

VILNIAUS UNIVERSITETAS
Biofizikos ir Biochemijos katedra

Biofizikos studijų programos studentas

Zigmantas TOLEIKIS

Bakalaurinis darbas

Baltymų - ligandų jungimosi tyrimai, esant aukštam slėgiui

Darbo vadovas

Dr. D. Matulis

Vilnius 2007

Turinys

Sutrumpinimai.....	4
1. Įvadas.....	5
2. Literatūros apžvalga.....	7
2.1 CA apžvalga, reakcinis centras ir slopikliai.....	7
2.1.1 Bendra karboanhidrazių apžvalga.....	7
2.1.2 α -CA reakcinio centro struktūra ir katalizuojamos reakcijos mechanizmas.....	8
2.1.3 CA inhibitorių jungimasis aktyviajame centre.....	9
2.1.4 CA inhibitorių struktūra ir kūrimo principai.....	10
2.2 Hsp90 struktūra, funkcijos, ir slopikliai.....	12
2.2.1 Radisikolis ir jo jungimasis su Hsp90.....	14
2.3 ANS jungimasis ir fluorescencija.....	15
2.4 Baltymų temperatūrinis stabilumas, T_m ir ligandų jungimasis.....	17
2.4.1 Baltymų temperatūrinis stabilumas ir T_m	17
2.4.2 Ligandų jungimosi modelyje, išsisukimo entalpija ir jungimosi konstanta	20
2.4.3 Baltymų - ligandų jungimosi stochiometrija.....	22
2.5 Aukšto hidrostatinio slėgio poveikis baltymams.....	23
2.5.1 Tūrio pokyčiai denatūruojant baltymus.....	23
2.5.2 Suspaudžiamumas	24
2.5.3 Metastabilios būsenos formavimasis, veikiant baltymus slėgiu.....	25
2.5.4 Slėgio įtaka baltymų agregatams ir agregacijai.....	26
2.5.5 Mutantinių baltymų stabilumas, esant aukštam slėgiui.....	27
2.5.6 ANS - baltymų jungimasis, esant aukštam slėgiui	29
2.5.7 Slėginio ir temperatūrinio baltymų stabilumų palyginimas.....	29
2.5.8 Grįžtamos ir negrįžtamos baltymų denatūracijos fazių diagrama	30
2.5.9 Tūrio pokyčiai ligandams jungiantis prie baltymų.....	32
2.5.10 Baltymo – ligando komplekso lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio.....	33
3. Medžiagos ir tyrimo metodai.....	34
3.1 Naudotos medžiagos	34
3.2 Tirpalų ruošimas.....	34
3.3 Baltymų temperatūrinės denatūracijos poslinkio fluorescencinis metodas	35
3.4 Jungimosi konstantos nustatymas.....	35
3.5 Slėginis fluorimetras.....	36
3.6 Slėginės baltymų denatūracijos nustatymas	36
3.7 Temperatūrinės denatūracijos eksperimentai, esant aukštam slėgiui	36
3.8 Duomenų apdorojimas ir analizė.....	36
4. Eksperimentų rezultatai ir jų aptarimas.....	37
4.1 Sulfonamidinių slopiklių jungimasis su bCAII, esant atmosferos slėgiui	37
4.1.2 Acetazolamido-bCAII jungimasis.....	38
4.1.3 Pentafluorbenzensulfonamido (PFS)-bCAII jungimasis	39
4.1.4 VD5 - bCAII jungimasis.....	41
4.1.5 VD6 - bCAII jungimasis	42

4.1.6 VD20 – bCAII jungimasis.....	44
4.1.7 bCAII- sulfonamidinių slopiklių jungimosi palyginimas.....	45
4.2 Slėginiai eksperimentai.....	47
4.2.1 Slėgio įtaka ANS fluorescencijai, esant DMSO.....	47
4.2.2 ANS fluorescencijos kitimas skirtinguose tirpikliuose, kintant slėgiui.....	48
4.2.3 DMSO įtaka CA slėginei denatūracijai.....	48
4.2.4 CA slėginė denatūracija, esant acetazolamidui.....	49
4.2.5 GuanCl įtaka Hsp90N slėginei denatūracijai.....	50
4.2.6 rhCAI T _m kitimo priklausomybė nuo slėgio ir METZ.....	52
4.2.7 rhCAI jungimasis su metazolamidu (METZ), esant aukštam slėgiui.....	55
4.2.8 Hsp90N temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui.....	57
4.2.9 Hsp90N - radisikolis komplekso temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui.....	57
Išvados.....	60
Santrauka.....	61
summary.....	62

Sutrupinimai

CA	Karboanhidrazė
hCAI	žmogaus pirmoji karboanhidrazė
rhCAI	Rekombinantinė žmogaus pirmoji karboanhidrazė
bCAII	jaučio antroji karboanhidrazė
ACZ	Acetazolamidas
PFS	Pentafluorbenzensulfonamidas
DMSO	Dimetilsulfoksidai
vd5 /vd6 /vd20	Benzimidazo[1,2,-c]thiadiazol-7-sulfonamidai
ANS	8-anilino-1-naftaleno sulfonatas
TFMSA	Trifluormetansulfonamidas
GuanCl	Guanidino vandenilio chloridas
METZ	Metazolamidas

1. ĮVADAS

Temperatūros, slėgio ir tirpiklio įtakojamos tranzicijos tarp natyvaus ir išsisukusio baltymo charakterizavimas termodinaminiais parametrais leidžia suprasti baltymų stabilumą (Dubins, Filfil et al. 2003). Nuo slėgio priklausomos termodinaminės charakteristikos, tokios kaip tūris, suspaudžiamumas, plėtimasis papildydamos nuo temperatūros priklausomus parametrus: entropiją, entalpiją, šiluminę talpą, leidžia plačiau apibūdinti tiriamas sistemas ir suprasti jų elgesį (Silva and Weber 1993; Heremans and Smeller 1998).

Slėgis yra standartinis termodinaminis parametras keičiantis baltymų aktyvumą ir struktūrą (Mozhaev, Heremans et al. 1996; Balny, Masson et al. 2002). Slėgis įtakoja susisukusios polipeptidinės grandinės struktūrą, veikdamas silpnąsias sąveikas, atsakingas už baltymų stabilumą, kuris priklauso nuo slėgio dydžio, suspaudimo greičio ir laiko kurį sistema veikiamą slėgiu. Slėgis mažesnis nei 300 MPa nekeičia vandenilinių ryšių stiprumo, tad antrinė baltymo struktūra nepakinta, o tretinės struktūros pokyčiai mažai pastebimi. Aukštas slėgis ardo hidrofobines ir elektrostatines sąveikas, tad tai leidžia stebėti dalinę baltymų denatūraciją (Mozhaev, Heremans et al. 1996).

Šiame darbe tirti baltymų stabilumą ir jungimąsi, esant aukštam slėgiui, buvo pasirinkti du baltymai: karboanhidrazė (jaučio II ir rekombinantinė žmogaus I) ir šiluminio šoko baltymo N - galinis domenas (Hsp90N). Šie baltymai yra įdomūs dėl ląstelėje vykdomų svarbių funkcijų, kurių sutrikimai, įtakoja įvairių ligų, tokių kaip glaukoma ar vėžiniai susirgimai, atsiradimą. Šių baltymų aktyvumo sutrikimus, galima sumažinti slopikliais, kurie jungiasi baltymų aktyviajame centre ir stabdo jų katalizuojamas reakcijas. Nepaisant slopiklių stipraus jungimosi prie baltymų, jų neselektyvus jungimasis organizme sukelia daug pašalinių poveikių, todėl stengiamasi sukurti slopiklių, kurie būtų veiklūs mažomis koncentracijomis ir pasižymėtų dideliu selektyvumu norimiems baltymams ir jų izoformoms. Baltymų –slopiklių kompleksų slėginis stabilumas yra labai mažai tyrinėtas reiškinys, tad šio darbo **tikslas patyrinėti baltymų - ligandų jungimąsi, esant atmosferos ir aukštam slėgiui** ir tuo prisidėti prie fundamentalaus mokslo žinių papildymo apie baltymų ir jų jungimosi su slopikliais elgseną, esant aukštam slėgiui.

Darbo uždaviniai:

- 1) apžvelgti literatūrinius šaltinius nagrinėjančius darbo temos problematiką;

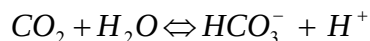
- 2) nustatyti jaučio antrosios karkoanhidrazės (bCAII) lydymosi temperatūros priklausomybę nuo sulfonamidinių slopiklių koncentracijos;
- 3) nustatyti naujai sukurtų bCAII sulfonamidinių slopiklių jungimosi konstantas;
- 4) nustatyti aukšto hidrostatinio slėgio poveikį ANS fluorescencijai;
- 5) nustatyti Hsp90N, CA, ir Hsp90N-radisikolio komplekso lydymosi temperatūrų priklausomybę nuo aukšto slėgio;
- 6) nustatyti metazolamido ir rhCAI jungimosi konstantos priklausomybę nuo aukšto slėgio;
- 7) pabandyti nustatyti Hsp90N ir CA slėginę išsisukimo tranziciją;
- 8) patyrinėti CA slėginės išsisukimo tranzicijos priklausomybę nuo acetazolamido.
- 9) patyrinėti Hsp90N slėginės išsisukimo tranzicijos priklausomybę nuo GuanCl.

2. LITERATŪROS APŽVALGA

2.1 CA apžvalga, reakcinis centras ir slopikliai

2.1.1 Bendra karboanhidrazių apžvalga

Karboanhidrazės (CA) yra plačiai paplitę fermentai katalizuojantys grįžtamąją, anglies dvideginio virtimą angliarūgšte, reakciją:



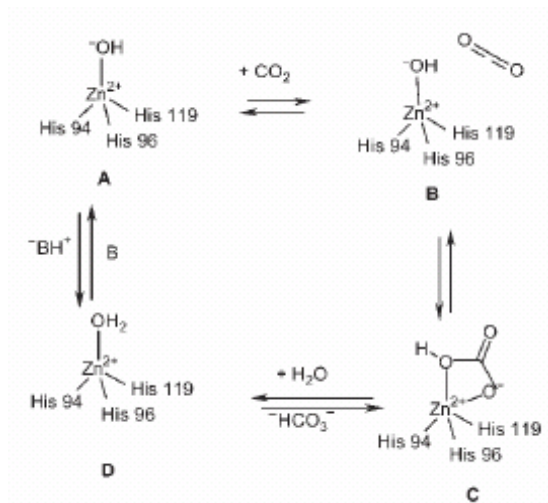
Ši reakcija svarbi vykdant kvėpavimą, elektrolitų išskyrimui į audinius ir organus, pH reguliavimui ir homeostazės palaikymui, CO₂ fiksavimui augaluose. Karboanhidrazės dalyvauja metabolitų sintezės reakcijose: gliukoneogenezėje, lipogenezėje, šlapalo sintezėje, reguliuoja kalcio apykaitą kauluose, inicijuoja arba stabdo vėžinių ląstelių susidarymą (stuburiniuose) ir k.t. (Hewett-Emmett 2000).

Pagal struktūrą karboanhidrazės skirstomos į šeimas: α-CA (esanti gyvūnuose), β-CA (randama kai kuriuose bakterijose, dumbliuose ir augaluose), γ-CA (buvo rasta metanogeninėje archeobakterijoje *Methanosarcina thermophila*), δ-CA (aptikta juriniame diatominiame dumblyje *Thalassiosira weissflogii*). Žinduoliuose randamos keturiolika α-CA izoformų. Vienos lokalizuotos citozolyje (CA I CA II, CAIII, CA VII, CAXIII), kitos membranoje (CA IV, CA IX, CA XII, CA XIV), CA V aptikta mitochondrijose, CA VI išskiriama su seilėmis ir pienu, ir trys likusiosios (CARP VIII, CARP X, CARP XI) žinomos kaip fermentai giminingi CA (Pastorekova, Parkkila et al. 2004).

2.1.2 α-CA reakcinio centro struktūra ir katalizuojamos reakcijos mechanizmas

α-CA turi vieną reakcinį centrą, kuriame yra Zn (II) jonas, būtinas katalizės reakcijai. Rentgeno spindulių difrakcijos kristalografiniais duomenimis, nustatyta, jog Zn (II) koordinuotas trimis His liekanomis (His 94, His 96, His 119) ir vandens molekule arba hidroksilo jonu (1 pav.). Prie cinko prisijungęs vanduo vandeniliniais ryšiais sąveikauja su Trp 199 Oγ, o pastarasis sudaro vandenilinius ryšius su Glu 106 karboksilo grupe. Toks aminorūgščių liekanų erdvinis išsidėstymas ir vandenilinių ryšių tinklas bei Zn jono koordinacija sustiprina aktyviame centre esančios vandens molekulės nukleofilškumą, tai pat padeda orientuoti substratą (CO₂) į reakcijos centrą. Aktyvi CA forma yra su prisijungusiu prie cinko hidroksilo jonu (1 pav. A). CO₂ molekulė patekusi į reakcijos centrą prisijungia prie hidroksilo jono, susidarant vandenilio

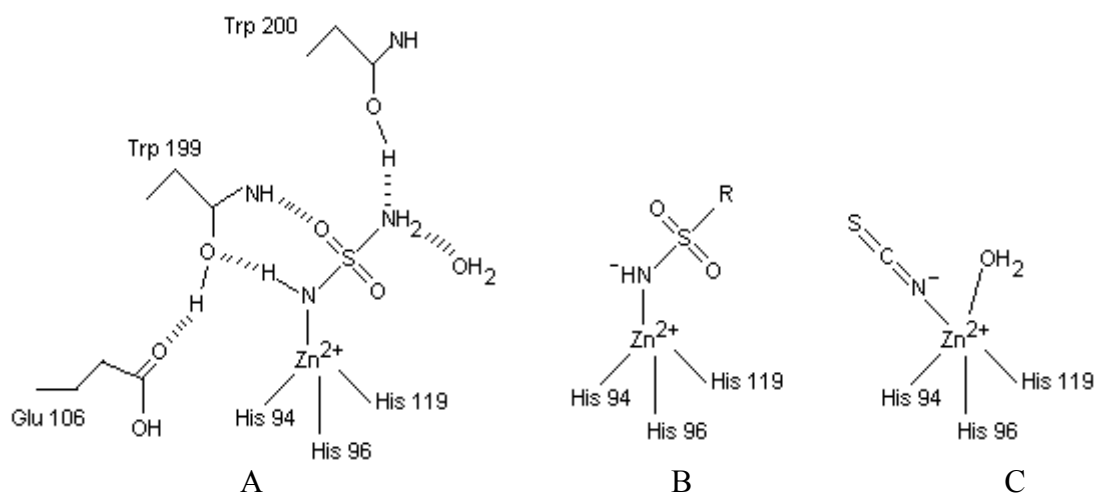
bikarbonatui, kuris prisijungęs prie cinko jono (1 pav. C). Prie cinko jono prisijungus vandens molekulei vandenilio bikarbonatas atskyja, susidarant neaktyviai, rūgštinei baltymo formai (1 pav. D). Nuo prisijungusios vandens molekulės atskilus vandenilio jonui, fermentas vėl tampa aktyvus (Briganti, Mangani et al. 1997; Kim, Whittington et al. 2002; Supuran, Scozzafava et al. 2003)



1 pav. Karboanhidrazės katalizuojamos reakcijos mechanizmo struktūrinė schema (Lindskog, et al., 2000).

