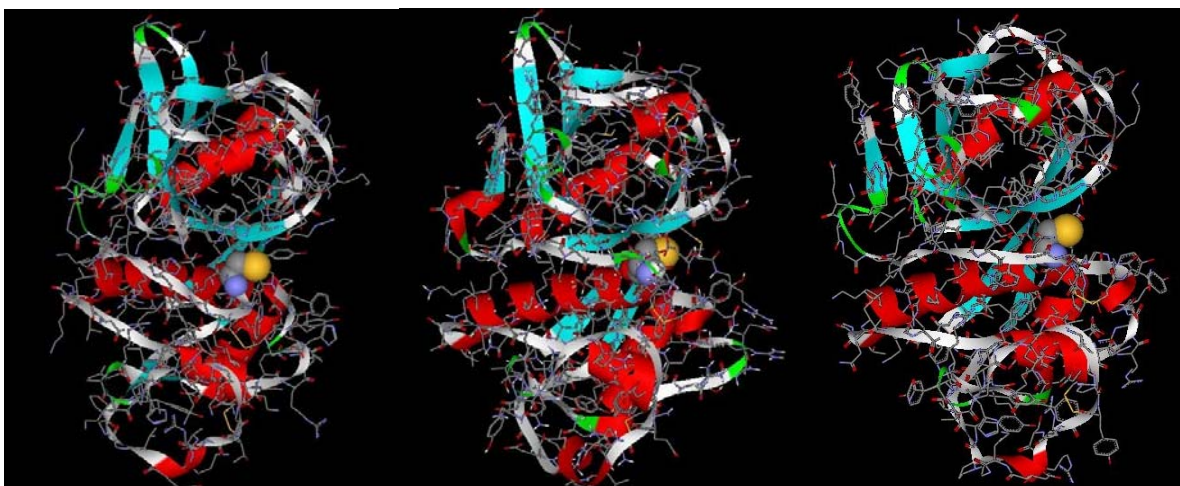
Savybė	Aktinidinas	Bromelainas	Papainas	Chimopapainas	Proteazė- ω
Arg skaičius	5	6	12	5	11
His skaičius	1	1	2	3	4
Lys skaičius	6	15	10	21	22
Bendras teigiamų krūvių skaičius	13	23	25	30	38
Asp skaičius	16	8	6	6	3
Glu skaičius	11	9	7	7	11
Bendras neigiamų krūvių skaičius	28	18	14	14	15

Bendras krūvių skaičius	41	41	39	44	53
Bendras amino rūgščių skaičius	220	212	212	218	216
pI	3.1	9.6	8.8	~10	~11
PDB kodas	2ACT	-	9PAP	1YAL	1PPO
Anijon. grupių sk. reikalingas maksimaliai apsaugai	~12	26	20	-	32

Šios proteazės turi homologišką struktūrą, bet skirtingus paviršiaus krūvius, todėl jos yra įdomi modelinė sistema baltymų – ligandų sąveikos priklausomybei nuo baltymų krūvio tirti.

1.2.2 Augalų cisteino proteazių struktūros

Papainas, bromelainas, karikainas (proteazė- ω), chimopapainas, aktinidinas priklauso $\alpha+\beta$ baltymų klasei, turi dviejų skilčių struktūrą su vyraujančiomis alfa ir antiparalelinėmis beta juostomis (Haq et al., 2002). Šios proteazės turi vieną grandinę, suformuojančią du domenų, tarp kurių yra plyšys, kuriame prie fermento jungiasi substratas. Papaino aktyviame centre esančios amino rūgštys Cys-25 ir His-159 lokalizuotos šio plyšio viduje, ant priešingų fermento domenų. Aktinidino ir proteazės- ω struktūros ir aktyvaus centro amino rūgštys palyginus su papainu yra išsidėstę beveik identišškai (Grudkowska ir Zagdańska, 2005).



1.2 pav. Aktinidino, papaino ir karikaino (iš kairės į dešinę) struktūros.

1.2.3 Papaino praktinis panaudojimas

Papainas dažniausiai gaminamas iš papajos vaisiaus žievės, kurią išdžiovinus gryninamas fermentas.

Papainas naudojamas maisto pramonėje mėšai ir kitiems baltyminiams produktams minkštinti. Papainas naudojamas molekulinėje biologijoje pirmame ląstelių kultūros ruošimo etape disocijuoti ląstelėms viena nuo kitos: skaidomos užlastelinio matrikso molekulės, kurios riša ląsteles. Po 10 minučių truncančio skaidymo proteazę reikia inhibuoti, kad nebūtų lizuotos pačios ląstelės.

Papainas naudojamas kaip farmaciškai veikli medžiaga: papaino pasta – namų sąlygomis gydyti medūzų žaizdoms, gyvačių nuodams skaidyti, papaino kapsulės naudojamos kaip maisto papildas besiskundžiantiems nevirškinimu (Wikipedia, 2006). Papaino gelis dėl savo baktericidinių, bakteriostatinių ir antiuždegiminių bei proteolitinių savybių ir pradėtas naudoti kaip naujas chemo-mechaninis karieso pašalinimo agentas firminiu pavadinimu „Papacárie“ (Bussadori SK et al., 2005).

1.3 Baltymų denatūracija

Natyvią baltymo konformaciją palaiko daugybė skirtingo stabilumo nekovalentinių ryšių, kuriems nutraukti reikia arba skirtingų sąlygų arba jie trūksta skirtingais greičiais tomis pačiomis sąlygomis. Dalies ryšių nutraukimas baltymų gali ir nedenatūruoti, jei likę palaiko artimą natyviai struktūrą. Tačiau kai nutraukiama pakankamai daug ryšių, visa struktūra „sprogsta“ ir išsivynioja (Xiao et al., 1993). Denatūravę baltymai neturi amino rūgščių šoninių grandinių nekovalentinių ryšių palaikomos struktūros (Pace ir Tanford, 1968).

Tiriant baltymų denatūraciją ji dažniausiai sukelia cheminiais reagentais, rūgštimi, aukšta temperatūra ar kitomis nepalankiomis sąlygomis.

Baltymų denatūracijai sukelti naudojami įvairūs reagentai (guanidino hidrochloridas, urea) (Wu ir Wang, 1999). Pastebėta, kad papainą denatūruojant guanidino hidrochloridu jo konformacija keičiasi mažai, palyginus su aktyvumo mažėjimu: aktyvus centras yra lankstesnis, nei visa molekulė (Xiao et al., 1993).

Baltymų stabilumas priklausomai nuo pH charakterizuojamas varpo formos kreive. Didžiausias stabilumas pasiekiamas esant mažiausiai laisvajai susivyniojimo energijai. (Alexov, 2003).

Terminė papaino denatūracija - negrįžtamas procesas, baltymo domenai išsivynioja beveik nepriklausomai vienas nuo kito. Chimopapaino struktūra ir architektūra gana panaši, tačiau jų lydymosi temperatūros skiriasi. Tai gali lemti stipresnę chimopapaino domenų tarpusavio sąveiką ir skirtingą hidrofobinę baltymo šerdį. Plačiam temperatūrų intervale išsivyniojimo entalpija yra tiesinė temperatūros funkcija, kurios polinkio kampas lygus šiluminės talpos skirtumui tarp išsivyniojusios ir natyvios būsenų (Solis-Mendiola et al., 1993).

Terminė bromelaino denatūracija taip pat negrįžtamas procesas, vykstantis pagal paprastą 2 būsenų modelį arba modelį su perenamąja būsena, kuri visada yra pusiausvyroje su natyvia forma. Bromelaino denatūracijos greitį riboja išsivyniojimo procesas. (Arroyo-Reyna ir Hernandez-Arana, 1995). Palyginus literatūroje pateikiamas papaino ir bromelaino šiluminės talpos priklausomybės nuo temperatūros kreives, matome, kad papainas denatūruoja aukštesnėje temperatūroje $T_m \approx 79^\circ\text{C}$ nei bromelainas $T_m = 59,3^\circ\text{C}$, T_m - denatūracijos, lydymosi temperatūra (Arroyo-Reyna et al., 1995 ir Lozano et al., 1993).

1.3.1 Apsauga nuo denatūracijos

Nors papainas yra sąlyginai stabilus aukštesnėje nei kambario temperatūroje, temperatūrose iki 60°C galima pastebėti pirmą konformacijos pokytį, dėl kurio sumažėja jo aktyvumas. Laikant papainą aukštesnėje nei 60°C temperatūroje jo konformacija pakinta negrįžtamai, papainas išsivynioja (tirpale virsta nuosėdomis).

- apžvelgti literatūrinius duomenis apie cisteino proteazių ir kitų baltymų sąveiką su MCC ligandais
- pasirinkti keletą literatūroje aprašytų ir keletą netirtų MCC ligandų sąveikai su papainu ir bromelainu tirti, rezultatus palyginti su literatūroje pateikiamais
- patikrinti šių ligandų elektrostatinio jungimosi modelį, nustatyti dažų poveikį baltymo stabilumui (aktyvumo išsaugojimui) rūgštinėmis sąlygomis, susieti ligando struktūrą su jo sąveikos su baltymu ypatumais
- izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu ištirti pasirinkto dažo sąveikos su papainu termodinaminius parametrus, išanalizuoti dažo skiedimosi vandenyje procesą.

Polihidroksiliai kotirpikliai (turintys nuo 2 iki 6 hidroksilo grupių) pagerina papaino termostabilumą. Jie sąveikauja ir solvofobiškai, palaikydami natyvią struktūrą, ir išsaugodami vandens sluoksnį apie baltymo molekulę. Apsaugojimo efektas proporcingas kotirpiklio koncentracijai ir molekulinei masei (Lozano et al., 1993).

1.4 MCC ligandai, dažai

1.4.1 MCC ligandų ir dažų apibūdinimas

Terminas MCC (*matrix coprecipitating and cocrystallizing*) ligandai - matricą formuojantys nusodinantys ir kristalizuojantys ligandai - pirmą kartą buvo panaudotas 1992 m. (Conroy ir Lovrien, 1992). Šie ligandai turėdami vieną ar kelias stipriai anijonines sulfonatinės grupes pradeda jungtis prie baltymų teigiamų amino rūgščių. Pradinis jungimasis standina baltymo konformaciją, išstumia vandens molekules, lipnios hidrofobinės MCC ligandų sritys pritraukia baltymų molekules vieną prie kitos. Baltymai iškrenta į nuosėdas su ligandais, darinyje, kuriame ligandas tarsi sudaro matricą baltymams (Matulis et al., 1996). Sąveika tarp baltymo ir anijono stiprėja didėjant aromatinės ligando dalies paviršiaus plotui ir nepolinei daliai (Gupta et al., 1996). Vieni iš MCC ligandų yra azoaromatiniai sulfonatiniai dažai.

Bendru atveju dažai yra spalvotos, dažniausiai aromatinį žiedą turinčios medžiagos, naudojamos audiniams, popieriui, odai, medžiui, aliejams, riebalams, vaškam ir kitiems produktams suteikti spalvą, taip pat augalų ir gyvūnų audinių dažymui mikroskopijoje.

Benzeno žiedas deriniuose su įvairiais pakaitais ir elementais gali sukurti begalę įvairių kombinacijų. Spalva priklauso nuo chromoforinių grupių ($C=C$, $C=O$, $C=S$, $C=N$, $N=N$, $N=O$, NO_2) buvimo ir padėties. Kad dažas elektrostatiškai ar kovalentiškai susijungtų su dažomos medžiagos galinėmis grupėmis, jis turi turėti jungiančius funkcines grupes – auksochromus (dažniausiai sulfoninės ir karboksirūgštys, imino druskos), kurie sudaro jungtis su dažoma medžiaga tiesiogiai ar per chelatus sudarančius metalus. Azo dažai turi chromoforinę $-N=N-$ grupę, jungiančią benzeno ar naftaleno žiedus (Conns, 1977).

1.4.2. Panaudojimas ne dažymo tikslais

Azoaromatiniai junginiai yra tiriami dėl savo savybių sudaryti kompleksus su baltymais bei kitų specifinių savybių, siekiant kryptingai juos taikyti biotechnologijų, farmacijos bei diagnostikos srityje.

Dėl selektyvaus baltymų išsodinimo grįžtamai juos denatūruojant, kai kurie dažai naudojami kaip alternatyvus baltymų frakcionavimo būdas. Schneedorf et al. apžvelgiamas flaviano rūgštis (2,4-dinitro-1-naftol-7-sulfoninė rūgštis), geltono tekstilės dažo panaudojimo

atvejis: jau 1928 m. šis dažas naudotas frakcionuoti bazinėms amino rūgštims iš neapdirbtų baltymų ekstraktų, norint išgryninti mėginius ir pagaminti produktus neturinčius histidino ir arginino amino rūgščių (Schneedorf et al, 2001). Gryninant lektino ir bromelaino baltymus iš neapdorotų žaliavų (riešutų, ananasų) per 1-2 nusodinimo dažais valandas pasiekama 80-90% aktyvumo išeiga. Iš nuosėdų ligandai pašalinami keičiant pH ir naudojant jonų mainų dervas (Matulis et al., 1996).

Pastaraisiais metais tiriant dažų farmakologinį poveikį nustatyta, kad diazo dažas Kongo raudonasis (turintis dvi sulfonatines grupes) gali išgydyti ląsteles nuo užkrečiamos avių spongiforminės encefalopatijos (prioninė liga), tačiau *in vivo* šis gydymo ar profilaktikos būdas netaikomas dėl dažo kancerogeniškumo ir prasto perėjimo per hematoencefalinį barjerą (Rudyk et al., 2000). Susintetinti Kongo raudonojo dažo struktūriniai analogai turintys kitokią tarpinę tarp dviejų azo jungčių molekulės dalį arba molekulės su kita anijonine grupe (sulfonatai keičiami kaboksi rūgšties funkcinėmis grupėmis) (Rudyk et al., 2003). Ištyrus efektyvumo (normalaus PrP^C baltymo polimerizacijos inhibavimo) priklausomybę nuo dažo struktūros, padarytos išvados: Kongo raudonasis yra simetrinė molekulė, bet abi jos dalys reikalingos aktyvumui palaikyti, sulfonatines grupes galima pakeisti karboksilinėmis smarkiai neįtakojant aktyvumo, turėtų būti įmanoma keisti rūgštinės grupės lokalizaciją aromatiniam žiede, amino grupė nebūtinai reikalinga teigiamam junginio aktyvumui, šiek tiek galima keisti jungėjo (bifenilo) struktūrą (Sellarajah et al., 2004).