Išskiriamos dvi CA inhibitorių klasės: sudėtiniai metalų anijonai ir nepakeičiamieji sulfonamidai. Inhibitoriai jungiasi prie CA Zn (II) jono pakeisdami hidroksilo joną ir formuodami keturnarį junginį su Zn (II) (tetraedrinė Zn (II) jono geometrija) arba jungiasi papildomu ryšiu su Zn (II) jonu formuodami penktąją jungtį (penkianarė Zn(II) jono geometrija). Svarbiausi CA inhibitoriai – sulfonamidai, su cinko jonu jungiasi pakeisdami hidroksilo joną ir formuodami tetraedrinę Zn(II) jono geometriją (2pav. B). Anijonai gali jungtis prie Zn(II) jono pakeisdami hidroksilo joną arba formuodami penktąjį ryšį (sudaroma penkianarė Zn(II) struktūra), kaip antai tiocianato jungimasis (2 pav.C).

Rengeno spindulių difrakcijos metodu nustatytos CA I, CA II, CA IV kompleksuose su įvairiais sulfonamidais struktūros (Abbate, Supuran et al. 2002). Visi tirti sulfonamidai NH galu jungiasi su Zn (II) jonu ir tuo pat metu sudaro vandenilinių ryšių su Trp 199 deguonimi (O_γ), kuris kitoje plokštumoje vandeniliniu ryšiu prisijungęs prie Glu 106 karboksi grupės. Vienas deguonies atomas iš sulfonamido SO₂NH dalies sudaro vandenilinių ryšių su Trp 199 esančia NH dalimi (2 pav. A). Taigi, didelis sulfonamidų giminingumas karboanhidrazėms aiškinamas anksčiau minėtų ryšių aktyviajame centre sudarymu.



2 pav. (A) Schematiškai pavaizduotas sulfonamido (monoanijono) jungimasis hCAII aktyviajame centre. (B) Prisijungus sulfonamidui, Zn (II) jonas aktyviajame centre yra kordinuotas keturiomis jungtimis. (C) Prisijungus tiocianatui Zn (II) jonas koordinuotas penkiomis jungtimis (Lindahl, et al, 1991).

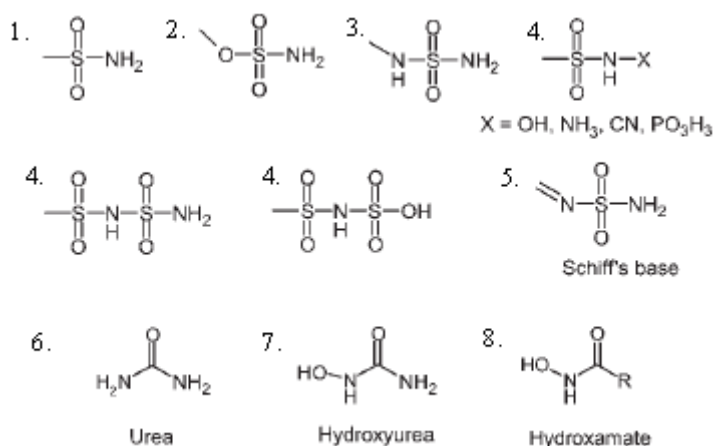
2.1.4CA inhibitorių struktūra ir kūrimo principai

Dažniausiai, CA inhibitorių galima išskaidyti į kelias struktūrines dalis: 1) cheminę grupę, kuri jungiasi prie cinko jono (ZBG) ir sudaro vandenilinį ryšį su Trp 199 ir Glu 106 esančiais aktyviame centre, 2) „griaučiai“ (kartais, naujai kuriamuose junginiuose, šios dalies gali nebūti, pav., trifluorbenzensulfonamidas), dažniausiai sudaryti iš aromatinio ar heterociklinio žiedo, 3) hidrofilinė „uodega“, prisijungusi prie „griaučių“ (aromatinio/heterociklinio žiedo). Šie struktūriniai elementai užtikrina efektyvią sąveiką tiek su hidrofilinėmis, tiek su hidrofobinėmis CA aktyvaus centro dalimis (Supuran, Scozzafava et al. 2003).

Iki šiol sintetinti inhibitoriai, su sulfonamido, sulfamato, sulfamido, sudėtinio sulfonamido, Šifo bazės, urėjos, hidroksiurėjos, hidroksimato prie cinko besijungiančiomis grupėmis (3 pav.).

Nauji CA sulfonamidiniai slopikliai yra kuriami remiantis dviem principais: „žiedo“ ir „uodegos“ (Clare and Supuran 1994) 1) „Žiedo“ principas – skirtingos struktūros aromatiniai ir/arba heterocikliniai žiedai jungiami prie cheminės grupės, kuri jungiasi su cinko jono, ir tiriama jų įtaka CA-ligando sąveikos giminingumui. Šiuo principu buvo sukurti dorzolamidas ir brinzolamidas, bei keletas junginių, mažinančių akies vidinį spaudimą, tačiau dauguma jų pasižymėjo alerginėmis savybėmis. 2) „Uodegos“ principo esmė, yra tirti, kaip keičiasi inhibitoriaus giminingumas baltymui, prijungus prie inhibitoriaus „griaučių“, kurių giminingumas baltymui gerai ištirtas, hidrofilinę „uodegą“. Derinant pastovios struktūros

„uodegą“ su skirtingais aromatiniais/heterocikliniais žiedais arba skirtingas „uodegas“ su pastovios struktūros žiedais, galima sukurti daugiau įvairių junginių nei žiedo principu. Tokiu principu sukurti junginiai, kol kas dar nėra naudojami kaip vaistai medicinoje, bet pasižymi daug stipresniu antigliaukominiu poveikiu nei dabartiniai vaistai (dorzolamidas, brinzolamidas) mažinantys padidėjusį vidinį akies spaudimą (Supuran, Scozzafava et al. 2003).

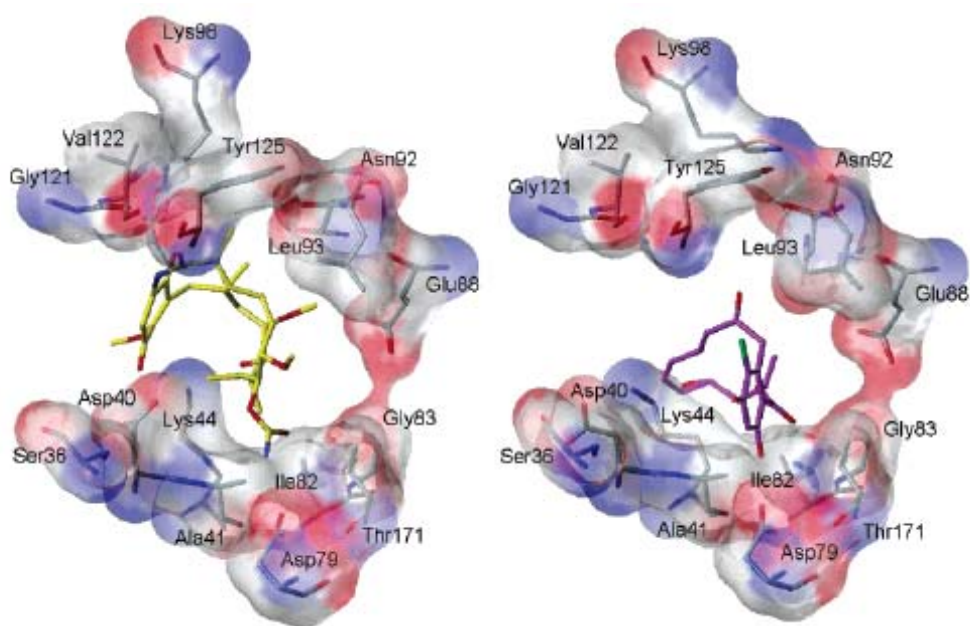


3 pav. Prie cinko besijungenčios grupės: sulfonamido (1), sulfamato (2), sulfamido (3), sudėtinio sulfonamido (4), Šifo bazė (5), urėja (6), hidroksiurėja (7) hidroksimatas (8) (Supuran, Scozzafava et al. 2003)

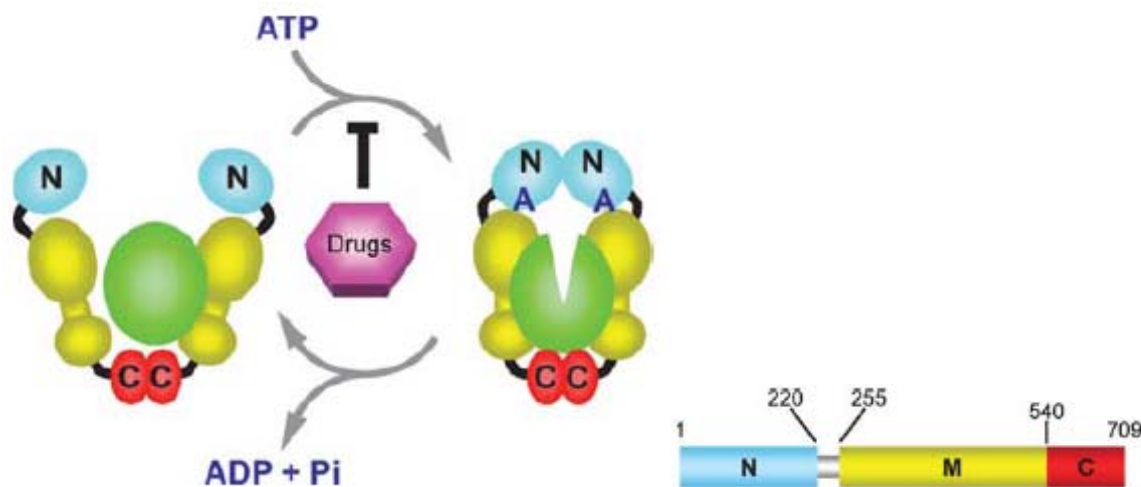
2.2 Hsp90 struktūra, funkcijos, ir slopikliai

Karščio šoko baltymas 90 (Hsp90, angl., heat shock protein 90) yra 90kDa šaperonas, apsaugantis naujai ekspresuotus baltymus „klientus“ nuo klaidingo susisukimo, agregacijos ir tarpusavio sąveikos. Normaliomis sąlygomis Hsp90 sudaro 1-2% ląstelėje esančių baltymų, tačiau streso sąlygomis, jų kiekis padvigubėja. Padidėjusi šių baltymų ekspresija audiniuose, kurie atakuojami karščiu, sunkiaisiais metalais, padidėjusiu rūgštingumu, deguonies trūkumu, padidina ląstelių išlikimą. Hsp90 padeda išlikti ne tik sveikom bet ir piktybinėm (vėžinėm) ląstelėm. Hsp90 vėžinėse ląstelėse pasižymi dideliu ATP- aziniu aktyvumu. Spejama, jog tai dėl baltymų susirinkimo į multimerinius darinius. Hsp90 yra būtinas eukariotinėse ląstelėse, kuomet E coli šis šaperonas nėra gyvybiškai svarbus.

Citoplazmoje Hsp90 yra homodimeras, sudarytas iš tridomeninių monomerų: N - galinio, vidurinio ir C - galinio (4 pav.). Vidurinis domenas atsakingas už košaperonų, ir baltymų „klientų“ jungimąsi, bei N- galiniame domene esančios, ATP- azės aktyvinimu. C – galinis domenas atsakingas už Hsp90 dimerizaciją, prie jo jungiasi košaperonai. N-galinis domenas pasižymi ATP –aziniu aktyvumu ir košaperoninų jungimusi. Jis turi specifinį ATP jungimosi centrą prie kurio gali jungtis struktūriškai nepanašūs natūralūs: geldanamycinas ir radisikolis, pusiau sintetiniai ir sintetiniai junginiai (4 pav.). Šios medžiagos jungdamosios stipriau nei natūralūs nukleotidai, sustabdo ATP jungimąsi ir tokiu būdu keičia natūralias baltymo funkcijas. ATP jungiantis prie Hsp90 įvyksta molekulės konformacijos pokyčiai, kurių metu yra aktyvuojamas „kliento“ baltymas, o prisijungę slopikliai, kurie žinomi kaip vaistai vėžio gydymui, stabdo šią funkciją (5 pav.) ir baltymai „klientai“ (kinazės, transkripcijos faktoriai, telomerazės, helikazės) (Jackson, Queitsch et al. 2004) lieka neaktyvūs, negalėdami atlikti ląstelėje jiems skirtos funkcijos (Pearl and Prodromou 2006). Hsp90 vėžinėse ląstelėse pasižymi 100 kart stipresniu jungimusi su slopikliais nei sveikose ląstelėse, tad Hsp90 reikšmė piktybinei ląstelei išgyventi - gerokai didesnė, nei sveikose ląstelėse. Dėl pastarųjų priežasčių Hsp90 yra puikus priešvėžinių vaistų taikiny (Kim, Felts et al. 2004). Vienas iš klinikoje taikomų vaistų, gydant antros stadijos piktybinę melanomą, yra 17AAG (17-alilamin-17-dimetilamino geldanamycinas) yra taikomas klinikoje, Kiti Hsp90 slopikliai yra kuriami ir bandomi laboratorijose.



4 pav. Geldanamycinas (kairėje) ir radisikolis (dešinėje) Hsp90N specifiniame ATP jungimosi centre (Shen, Wang et al. 2006).