1.5 Ligandų-makromolekulių jungimosi energetika

Ligando jungimosi su receptoriumi stiprumas išreiškiamas pusiausvyros konstanta. Žinant ją, energetiniai dydžiai išreiškiami lygtimi

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_{eq}$$

Kur K_{eq} yra pusiausvyros koncentracija, ΔG° –laisvoji Gibso energija cheminei transformacijai, atitinkamai pusiausvyros konstantai.

Žinant stecheometrinio jungimosi konstantas homologinių junginių serijai, galima įvertinti struktūrinių pakaitų indėlį į ligando ir receptoriaus sąveikos energijos dydį.

ΔG° pokyčiai jungiantis ligando molekulių sekai gali atspindėti įvairias sąveikos ypatybes. Jei $\Delta G_2^\circ - \Delta G_1^\circ$ (stecheometriškai pirmo ir antro ligandų jungimosi energijų skirtumas) yra iš esmės

vienodas keliems ligandams, tarp šių anijonų ir baltymo matricos nėra specifinės cheminės sąveikos (dėl jos $\Delta(\Delta G^\circ)$ būtų skirtingi).

Kai kuriais atvejais galima kiekybiškai priskirti laipsniškus ΔG_i° pokyčius aiškiai apibrėžtiems indėliams, tokiems kaip elektrostatinė sąveika. Pavyzdžiui dianijonui azosulfatiazolui jungiantis prie jaučio serumo albumino jungimosi konstantos K_i gali būti transformuotos į atitinkamas ΔG_i° reišmes. Kiekvienu etapu, kai vienas iš ligando dianijonų prisijungia prie receptoriaus, elektrostatinis laukas aplink kompleksą tampa labiau atstumiantis sekančiam anijonui, todėl afiniškumas $-\Delta G_i^\circ$ mažėja. Šis sumažėjimas prisideda prie statistinio

$\left(\frac{K_i}{K_{i-1}}\right)_{idealus}$ faktoriaus, rodančio atvirų jungimosi vietų mažėjimą ant ligando-receptoriaus komplekso, didėjant i . Šį statistinį faktorių galime įvertinti lygtimi:

$$\left(\frac{K_i}{K_{i-1}}\right)_{idealus} = \frac{(n-i+1)(n-i)}{(n-i+2)i},$$

jei galima pagrįstai įvertinti n .

Jonų jungimosi stiprumas labai priklauso nuo baltymo izoelektrinio taško. Kuo žemesnis baltymo izoelektrinis taškas, tuo didesnis baltymo neigiamas krūvis, tuo stipriau yra traukiamas katijonas, ir atvirkščiai. Esant galimybėms naudoti specifinės mutagenezės technologiją galima tirti sistemingo amino rūgščių, esančių kontakto vietoje, pakeitimo įtaką ir nustatyti amino rūgščių šoninės grandinės indėlį į baltymo - ligando jungimosi laisvąją energiją.

Daugumai receptorių ligandų jungimosi stiprumas nekinta kintant receptoriaus koncentracijai, tačiau būna ir išimčių.

1.5.1. Jungimosi entalpija ir entropija

Ligando – receptoriaus jungimosi reakcijos entalpija eksperimentiškai dažniausiai nustatoma iš jungimosi stiprumo priklausomybės nuo temperatūros. Naudojama van't Hoff'o

lygtis $\frac{d \ln K}{dT} = \frac{-\Delta H^\circ}{RT^2}$. Praktikoje lygtis pertvarkoma į $d \ln K = \frac{-\Delta H^\circ}{R} d\left(\frac{1}{T}\right)$, grafiškai

vaizduojamas $\log K_i$ prieš $\frac{1}{T}$, o ΔH° apskaičiuojamas iš kreivės polinkio. Plačiai paplitęs klaidingas požiūris, kad toks van't Hoff'o grafikas visada turi būti tiesė, ir kad jos polinkis ΔH° yra konstanta. Pavyzdžiui kalorimetriškai išmatuota, kad 2'CMP jungimosi prie ribonukleazės A, temperatūrai kintant nuo 15 iki 40°C, ΔH° vertės kinta nuo -8.82 iki -13.99 kcal/mol, tačiau braizant grafiką $\log K_i$ prieš $\frac{1}{T}$ per taškus galima išvesti tiesę su koreliacijos koeficientu 0.979 ir gauti pastovų ΔH° , lygų -9.47 kcal/mol.

Jungimos entalpijos taip pat gali būti matuojamos tiesiogiai, atsiradus komerciškai platinamiems mikrokalorimetrams.

Išmatavus ΔH° entropijos pokyčiai gali būti apskaičiuoti iš termodinaminės lygties $\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ$. Galima tikėtis, kad palanki ΔG° (neigiamas dydis) bus susijęs su neigiamu ΔH° verte, nes komplekso vidinė energija mažesnė, nei atskirų sudedamųjų dalių. Nors iš lygties matome, kad yra papildoma ΔG° dedamoji ΔS° , ji dažniausiai būna nepalanki: laisvas ligandas ir receptorius turi daugiau judėjimo laisvės laipsnių nei ligando-receptoriaus kompleksas. Tačiau šie apibendrinimai yra tik supaprastintas bendras vaizdas, nes yra daug ligando-receptoriaus komplekso pavyzdžių, kuriuose ΔH° yra neigiamas, bet skaitine verte mažesnis už ΔG° , arba artimas nuliui arba netgi teigiamas. Pastaruoju atveju kompleksas turi didesnę energiją nei atskiros sudedamosios dalys, ir $\Delta E^\circ (\approx \Delta H^\circ)$ turi būti teigiamas, t.y. E° „kyla į kalną“. Kai ΔG° yra neigiamas ne dėl dominuojančio palankaus ΔH° , tuomet komplekso susidarymą lemia teigiamas entropijos pokytis – stebinantis rezultatas dviems atskiriems junginiams jungiantis į kompleksą. (Klotz, 1997). Pavyzdžiui lipidams jungiantis prie DNR, ΔS° yra teigiamas, ir tuo didesnis, kuo ilgesnė alifatinė grandinė (Matulis et al., 2002).

1.5.2. Sąveikos jėgos

Sąveikos tarp molekulių jėgos yra skirstomos į kelias klases: nepolinė sąveika (Van der Waals, London'o, hidrofobinė), joninė ir elektrostatinė sąveika, vandenilinių ryšių susidarymas. Baltymų ir kitų molekulių sąveikai įtakos taip pat gali turėti klatratų hidratai (nešvarumai ar „molekulė – svečias“ italpinta į vandens molekulių narvą).

Van der Waal'so jėgą apibrėžia dipolių, kurie neišvengiamai susidaro nepolinėse molekulėse, sąveikos. Londono jėga susidaro net ir tarp nepolinių molekulių ar atomų, nes dėl

elektronų judėjimo elektronų debesyje jie įgyja laikiną elektronų nesubalansavimą (savęs poliarizacija). Vandeniniuose tirpaluose van der Waals ir Londono jėgos veikia tarp tirpiklio ir tirpinio molekulių, taip pat tarp abiejų komponentų tarpusavyje. Bendras ΔH° pokytis priklauso nuo santykinio skirtingų energijų indėlio.

Elektrostatinė sąveika yra labai stipri, kai jonų neskiria tirpiklio molekulės. Tačiau jono-tirpiklio sąveika pranoksta elektrostatinę sąveiką (joninės hidratacijos entropijos yra neigiamos, to galima tikėtis esant stipriai sąveikai tarp įkrauto tirpinio jono ir dipolinės vandens molekulės), todėl pvz. NaCl būseną tirpale yra joninė, ne molekulinė. Taigi, kai vandeniniame tirpale asocijuoja 2 jonai, ΔS° dažnai yra teigiama. Molekuliniame lygmenyje tai turi tokį pagrindą: nors 2 nepriklausomos dalelės suformuoja kompleksą, dalis vandens molekulių, formavusių atskirus jonus gaubiantį hidratacinį sluoksnį, yra pašalinamos ir atgauna savo judėjimo laisvės laisvius.

Kitos elektrostatinės sąveikos: jono-dipolio, dipolio-dipolio ir jono ar dipolio indukuoto dipolio. Dažnai pamiršamos kvadrupolinės sąveikos, kurios gali atsirasti tarp molekulių, bendru atveju suprantamų kaip nepolinės ar hidrofobinės. Kvadrupolinės sąveikos pavyzdys – benzeno žiedas, kur elektronai išsidėstę abiejose plokštumos dalyse. Galima parodyti, kad vandeniniuose tirpaluose katijono-kvadrupolio sąveika gali būti tokia pat stipri kaip ir tarp jono ir dipolinės (pvz. H_2O) molekulės. Tinkamai sukonstruotos aromatinės molekulės, sudarančios kvadrupolių žiedą gali ištraukti katijoną iš vandeninės aplinkos į nepolinę. Taigi yra pagrindo tikėtis, kad katijoninė amino rūgščių grandinė sąveikautų su fenilalanino, tirozino ar triptofano kvadrupoliais.

Jei komplekso formavimuisi laisvoji energija yra palanki dėl elektrostatinės kilmės sąveikos, tuomet ΔG_{elekt} yra atomo matmenų r , krūvio z , ir aplinkos dielektrinės konstantos D funkcija.

Elektrostatinių sąveikų laisvosios energijos pokytis iš esmės yra lemiamas entropijos, entalpija sudaro tik mažą sudedamąją dalį. Taigi, teigiamos ligandų jungimosi su receptoriais entropijos nebūtinai yra hidrofobinių sąveikų rezultatas, bet gali būti elektrostatinių reiškinių išdava.

Vandeniliniai ryšiai baltymuose dažniausiai susidaro tarp amidinio ryšio vandenilio ir kito amidinio ryšio deguonies. Vandeniniame tirpale tarp baltymų amino rūgščių liekanų susidaręs vandenilinis ryšys atviras konkuruojantiems ryšiams su vandeniu. Suminis energijos pokytis, arba ΔH° ryšio nutraukimui vandeninėje terpėje daug mažesnis, nei tokio pat ryšio nutraukimas

dujinėje fazėje ar hidrofobinėje aplinkoje. Iš teorijos ir kalorimetrinių eksperimentų galima padaryti išvadą, kad vandenilinių ryšių tarp amidinių grupių tiek nepolinėse (hidrofobinėse) kišenėse ΔH° tiek vandeninėje aplinkoje yra lygūs (N-metilacetamido vandeniliniams ryšiams išmatuotas $\Delta H^\circ = -2.7$ kcal/mol). Nors vandeniliniai ryšiai ir nestabilūs modelinėse peptidinėse molekulėse, nėra abejonių, kad vidumolekuliniai vandeniliniai ryšiai egzistuoja vandeniniuose polipeptidų tirpaluose. Vėlgi svarbų vaidmenį vaidina entropijos sudedamoji dalis. Baltymo sintezės metu dalis laisvosios energijos turi būti panaudota nugalėti nepalankiam $T\Delta S$, amidinių grupių prinešimui vienai arti kitos. Skaičiavimais parodyta, kad lokali peptidinių grupių koncentracija baltymo molekulės tūryje yra 12-13M. Prototipinė molekulė N-metilacetamidas 12M tirpale didžiąja dalimi yra amido-vandenilinių ryšių formoje. Giliau žiūrint į vandenilinių ryšių svarbą, galima pastebėti, kad vanduo gali būti labai reikšmingas sudarant vandenilinius ryšius kaip tiltelius tarp ligando ir jo receptoriaus, taip pagerindamas komplekso stabilumą (Klotz, 1997).

1.6 Biomolekulių izoterminės titracijos kalorimetrija

Makromolekulių ir ligandų sąveikai apibūdinti tiriamos makromolekulių-ligandų sistemos funkcijos, struktūros, kinetikos ir energetikos tarpusavio ryšys tam tikromis fizinėmis ir cheminėmis sąlygomis. Visų grįžtamų bimolekulinių sąveikų metu vyksta nekovalentinių ryšių persiskirstymas. Norint šį persiskirstymą analizuoti, svarbu išmatuoti sistemos termodinaminius parametrus (O'Brien et al., 2001).

Naudojama daug netiesioginių termodinaminių dydžių nustatymo būdų: dializė, ultracentrifugavimas, spektroskopija (ΔH nustatoma iš disociacijos konstantos priklausomybės nuo temperatūros - van't Hoff analizė), tačiau šie būdai gana riboti. Izoterminio titravimo kalorimetrijos būdu tiesiogiai matuojama šiluma, susijusi su vykstančiu procesu, kuri pastoviam slėgyje lygi entalpijos pokyčiui (Campoy ir Freire, 2005).

Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITK) – šiuo metu vienintelis metodas, kuriuo galima tiesiogiai išmatuoti entalpiją beveik bet kokiam bimolekuliniam procesui. Taip pat galima gauti pusiausvyros konstantą K_{eq} , reaguojančių medžiagų molines dalis, laisvosios energijos ir entropijos pokyčius (ΔG° ir ΔS°) apibrėžtose sąlygose. Atliekant eksperimentus skirtingose temperatūrose, galima gauti sistemos šiluminės talpos pokytį (ΔC_p°) (O'Brien et al., 2001).