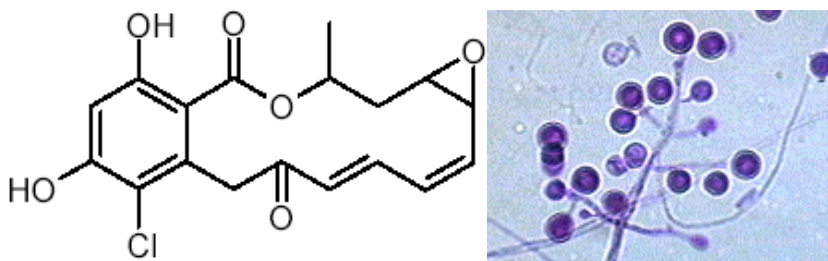


5 pav. Hsp90 monomero struktūrinė shema (dešinėje). Hsp90 monodimeras sudarytas iš N-galinio, vidurinio (M) ir C galinio domenu. Struktūrinė Hsp90 dimero konformacijos schema (kairėje), vykstant ATP, baltymo „kliento“ (žalias pailgas apskritimas, per vidurį) ir vaistų prisijungimui. Prisijungus ATP, Hsp90 aktyvuoja „kliento“ baltymą. Cheminiai junginiai, kaip geldanamycinas, radisikolis, užima ATP jungimosi centrą ir baltymas „klientas“ neaktyvuojamas. (Pearl and Prodromou 2006)

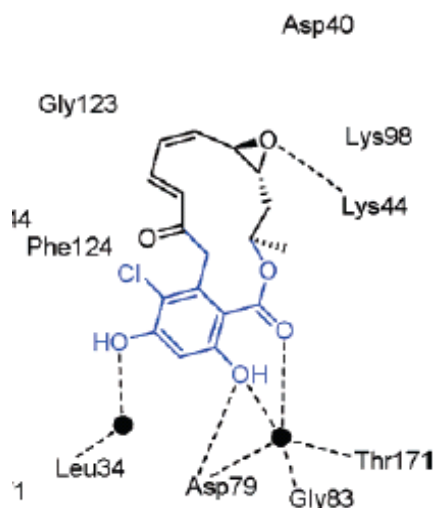
2.2.1 Radisikolis ir jo jungimasis su Hsp90

Radisikolis (monordenas) yra makrolaktoninis antibiotikas gaunamas iš *Humicola fuscoatra* arba *Diheterospora chlamydosporia* (6 pav.). Jis pasižymi specifiniu jungimusi prie Hsp90 ir yra potencialiausias Hsp90 slopiklis. Hsp90- radisikolio išspresta kristalinė struktūra parodė, radisikolio jungimąsi N – galineme domene, specifiniame ATP jungimosi centre (6 pav.). Izoterminiu titravimo kalorimetru nustatyta, jog radisikolio jungimasis su pilnu mielių Hsp90 yra silpnesnis ($K_d = 19$ nM), nei su atskirai ekspresuotu N – galiniu domenu ($K_d = 2.7$ nM) (Roe, Prodromou et al. 1999). Mark Roe et al pabrėžė, jog ITC metodu radisikolio jungimasis prie N – galinio domeno yra per stiprus, tiksliai jungimuisi nustatyti. Radisikolio ir Hsp90 jungimosi stehipmetrija: 1:1.

Radisikolis, kaip vaistas vėžio gydymui nėra tinkamas, nes gyvame organizme veikiančios sistemos paverčia jį mažai aktyviu arba neaktyviu junginiu. Tačiau kai kurie sintetiniai, iš radisikolio gauti junginiai, pasižymi nanomoliniu jungimusi in vitro ir in vivo. (Chaudhury, Welch et al. 2006)



6 pav. Radisikolio struktūrinė formulė (kairėje) ir organizmas (*Humicola fuscoatra*) iš kurio išskiriamas radisikolis (dešinėje)



7 pav. Radisikolio vandenilinių ryšių sudarymas su Hsp90N jungimosi centre esančiomis amino rūgštimis (Shen, Wang et al. 2006).

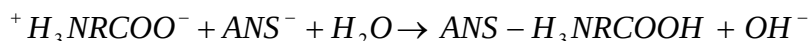
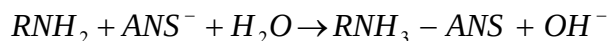
2.3 ANS jungimasis ir fluorescencija

ANS (8-anilino-1-naftaleno sulfonatas) yra fluorescencinis dažas, naudojamas baltymų ir biologinių membranų tyrimuose. Kalorimetriniu metodu buvo nustatyta, jog ANS jungiasi prie baltymo katijoninių grupių (His, Arg, Lys) sudarydami jonų poras. ANS anijonai prie baltimų jungiasi dviem būdais: 1) aplinkoje, kurioje nėra arba beveik nėra vandens (intensyvi ANS fluorescencija); 2) antruoju būdu prisijungusius ANS anijonus supa vanduo, kuris gesina fluorescenciją, todėl ANS fluorescuoja labai silpnai (Matulis and Lovrien 1998).

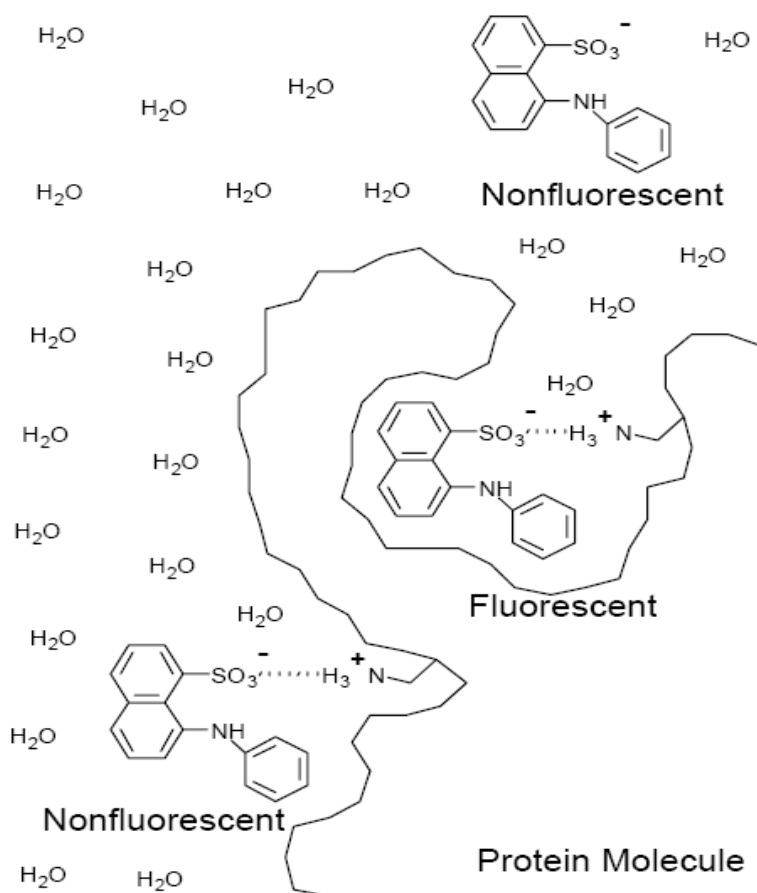
Kalorimetriškai buvo nustatytas, ANS jungimasis prie jaučio kraujo serumo albumino (BSA), kuris labai panašus į vėliau nustatytą, bet nepublikuotą ANS jungimąsi prie bCAII. BSA turi 100 ANS prisijungimo centrų, iš kurių 5 apsupti hidrofobinės aplinkos ir 95 – vandens. Aplinkos dielektrinė skvarba, įtakoja ANS prisijungimo greitį. ANS prisijungimo greitis didžiausias hidrofobinėje terpėje (ten dielektrinė skvarba maža), o vandeninėje (didesnė)

dielektrine skvarba) -mažesnis. Kintant terpės, pH nuo 4 iki 2, baltyme padidėja atitinkamai nuo 4 iki 12 ANS jungimosi centrų, kuriuos supa hidrofobinė aplinka. Dėl šios priežasties tirpalo, fluorescencija išauga.

ANS anijonai, prisijungę antruoju būdu, veikia kaip matricą formuojantys ir baltymą apsaugantys junginiai, ir vadinami matriciniais ligandais. Šie ligandai pasižymi stipriu jungimusi, kuris sukelia baltymo konformacinius pokyčius ir apsaugą. Matriciniai ligandai prisijungę prie baltymo sukelia terpės pH padidėjimą, todėl padidėja baltymo lydymosi temperatūra. Minėtas pH padidėjimas įvyksta, dėl ANS anijonų prisijungimo prie baltymo teigiamai įkrautų šoninių grandinių arba karboksilo grupių protonizacijos. Vykstant šiems procesams, yra hidrolizuojama vandens molekulė:



Baltymo molekulė, stengdamasi neutralizuoti sutrikdytą krūvių pusiausvyrą, iš hidrolizuoto vandens prisijungia protonų, bet nepaisant to, baltymas lieka įkrautas neigiamai, nes vandenilio jonų prisijungia per pus mažiau nei ANS anijonų. Sumažėjus elektrostatiniai stūmos jėgai tarp teigiamų krūvių, molekulė susitraukia.



8 pav. Du ANS prisijungimo prie baltymo būdai. Prisijungęs ANS gali fluorescuoti arba ne fluorescuoti. Fluorescenciją nulemia terpė supanti anilino naftaleno grupę. Jei šią grupę supa vanduo, tai ANS beveik ne fluorescuoja, jei hidrofobinė terpė, tai ANS fluorescencija intensyvi (Matulis, Baumann et al. 1999).

2.4 Baltymų temperatūrinis stabilumas, T_m ir ligandų jungimasis

2.4.1 Baltymų temperatūrinis stabilumas ir T_m

Tiriant baltymų temperatūrinį stabilumą, didinant temperatūrą, matuojami baltymo struktūrą įtakojantys parametrai. Temperatūra visiškai denatūravus baltymą, iš užfiksuotos tranzicijos yra nustatoma lydymosi temperatūra (T_m). Esant šiai temperatūrai, baltymo išsisukimo grįžtamoji reakcija yra pusiausvyrinėje būsenoje, kurioje natyvių ir išsisukusių baltymų struktūrų, laisvosios energijos yra lygios ($\Delta G = G_U - G_F = 0$, čia G_U- išsisukusio ir G_F - susisukusio baltymų laisvosios energijos).

Baltymo lydymosi temperatūros nustatymui yra sukurta nemažai metodų (kalorimetriniai, optiniai). Vienas iš optinių T_m nustatymo metodų yra fluorescencinis. Šiuo metodu yra matuojamas baltymo temperatūrinis stabilumas stebint triptofano arba prikabinėtų dažų (pvz. ANS) fluorescenciją.

Stebima fluorescencija gali būti apibūdinamas lygtimi:

$$y(T) = y_F + \frac{y_U - y_F}{1 + e^{-\Delta_U G(T)/RT}} = y_U + \frac{y_F - y_U}{1 + e^{-\Delta_U G(T)/RT}} \quad (1)$$

Čia y_F ir y_U yra, atitinkamai, natyvaus ir denatūravusio baltymo fluorescencijos intensyvumai. Eksponentė rodo tikimybę, baltymui denatūruoti, esant laisvajai energijai $\Delta_U G(T)$. Pradinis ir galutinis fluorescencijos intensyvumai, gali būti išreiškiami tiesinėmis priklausomybėmis:

$$y_{F(T)} = y_{F, T_m} + m_F (T - T_m) \quad (2)$$

$$y_{U(T)} = y_{U, T_m} + m_U (T - T_m) \quad (3)$$

Čia y_{F(T_m)} ir y_{U(T_m)} yra ANS fluorescencija, atitinkamai, prisijungusio prie natyvaus ir denatūravusio baltymo, lydymosi temperatūros taške; m_U ir m_F, atitinkamai, denatūravusio ir natyvaus baltymo fluorescencijos koeficientai priklausantys nuo tiesinės temperatūros (jų pokytis keičia tiesių y_{F(T)} ir y_{U(T)} pokrypį kampą).

Baltymo išsisukimo laisvosios energijos pokytis, kaip temperatūros funkcija ($\Delta_U G(T)$), gali būti išreikšta per išsisukimo entalpijos ($\Delta_U H_{Tr}$), entropijos ($\Delta_U S_{Tr}$) ir šiluminės talpos ($\Delta_U C_p$) pokyčius:

$$\Delta_U G(T) = \Delta_U H_{(T)} - T \Delta_U S_{(T)} = \Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T \left(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln \left(\frac{T}{T_r} \right) \right) \quad (4)$$

Čia T_r yra baltymo lydymosi temperatūra (T_m), kai nėra prisijungusio ligando, T -absoliutinė temperatūra. Pateiktoje lygtyje tariama, jog šiluminė talpa, esant mažam temperatūriniam pokyčiui, nepakinta. Baltymui išsisukant, temperatūriniame taške T_m , $\Delta_U G_{Tr}=0$. Tuomet entropija ir entalpija baltymui išsisukant yra susietos lygybe:

$$\Delta_U H_{Tr} = T \Delta_U S_{Tr} \quad (5)$$

Pastaroji lygybė teisinga, kai fiksuojame lydymosi temperatūrą nesant ligandui, todėl negalime taikyti šios lygybės norint supaprastinti lygtis, išreiškiančias baltymo temperatūrinį stabilumą.

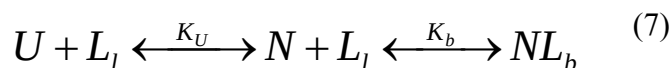
Iš 1-4 lygčių galima sudaryti fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros funkciją:

$$y_{(T)} = y_{F,T_m} + m_F (T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{F,T_m} + (m_U + m_F)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T(\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r)))}{RT}}} \quad (6)$$

Ši lygtis naudojama eksperimentinių duomenų parametrų nustatymui. Naudojant Levenberg-Marquardt algoritimą, kvadratų sumai minimizuoti, nustatomi šeši eksperimentinių duomenų (6) parametrai (y_{F,T_m} , m_F , y_{U,T_m} , $\Delta_U H_{Tr}$, T_m). (Matulis, Kranz et al. 2005) Ligandų jungimasis

Klasikinis metodas nustatyti ligandų jungimosi giminingumą yra tiriant jų poveikį baltymų stabilumui, veikiant denatūraciją sukeliančiais cheminiais junginiais arba aukšta temperatūra. Šis būdas tirti baltymų stabilumą yra patogus dėl pakankamai gerai ištirto cheminės ir terminės baltymų denatūracijos reiškinių, kuriam sukurta daugybė vykstančių procesų aiškinančių modelių. Surinktus duomenis galima nagrinėti reakcijų pusiausvyros ar kinetikos aspektais.

Prie natyvaus baltymo prisijunę ligandai, paslenka grįžtamosios denatūravusio-natyvaus baltymo reakcijos pusiausvyrą natyvaus baltymo susidarymo kryptimi:



Čia U - denatūravusi, N - natyvi baltymo formos, L_l – laisvas ligandas ir NL_b - baltymo-ligando kompleksas.

Baltymo stabilumą galima išreikšti laisvosios energijos pokyčiu, susidedančiu iš stabilumo nesant ligando ($\Delta_U G_{(T)}$) ir papildomos stabilizavimo laisvosios energijos ($\Delta_B G_{(T)}$), dėl prisijungusio ligando, kurią galima išreikšti per jungimosi konstantą K_b ir ligando koncentraciją $[L_f]$:

$$\Delta G_{(T)} = \Delta_U G_{(T)} + \Delta_B G_{(T)} = \Delta_U G_{(T)} + RT \ln(1 + K_b [L_f]) \quad (8)$$

Reiktų paminėti, jog $\Delta G_{(T)} = 0$, kai $T = T_m$, tuomet $\Delta_U G_{(T)} = -RT \ln(1 + K_b [L_f])$.