ITK kol kas vienintelė technologija, kuria galima atskirti jungimosi entalpinį ir entropinį komponentą. Entalpinis ir entropinis komponentai susiję su struktūriniais parametrais, todėl gali būti naudojami molekulių struktūriniam planavimui, iš anksto apskaičiuojant ir numatant jungimosi energetiką. Tobulėjant instrumentams ir jų jautrumui, ITK taps dar svarbesnė molekuliname dizaine, vaistų kūrimo (Leavitt ir Freire, 2001).

Pagal šilumos matavimo pobūdį, kalorimetrai gali būti adiabatiniai, šilumos laidumo ir galios kompensaciniai. Adiabatiniuose nėra šilumos mainų su aplinka, šilumos laidumo kalorimetruose išsiskyrusi ar absorbuota šiluma pereina į (iš) matavimo kiuvetę supantį indą, o tarpe esančia termopora išmatuojama pratekanti šiluma. Galios kompensaciniame kalorimetre išsiskyrusi šiluma subalansuojama ir matuojama energija, egzoterminiame procese sunaudota vėsinimui, o endoterminiame procese – kaitinimui (O'Brien et al., 2001).

Dauguma kalorimetrų veikia diferencine kiuvetės grįžamojo ryšio sistema. Įšvirkštus ligando į makromolekulės tirpalą, šilumos pokytis atsiranda dėl šių priežasčių: jungimosi sąveikos, ligando skiedimosi, makromolekulės skiedimosi, dėl maišymo atsirandančio šilumos pokyčio ir kt. Atsiradęs temperatūrų skirtumas tarp pavyzdžio ir palyginamosios kiuvetės, matuojamas kalorimetru. Šis temperatūrų skirtumas sukelia grįžamojo ryšio galios pokytį, naudojamą kompensuoti kiuvetėje vystantiems energetiniams procesams. Grįžamojo ryšio energijos pokytis matuojamas bėgant laikui. Jungimosi šiluma gaunama integruojant grafiko galia - laikas kreivę. Parametrų reikšmės įvertinamos taikant nelinejinę regresijos analizę (Holdgate ir Ward, 2005).

ITK sisteminės paklaidos atsiranda dėl šalia tiriamos sąveikos papildomai vykstančių procesų, pavyzdžiui garavimo, kondensacijos, nepilno išsimašymo, nespecifinės adsorbcijos (O'Brien et al., 2001).

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

Darbe naudoti:

Fermentai

Papainas (Sigma) „Papain Crude powder, from papaya latex“ – neapdirbti milteliai, išskirtas iš papajos žievės. 2mg/ml pradinis tirpalas ruošiamas vandenyje, laikomas -20°C ilgiausiai 2 savaites.

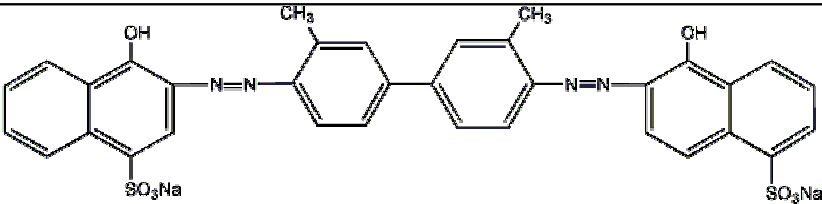
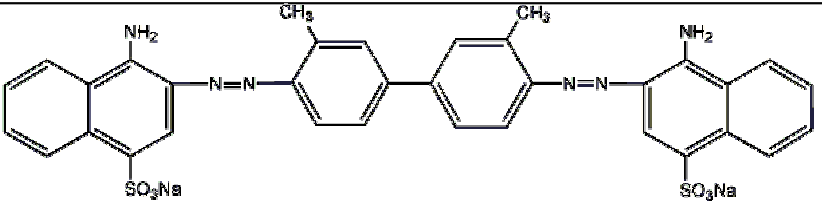
Papainas (Merck) wasserlöslich – tirpus, skirtas biocheminiams eksperimentams. 2mg/ml pradinis tirpalas ruošiamas vandenyje, laikomas -20°C ilgiausiai 2 savaites.

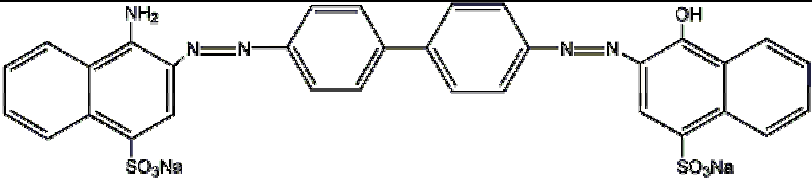
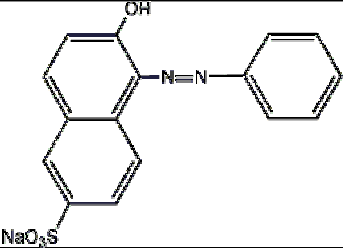
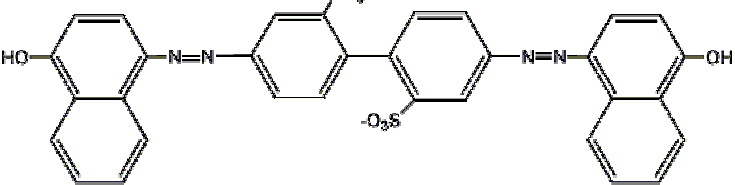
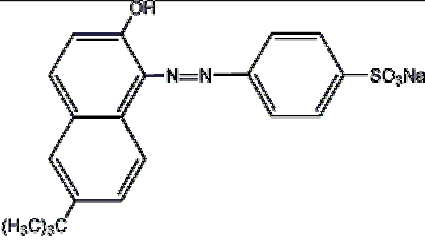
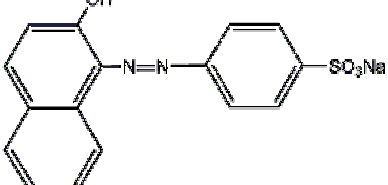
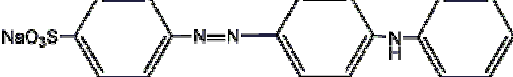
Bromelainas (Sigma) - 2mg/ml pradinis tirpalas ruošiamas vandenyje, laikomas -20°C, ilgiausiai 2 savaites.

Dažai

Darbe naudotų dažų pavadinimai, struktūros ir gamintojai pateikiami 2.1 lentelėje.

2.1 Lentelė. Darbe naudoti dažai (ligandai).

Dažo pavadinimas, sutrumpinimas	Formulė	Spalvinis indeksas, gamintojas
Azo Blue (AB)		CI 23685, Matheson Coleman & Bell
Benzopurin 4B (BP4B)		CI 23500, Matheson Coleman & Bell

Congo Corinth G (CCG)		CI 375, Matheson Coleman & Bell
Crocein Orange G (COG)		CI 13720, Aldrich
Jurgos raudonasis (Jurga's red) (JR)		JAV Minesotos universiteto laboratorija
Little rock orange		JAV Minesotos universiteto laboratorija
Orange II		CI 15510, JAV, Aldrich
Orange IV		CI 13080, Aldrich

Dažų pradiniai tirpalai ruošiami 2mg/ml arba 1mg/ml vandenyje, po to skiedžiami iki reikiamos koncentracijos.

Buferiniai tirpalai

Fermentų aktyvumui matuoti naudotas 0.05M NaH₂PO₄-Na₂HPO₄, pH 6.8

Pradiniai tirpalai įvairių pH buferiams ruošti 0.2M HCl, H₃PO₄, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, CH₃COOH, CH₃COONa.

Rūgštiniam stresui sukelti naudotas 0.2M HCl (pradinis tirpalas)

Rūgštiniam stresui neutralizuoti naudotas 0.2M Na₂HPO₄

Aktyvumo matavimo reakcijai sustabdyti naudotas 1M HClO₄

Kitos fermentų tyrimui naudotos medžiagos

Dowex 1×2 50-100 mesh, chloridas (Sigma) - stipriai bazinė anijonų mainų derva.

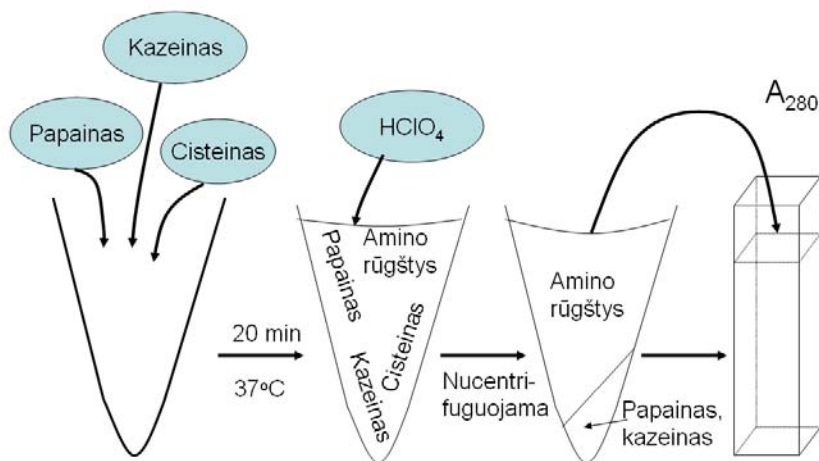
Dowex 1×4-100-200 mesh, chloridas (Serva) - anijonų mainų derva.

Dowex 1-X8-20-50 mesh, chloridas (Bio-Rad) – anijonų mainų derva.

2.2 Metodai

2.2.1 Kunitz'o fermentinio aktyvumo nustatymo metodas

Papaino ir bromelaino fermentinio aktyvumo matavimui substratu naudotas kazeinas, kuris šių proteazių hidrolizuojamas iki tirpių, rūgštyje nedematuojančių peptidų, absorbuojančių $\lambda=280\text{nm}$ bangos ilgio šviesą. Fermentinis aktyvumas matuojamas 37°C temperatūroje, reakcijos trukmė 20 (A variantas) arba 15 (B variantas) minučių.

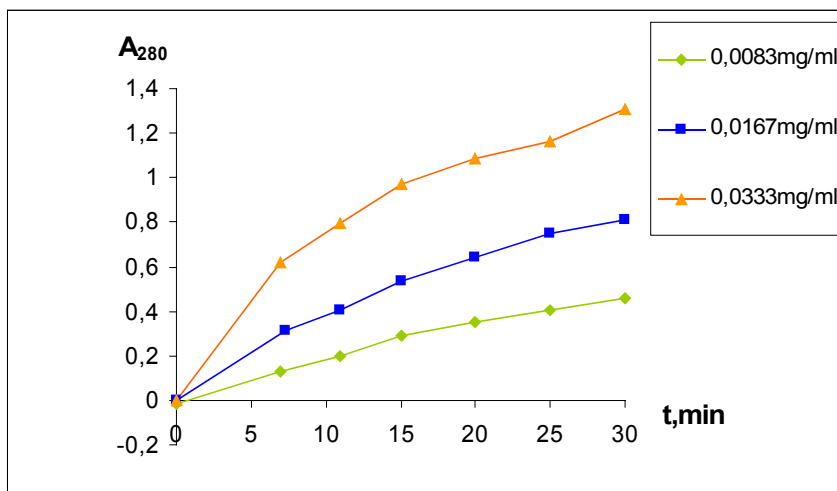


2.1 pav. Kunitz'o fermentinio aktyvumo nustatymo schema.

Reakcijos mišinį sudaro 0.1ml fermento tirpalo vandenyje, 0.5ml 10mg/ml kazeino ir 5mM L-cisteino tirpalo 50mM fosfatiniame buferyje (L-cisteinas ruošiamas šviežiai, kazeino tirpalą galima laikyti +4°C apie mėnesį).

Į ependorfinio tipo 1.5ml mėgintuvėlius įpilamas tiriamo fermento tirpalas (0.1ml), ir įstatoma į Eppendorf Thermostat plus (1,5 ml) termostatą sušilti. Reakcija pradedama užpilant 0.5ml kazeino/cisteino tirpalo. Reakcija sustabdoma užpilant 0.6ml 1M perchloro rūgšties.

Nehidrolizuota kazeino dalis nusodinama centrifuguojant 13200 aps/min greičiu 4 minutes Eppendorf Centrifuge 5415 R centrifugoje. Matuojama supernatanto šviesos sugertis 280nm bangos ilgyje siauroje (1,5ml) kvarcinėje kiuvetėje (šviesos kelias per tirpalą - 1cm) Jenway 6305 UV/vis spektrofotometru.



2.2 pav. Papaino aktyvumo priklausomybė nuo laiko ir koncentracijos.

2.2.1 Fermentų išsodinimas dažais

Į 0,1 ml fermento tirpalo pilama 0,1 ml reikiamos koncentracijos dažo tirpalo (arba atitinkamas kiekis dažo tirpalo ir likęs iki 0,1ml tūris vandens), kad vienai fermento molekulei tektų reikiamas pagal tyrimą neigiamų dažo grupių kiekis ir 0,2 ml buferio. Norint atskirti agregavusį su dažu fermentą, eppendorfiniai mėgintuvėliai centrifuguojami 3min 8000aps/min greičiu Eppendorf Centrifuge 5415 R centrifugoje, supernatantas nusiurbiamas ir perpilamas į atskirus mėgintuvėlius. Norint fermento agregatą išvalyti nuo dažo, nuosėdos suspenduojamos 0,4ml buferio (galima kelias minutes pamaišyti purtyklėje).

2.2.3 Fermentų valymas nuo dažų Dowex reagentu

Į fermento-dažo suspensiją dedama apie 100μl drėgnų dowex grūdelių ir 30min maišoma Yellow line TTS purtyklėje 800aps/min greičiu. Išvalymas nuo dažo vertinamas vizualiai. Nustojus maišyti palaukiama, kol Dowex grūdeliai nusistovi, fermento tirpalas lieka virš grūdelių.

2.2.2 Rūgštinis stresas

Rūgštinis stresas fermentams sukeliamas atitinkamos koncentracijos HCl arba reikiamo pH 50mM fosfatiniu buferiu. Į ependorfą pilama 0.1ml fermento (arba fermento-dažo) tirpalo, 0.2ml reikiamos koncentracijos HCl arba buferio. Po inkubacijai reikalingo laiko rūgštis neutralizuojama 0.1ml, 4 kartus didesnės koncentracijos nei naudota HCl, Na₂HPO₄.

2.2.2 Baltymų koncentracijos nustatymo metodas pagal tirozino kiekį

Pagrindinė baltymų sugerties 280nm bangos ilgyje priežastis yra aromatinės amino rūgštys. Tirozinas yra vienintelė aromatinė amino rūgštis, kurios šoninės grandinės prie aromatinio žiedo prijungta -OH grupė šarminiame pH deprotonizuojasi, ir dėl pasikeitusio neigiamo krūvio pasiskirstymo aromatiniam žiede absorbcijos maksimumas pasislenka iki 297nm (2.3 pav.).

Šioje srityje kiti junginiai (jei nėra baltyminių priemaišų) mažai sugeria šviesą, todėl baltymo koncentraciją galima apskaičiuoti iš sugerties šarminėje ir neutralioje terpėje skirtumo,

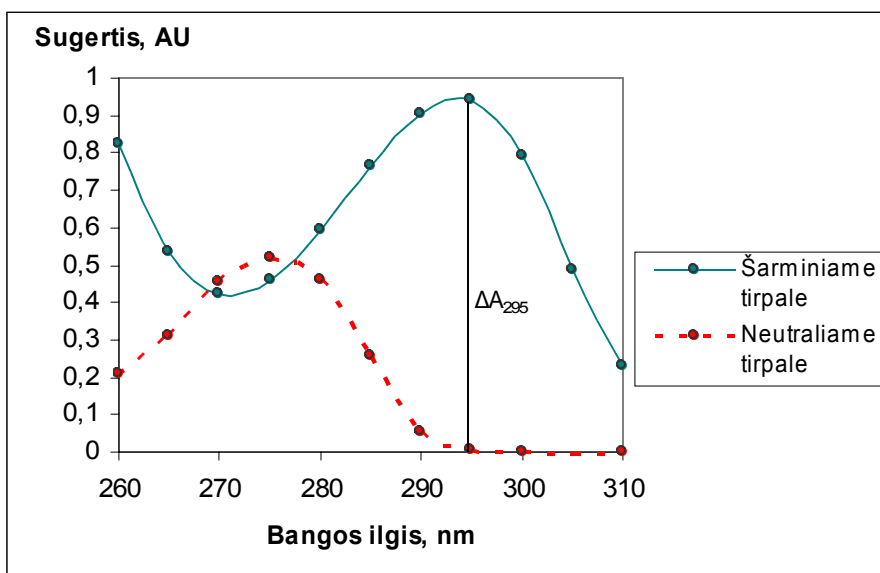
naudojant formulę
$$c_{baltymo} = \frac{\Delta A}{\epsilon_{tyr} f_{tyr} l};$$

ΔA_{295} - sugerčių šarme ir neutralioje terpėje skirtumas esant 295nm bangos ilgiui.

ϵ_{tyr} =2471 AU·l·mol⁻¹·cm⁻¹ tirozino ekstinkcijos koeficientas λ =295nm

f – tirozino amino rūgščių skaičius vienoje molekulėje baltymo,

l – kiuvetės plotis (spindulio kelias).



2.3 pav. Tirozino sugertis neutralioje ir šarminėje terpėje

Į 2 ependorfinius mėgintuvėlius pilama po 0.5ml tiriamo baltymo tirpalo. Į vieną mėgintuvėlį pilama 0.5ml vandens, į kitą 0.2M NaOH. Matuojami sugerties spektrai $\lambda=280-310\text{nm}$, apskaičiuojama ΔA_{295} ir koncentracija.

2.2.3 Baltymų koncentracijos nustatymas spektrofotometriškai

Baltymų tirpalo sugertis matuojama 280nm bangos ilgyje. Jei optinis tankis didesnis nei 0.7, tirpalas skiedžiamas, vėliau skaičiuojant baltymo koncentraciją, ji padauginama iš skiedimo koeficiento.

Baltymo ekstinkcijos koeficientas paskaičiuojamas pagal formulę:

$$\epsilon_{280} = 5500 \cdot n_{\text{trp}} + 1490 \cdot n_{\text{tyr}} + 125 \cdot n_{\text{S-S}} \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)},$$

kur n_{trp} , n_{tyr} – triptofano ir tirozino amino rūgščių kiekiai baltymo molekulėje, $n_{\text{S-S}}$ – disulfidinių tiltelių kiekis baltymo molekulėje.

Baltymo koncentracija skaičiuojama pagal formulę:

$$c = \frac{A_{280}}{\epsilon} (M) = \frac{A_{280} \cdot mw}{\epsilon} (mg / ml),$$

kur mw – baltymo molinė masė.

2.2.4 Izoterminis kalorimetrinis titravimas

Izoterminiam kalorimetriniam titravimui atlikti naudotas CalSci Corp gamintas 5300 modelio mikrokalorimetras. Kiuvetės tūris 0,975ml, švirkšto tūris - 250μl. ITCRun (1.1.0.27 versija) programoje nustatomi parametrai – temperatūra, makromolekulės ir ligando koncentracijos, maišymo greitis, intervalai tarp injekcijų, injekcijų kiekis. Kiuvetei užpildyti ruoštas 0.04mM 2.5ml baltymo tirpalas, švirkštui - 2mM 0.5ml dažo (ar kito ligando) tirpalas. Titravimas vykdytas kas 180s suleidžiant 10μl ligando tirpalo (iš viso 25 injekcijos).

Mikrokalorimetro kiuvetė ir švirkštas prieš eksperimentą gerai praplaunami vandeniu, po to kiuvetė praplaunama 1ml baltymo tirpalo, ir į ją iki metalo-teflono ribos įpilama baltymo tirpalo. Švirkštas pagal galimybes praplaunamas ligando tirpalu ir prisiurbiamas ligando taip, kad stūmoklio gale liktų 5-10μl oro burbuliukas, o adatos gale oro nebūtų. Ligando perteklius nuo adatos nuplaunamas ir nusausinamas.

Adata įsukama į laikiklį ir įstatoma į kalorimetro korpusą. Kai kiuvetės temperatūra artėja prie reikiamos (šilumos kompensacijos kreivė - bazinė linija - kinta jos matavimo ribose), įjungiamas maišiklis. Bazinei linijai nusistovėjus pradedamas eksperimentas.

Eksperimento metu šilumos pokyčiai registruojami ITCRun programoje, kurie vėliau analizuojami BindWorks (3.1.5 versija) programa.

2.2.7 Programinė įranga

Cheminėms medžiagų formulėms piešti buvo naudota Chem Office 2002 Chem Draw Ultra 7.0 2001 version programa.

Izoterminiam kalorimetriniam titravimui valdyti naudota ITCRun 2002 programa, 1.1.0.27 versija.

Izoterminio titravimo kalorimetrijos duomenims analizuoti naudota BindWorks 2002 programa 3.1.5 versija.

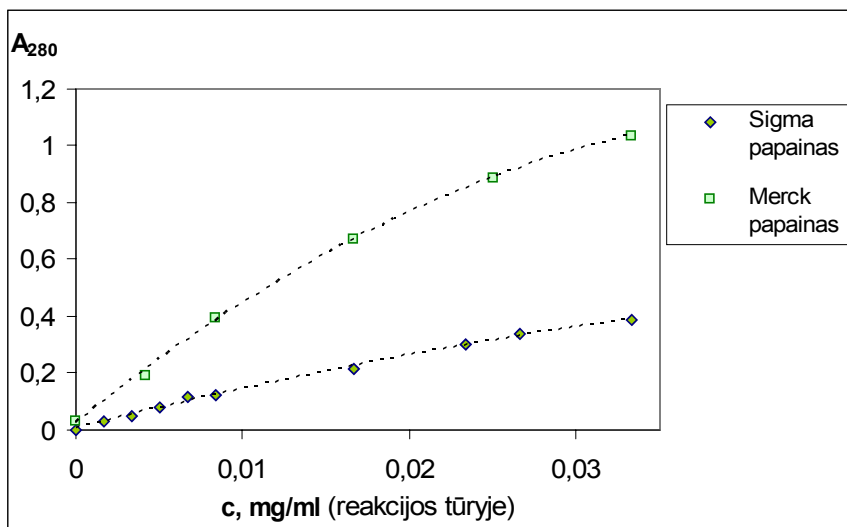
Tretinėms baltymų struktūroms analizuoti naudota ViewerLite 5.0 2002 programa.

Baltymų pirminei struktūrai analizuoti naudotas ProtParam įrankis, pateikiamas www.expasy.org puslapyje.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 Fermentų aktyvumo priklausomybė nuo koncentracijos ir laiko

Norint nustatyti tyrimamas tinkamus fermentų papaino ir bromelaino koncentracijų intervalus, aktyvumo matavimo trukmę, tirta šių fermentų aktyvumo priklausomybė nuo laiko ir koncentracijos. Tirtas Sigma kompanijos gamintas neapdirbtas papainas ir Merck kompanijos gamintas išvalytas papainas skirtas biocheminiams eksperimentams. Aktyvumas matuotas Kunitz'o metodu, A variantas.



3.1 pav. Sigma ir Merck kompanijų papainų aktyvumas (reakcija su Kazeinu vykdyta 20min).

Sigma papaino, gaminamo neapdirbtų miltelių, išskirtų iš papajos žievės forma, aktyvumas buvo maždaug 3 kartus mažesnis nei Merck firmos papaino (3.1 pav.), skirto biocheminiams eksperimentams, be to dalis priemaišų Sigma papaine buvo netirpios. Todėl vėlesniems eksperimentams buvo naudojamas Merck firmos gamintas papainas, ir galima teigti, kad kiekybiniai eksperimentai, atlikti su Merck kompanijos papainu, tikslesni.

Aktyvumą matuojant Kunitz'o metodu 20min sugertis tiesiškai priklauso nuo koncentracijos maždaug iki 0.6 sugerties vienetų.

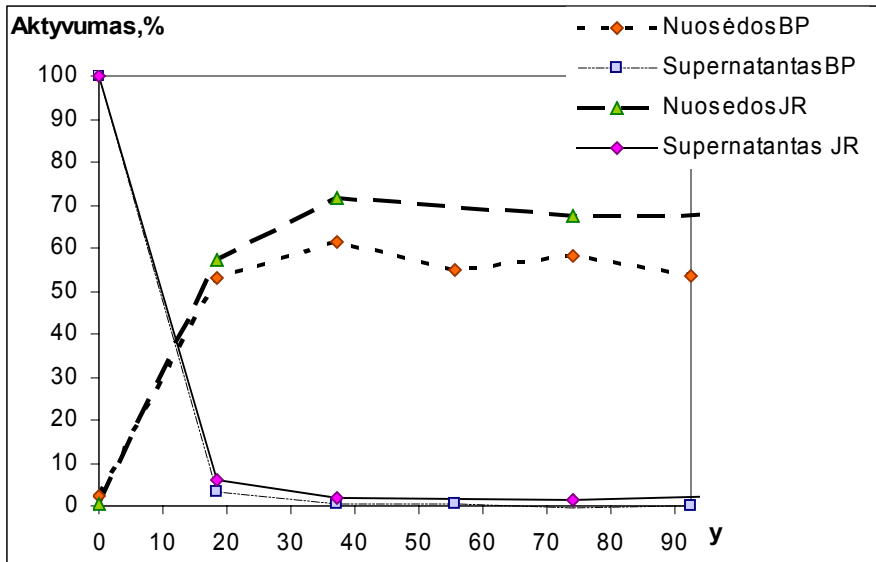
Papaino aktyvumo priklausomybė nuo laiko trimis skirtingoms koncentracijoms pavaizduota 2.2 pav.

3.2 Papaino ir bromelaino grynumas

Papaino ir bromelaino koncentracijos matuotos spektrofotometriškai pagal sugertį 280nm bangos ilgyje ir pagal tirozino kiekį, matuojant sugerties skirtumą 295nm bangos ilgyje vandenyje ir šarme. Papaino ekstinkcijos koeficientas 280nm bangos ilgyje apskaičiuojamas pagal formulę $\epsilon_{280} = 5500 \cdot n_{\text{trp}} + 1490 \cdot n_{\text{tyr}} + 125 \cdot n_{\text{S-S}}$, lygus $56185 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, bromelaino $48735 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Negrynintam sigma papainui gauta koncentracijos vertė parodė, kad papaino visoje medžiagoje yra apie 13%, biocheminiam naudojimui skirto Merck papaino grynumas apie 27%, o bromelaino apie 23%.