Pusiausvyros konstantas, kurios nusako baltymo stabilumą ir ligando jungimąsi, pavaizduotas (7) lygtyje, galima išreikšti laisvosiomis energijomis:

$$K_u = \frac{[U]}{[N]} = e^{\frac{-\Delta_U G_{(T)}}{RT}} = e^{-(\Delta_U H_{(T)} - T\Delta_U S_{(T)})/RT} = e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r)))/RT} \quad (9)$$

$$K_b = \frac{[NL_b]}{[N][L]} = e^{\frac{-\Delta_b G_{(T)}}{RT}} = e^{-(\Delta_b H_{(T)} - T\Delta_b S_{(T)})/RT} = e^{-(\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T(\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln(T/T_0)))/RT} \quad (10)$$

Čia $\Delta_U G_{(T)}$, $\Delta_U H_{(T)}$, $\Delta_U S_{(T)}$ ir $\Delta_U C_p$, atitinkamai, baltymo stabilumą lemiančios Gibso laisvosios energijos, entalpijos, entropijos funkcijos ir baltymo šiluminė talpa; $\Delta_b G_{(T)}$, $\Delta_b H_{(T)}$, $\Delta_b S_{(T)}$, $\Delta_b C_p$ atitinkamai, ligando jungimąsi nusakančios Gibso laisvosios energijos, entalpijos, entropijos funkcijų ir šiluminė talpos pokyčiai, prisijungus ligandui.

Suminius, minėtose reakcijose dalyvaujančius, baltymo (P_t) ir ligando (L_t) kiekius galima išreikšti lygybėmis:

$$P_t = [N] + [U] + [NL_b] \quad (11)$$

$$L_t = [L_f] + [NL_b] \quad (12)$$

Naudojantis 11, 12, 9 ir 10 lygtimis, galima išreikšti bendrą ligando koncentraciją:

$$L_t = (1 - K_u) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{K_u K_b} \right) \quad (13)$$

Perrašant šią lygtį pasinaudojus 9 ir 10 lygtimis galima išreikšti bendrą ligando koncentraciją reikalingą padidinti baltymo T_m vertę:

$$L_t = \left(1 - e^{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} \right) X \left(\frac{P_t}{2} + e^{-(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} e^{(\Delta_b H_{T0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T (\Delta_b S_{T0} + \Delta_b C_p \ln(T/T_0))) / RT} \right) \quad (14)$$

Kai ligandų jungimasis silpnas, tai $P_t < K_d = K_b^{-1}$, tuomet 14 lygtį galima supaprasti:

$$L_t = \left(1 - e^{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} \right) X \left(e^{(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} e^{(\Delta_b H_{T0} + \Delta_b C_p (T - T_0) - T (\Delta_b S_{T0} + \Delta_b C_p \ln(T/T_0))) / RT} \right) \quad (15)$$

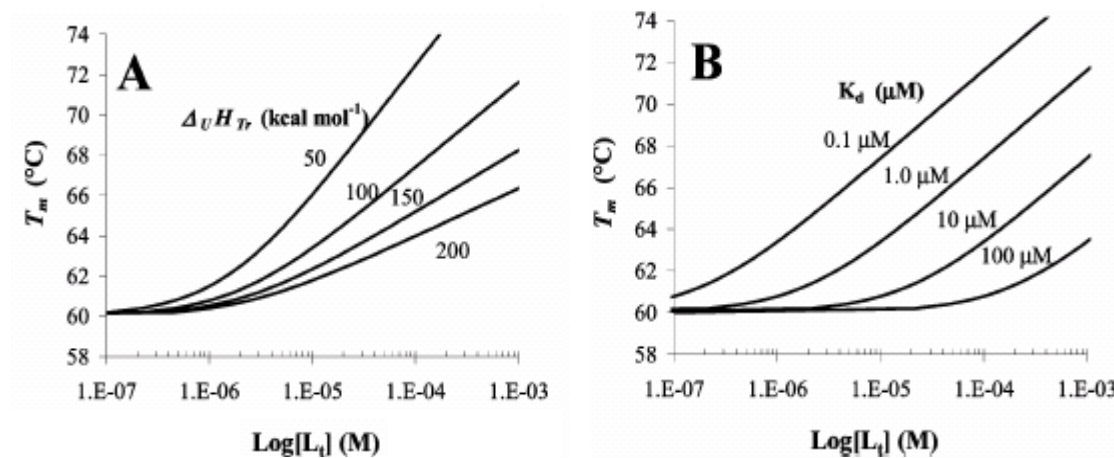
Pateiktos 14 ir 15 lygtys yra transcendentinės, todėl pagal jas negalima tiksliai įvertinti T_m priklausomybės nuo bendros ligando koncentracijos (L_t). Tačiau nepaisant to pagal šias lygtis yra skaičiuojamas L_t ir modeliuojamos T_m priklausomybės nuo L_t kreivės. (Matulis, Kranz et al. 2005)

2.4.2 Ligandų jungimosi modelyje, išsisukimo entalpija ir jungimosi konstanta

Nustatant ligando jungimosi konstantą pagal 14 lygtį, yra labai svarbu žinoti baltymo išsisukimo entalpijos pokutį ($\Delta_U H$), t.y. sunaudotą energiją, reikalingą vienam moliui baltymo molekulių denatūruoti. Skirtingų baltymų $\Delta_U H$ skiriasi. Esant pasirinktai ligando koncentracijai, baltymai su mažesne išsisukimo entalpija ($\Delta_U H$), pasižymi didesniu lydymosi temperatūros (T_m) pokyčiu, nei baltymai su didesne $\Delta_U H$ (10A pav.). Iš baltymo tranzicijos empiriškai galima stebėti ir naudojantis teoriniu modeliu apskaičiuoti (6 lygtis), van Hofo išsisukimo entalpiją, kuri šiek tiek kinta nuo ligando koncentracijos. Daugelio baltymų išsisukimas yra negrįžtamas, todėl pagal 6 lygtį apskaičiuotas van't Hofo entalpijos pokytis yra nepatikimas, tad išsisukimo entalpijos pokytį reiktų nustatyti kalorimetriniu metodu.

10 B paveiksle parodytos pagal 14 lygtį sumodeliuotos kreivės, rodančios T_m priklausomybę nuo ligando koncentracijos, esant skirtingoms jungimosi konstantoms K_b ($K_b = 1/K_d$) arba kitaip tariant skirtingiems ligandams. Pastebėta, jog skirtingiems ligandams jungiantis su tuo pačiu baltymu (kai ligando koncentracija didesnė nei disociacijos konstanta K_d), lydymosi temperatūra, priklausanti nuo ligando koncentracijos, didėja labai panašiai (10 B pav.). Šis modelis

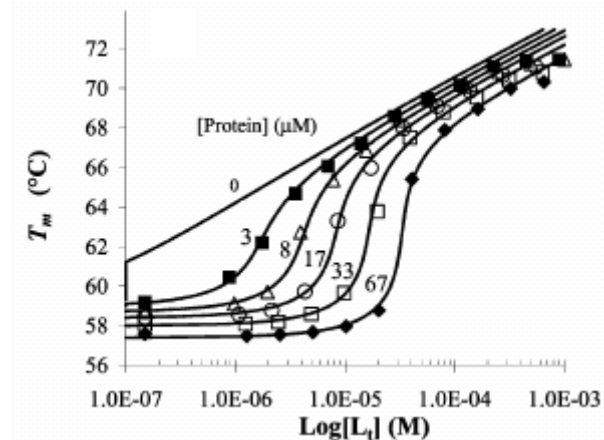
naudojamas, kai baltymas nėra prisotintas ligando, t.y. kai didinant ligando koncentraciją, T_m didėja. (Matulis, Kranz et al. 2005)



5 pav. Ligando įtaka T_m vertei, (A) esant skirtingoms išsisukimo entalpijoms, (B)

2.4.3 Baltymų - ligandų jungimosi stochiometrija

Jungiantis TFMSA (trifluormetansulfonamidas) prie hCAI, galima nustatyti jungimosi stochiometriją. Nagrinėjant jungimosi kreives (11 pav.), galima išskirti tris skirtingas pasirinktos kreivės atkarpas: 1) priešstochiometrinė, kai ligando koncentracija mažesnė už baltymo, 2) kai ligando koncentracija apytiksliai lygi baltymo koncentracijai, ir 3) kai ligando koncentracija didesnė už baltymo. Pirmojoje atkarpoje pastebimas labai mažas T_m pokytis. Kai ligando koncentracija apytiksliai lygi baltymo koncentracijai ($0.2[\text{baltymo}] < [\text{ligando}] < 5[\text{baltymo}]$), pastebimas staigus sigmoidinis T_m pokytis. Kai ligando koncentracija yra daug didesnė nei



6. pav. T_m priklausomybė nuo ligando (trifluormetansulfonamido) koncentracijos (L_t) esant atitinkamoms hCAI baltymo koncentracijoms: $3\mu\text{M}$ (■), $8\mu\text{M}$ (○), $17\mu\text{M}$ (○), $33\mu\text{M}$ (□), $67\mu\text{M}$ (○). (Matulis, Kranz et al. 2005)

baltymo, T_m didėja lėtai. Nesant ligando, didėjant baltymo koncentracijai, T_m mažėja. Šis reiškinys įvyksta dėl hCAI išsisukimo reakcijos negrįžtamumo ir agregacijos. Nagrinėjant minėtų priklausomybių tarp ligando ir baltymo koncentracijų skirtumus, galima įvertinti jungimosi stochiometriją. TFMSA (trifluormetansulfonamido) jungimosi su hCAI arba bCAII jungimosi stochiometrija 1:1. Reiktų paminėti, jog su silpnai besijungiančiais ligandais (acetazolamidas, metazolamidas, sulfonilamidas) jungimosi stochiometrijos nustatyti negalima, nes T_m priklausomybės nuo ligando koncentracijos kreivės nepasižymi sigmoidiškumu. (Matulis, Kranz et al. 2005).

2.5 Aukšto hidrostatinio slėgio poveikis baltymams

2.5.1 Tūrio pokyčiai denatūruojant baltymus

Dėl aukštos temperatūros, vykstant baltymo išsisukimo virsmams, tūrio pokyčiai, esant atmosferos slėgiui, gali būti teigiami arba neigiami. Slėgiu denatūruojant globulinius baltymus, tūrio pokyčiai visad yra neigiami. Šis pastebėjimas atspindi Le Chatelier principą ir nuostatą, jog baltymai veikiami aukštu slėgiu denatūruoja tuomet, kai denatūravusi jų forma užima mažesnę tūrį, nei natyvi (Chalikian 2003).

Dalinis tirpinio molekulių ar jonų molinis tūris, V_i , apibūdinamas, kaip tirpalo tūrio pokytis, dėl pridėtos tirpinamos medžiagos, kai kiti sistemos parametrai (slėgis, temperatūra ir k.t.) nekinta.

Jis išreiškiamas lygybe:

$$V_i = \left(\frac{\partial V}{\partial n_i} \right)_{n_j, p, T} \quad (16)$$

Čia V - tirpalo tūris, n_i – tirpinio kiekis moliais. V_i nėra lygus molekulių ar atskirų jonų tūriui, kurie nesąveikauja su tirpiniu. V_i sudaro trys tūrių dedamosios:

$$V_i = V_{\text{atomų}} + V_{\text{ertmių}} + \Delta V_{\text{hidratacijos}} \quad (17)$$

$\Delta V_{\text{hidratacijos}}$ yra tirpalo tūrio pokytis, atsirandantis dėl tirpinio (pvz. baltymo molekulių) sąveikos su tirpikliu.

Tirpalą veikiant slėgiu arba temperatūra, V_{atomo} nekinta, todėl tirpalo suspaudžiamumas ir plėtimasis priklauso nuo $V_{\text{ertmių}}$ ir $\Delta V_{\text{hidratacijos}}$. Kiekvieno iš pastarųjų narių indelį į suspaudžiamumo koeficiento reikšmę sunku įvertinti, todėl daromos prielaidos, kurias sunku patikrinti eksperimentiškai (Heremans and Smeller 1998). Ultragarsiniu tyrimo metodu yra

nustatomas pilnas molinis tūris, kuomet kitais metodais (spektroskopiniais, BMR, X- spindulių kristalografija) galima nustatyti tik lokalius, įvykstančius baltymo viduje, tūrio pokyčius.

Baltymo tirpalą veikiant slėgiu, tūrio pokytis atsiranda, dėl molekulėse esančių vidinių ertmių.

Šis tūrio pokytis yra gana mažas, siekiantis apytiksliai 1% viso baltymo tūrio.

Ekspimentais su stafilokoko nukleazės mutantais buvo parodyta, jog aktyvacijos ir pusiausvyros tūrių pokyčiai nepriklauso nuo GuanCl koncentracijos.

2.5.2 Suspaudžiamumas

Vienas iš svarbių parametrų apibūdinčių tiriamos terpės savybes yra jos suspaudžiamumas.

Bendruoju atveju jis apibūdinamas kaip tūrio pokytis, dėl pakitusio slėgio (Heremans and Smeller 1998):

$$\beta = -\frac{1}{V_i} \left(\frac{\partial V_i}{\partial p} \right) \quad (18)$$

Tiriamos sistemos apibūdinamos adiabatiniu ir izoterminiu suspaudžiamumais (Chalikian 2003).

Atliekant skysčio (tirpalo, tirpiklio) tankio (ρ) ir ultragarso greičio (U) matavimus, adiabatini suspaudžiamumą (β_s) galima nustatyti, naudojant Niutono-Laplaso lygtį:

$$\beta_s = \rho^{-1} U^{-2} \quad (19)$$

Izoterminis suspaudžiamumas (β_T) gali būti apskaičiuojamas pagal šią priklausomybę:

$$\beta_T = \beta_s + \frac{\alpha^2 T}{\rho C_p} \quad (20)$$

Čia α - temperatūrinio plėtimosi koeficientas, ρ – tankis, C_p – šiluminė talpa.

Baltymai tirpiklyje gali būti apibūdinami daliniu moliniu (K°) ir specifiniu daliniu moliniu (k°) suspaudžiamumais.

Dalinis molinis adiabatinis suspaudžiamumas (K_s°) gali būti nustatomas

skirtinguose tirpaluose, matuojant jų tankį ir ultragarso greitį. Žinant K_s° galima apskaičiuoti

dalinį molinį izoterminį suspaudžiamumą K_T° (Chalikian 2003). Izoterminio suspaudžiamumo

pokytį (ΔK_T), susijusi su slėgio įtakojama tranzicija, galima nustatyti ne tik iš tankio ir garso

greičio matavimo, bet ir iš spektroskopinių duomenų (Heremans and Smeller 1998) (Prehoda,

Mooberry et al. 1998). Spektroskopiniai metodai (pvz. liuminescenciniai) leidžia įvertinti

suspaudžiamumą baltymo viduje, kuris yra skirtingas nei nustatytas ultragarsiniais metodais.