3.3 Papaino ir bromelaino išsodinimas dažais, aktyvumas nuosėdose ir supernatante, ne visiškai aktyvumo atsistatymas

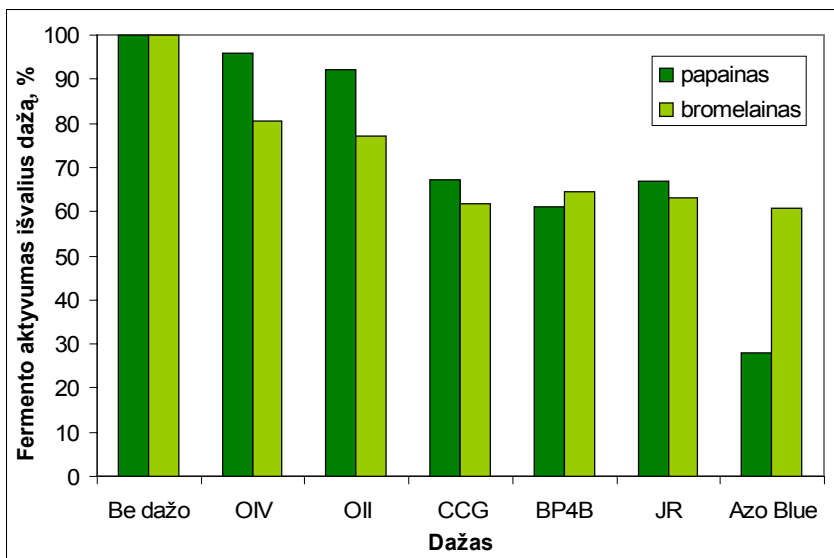
Azoaromatiniai sulfonatai (dažų savybių turinčios medžiagos, MCC ligandai), priklausomai nuo jų struktūros, turi savybę sudaryti netirpų kompleksą su sulfhidrilinėmis proteazėmis. Šie ligandai jungiasi su baltymais sudarydami jonų poras tarp neigiamai įkrautų sulfonato grupių ir teigiamai įkrautų baltymo amino rūgščių (Matulis et al., 1999). Iki šiol daugiausiai tirtas fermento bromelaino nusodinimas dažais, todėl vienas iš šio darbo tikslų buvo pakartoti panašius eksperimentus su papainu, ir patikrinti, ar maksimalus jo išsodinimas pasiekiamas įdėjus tiek dažo, kad neigiamų sulfonato grupių skaičius būtų lygus bendram teigiamų amino rūgščių skaičiui. Kaip gerai išsodinantis dažas naudotas Jurgos raudonasis, taip pat pagal struktūrą parinktas dažas Benzopurin 4B.



3.2 pav. Papaino išsodinimas JR ir BP4B ligandais. Aktyvumo pasiskirstymas supernatante ir nuosėdose pagal neigiamų dažų grupių kiekį, tenkantį vienai baltymo molekulei (y).

Papainą išsodinus skirtingais dažų kiekiais (neigiamų ligandų grupių, šiuo atveju sulfonatų, nuo 0 iki 70-90 vienai baltymo molekulei), išvalius nuo dažo ir matuojant papaino iš nuosėdų ir neišsėdusio papaino aktyvumą, matome, kad maksimalus aktyvumas nuosėdose pasiekiamas kai vienai baltymo molekulei tenka apie 20-30 neigiamų ligando grupių (3.2 pav). Tada supernatanto aktyvumas sumažėja beveik iki nulio, t.y. praktiškai visas baltymas iškrenta į netirpų kompleksą su ligandu. Papainas iš viso turi 25 teigiamai įkrautas amino rūgštis, todėl šiuo atveju iškelta hipotezė, kad neigiami ligandai jungiasi prie teigiamų baltymo amino rūgščių stecheometriškai (Conroy ir Lovrien, 1992) (Matulis et al., 1999), patvirtinama. Tačiau, kaip galime pastebėti 3.2 pav. grafike, iš nuosėdų regeneruotas papainas neatgauna pradinio savo aktyvumo. Labiausiai tikėtina, kad taip vyksta dėl stipraus dažo jungimosi prie baltymo ir ne visiškai jo išsivalymo.

Naudojant silpniau besijungiančius dažus, pavyzdžiui Orange II ar Orange IV, po dažo išvalymo papaino aktyvumas siekia 92-95% (lyginant su papaino, neveikto dažų) aktyvumu (3.3 pav.), mažesnis aktyvumas gaunamas fermentus išvalius nuo Jurgos raudonojo, Crystal Orange G ir Benzopurin 4B dažų (apie 70%). Labai skirtingas fermentų aktyvumas gaunamas paveikus papainą ir bromelainą Azo Blue ligandu, nors jis vizualiai vienodai gerai išsivalo iš abiejų dažų, papaino aktyvumas po išvalymo daugiau nei dvigubai mažesnis už bromelaino. Galbūt Azo Blue selektyviai pakeičia ar kitaip jungiasi prie papaino aktyvaus centro.

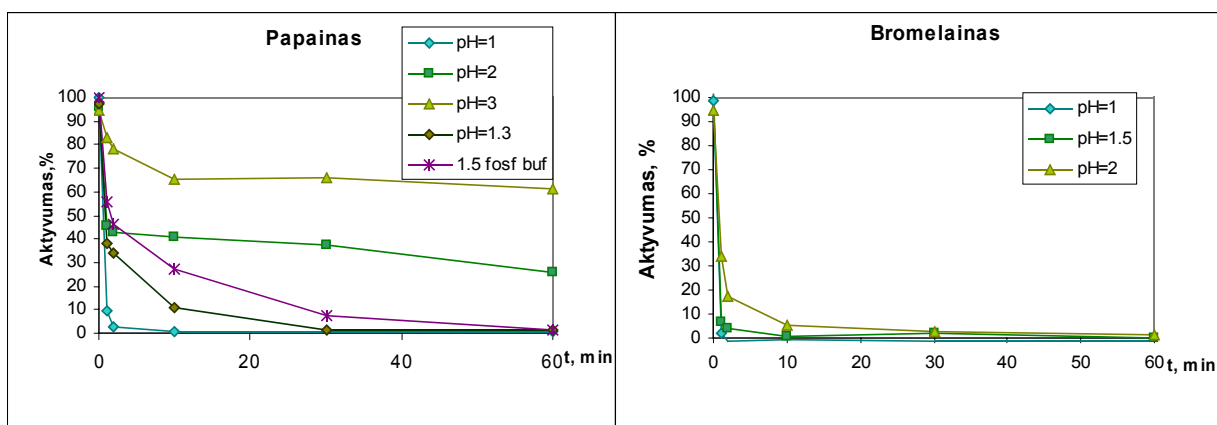


3.3 pav. Papaino ir bromelaino aktyvumo dalis, atgauta išvalius fermentus nuo dažo Dowex reagentu.

Tačiau dažo išvalymo savybes kiekybiškai lyginti sunku, nes jos priklauso nuo Dowex dervos kiekio, rūšies, valymo trukmės ir galbūt kitų nenumatytų veiksnių.

3.4 Papaino ir bromelaino denatūracija rūgštimi

Buvo tirta papaino ir bromelaino denatūraciją HCl rūgštimi (pH nuo 1 iki 3). Pastebėta, kad papainas yra kur kas atsparesnis rūgštiniam stresui, nei bromelainas (3.4 pav.).



3.4 pav. Papaino ir bromelaino denatūracija esant skirtingai HCl koncentracijai.

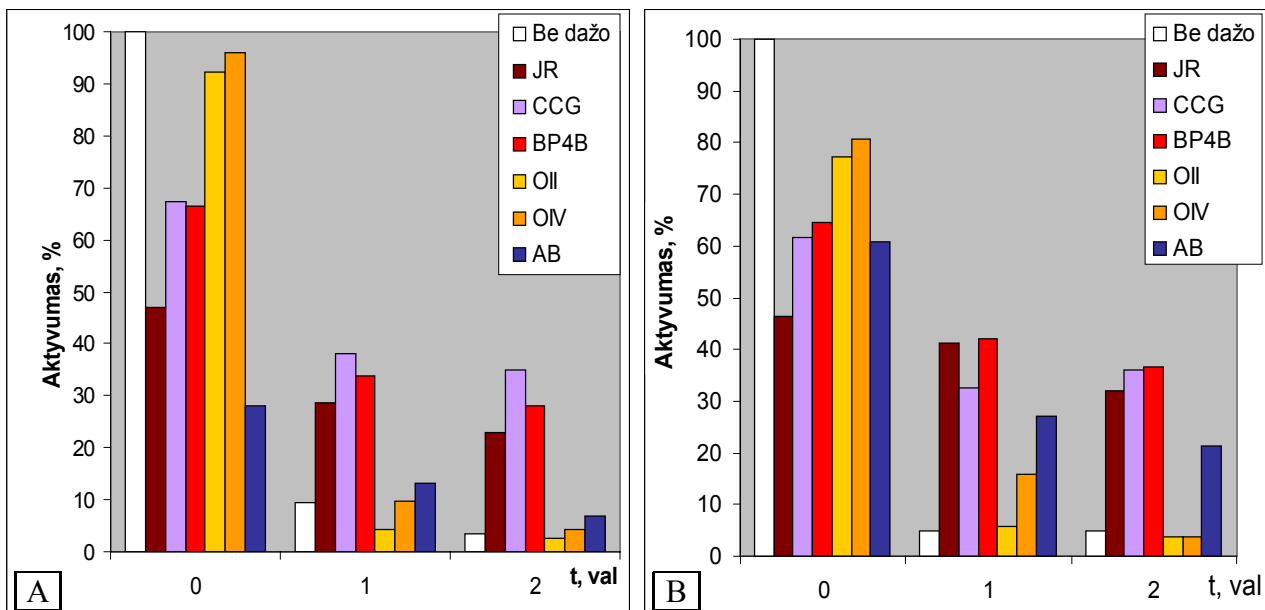
Bromelainas esant pH 2 per valandą laiko praktiškai visiškai praranda savo aktyvumą, papainas tokiomis sąlygomis po valandos išlaiko apie ketvirtadalį savo aktyvumo. Norint, kad denatūracija ir apsauga nuo denatūracijos būtų pakankamai ryški ir lengvai stebima veikiant rūgštimi iki 60 min, tikslinga tirti papaino apsaugą nuo rūgštinio streso esant pH 1.3 ir rūgštesnėje terpėje.

Taip pat buvo tirta ir papaino denatūracija fosfatinio buferiu pH 1.55, 2.0, 3.0. Fosfatiname buferyje papaino aktyvumas mažėja lėčiau, nei veikiant rūgštimi (pH 2.0 fosfatiname buferyje po valandos lieka apie 70% aktyvumo, o rūgštyje tik apie 25%), tai gali lemti fosfatinės grupės buvimas ir galimas panašus į sulfonatinių ligandų saugojimo poveikis.

Iš literatūroje pateiktų duomenų matome, kad papainas yra atsparesnis aukštai temperatūrai nei bromelainas, jų T_m (lydymosi, arba denatūracijos temperatūros) skiriasi 20 laipsnių (Arroyo-Reyna et al., 1995 ir Lozano et al., 1993), taigi, papaino didesnis stabilumas aukštoje temperatūroje koreliuoja su didesniu stabilumu rūgštinėje terpėje. Tačiau ProtParam įrankiu apskaičiuoti nestabilumo indeksai (25.54 papainui ir 26.22 bromelainui) ir alifatiniai indeksai (73.54 papainui ir 73.25 bromelainui) yra beveik vienodi (nors abu rodo didesnę papaino stabilumą). Priežasčių, lemiančių žymiai didesnę papaino stabilumą nei prognozuojama pagal pirminę struktūrą, galbūt reikėtų ieškoti tretinėje baltymų struktūroje, kuri bromelainui dar nėra nustatyta.

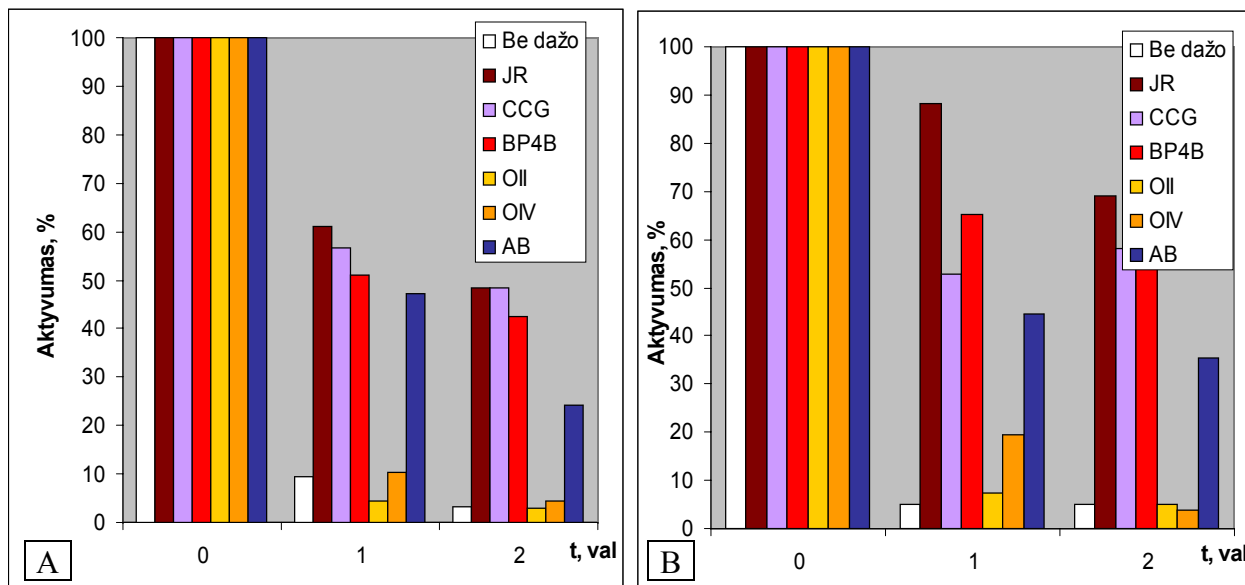
3.5 Papaino ir bromelaino apsauga nuo rūgštinio streso dažais

Baltymų stabilumui įtakos turi įvairūs veiksniai: kotirpikliai, ligandai, mechaninis maišymas. Matulis ir bendradarbiai pastebėjo, kad sulfhidrilinių proteazių stabilumą rūgštinėje terpėje ir aukštose temperatūrose žymiai pagerina MCC ligandai, vieni iš jų - azoaromatiniai sultonatai. Darbe pasirinkta tirti keletas ligandų, kurių sąveika su bromelainu jau buvo aprašyta (Matulis et al. 1999) - Jurgos raudonasis, Crocein Orange G, Orange II - ir keletas netirtų nei su papainu nei su bromelainu ligandų - Benzopurin 4B, Congo Corinth G, Orange IV, Azo Blue. Absoliutus aktyvumas laikant 1 ir 2 val. rūgštyje pavaizduotas 3.5 pav.