Liuminescenciniais metodais yra matuojami atstumo pokyčiai, tarp baltymo molekulėje esančių atomų. Šie pokyčiai atsiranda, dėl vidinių baltymo ertmių suspaudžiamumo, kuomet ultragarsiniais matavimais aptinkami ne tik vidiniai baltymo plyšiai, bet ir hidratacija (Heremans and Smeller 1998).

Manoma, jog dalinis specifinis adiabatinis suspaudžiamumas, leidžia apibūdinti baltymų tarpines būsenas (Chalikian and Breslauer 1996). Jis sudarytas iš teigiamo baltymo molekulės suspaudžiamumo (k_M) ir neigiamos hidratacijos (k_h) dedamųjų:

$$k_S^o = k_M + k_h \quad (21)$$

Sistemos dedamoji k_M atspindi tirpikliui neprieinamas vidines baltymo ertmes, susidarančias, dėl netobulo baltymų susisukimo. Ji susijusi su vandeniui neprieinamu baltymo tūriu, V_M , ir jo adiabatinio suspaudžiamumo koeficientu, β_M :

$$k_M = \frac{\beta_M V_M}{M} \quad (22)$$

M – baltymo molekulinė masė.

Hidratacijos dedamoji, k_h , parodo suspaudžiamumo sumažėjimą, dėl vandens sąveikos su baltymo paviršiumi:

$$k_h = M^{-1} \sum_i S_{Ai} K_{Si} \quad (23)$$

S_{Ai} – i-tosios a.r. liekanos, tirpalui pasiekiamas paviršiaus plotas;

$K_{Si} - 1 \text{ Å}^2$ ploto i-tosios a.r liekanos suspaudžiamumas;

Globuliniams baltymams, $\sum_i S_{Ai} K_{Si}$ narys yra neigiamas, o atskirų a.r liekanų K_{Si} ženklas priklauso nuo eksperimento sąlygų ir tiriamo a.r liekanos tipo. (Chalikian and Breslauer 1996)

2.5.3 Metastabilios būsenos formavimasis, veikiant baltymus slėgiu

Veikiant baltymą slėgiu, galima stebėti išsisukančio baltymo tarpines, metastabiles būsenas, kurių negalima aptikti kitais metodais. Jos gali atitikti trumpalaikes tarpines būsenas, vykstant baltymo susisukimo procesui. Su daugeliu literatūroje aprašytų tirtų baltymų: apolipoproteinu A-I, arc represoriumi, apomioglobinu, α -laktalbuminu, kreatino kinaze ir modeliniu trim spiralėm surištu baltymu, esant aukštam slėgiui buvo aptiktos tarpinė būsenos, pavadintos besilydančiąja globule (angl. molten globule). Ši būseną pasižymi mažesnia išsisukimo energija, nei pilnai išsisukęs baltymas. Ji nustatyta aukštą slėgį kombinuojant su įvairia (priklausomai nuo baltymo stabilumo)

GuanCl koncentracija. Pavyzdžiui, eksperimentais su žmogaus apolipoproteinu A-I nustatyta, slėgiu veikiamo baltymo energijos būseną, mažesnę nei baltymą denatūruojant 2M GuanCl (Mantulin and Pownall 1985).

Atlikti slėginiai eksperimentai su lizozimu, naudojant skirtingas GuanCl koncentracijas ir įvairią temperatūrą, leidžia manyti, jog lizozimas, esant tam tikroms sąlygoms linkęs pereiti į nepilno susisukimo būseną (Sasahara and Nitta 1999). Kriatino kinazės 43kDa dimeras tampa nebeaktyvus prie 1,5 kbar, o prie 6,5 kbar slėgio arba 0,8 M GuanCl (prie normalaus atmosferos slėgio) pereina į dalinai susisukusio baltymo būseną. Pilnai baltymui denatūruoti reikia 1,5 M GuanCl ir slėgio iki 6,5 kbar (Zhou, Zhu et al. 2000).

Modelinis 65 a.r trispiralinis baltymas, turintis ganėtinai mažą išsisukimo energiją (4,6 kcal/mol) buvo nepilnai denatūruotas 3,5 kbar slėgiu (Chapeaurouge, Johansson et al. 2001). Pilnas šio baltymo išsisukimas pasiektas 6M GuanCl. Veikiant baltymą iki denatūracinė 1 M GuanHCl koncentracija ir 3,5 kbar slėgiu, buvo nustatyta tarpinio susisukimo būseną, prie kurios jungėsi fluorescuojantis dažas, 4,4-dianilino-1,1-binaftil-disulfoninė rūgštis (bis-ANS). Naudojant 1M GuanHCl ir slegiant iki 3,5 bar, buvo atlikta baltymo šalioji denatūracija, kurios metu nustatyta papildoma nepilnai susisukusio baltymo būseną, prisijungianti bis-ANS. Kompiuteriniu modeliavimu buvo pastebėta, jog esant tam tikroms sąlygoms šis baltymas turi savybę pereiti į tarpinio susisukimo būsenas (Chapeaurouge, Johansson et al. 2001).

2.5.4Slėgio įtaka baltymų agregatams ir agregacijai

Vykstant baltymų susisukimo procesui, gali įvykti jų agregacija. Jos mechanizmas nėra gerai suprastas, tačiau aukšto slėgio taikymas, mėginant išsiaiškinti baltymų klaidingą susisukimą ir agregaciją, duoda įdomių rezultatų ir gali padėti išsiaiškinti šių reiškinių mechanizmus.

Eksperimentais buvo parodyta, kad esant aukštam slėgiui vyksta nespecifinė baltymų agregatų disociacija, palengvinanti baltymų grįžimą į tirpę susisukusią būseną (Gorovits and Horowitz 1998).

Aukštas slėgis, esant nedenatūruojančiai GuanCl koncentracijai gali būti naudojamas kaip metodas, renatūruoti netirpių agregatų baltymus. Mėginant išsiaiškinti netirpios baltymų formos virtimą tirpia frakcija, buvo tiriami žmogaus augimo hormono ir lizozimo agregatai, bei β -laktamazės intarpiniai kūneliai. Žmogaus hormono agregatus 24 valandas veikiant 2 kbar slėgiu,

esant 0,7 M GuanCl, buvo pasiektas 100 % tirpaus susisukusio baltymo atkūrimas, nepriklausomai nuo baltymo koncentracijos iki 9 mg/ml. Panašūs rezultatai buvo gauti su lizozimu. β -laktamazės tirpaus baltymo atkūrimui iš tarpinių kūnelių, pakako aušto slėgio, nenaudojant GuanCl. Taigi, naudojant aukštą slėgį galima efektyviau ir patogiau gauti tirpius baltymus, nenaudojant didelės chaotropinių medžiagų koncentracijos.

Slėgiu nustatytas žmogaus interferono- γ agregatų susidarymo mechanizmas, parodė, jog agregatų susidarymo tranzicija struktūriškai ir energetiškai panaši į natyvų baltymą, todėl tai paaiškina stebimą agregatų susidarymą, esant natyviom baltymui palankiom sąlygom ir padeda suprasti daugelio ligų patologiją.

Manoma, jog neteisingas baltymų susisukimas ir agregacija yra pagrindinė priežastis sukelianti Alzheimerio, Parkinsono ir prionines ligas. Aiškinantis ligų susidarymo mechanizmus, aukštas slėgis yra taikomas ne tik kaip būdas denatūruoti baltymus, bet ir kaip svarbus parametras ieškant sąlygų, prie kurių būtų skatinamas ar slopinamas agregatų susidarymas. Aukšto slėgio metodas yra ypatingai svarbus norint tirti baltymų susisukimo, agregacijos ir amiloidinių struktūrų susidarymo kinetiką. Aukštas slėgis, dėl savybės stabdyti agregacijos procesą gali būti pritaikomas biotechnologijos ir farmacijos srityse (Foguel, Robinson et al. 1999).

Urėja paveikti baltymai (rhodanese) formuoja tarpines struktūras, kurios skiriasi savo dydžiu, polinkiu agreguoti ar sudaryti natyvias, be klaidų susisukusias struktūras. Disocijuotus baltymų agregatus veikiant aukštu slėgiu, galima pasiekti didesnę teisingai susisukusių monomerinių baltymų skaičių, negu naudojant urėją. Norint apsaugoti baltymą nuo agregacijos, pakanka 0,5 kbar slėgio (Gorovits and Horowitz 1998). Tai yra daug mažesnis slėgis, nei reikalingas oligomerų disociacijai. Slėgio ir cheminių, denatūraciją sukeliančių medžiagų naudojimas, tiriant baltymų susisukimą gali padėti detaliau išsiaiškinti baltymų susisukimo mechanizmą (Panda, Gorovits et al. 2000).

2.5.5 Mutantinių baltymų stabilumas, esant aukštam slėgiui

Slėginiais eksperimentais su Stafilokoko nukleaze, apomiglobinu ir jų mutantais buvo parodyta, kad vienos a.r. pakeitimas gali gana stipriai įtakoti baltymo stabilumą. Royer su kolegomis fluorescenciniu ir BMR metodais tyrė dviejų laukinių tipų Stafilokoko nukleazės ir jų mutantus. Nustatytos baltymų slėginių tranzicijų vidurio taškų vertės (92-310 MPa) ir apskaičiuoti išsisukimo tūriai (nuo -47 iki -65 ml/mol). Verta paminėti, jog vienas mutantas (P47G + P117G)

pasižymėjo dideliu atsparumu slėgiui net iki 500 MPa. Laukinio tipo baltymų ir jų mutantų slėginės denatūracijos metu, įvyksta neigiamas tūrio pokytis, kuris, manoma, kad atsiranda dėl: 1) susisukusiame baltyme esančių ertmių, 2) elektrostrikcijos reiškinių, atsirandančio vandens molekulėms sąveikaujant su krūvį turinčiomis a.r. liekanomis, 3) vandens skirtingos struktūros formavimosi prie atsivėrusių hidrofobinių a.r. liekanų.

Eksperimentais su apomiglobino mutantais buvo parodyta, jog veikiant baltymą slėgiu, galima stebėti jo susipakavimą. Eksperimentais su apomiglobino S108L ir F123W mutantais, buvo parodyta, kad dėl atsiradusių didesnių nei laukinio tipo baltyme a.r.liekanų, neįprasto supakavimo susisukusiame baltyme, mutantai buvo mažiau atsparūs aukštam slėgiui. Atlikus mutacijas, kuriomis nepolinė a.r. liekana pakeista krūvį turinčia (A130K) ir S108K, baltymų atsparumas slėgiui, sumažėjo per pus, lyginant su laukinio tipo baltymu (Bondos, Sligar et al. 2000). Tad iš minėtų eksperimentų rezultatų galima teigti, jog baltymų mutantai turintys nepolines ar krūvio neturinčias a.r liekanas pakeistas krūvį turinčiomis, yra mažiausiai atsparūs slėgiui (Jonas 2002).

Slėginiuose baltymų susisukimo kinetiniuose eksperimentuose, nėra aptinkama daug tarpinių būsenų, todėl yra patogus būdas stebėti pagrindinę susisukimo tranziciją. Slėginio sukelti baltymų susisukimo, išsisukimo procesai vyksta lėtai, todėl nustatyti vykstančių procesų kinetiką yra lengviau, nei kitais metodais, nustatomi šių procesų kinetiniai parametrai. Staiga slėgio pokyčio eksperimentais su *Stafilokoko* nukleaze buvo nustatyta, kad tranzicijos busenoje baltymo tirpalo tūris didesnis, nei tirpalo su natyviu arba denatūravusiu baltymu, o aktyvacijos tūris yra ženkliai didesnis susisukusio nei išsisukusio baltymo (Vidugiris, Truckses et al. 1996). Šie pastebėjimai ir atlikti bandymai su kitais mažais baltymais, leidžia manyti apie egzistuojančią globulės stadiją, panašią į susisukusį baltymą (Perrett and Zhou 2002).

Eksperimentais su trp represoriaus dimeru buvo nustatyti: teigiamas susisukusio/asocijuoto baltymo ir neigiamas išsisukusio/disocijuoto baltymo aktyvacijos tūriai. Pastebėta, jog padidėjusi temperatūra padidina išsisukusio baltymo sistemos tūrį daugiau nei susisukusio (Desai, Panick et al. 1999). Pagal tai galima paaiškinti, jog slėgis stabilizuoja temperatūra veikiamą baltymą (Zipp and Kauzmann 1973).

2.5.6ANS - baltymų jungimasis, esant aukštam slėgiui

Veikiant baltymus slėgiu, hidrofobinių grupių išsisukimą į vandenį galima stebėti naudojant hidrofobinį dažą, ANS. Stebint fluorescencijos intensyvumo spektrus, mažinant suslėgto baltymo ir ANS tirpalo slėgį, buvo pastebėta, jog ANS prisijungimas yra negrįžtamas. Atlikti fluorescenciniai - slėginiai eksperimentai su laukinio tipo rekombinantine žmogaus acetilcholinesteraze (rHuAChE) ir jos mutantais su prisijungusiu ANS parodė skirtingą baltymų atsparumą slėgiui. Nustatyta, jog slėgis stabilizuoja ANS-baltymas kompleksą. Fluorescenciniuose eksperimentuose rHuAChE mutantas su pakeistomis šešiom aminorūgštim buvo nejautrus slėgiui, tačiau atlikus elektroforezės slėginius eksperimentus pastebėtas skirtingas mutanto atsparumas slėgiui, esant ir nesant ANS. Remiantis minėtų eksperimentų duomenimis, galima manyti, jog ANS apsaugo baltymus nuo slėginės denatūracijos (Clery-Barraud, Ordentlich et al. 2002).

2.5.7Slėginio ir temperatūrinio baltymų stabilumų palyginimas

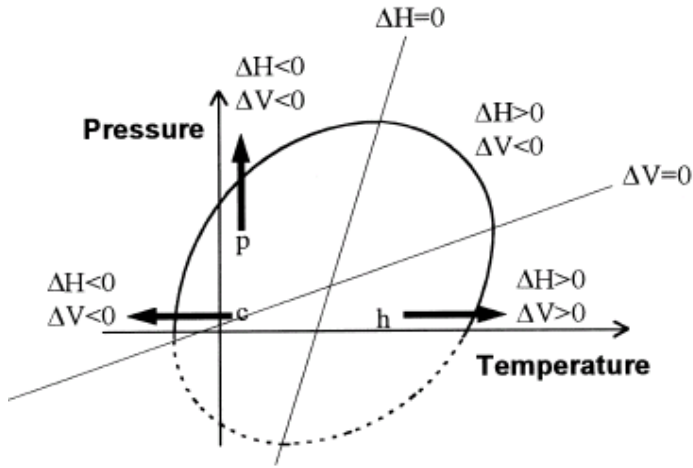
Aukštas hidrostatinis slėgis ir temperatūra yra silpnųjų sąveikų antagonistai. Dažniausiai aukštas slėgis stabilizuoja silpnąsias sąveikas, o aukšta temperatūra jas destabilizuoja. Tačiau, jei formuojantis hidrofobinei ar elektrostatinei sąveikai įvyksta teigiamas tūrio pokytis, tai ši sąveika slėgiu yra destabilizuojama (Heremans 1982; Mozhaev, Heremans et al. 1996), o temperatūra stabilizuojama. Aukštas slėgis neįtakoja vandenilinių jungčių formavimosi, tačiau temperatūros poveikis nėra palankus šių jungčių susidarymui. Slėgiu stabilizuojamos aromatinių žiedų Stekingo ir krūvių persitvarkymo sąveikos (Mozhaev, Heremans et al. 1996).

Eksperimentais su rHuAChE mutantais, kurių neigiamai įkrautos a.r. pakeistos polinėmis arba nepolinėmis (E450A ir šešių pakeistų a.r. mutantai) a.r., buvo nustatytas šių mutantų destabilizavimas slėgiu ir stabilizavimas temperatūra, lyginant su laukinio tipo baltymu.

Slėgio poveikis sukelia sistemos tūrio kitimus, o temperatūra - tūrio ir šiluminės energijos kitimus. Slėgiu denatūruojant baltymus, suspaustas vanduo patenka į baltymo šerdies tuščias ertmes, dėl to pasikeičia baltymo struktūra, bet kompaktiška forma - išlaikoma. Baltymą veikiant temperatūra, jo hidrofobinės grupės atsiveria į vandenį (Lesch, 2002). Su daugeliu baltymų buvo nustatyta, jog slėginė ir cheminė denatūracijos yra grįžtami procesai, o temperatūra baltymai, dėl agregatų susidarymo, denatūruojami negrįžtamai.

2.5.8 Grįžtamos ir negrįžtamos baltymų denatūracijos fazių diagrama

Baltymams būdinga slėgio-temperatūros (p-T) plokštumoje egzistuojanti elipsinė fazių diagrama. Matematiškai elipsės formą nulemia antros eilės nariai, kurie naudojami aprašant ΔG ($\Delta G = G_D - G_N$). Fizikiniu požiūriu, antros eilės nariai yra proporcingi suspaudžiamumo, šiluminės talpos ir šiluminio plėtimosi pokyčiams (atitinkamai $\Delta\beta$, ΔC_p , $\Delta\alpha$) tarp natyvaus (N) ir denatūravusio (D) baltymo. Laisvosios energijos pokytį (ΔG) tarp D ir N galima išreikšti lygtimi (Heremans and



7 pav. Baltymų stabilumo diagrama. Elipsės viduje yra natyvus baltymas, išorėje denatūravęs. Rodyklėmis parodytos dažniausiai naudojamos baltymų denatūracijos (slėginiu (P), šalčiu (C) ir karščiu (h)) ir jų kryptys (Heremans and Smeller 1998)

Smeller 1998):

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta\hat{\beta}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta\hat{\alpha}(p - p_0)(T - T_0) \quad (24)$$

Čia $\Delta\hat{\beta}$ suspaudžiamumo ($\hat{\beta} = \beta V$) ir $\Delta\hat{\alpha}$ šiluminio plėtimosi ($\hat{\alpha} = \alpha V$) faktorių pokyčiai tarp denatūravusio ir natyvaus baltymo. Juos ir ΔC_p galima išreikšti lygtimis:

$$\Delta\hat{\alpha} = \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_p = \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial p} \right)_T \quad (25); \quad \Delta\hat{\beta} = \left(\frac{\partial \Delta V}{\partial p} \right)_T \quad (26); \quad \Delta C_p = T \left(\frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right)_p \quad (27)$$

Kreivė bus elipsė, kai 24 lygtyje koeficientai: $-\hat{\alpha} > \Delta C_p \Delta\beta / T_0$ (28). Šios sąlygos parodo, jog $\Delta\beta$ ir ΔC_p turi būti priešingų ženklų. Iš 24 lygties galima nustatyti suspaudžiamumo, šiluminio

plėtimosi ir šiluminės talpos pokyčius tarp natyvaus ir išsisukusio baltymo (Meersman, Dobson et al. 2006).

Kai $\Delta G=0$, kreivė p-T plokštumoje yra elipsė, išreiškianti baltymo išsisukimo reakcijos pusiausvyrą. Ši kreivė vadinama fazių arba stabilumo diagrama (7 pav.).

Vandenyje tirpių polimerų ir baltymų slėgio-temperatūros fazių diagramos yra panašios. Atlikti bandymai parodė, jog krakmolo ir baltymų elgesys paveikus slėgiu ir temperatūra yra labai panašus, todėl iškyla klausimas ar visos makromolekulės į aukštą slėgį reaguoja panašiai. (Heremans and Smeller 1998)

2.5.9 Tūrio pokyčiai ligandams jungiantis prie baltymų

Cheminės reakcijos tūrio pokyčius galima nustatyti dviem būdais: 1) atlikti dilatometrinius bandymus (tiesioginis tūrio pokyčio matavimo būdas) arba 2) žinant jungimosi konstantą, apskaičiuoti pagal lygtį:

$$\Delta V = - \frac{RTd \ln K_L}{dp}$$

čia K_L – ligando jungimosi pusiausvyros konstanta.

Nustatant baltymo lydymosi temperatūros ir van Hofo entalpijos pokyčius (atitinkamai ΔT_m ir ΔH_{vH}) dėl pakitusio slėgio, pagal Klapeirono lygtį galima apskaičiuoti tūrio pokytį baltymui denatūravus (Dubins et al., 2000) :

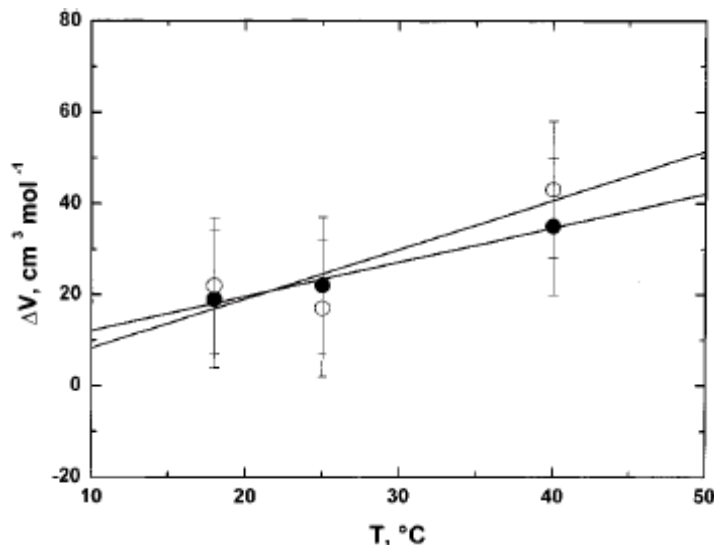
$$\Delta V_D = \left(\frac{\partial T_m}{\partial P} \right) \frac{\Delta H_{vH}}{T_m}$$

Nustačius išsisukusių baltymo ir baltymo ligando kompleksų tūrių pokyčius (atitinkamai $\Delta V_D(P)$ ir $\Delta V_D(PL)$) galima apskaičiuoti ligandų jungimosi tūrio pokytį :

$$\Delta V = \Delta V_D(P) - \Delta V_D(PL)$$

Pirmieji tūrio pokyčiai jungiantis deguoniui ir etilizocianatui prie ferohemoglobino (Johnson ir Schlegel, 1948; Suzuki et al., 1972) buvo atlikti, nustatant aukšto hidrostatinio slėgio įtaką jungimosi konstantai. Iš jos apskaičiuoti ligandų jungimosi tūrio pokyčiai: deduonies $\Delta V=0$, etilizocianato $\Delta V= -23$ ml/mol.

Eksperimentais su ribonukleazės A ir dviem prie jos besijungiančiais ligandais (3-CMP, 2-CMP) buvo parodyta jungimosi tūrių pokyčių priklausomybė nuo temperatūros (8 pav.) (Dubins et al.,

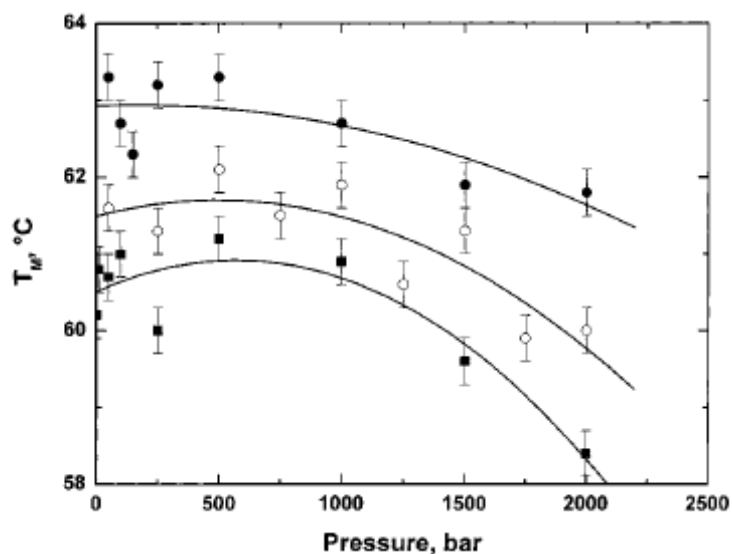


8 pav. Ligandų (2'-CMP(●), 3'-CMP (○)) jungimosi, prie ribonukleazės A, tūrio pokyčių (nustatytų matuojant ultragarso greitį) priklausomybė nuo temperatūros (Dubins et al., 2000).

2000). Prie didesnės temperatūros ligandų jungimosi tūrių pokyčiai yra didesni. Jungiantis 2'-CMP prie ribonukleazės A, ΔV padidėja nuo 19 ± 15 cm³ mol⁻¹, esant 18 °C iki 35 ± 15 cm³ mol⁻¹, esant 40 °C, ir jungiantis 3'-CMP, ΔV padidėja nuo 22 ± 15 cm³ mol⁻¹, esant 18 °C iki 43 ± 15 cm³ mol⁻¹, esant 40 °C (Dubins et al., 2000)(Prehoda, Mooberry et al. 1998).

2.5.10 Baltymo – ligando komplekso lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio

Ligandai stabilizuojantys baltymus, esant atmosferos slėgiui, padidina baltymo lydymosi temperatūrą. Tačiau įdomu, kaip vyktų tų pačių ligandų jungimasis ir baltymų stabilizavimas, esant aukštam slėgiui? 9 pav. pateikta ribonukleazės A ir jos komplekso su ligandais, lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio. Esant atmosferos slėgiui ribonukleazė A lydymosi temperatūra ($T_m = 60.5 \pm 0.2$ °C) yra žemesnė negu 2'-CMP-Ribonukleazės A ($T_m = 62.9 \pm 0.3$ °C) , ar 3'-CMP- ribonukleazės A ($T_m = 61.5 \pm 0.4$ °C) kompleksų. Veikiant Ribonukleazę A ir jos kompleksus su ligandais aukštu slėgiu iki 1000 bar, buvo pastebėtas stabilizuojantis slėgio poveikis, o prie slėgio didesnio už 1000 bar lydymosi temperatūra mažėja (Dubins et al, 2000).



9 pav. Lydimosi temperatūros, T_M , priklausomybė nuo slėgio: ribonukleazės A (■), 2'-CMP-Ribonukleazės A komplekso (●), ir 3'-CMP- ribonukleazės A komplekso (○) (Dubins et al., 2000).

3. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

3.1 Naudotos medžiagos

Darbe naudotos medžiagos nurodytos 3.1.1 lentelėje.

3.1.1 Lentelė. Darbe naudoti reagentai.

Gamintojas	Produktas
Sigma	Acetazolamidas, bCAII, DMSO.
Aldrich Chem.Co	8-anilino-1-naftaleno sulfonato amonio druskos hidratas (ANS) NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O
EM Science	
Serva Feinbiochemica	Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O
Biotachnologijos institutas, Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorija	rhCAI, Hsp90N, VD5, VD6, VD20

3.2 Tirpalų ruošimas

Baltymų tirpalų ruošimas.

CA tirpalo ruošimas

Buvo ruošiamas 3 μM baltymo tirpalas, kurį sudarė: 3 μM bCAII, 50 μM ANS, 0-400 μM pasirinkto ligando, 0-1% DMSO ir 2,7 ml 100mM fosfatinio buferio ($pH=7$). Prieš ruošiant tirpalą baltymo koncentracija nustatoma spektrofotometru, matuojant tirpalo sugertį prie 280nm.

Hsp90N tirpalo ruošimas

Hsp90N ekspresuotas ir grynintas Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje. Buvo ruošiamas 10 μM Hsp90N buferinis tirpalas (10 μM Hsp90N, 50 μM ANS (tirpintas vandeny), 2% DMSO, 10mM Bis-Tris buferis, $pH=7$).

Buferinių tirpalų ruošimas.

Eksperimentuose naudoti 4 rūšių buferiai: fosfatinis, acetatinis, Tris-HCl ir Bis-tris. Fosfatinio ir acetatinio buferių komponentų kiekiai, norimai koncentracijai ir pH , apskaičiuoti pagal Hendelsono-Haselbacho lygtį. Eksperimentuose naudoti 50mM buferių koncentracijos. Paruoštų 50mM Tris buferių pH buvo privedamas prie norimos vertės su HCl ar NaOH.

3.3 Baltymų temperatūrinės denatūracijos poslinkio fluorescencinis metodas

Tiriant baltymo temperatūrinį stabilumą fluorescenciniu metodu buvo naudojamas ISS fotonus skaičiuojantis spektrofluorimetras (ISS PC1 Photon Counting spectrofluorometer) ir vandens kaitinimo vonelė. Kiuvetėje matuota temperatūra K tipo termoporu TFN520 (Embro Electronic GmbH & Co KG, Germany) ± 0.2 $^{\circ}\text{C}$ tikslumu. Kaitinant, 3 ml stiklinę kiuvetę, su paruoštu baltymo tirpalu, iki 85 $^{\circ}\text{C}$ (1,5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ greičiu) matuojama 510 nm ANS fluorescencija.