3.5pav. Papaino (A) ir bromelaino (B) aktyvumo išsaugojimas, laikant 1 ir 2 valandas HCl pH 1.46.

Kaip jau minėta 3.3 dalyje, po stipriai besijungiančių dažų pašalinimo, fermentų aktyvumas ne visiškai atsistatydavo (tai matome iš pirmų 3.5 pav. stulpelių, kur fermentai su dažu nebuvo laikomi rūgštyje, tačiau jų aktyvumas sumažėdavo palyginus su fermentų, nelaikytų ir nevalytų nuo dažų). Prilyginus išvalytų nuo dažų bet rūgštyje nelaikytų fermentų aktyvumus 100%, pagal santykinį aktyvumų sumažėjimą galime įvertinti dažo efektą baltymo stabilumo pagerinimui (3.6 pav).



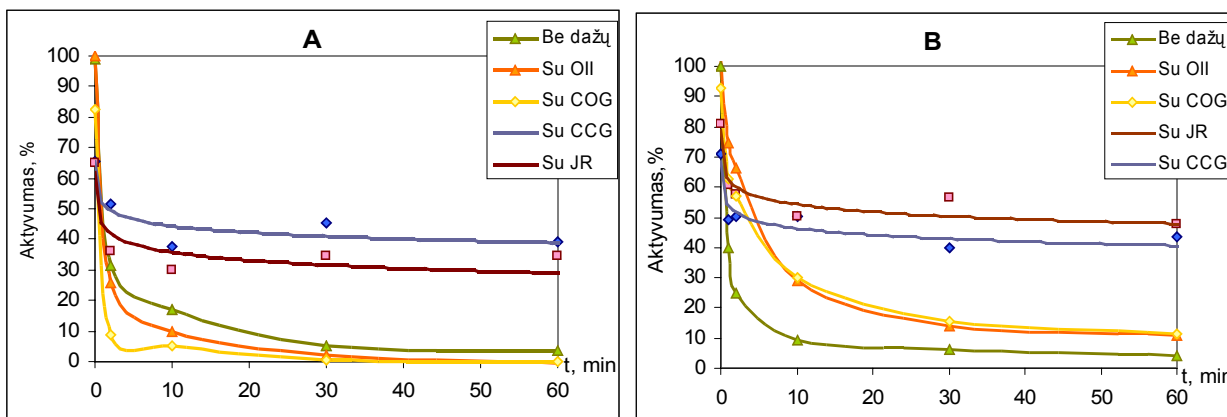
3.6 pav. Papaino (A) ir bromelaino (B) santykinis aktyvumas (palyginus su aktyvumu išvalius nuo dažo), po laikymo rūgštyje pH 1.46 1 ir 2 valandas.

Iš gautų duomenų matome, kad laikant papainą ir bromelainą be ligandų pH 1.46 1 ir 2 valandas, šie fermentai praktiškai inaktyvuojami. Panašus rezultatas gaunamas laikant šiuos fermentus su OII ir OIV ligandais. OIV pasižymi šiek tiek geresnėmis saugojimo savybėmis bromelainui: po 1 val rūgštinio streso jo aktyvumas išlieka apie 4 kartus didesnis, nei fermento, laikyto be dažo.

Iš tirtų ligandų vidutinėmis ir stipriomis baltymo stabilumą rūgštyje pagerinančiomis savybėmis pasižymėjo AB, BP4B, JR ir CCG ligandai. Bromelaino stabilumą išskirtinai pagerina JR ligandas (atitinka duomenis iš Matulio darbų), papaino atveju saugantis JR, CCG ir BP4B ligandų poveikis panašus. Papaino atveju CCG yra pranašesnis saugantis ligandas dėl šiek tiek geresnio jo pašalinimo Dowex reagentu. Baltymai laikyti su AB ligandu pakankamai gerai išlaiko savo aktyvumą, tačiau jų absoliutus aktyvumas (ypač papaino atveju) yra palyginus mažas (3.5 pav.).

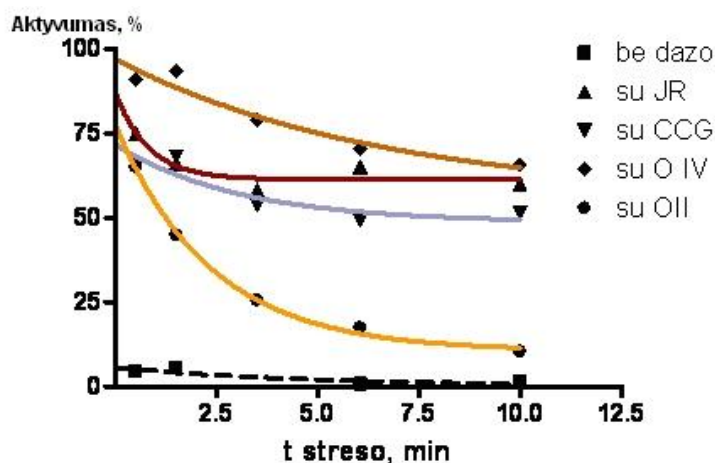
Tiriant aktyvumo mažėjimo priklausomybę nuo dažo struktūros, laikant rūgštyje iki 1 valandos ir iki 10 minučių pastebėta, kad tiek papainui, tiek bromelainui geriausi saugantys nuo rūgštinio streso ligandai yra Jurgos raudonasis ir CCG (3.7 ir 3.8 pav.), nors papaino aktyvumas išlieka šiek tiek didesnis jį saugant CCG ligandu, o bromelainą geriausiai saugo JR ligandas. Nors fermentai, palaikyti su CCG ir JR ligandais, po išvalymo praranda nemažą dalį savo aktyvumo, jau po 2 min rūgštinio streso (esant pH 2.0 bromelainui ir pH 1.4 papainui) šis

aktyvumo sumažėjimas tampa mažesnis, nei aktyvumo sumažėjimas laikant fermentą rūgštyje be saugančio ligando. Po valandos aktyvumas laikant fermentus su šiais ligandais išlieka apie 10 kartų didesnis, nei be jų. Papainui OII ir COG ligandai teigiamos apsaugai nuo rūgšties įtakos praktiškai neturi, nes fermento aktyvumas išlieka didesnis laikant jį rūgštyje be jokio ligando, nei su šiais ligandais. Tačiau šie ligandai pasižymi saugančiomis savybėmis bromelainui (labai panašiomis tarpusavyje), ir po valandos pH 2 rūgštinio streso bromelainui, jo aktyvumas laikant su šiais ligandais yra daugiau nei dvigubai didesnis, nei laikant be jų.



3.7 pav. Papaino (A) ir bromelaino (B) aktyvumo mažėjimas laikant juos rūgštyje (papainą pH 1.4, bromelainą pH 2.0) be ligandų, su JR, CCG, OII ir COG ligandais.

Įdomus labai didelio aktyvumo išsaugojimo ir gero išsivalymo reiškinys pastebėtas laikant bromelainą su OIV ligandu rūgštyje iki 10 minučių (3.8 pav.). Su šiuo ligandu bromelaino aktyvumas išsaugomas netgi geriau nei su JR ar CCG ligandais, tačiau laikant bromelainą rūgštyje ilgiau nei 1 valandą, OIV ligando įtaka apsaugai tampa menka, panaši, kaip silpnai saugančio ligando OII. Palyginus dažų struktūras iškelta hipotezė, kad tokį skirtingą elgesį lemia OIV struktūra, nepanaši nei į kitų gerai saugančių, nei į blogai saugančių ligandų struktūras.



3.8 pav. Bromelaino aktyvumo mažėjimas laikant jį be saugančių ligandų ir su ligandais pH 1.46 iki 10 min.

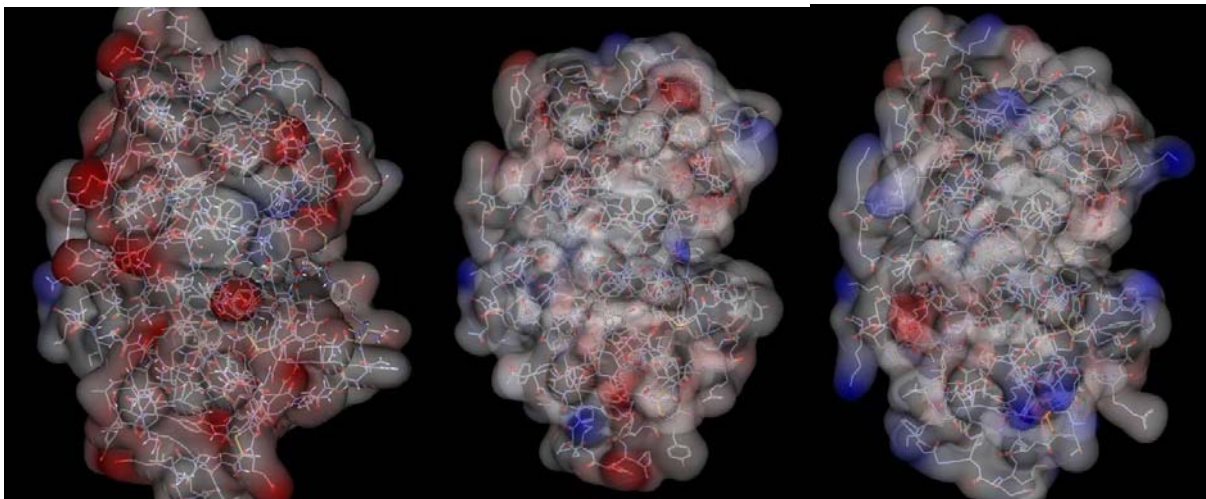
3.5.1 Apsaugos efektyvumo priklausomybė nuo dažo struktūros

Tirtų dažų struktūros pavaizduotos medžiagų ir metodų aprašyme 2.1 lentelėje. Papainui ir bromelainui vienareikšmišką saugojimo nuo rūgštinio streso poveikį turėjo BP4B, CCG ir JR ligandai. Jų struktūros yra gana panašios, šiek tiek skirtingas polinių grupių išsidėstymas: BP4B turi 2 amino (taip pat ir 2 metilo) grupes, CCG 1 amino, 1 hidroksi grupę, o JR dvi hidroksi grupes. BP4B, CCG amino ir hidroksi grupės prijungtos prie to paties benzeno žiedo, kaip ir sulfonatinės grupės, JR hidroksi grupės prijungtos prie kito benzeno žiedo nei sulfonatinės, o žiedus skiria diazo grupė, tačiau tai įtakos apsaugai nuo rūgštinio streso neturi. Labai panašus į BP4B savo struktūra yra AB ligandas, tik jame vietoj NH_2 grupių yra OH grupės, skiriasi vienos sulfonatinės grupės padėtis. Šie skirtumai (arba vienas iš jų) lemia prastą papaino aktyvumo atgavimą po sąveikos su AB ligandu. Bromelaino aktyvumas sumažėja ne taip smarkiai (gana panašus poveikis į CCG, BP4B ir JR ligandų), todėl įvertinus šių ligandų ir papaino bei bromelaino struktūrų skirtumus, galima būtų ieškoti specifinės sąveikos priežasčių.

Silpniau saugantys dažai LRO (šiam ligandui duomenys naudoti remiantis D. Matulio darbais), COG, OII, OIV yra monoazo monosulfonatai. COG ir OII struktūros labai panašios, skiriasi tik sulfonatinės grupės padėtis, kuri įtakos apsaugai beveik neturi (OII saugo nežymiai geriau nei COG). LRO turi tert-butilo liekaną, kuri pagerina jo jungimosi prie papaino ir bromelaino ir apsaugojimo nuo rūgštinio streso savybes.

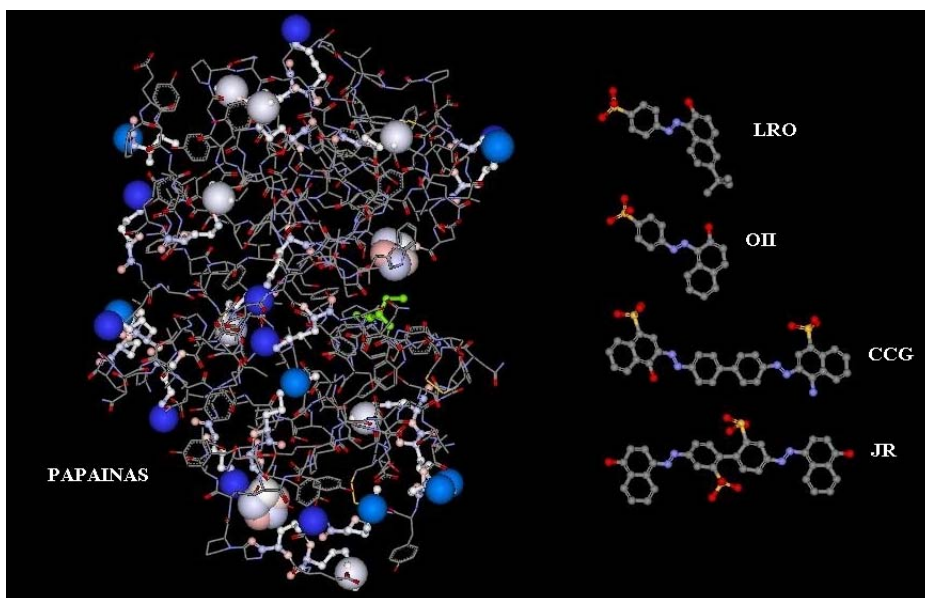
3.5.2 Galimas jungimosi modelis

Augalų cisteino proteazės yra labai homologiškos, tačiau jų teigiamą krūvį turinčių amino rūgščių kiekis labai skirtingas. Aktinidino, papaino ir karikaino krūvių išsidėstymą galime palyginti 3.9 pav. Paveikslėliai nupiešti naudojantis pdb.org duomenų bazės duomenimis.



3.9pav. Aktinidino, papaino ir karikaino tretinės struktūros

Bromelainas ir papainas yra gana panašūs amino rūgščių krūvių atžvilgiu: papainas turi 25 teigiamus, 14 neigiamų krūvių, bromelainas 23 teigiamus, 18 neigiamų krūvių. Bromelainas geriau saugomas JR ligando, kuriame negiamos sulfonatinės grupės yra arti viena kitos, o papainas geriau saugomas CCG ligando, kurio sulfonatinės grupės išsidėstę toliau viena nuo kitos. Galima daryti prielaidą, kad bromelaino struktūra saugoma MCC ligandui formuojant ne tik tarpmolekulinę matricą (šis paaiškinimas dažniausiai pateikiamas literatūroje), bet ir vidumolekulinius ryšius. Tikriausiai iš dalies tokia sąveika ir saugant papainą, tačiau kodėl jos mastai mažesni galima būtų bandyti įvertinti žinant tretinę bromelaino struktūrą.

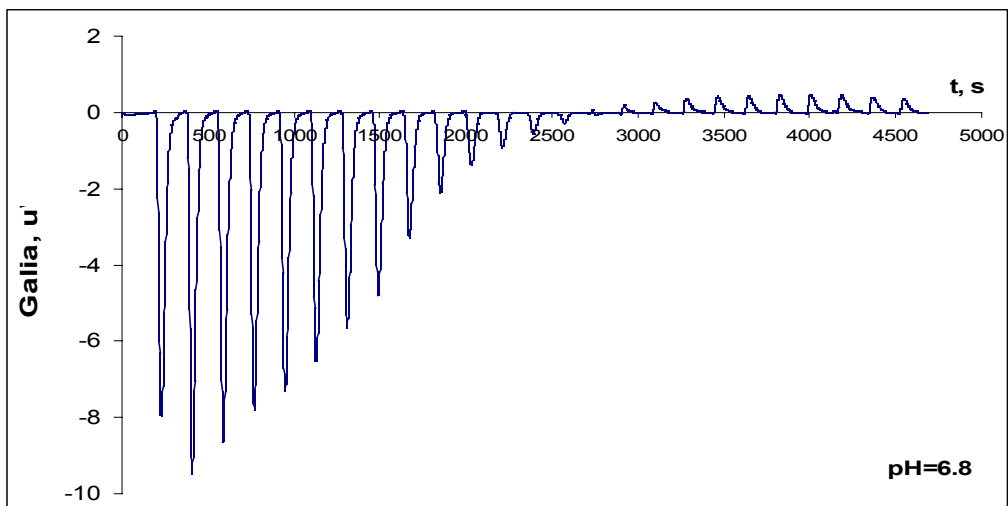
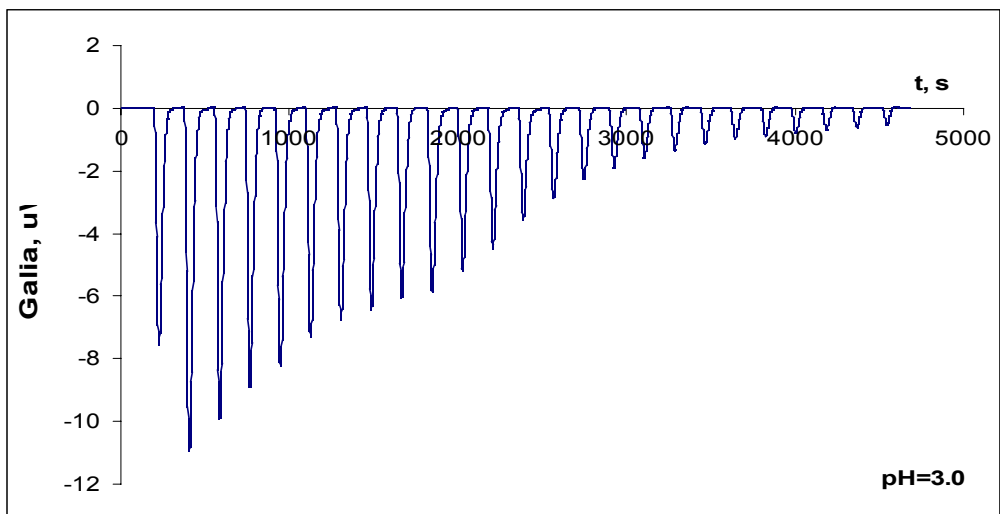
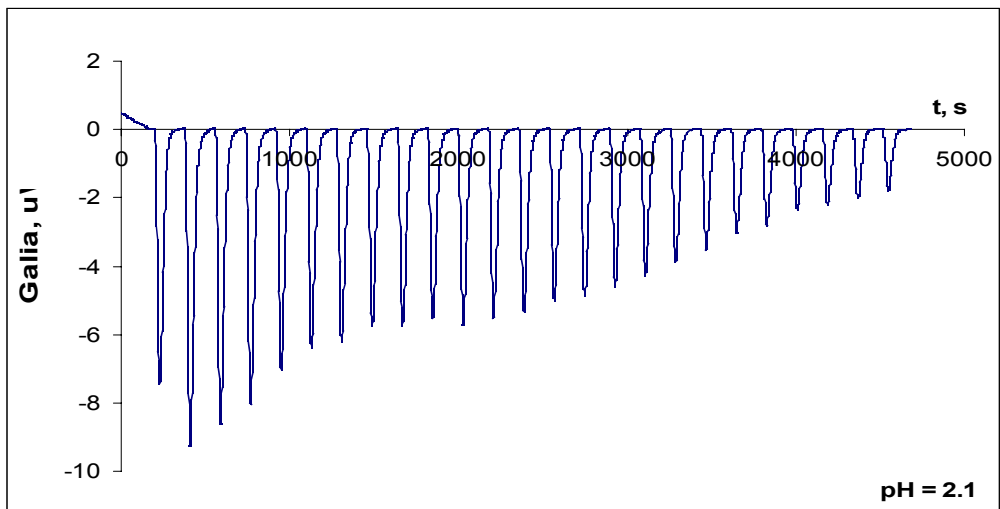


3.10 pav. Little rock orange (LRO), Orange II (OII), Congo Corinth G (CCG), Jurga's Red (JR) dažų ir papaino struktūros. Papaino teigiami krūviai pažymėti mėlynai ir melsvai, Cys25 amino rūgštis, esanti aktyviame centre – žaliai. Molekulių dydžiai proporcingi.

3.10 pav. pavaizduotos dviejų gerai saugančių (JR ir CCG), vieno vidutiniškai saugančio (LRO) ir vieno blogai saugančio (OII) dažų molekulės šalia papaino molekulės. Gerai saugantys dažai JR ir CCG turi daug didesnę hidrofobinę molekulės dalį, kuri gali sąveikauti su hidrofobinėmis baltymo sritimis, ir dvi sulfonatinės grupės, kurios gali sudaryti tarpmolekulinius ar vidumolekulinius ryšius, taip sustandindamos baltymo konformaciją. OII hidrofobinė sritis matyt yra per maža, kad sudarytų pakankamai stiprų ryšį baltymo struktūrai palaikyti, bet įvestas į jo struktūrą tert-butilo pakaitas (gautas LRO dažas) jau leidžia šiam ligandui pakankamai gerai apsaugoti baltymus nuo rūgštinės denatūracijos.

3.6 Termodinaminės LRO micelių susiformavimo charakteristikos

Tiriant Little Rock Orange dažo skiedimosi šilumas skirtingų pH 50mM fostatiniuose buferiuose pastebėta, kad esant neutraliam pH (6.8) skiedimosi šiluma sumažėja ir tampa pastovi (netgi teigiama) po 17 injekcijos, LRO koncentracijai pasiekus $3.5 \cdot 10^{-4} \text{M}$, esant pH 3.0 skiedimosi šiluma tampa pastovi po 21 injekcijos, LRO koncentracijai pasiekus $4.3 \cdot 10^{-4} \text{M}$, o esant pH 2.1, skiedimosi šilumos palyginus mažos, bet pastovi vertė iki $5.1 \cdot 10^{-4} \text{M}$ LRO koncentracijos nepasiekia (3.11 pav).



3.11 pav. LRO skiedimosi šilumos pH 2.1, 3.0, 6.8 50mM fosfatiniuose buferiuose.

Galima daryti prielaidą, kad šie skiedimosi šilumų pokyčiai atsiranda dėl micelių formavimosi. Kol junginio koncentracija tirpale nulinė arba labai maža, įlašinus didelės koncentracijos tirpalą į tirpiklį vyksta tik tolygaus išsisklaidymo (demicelizacijos) tirpiklyje procesas, kuris yra endoterminis. Kai pasiekama tam tikra medžiagos koncentracija tirpale (kritinė micelių koncentracija KMC), micelės neišyra ir stebima tik maža skiedimosi šiluma (Heerklotz et al., 2003). Šis procesas, kurio metu tirpalo sudedamųjų dalių struktūra nekinta, yra egzoterminis tirpaluose, kurių pH 6.8, endoterminis esant pH 3.0 ir mažiau.

Kuo mažesnis tirpalo pH, tuo mažiau LRO dažo molekulių įsikrovę neigiamai (sulfonato grupės $pK_a \sim 1$). Tik turinčios krūvį LRO molekulės gali formuoti mices, to mažesniame pH kritinė micelių koncentracija yra didesnė. Eksperimentų metu LRO ligandui nustatytos KMC pateiktos 3.1 lentelėje.

Micelių formavimosi laisvoji energija apibūdinama $\Delta G_{mic}^{\circ} = RT \ln \left(\frac{[KMC]}{55.5} \right)$, kur 55.5 – vandens molinė koncentracija (Heerklotz ir Seelig, 2000). Apskaičiuota LRO micelių formavimosi laisvoji energija pateikiama 3.1 lentelėje.

3.1 lentelė. Kritinė LRO dažo micelių koncentracija ir micelių formavimosi laisvoji energija įvairių pH 50mM fosfatiniame buferyje.

pH	KMC, M	ΔG_{mic}° , kJ/mol
2.1	$3.5 \cdot 10^{-4}$	-30.9
3.0	$4.3 \cdot 10^{-4}$	-30.3
6.8	$>5.1 \cdot 10^{-4}$	-29.9

3.7 Papaino ir LRO ligando komplekso susidarymo termodinamika

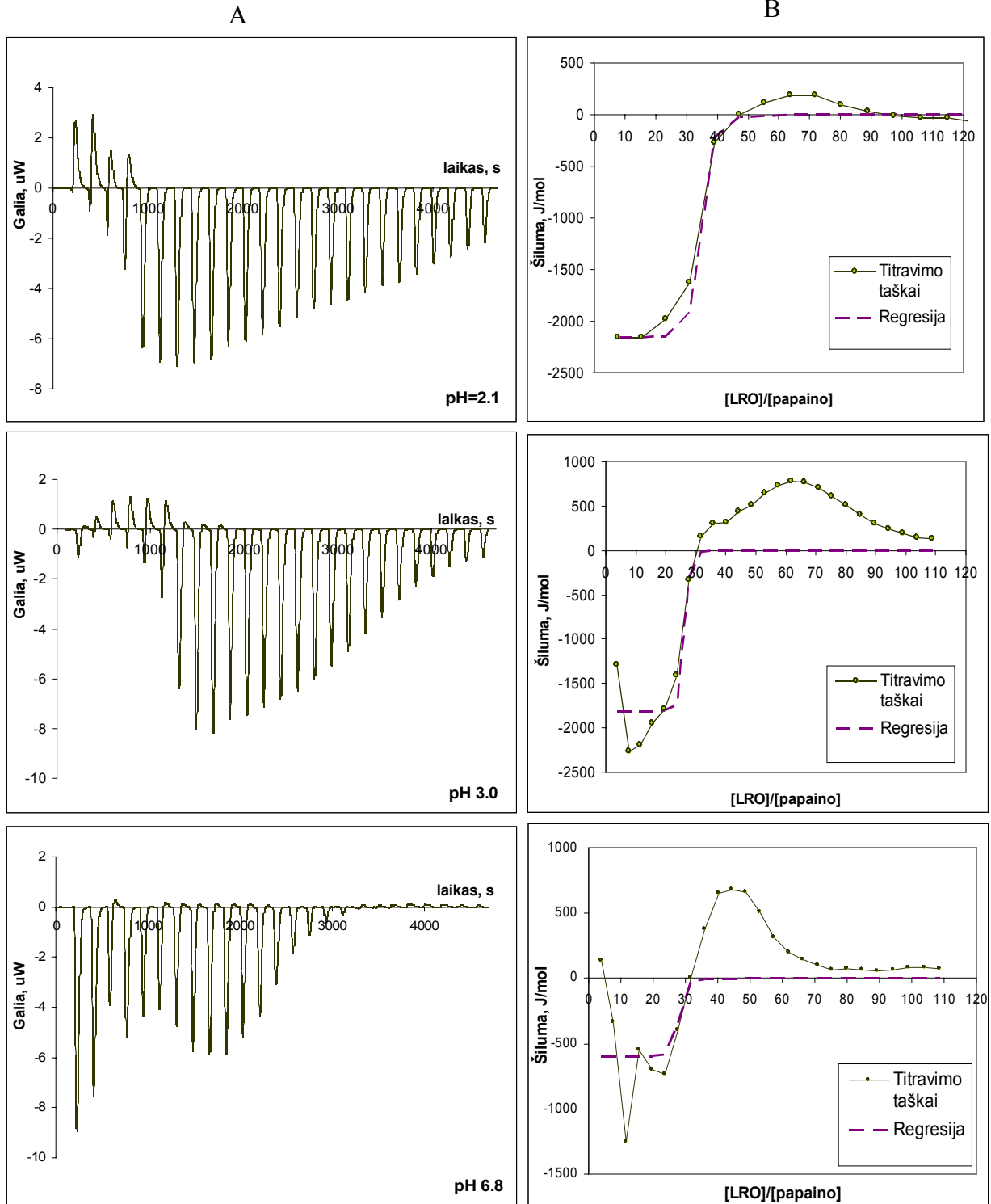
Papaino ir Little Rock Orange dažo sąveika buvo pasirinkta tirti dėl kelių priežasčių.