Fluorimetru užfiksuoti baltymo išsisukimo fluorescenciniai duomenys yra aproksimuojami žemiau pateikta funkcija (6), naudojant Levenberg-Marquardt algoritmas, kvadratų sumai minimizuoti, ir tokiu būdu nustatomi baltymo išsisukimo parametrai: T_m , išsisukimo entalpijos pokytis ir kiti (plačiau žiūrėkit teorinėje dalyje).

$$y_{(T)} = y_{F,T_m} + m_F(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{F,T_m} + (m_U + m_F)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r)))}{RT}}} \quad (6)$$

3.4 Jungimosi konstantos nustatymas

Nustatytų baltymo ir baltymo-ligando kompleksų T_m verčių priklausomybė nuo ligando koncentracijų yra aproksimuojama teorinio modelio (14) kreive, nustatant baltymo-ligando jungimosi konstantą.

$$L_t = \left(1 - e^{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} \right) \left(\frac{P_t}{2} + \frac{1}{e^{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T - T_r) - T(\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T/T_r))) / RT} K_b} \right)$$

(15)

3.5 Slėginis fluorimetras

Slėginiai eksperimentai buvo atlikti su ISS PC1 fotonus skaičiuojančiu spektrofluorimetru (ISS PC1 Photon Counting Spectrofluorimeter, USA), prie kurio prijungta slėginė kamera su safyriniais stiklais, atspariais hidrostatiniam slėgiui iki 400 MPa. Kamera plieniniais vamzdeliais sujungta su barometru ir slėgine rankine pompa. Slėgis kameroje gali būti didinamas maksimaliu 40 MPa žingsniu, po kurio reikia 5 min leisti safyriniams stiklams prisitaikyti prie pakitusio slėgio.

3.6 Slėginės baltymų denatūracijos nustatymas

Baltymo tirpalas yra supilamas į apvalią, 0,5 ml, stiklinę kiuvetę, kuri sandariai uždaroma slėgiui atsparia plėvele (Dura Seal, USA). Kiuvetė įstatoma į slėginę kamerą, kuri pripildyta labai švaraus distiliuoto vandens. Uždarius kamerą, slėgine pompa yra pašalinami oro burbulai susidarę slėginėje sistemoje. Sukant pompą žingsneliais po 20 MPa/2min, fluorimetru žadinant baltymo tirpale esantį ANS 380nm šviesa, matuojama 480nm fluorescencija.

3.7 Temperatūrinės denatūracijos eksperimentai, esant aukštam slėgiui

Eksperimentai atliekami slėginiu fluorimetru aprašytu 3.4 skyrelyje. Slėginė kamera kaitinama vandens šildymo vonelė 2°C/min greičiu ir termoporu kas 10 s fiksuojama išorė slėginės kameros temperatūra, kuri 8 °C didesnė nei kiuvetėje, esančioje kameros viduje. Slėgine pompa sudarius kameroje norimą slėgį (paprastai 20, 40, 60, 80, 120, 160, 200 MPa) baltymo tirpalas yra kaitinamas nuo 25 °C iki 90 °C, ir viso kaitinimo metu, žadinant tirpalą 380nm šviesa, matuojama 480nm ANS fluorescencija. Užfiksuoti fluorescenciniai duomenys mažiausiu kvadratų metodu aproksimuojami teorinio modelio kreive (6), nustatant baltymo išsisukimo parametrus ir lydimosi temperatūrą (T_m).

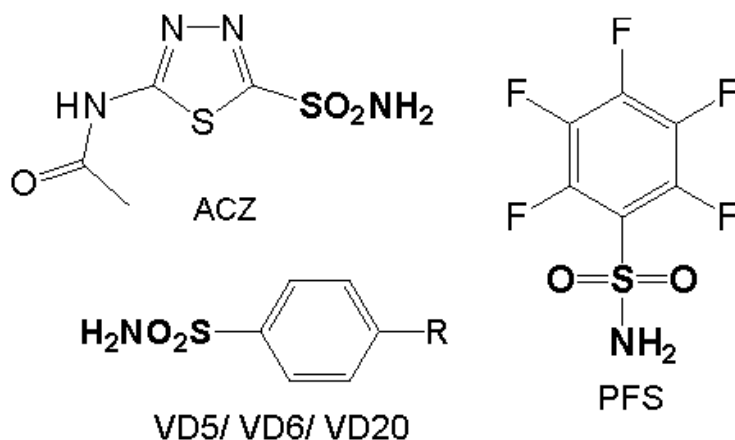
3.8 Duomenų apdorojimas ir analizė

Gauti fluorescenciniai duomenys apdorojami Microsoft Office Excel 2003 programa. Teorinės kreivės (6) artinimui prie eksperimentinių duomenų ir funkcijos (6) parametru nustatymui buvo naudojamas Levenberg-Marquardt algoritmas, kvadratų sumai minimizuoti.

4. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

4.1 Sulfonamidinių slopiklių jungimasis su bCAII, esant atmosferos slėgiui

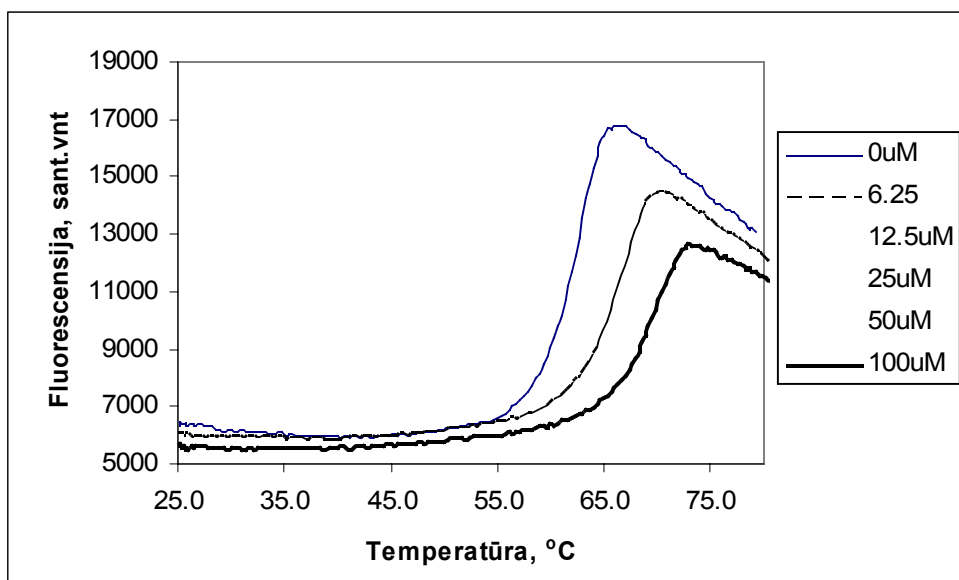
Eksperimentai atlikti su 5 sulfonamidais (CA inhibitoriais): acetazolamidu, pentafluorbenzensulfonamidu (PFS), VD5, VD6, VD20 (4.1.1.1 pav.). Šie ligandai stabilizuoja CA, padidindami jo lydymosi temperatūrą (T_m). bCAII stabilizavimas sulfonamidais buvo nustatytas temperatūrinės denatūracijos poslinkio fluorescenciniu metodu (apibūdintas 3.3 skyrelyje). Baltymo tirpale esančio ANS fluorescencija buvo matuojama ISS PC1 fluorimetru, kaitinant tirpalą nuo 25 iki 85 °C, 2 °C/min greičiu. Kiekvienu nauju bandymu sulfonamidų koncentracija didinama atitinkamai iki: 1.6; 3.125; 6,25; 12.5; 25; 50; 100 μ M; kai kurių iki 200; 400 μ M. Lyginant nustatytas baltymo išsisukimo tranzicijas, nesant ir esant skirtingos koncentracijos sulfonamidams, pastebimas T_m padidėjimas, kuris rodo, jog inhibitorius, jungdamasis prie natyvaus baltymo, keičia išsisukimo reakcijos pusiausvyrą natyvaus baltymo susidarymo kryptimi.



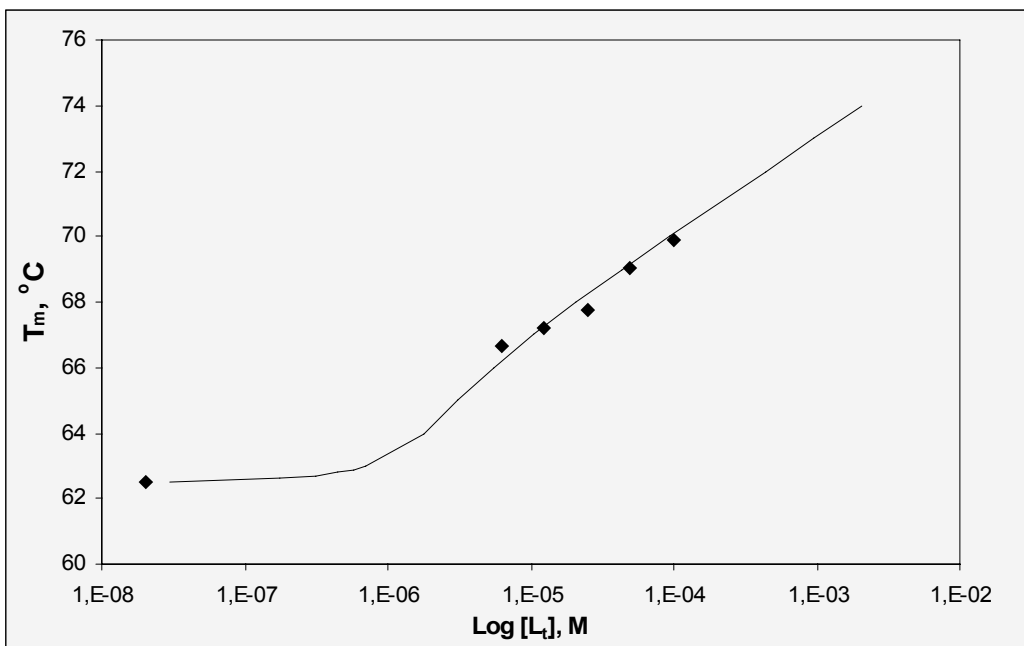
4.1.1.1 pav. Tirtų sulfonamidų, kurie jungiasi prie bCAII, struktūrinės formulės: acetazolamidas (ACZ), pentafluorbenzensulfonamidas (PFS), VD5, VD6 ir VD20.

4.1.2 Acetazolamido-bCAII jungimasis

Tiriant acetazolamido ir bCAII jungimąsi, gautos fluorescencijos kreivės, esant skirtingoms acetazolamido koncentracijoms (4.1.2.1 pav.). Baltymo tirpale (3 μ M, 0-400 μ M ACZ ištirpintas DMSO, 50 μ M ANS, 50mM fosfatinis buferis, pH=7) didinant acetazolamido koncentraciją pastebimas fluorescencinių kreivių poslinkis į aukštesnės temperatūros sritį. Šis reiškinys stebimas, nes prisijungęs acetazolamidas stabilizuoja bCAII ir padidina baltymo T_m . Kuo tirpale didesnė ACZ koncentracija, tuo didesnė tikimybė susidaryti bCAII-ACZ kompleksui todėl bCAII tranzicija slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį. Fluorescencinius duomenis aproksimuojant teoriniu modeliu (žiūrėti metodikoj (6)), buvo nustatytos baltymo lydymosi temperatūros (T_m), esant skirtingai ligando koncentracijai. T_m priklausomybę nuo ligando koncentracijos aproksimuojant teorinio modelio (14) kreive, nustatyta $K_b = 3,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (4.1.2.2 pav.).



4.1.2.1 pav. b-CAII temperatūrinė denatūracija esant skirtingoms acetazolamido koncentracijoms: 0 μ M, 6,25 μ M, 12,5 μ M, 50 μ M, 100 μ M.



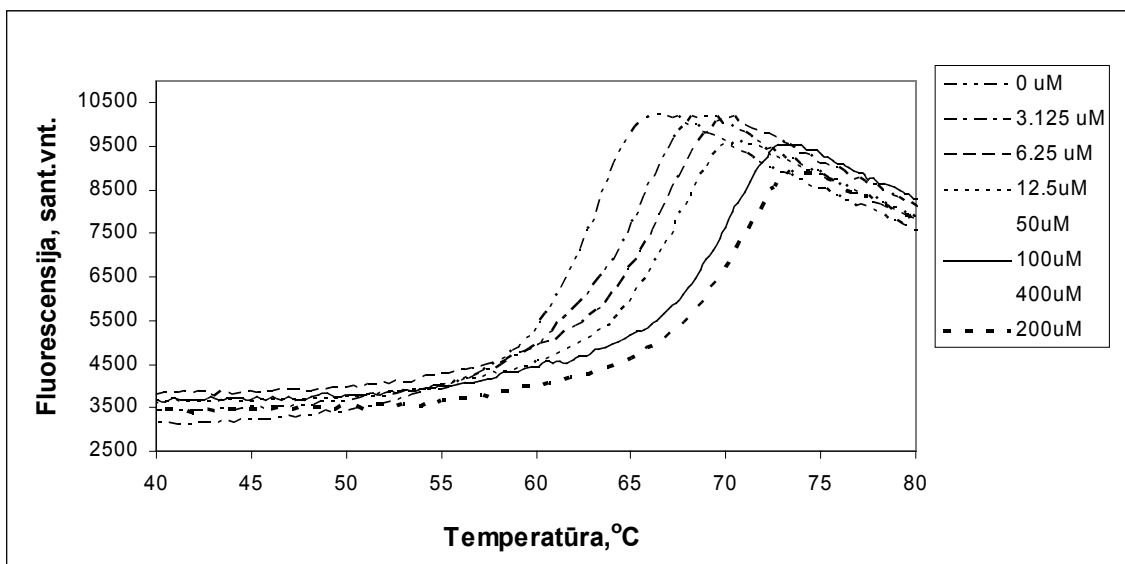
4.1.2.2 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) lydymosi temperatūros (T_m) priklausomybė nuo acetazolamido (ACZ) koncentracijos (L_t). Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o per juos nubrėžta teorinė kreivė. Acetazolamido jungimosi konstanta $K_b = 3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, disociacijos konstanta $K_d = 0,3 \text{ } \mu\text{M}$, išsisukimo entalpija $\Delta_u H_{Tr} = 170 \text{ kcal/mol}$, kai baltymo koncentracija $P_t = 3.4 \text{ } \mu\text{M}$.