- LRO yra vidutiniškai stiprų kompleksą su baltymu sudarantis dažas, jis kur kas silpniau jungiasi prie baltymo nei JR, bet apie 10 kartų stipriau nei Orange II. Jo sukibimas su prietaisų ir indų sienelėmis yra vidutinio stiprumo ir jį galima patikimai atplauti 1M NaOH tirpalu.
- Nustatyta jo jungimosi konstanta prie poliarginino yra $3 \cdot 10^6 M^{-1}$ (Matulis et al., 1999). LRO yra vienas iš junginių, kurių jungimosi su baltymais konstantą dar galima nustatyti

kalorimetriškai (kalorimetru paprastai galima nustatyti jungimosi konstantas 10^3 - 10^8 M⁻¹ intervale (O'Brien et al., 2001).

- LRO jungimasis prie baltymų reikšmingas baltymų apsaugai nuo rūgštinio streso (Matulis et al., 1999).

Nutitravus papaino tirpalą LRO tirpalu gauti šilumų pokyčiai (3.12 pav. A). Iš jų atėmus kontrolinių pikų aukštį (LRO titruojant į buferį, 3.11 pav.) ir suintegravus šilumos kreivę gautos LRO ligando jungimosi prie papaino entalpijos esant pH 2.1, 3.0, 6.8 (3.12 pav. B). Iš entalpijos pokyčių, taikant netiesinę regresiją, apskaičiuotas LRO ligandų kiekis n , kuris jungiasi prie vienos papaino molekulės. n apytiksliai lygus 25 esant pH 3.0 ir 6.8, o esant pH 2.1 apytiksliai lygus 35. Papaino molekulė turi 25 teigiamus krūvius, todėl šie eksperimentai patvirtina elektrostatinio jungimosi modelį, pagal kurį sulfonato anijonai stecheometriškai jungiasi prie teigiamų amino rūgščių šoninių grandinių. Neatitikimas prie pH 2.1 galimas dėl paklaidų, ne visiškai gryno dažo arba šioje terpėje stipresnės kelių ligandų tarpusavio sąveikos.



3.12 pav. Papaino ir LRO jungimosi šilumos esant pH 2.1, 3.0, 6.8. A dalyje pavaizduoti tiesiogiai eksperimento metu gaunami šilumų pokyčiai, B dalyje atimta skiedimosi šiluma, vertės suintegruotos.

Taip pat stebima pH įtaka jungimosi entalpijai: esant pH 2.1 ji lygi apie 2.2kJ/mol, kai pH 3.0 – apie 1.8kJ/mol, o esant pH 6.8 – apie 0.6kJ/mol. Šis pokytis atsiranda todėl, kad didėjant terpės pH, baltymo molekulė įgauna vis daugiau neigiamų krūvių, ir neigiamiems sulfonato anijonams darosi vis sunkiau prisijungti prie teigiamų baltymo amino rūgščių.

Nustatyta LRO ir papaino jungimosi konstanta apytiksliai lygi $1.9 \cdot 10^7 \text{M}^{-1}$.

IŠVADOS

1. Apžvelgus literatūros duomenis apie cisteino proteazių sąveiką su MCC ligandais, buvo pasirinkta tirti papaino ir bromelaino sąveika su ligandais, skirtingai saugančiais nuo rūgštinio streso: AB, BP4B, CCG, COG, JR, LRO, OII, OIV. Dauguma ligandų nebuvo tirti su papainu, dalis su bromelainu.

2. Papainą išsodinus JR ir BP4B dažais patvirtintas elektrostatinio jungimosi modelis. Veikiant rūgštimi papaino ir bromelaino-dažų kompleksus nustatyta, kad CCG, BP4B, AB yra gerai nuo rūgštinio streso saugantys ligandai (tai yra ligandai, turintys didesnę hidrofobinę sritį ir 2 sulfonatines grupes). Nustatyta, kad JR geriau saugo nuo rūgštinio streso bromelainą, nei papainą, AB yra geras saugantis ligandas tik bromelainui. OII, COG, OIV nepasižymėjo geromis apsaugos nuo rūgštinio streso savybėmis, išskyrus OIV, kuris gerai saugo nuo rūgštinio streso trumpą laiką. Duomenys leidžia daryti prielaidą, kad baltymų apsaugai svarbus vidumolekulinių ryšių per ligando molekules susidarymas.

3. Ištyrus LRO ligando jungimąsi su papainu izoterminės titravimo kalorimetrijos metodu, buvo patvirtintas elektrostatinio jungimosi modelis ir gauta jungimosi konstanta, kuri apytiksliai lygi $1.9 \cdot 10^{-7} \text{M}^{-1}$. Tiriant LRO skiedimąsi vandenyje, nustatytas micelių formavimosi reiškiny, kritinė micelių koncentracija ir micelių formavimosi laisvoji energija esant pH 2.1, 3.0 ir 6.8.

Summary

Protection of cysteine proteases from acid stress by matrix ligands

Cysteine proteases are enzymes found in all life forms, hydrolyzing various cellular proteins. Papain and bromelain, cysteine proteases isolated from tropical fruits papaya and pineapple were studied in this work.

Matrix ligands are aromatic azo dyes, bearing negatively charged sulfonate group. Such ligands form ionic bonds with protein positively charged groups, while the hydrophobic aromatic functional groups bind to each other and form protein – ligand matrix that falls into a coprecipitate. Matrix ligands are used for protein purification and protection from various stresses – acid and temperature.

Disulfonate dyes such as Jurga's red, Congo Corintg G, Benzopurpurin 4B, protect papain and bromelain from acidic stress very well. However, these dyes do not fully separate from the enzyme. Orange II and Crocein Orange G are much poorer protectors from acidic stress, but separate well. Orange IV well protects from acidic stress for short period. Azo blue is a good protector but strongly inactivates papain.

While studying dilution of Little Rock Orange (LRO) in water, the Gibbs free energy of micelle formation was determined at several pHs. The LRO - papain binding constant was determined at several acidic pHs. The electrostatic ligand – protease binding model was confirmed by the number of stoichiometrically bound ligand sulfonate per protein positive charge. The binding enthalpy was also more exothermic at lower pHs when the charge of the protein was more positive.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovui dr. D. Matuliui už suteiktą galimybę atlikti bakalauro darbą Biotechnologijos instituto biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje, suteiktą informaciją, pagalbą ir palaikymą.

Taip pat dėkoju visiems laboratorijos darbuotojams už malonią ir darbingą atmosferą ir pagalbą mokantis.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Alexov E. Numerical calculations of the pH of maximal protein stability, the effect of the sequence composition and three-dimensional structure, *Eur. J. Biochem.* 2004; 271:173–85
2. Arroyo-Reyna A, Hernandez-Arana A. The thermal denaturation of stem bromelain is consistent with an irreversible two-state model. *Biochimica et Biophysica Acta* 1995; 1248:123-8.
3. [Barrett AJ](#), [Rawlings ND](#). Evolutionary lines of cysteine peptidases. [Biol Chem.](#) 2001; 382(5):727-33.
4. [Bussadori SK](#), [Castro LC](#), [Galvao AC](#). Papain gel: a new chemo-mechanical caries removal agent. [J Clin Pediatr Dent.](#) 2005;30(2):115-9.
5. Conns HJ. Biological stains. 9th ed. Waverly press: Baltimore; 1977
6. Conroy MJ, Lovrien RE. Matrix coprecipitating and cocrystallizing ligands (MCC ligands) for bioseparations. *Journal of crystal growth.* 1992;122:213-22.
7. EMBL-EBI [duomenų bazė internete]. European bioinformatics institute; [atnaujinta 2006 02 24; cituota 2006 04 20]. Adresas: <http://www.ebi.ac.uk/interpro/IEntry?ac=IPR000668>.
8. Enzyme nomenclature database [duomenų bazė internete]. Swiss institute of bioinformatics, Geneva; [atnaujinta 2006 05 30; cituota 2005 06 02]. Adresas: <http://www.expasy.org/enzyme/> .
9. Grudkowska M, Zagdańska B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases. *Acta Biochimica Polonica.* 2005;51(3):609-24.
10. Gupta MN, Kaul R, Guoqiang D, Dissing U, Mattiasson B. Affinity precipitation of proteins. *J Mol Recognit.* 1996;9:356-9.
11. Haq SK, Rasheedi S, Khan RH. Characterization of a partially folded intermediate of stem bromelain at low pH, *Eur. J. Biochem.* 2002; 269, 47-52
12. Heerklotz H, Seelig J. Correlation of Membrane/Water Partition Coefficients of Detergents with the Critical Micelle Concentration. *Biophys J.* 2000;78(5):2435-40
13. Heerklotz H, Szadkowska H, Anderson T, Seelig J. The Sensitivity of Lipid Domains to Small Perturbations Demonstrated by the Effect of Triton. *J. Mol. Biol.* 2003; 329:793-9

14. Klotz IM. Ligand-receptor energetics: a guide for the perplexed. 1st ed. New York: John Wiley & Sons, Inc; 1997.
15. [Leavitt S](#), [Freire E](#). Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. [Curr Opin Struct Biol](#). 2001;11(5):560-6.
16. [Holdgate GA](#), [Ward WH](#). Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. [Drug Discov Today](#). 2005;10(22):1543-50.
17. Lozano P, Cano J, Iborra JL, Manjon A. Influence of polyhydroxylic cosolvents on papain thermostability. *Enzyme Microb. Technol.* 1993; 15:868-73
18. [Matulis D](#), [Lovrien R](#), [Richardson TI](#). Coprecipitation of proteins with matrix ligands: scaleable protein isolation. [J Mol Recognit](#). 1996;9(5-6):433-43.
19. Matulis D, Rouzina , Bloomfield V. Thermodynamics of cationic lipid binding to DNA and DNA condensation: roles of electrostatics and hydrophobicity. *J Am Chem Soc*. 2002;124:7331-42.
20. Matulis D, Wu C, Pham TV, Guy C, Lovrien R. Protection of enzymes by aromatic sulfonates from inactivation by acid and elevated temperatures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1999; 7:21-36.
21. O'Brien R, Ladbury JE, Chowdhry BZ. Isothermal titration calorimetry of biomolecules. In: Harding ES, Chowdhry BZ editors. *Protein – Ligand Interactions: hydrodynamics and calorimetry*. New York: Oxford university press; 2001. p. 263-86.
22. Otto HH, Schirmeister T. Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev*. 1997; 97:133-71
23. Pace CN, Tanford C. Thermodynamics of the Unfolding of β -Lactoglobulin A in Aqueous Urea Solutions Between 5 and 55 C. *Biochemistry*. 1968;7:198-208.
24. Perturbations Demonstrated by the Effect of Triton. *J. Mol. Biol.* 2003; 329:793-9
25. Prosite [duomenų bazė internete]. Swiss institute of bioinformatics, Geneva; [atnaujinta 2006 04; cituota 2005 06 02]. Adresas: <http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00126>
26. Rawlings ND, Barret AJ. Families of Cysteine Peptidases. *Methods in Enzymology*. 1994; 244:461-87

27. Rudyk H, Knaggs MH, Vasiljevic S, Hope J, Birkett CR, Gilbert IH. Synthesis and evaluation of analogues of congo red as potential compounds against transmissible spongiform encephalopathies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2003; 38:567-79.
28. Rudyk H, Vasiljevic S, Hennion RM, Birkett CR, Hope J, Gilbert IH. Screening Congo Red and its analogues for their ability to prevent the formation of PrP-res in scrapie-infected cells. *Journal of General Virology* 2000; 81:1155-64.
29. Schneedorf JM, Santoro MM, Lovrien R, Mares-Guia M. A time-dependent, two-step binding mode of the nitro dye flavianic acid to trypsin in acid media. *Braz J Med Biol Res.* 2001;34(8):1047-54.
30. Sellarajah S, Lekishvili T, Bowring C, Thompsett AR, Rudyk H, Birkett CR, Brown DR, Gilbert IH. Synthesis of Analogues of Congo Red and Evaluation of Their Anti-Prion Activity. *J. Med. Chem.* 2004(47):5515-34.
31. Storer AC, Menard R. [33] Catalytic Mechanism in Papain Family of Cysteine peptidases. *Methods in Enzymology.* 1994; 244:487-500
32. [Turk B](#), [Turk V](#), [Turk D](#). Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. [Biol Chem.](#) 1997; 378:141-50.
33. Varughese K, Ahmed F, Carey P, Hasnain S, Huber C, Storer A. Crystal structure of a papain -E-64 complex. *Biochemistry* 1989;28:1330-2
34. Vernet T, Tessier DC, Chatellier J, Plouffe C, Lee TS, Thomas DY, Storer AC, Ménard R. Structural and Functional Roles of Asparagine 175 in the Cysteine Protease Papain. *Biol Chem.* 1995;270(28):16645-52.
35. Wikipedia [internetinė enciklopedija]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Papain>
36. Worthington-biochem katalogas [internetinė svetainė] Worthington Biochemical Corporation; [atnaujinta 2006 05 10; cituota 2006 05 16]. Adresas: <http://www.worthington-biochem.com/PAP/cat.html>
37. Wu JW, Wang ZX. New evidence for the denaturant binding model. *Protein Science.* 1999;8:2090–7.
38. Xiao J, Liang SJ, Tsou CL. Inactivation before significant conformational change during denaturation of papain by guanidine hydrochloride. *Biochimica et Biophysica Acta* 1993; 1164: 44-60.