4.1.3 Pentafluorbenzensulfonamido (PFS)-bCAII jungimasis

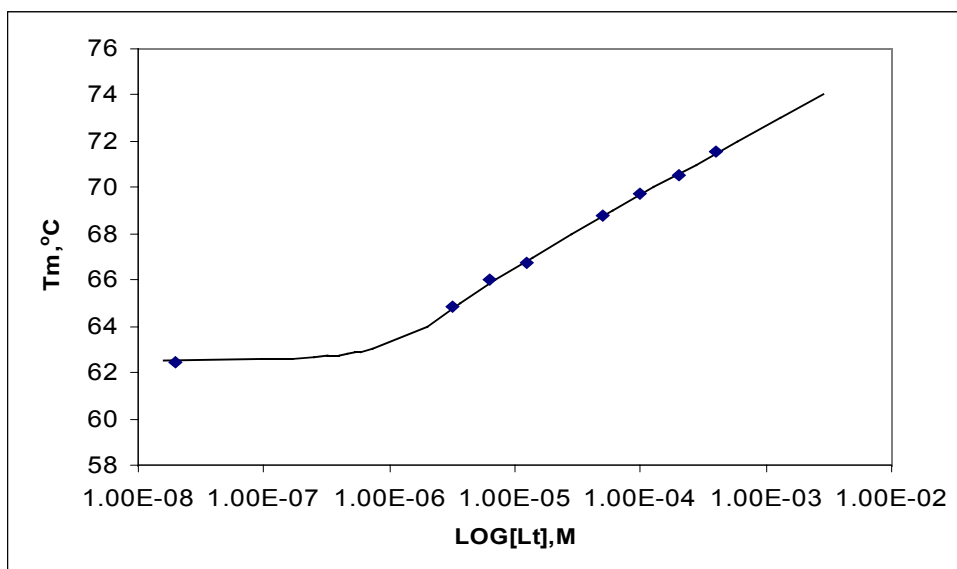
Tiriant pentafluorbenzensulfonamido (PFS) įtaką bCAII temperatūriniam stabilumui, kaitinant bCAII tirpalą ($3,4 \text{ } \mu\text{M}$, $0\text{--}400 \text{ } \mu\text{M}$ PFS ištirpintas DMSO, $50 \text{ } \mu\text{M}$ ANS, 50mM fosfatinis buferis, $\text{pH}=7$) iki 80°C , užfiksuotos fluorescencijos kitimo kreivės (pav.4.1.3.2), kuriose nustatytos bCAII T_m vertės, esant skirtingai PFS koncentracijai. Didinant ligando koncentraciją fluorescencijos kreivės slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį. Šis poslinkis rodo bCAII stabilizavimą, todėl baltymas denatūruoja aukštesnėje temperatūroje. Iš bCAII T_m priklausomės nuo PFS koncentracijos, nustatyta jungimosi konstanta, $K_b = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (4.1.3.3 pav.)

4.1.3.1 lentelė. bCAII T_m , esant skirtingai PFS koncentracijai tirpale.

PFS konc., μM	0	3,125	6,25	12,5	50	100	200	400
T_m , $^\circ\text{C}$	62,82	64,98	66,03	66,75	68,78	69,71	70,55	71,55



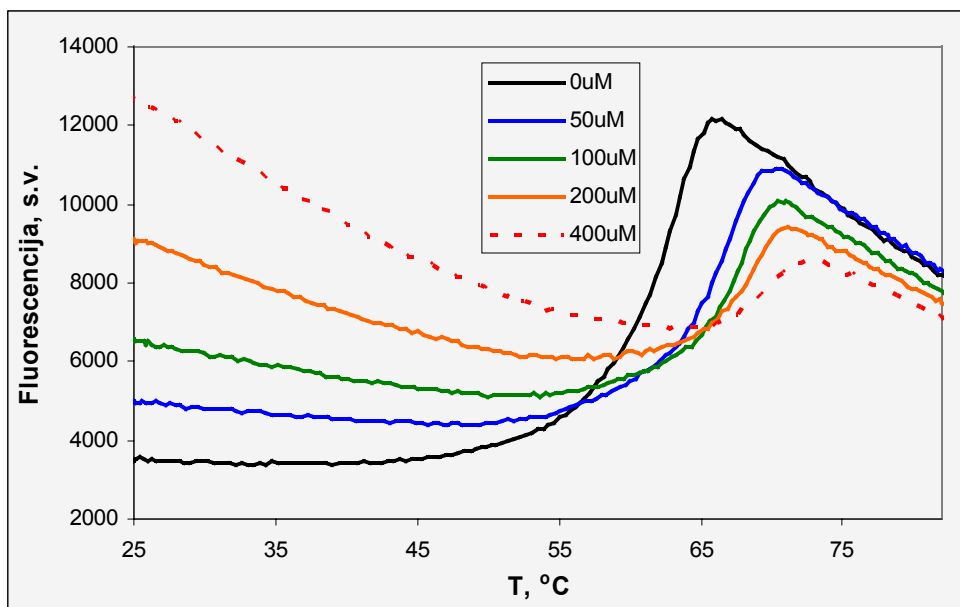
4.1.3.2 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) temperatūrinė denatūracija ir pentafluorbenzensulfonamido įtaka stabilizuojant baltymą. Atitinkamai didinant ligando koncentraciją (0 μM , 3,125 μM , 6,25 μM , 12,5 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM) stebima fluorescencijos kreivių slinktis į aukštesnės temperatūros sritį.



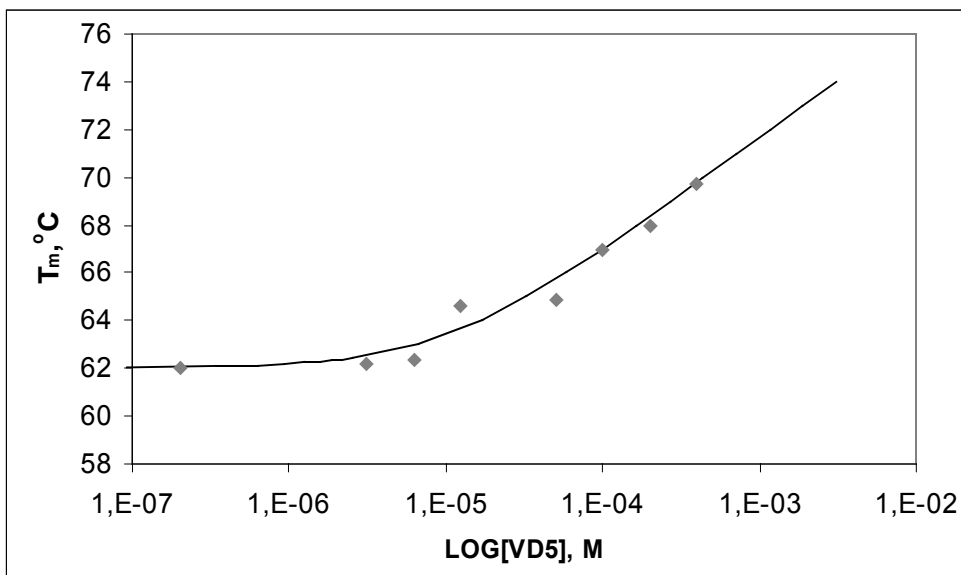
4.1.3.3 pav. bCAII lydymosi temperatūros (T_m) kitimas priklausantis nuo pentafluorbenzensulfonamido (PFS) koncentracijos (L_t). Taškai žymi eksperimentinius duomenis, o per juos nubrėžta teorinė kreivė. Nustatyta PFS jungimosi konstanta $K_b = 2.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, disociacijos konstanta $K_d = 0.4 \mu\text{M}$, išsisukimo entalpija $\Delta_u H_{Tr} = 170 \text{ kcal/mol}$, kai baltymo koncentracija $P_t = 3.4 \mu\text{M}$.

4.1.4VD5 - bCAII jungimasis

Tiriant bCAII, VD5 jungimąsi, kaitinant tirpalą (3,4 μM , 0-400 μM VD5 ištirpintas DMSO, 50 μM ANS, 50 mM fosfatinis buferis, pH=7) iki 80 $^{\circ}\text{C}$, 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ greičiu, buvo matuojama ANS fluorescencija. Didinant ligando koncentraciją fluorescencijos kreivės slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį (4.1.4.1 pav.). Šis poslinkis rodo bCAII stabilizavimą, todėl baltymas denatūruoja prie aukštesnės temperatūros. Iš gautų fluorescencinių kreivių buvo nustatytos baltymo lydymosi temperatūros (T_m), esant skirtingoms ligando koncentracijoms. Esant VD5 koncentracijoms iki 12,5 μM nebuvo pastebėtas reikšmingas T_m pokytis. Tik prie 12,5 μM ir didesnių VD5 koncentracijų T_m pastebimai skyresi nuo kontrolės: 62 $^{\circ}\text{C}$ (0 μM); 64,7 $^{\circ}\text{C}$ (12,5 μM); 64,8 $^{\circ}\text{C}$ (50 μM); 67 $^{\circ}\text{C}$ (100 μM); 67,8 $^{\circ}\text{C}$ (200 μM); 69,7 $^{\circ}\text{C}$ (400 μM). Baltymo lydymosi temperatūros priklausomybę nuo VD5 koncentracijos, aproksimuojant teorine kreive (14) (4.1.4.2 pav.), nustatyta jungimosi konstanta: $K_b = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. 4.1.3.1 pav. kreivėse mažėjanti fluorescencija iki baltymo tranzicijos ir po tranzicijos nėra gerai suprasta. Paprastai aiškinama, jog po baltymo tranzicijos fluorescencija yra slopinama dėl greitesnio tirpalo dalelių šiluminio judėjimo.



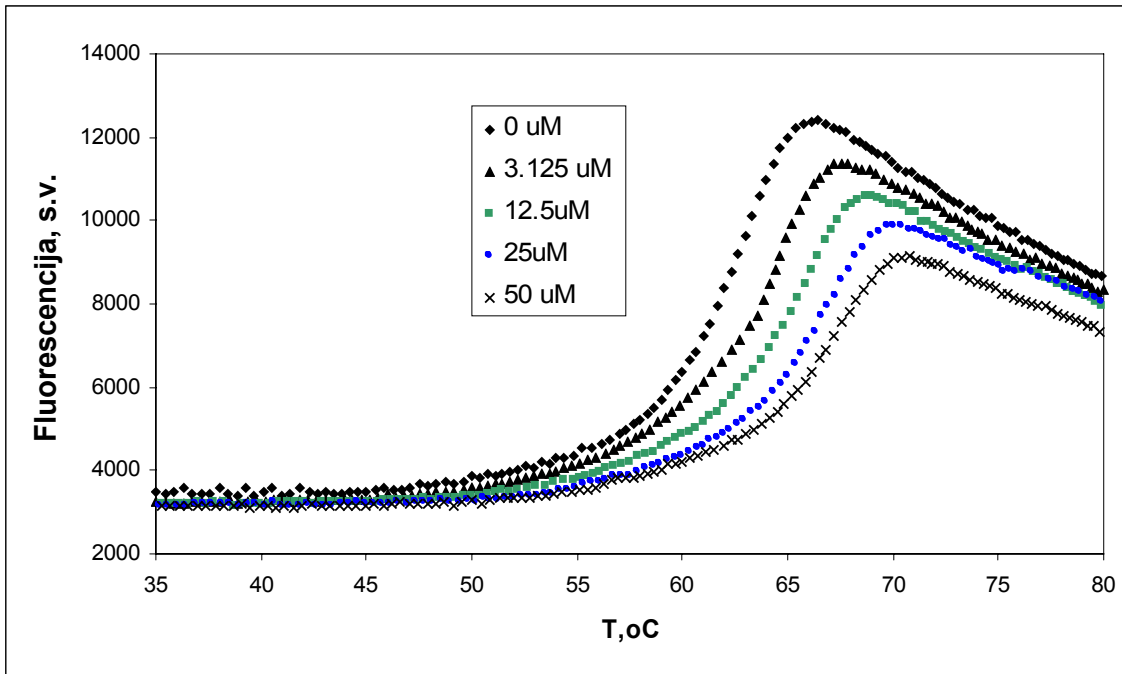
4.1.4.1 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) temperatūrinis stabilizavimas, esant skirtingos koncentracijos (0 μM , 12,5 μM , 50 μM , 100 μM , 200 μM , 400 μM) VD5 slopikliui.



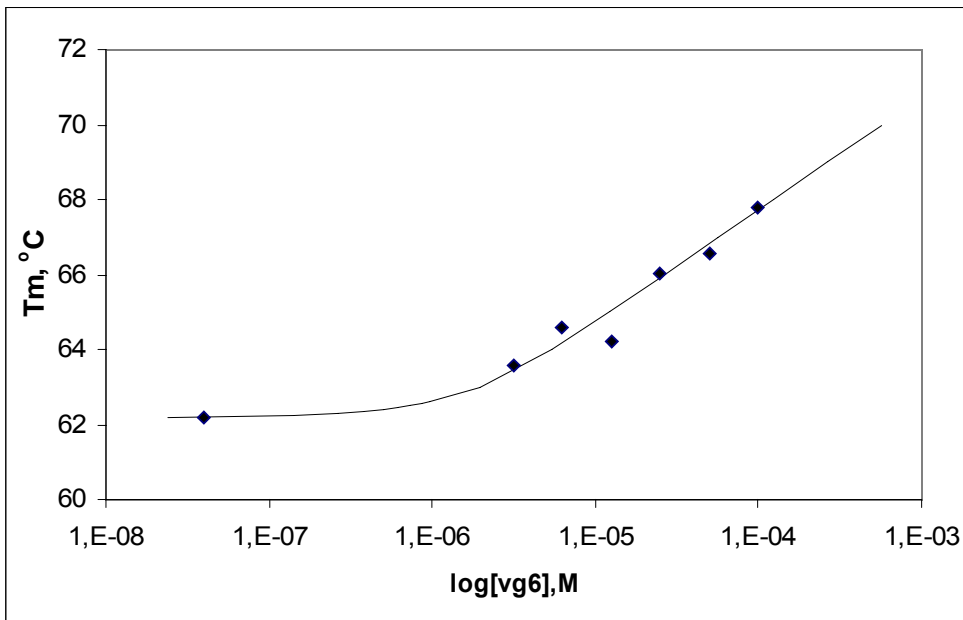
4.1.4.2 pav. Jaučio II karboanhidrazės (b-CAII) lydymosi temperatūros (T_m) kitimas priklausantis nuo vd5 koncentracijos (L_t). Taškai žymi eksperimentinius duomenis ir per juos nubrėžta teorinė kreivė. Vd5-baltymas jungimosi konstanta $K_b = 5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, disociacijos konstanta $K_d = 2 \text{ } \mu\text{M}$, išsisukimo entalpija $\Delta uH_{Tr} = 170 \text{ kcal/mol}$, baltymo koncentracija $P_t = 3.4 \text{ } \mu\text{M}$.

4.1.5VD6 - bCAII jungimasis

Tiriant bCAII, VD6 jungimąsi, kaitinant tirpalą ($3,4 \text{ } \mu\text{M}$, $0\text{--}400 \text{ } \mu\text{M}$ VD6 ištirpintas DMSO, $50 \text{ } \mu\text{M}$ ANS, 50 mM fosfatinis buferis, $\text{pH}=7$) iki $80 \text{ } ^\circ\text{C}$, $2 \text{ } ^\circ\text{C/min}$ greičiu, buvo matuojama ANS fluorescencija. Didinant ligando koncentraciją fluorescencijos kreivės slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį (4.1.5.1 pav.). Šis poslinkis rodo bCAII stabilizavimą, todėl baltymas denatūruoja prie aukštesnės temperatūros. Iš gautų fluorescencinių kreivių buvo nustatytos baltymo lydymosi temperatūros (T_m), esant skirtingoms ligando koncentracijoms. Baltymo lydymosi temperatūros priklausomybę nuo VD5 koncentracijos, aproksimuojant teorine kreive (14) (4.1.5.2 pav.), nustatyta jungimosi konstanta: $K_b = 0,7 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.



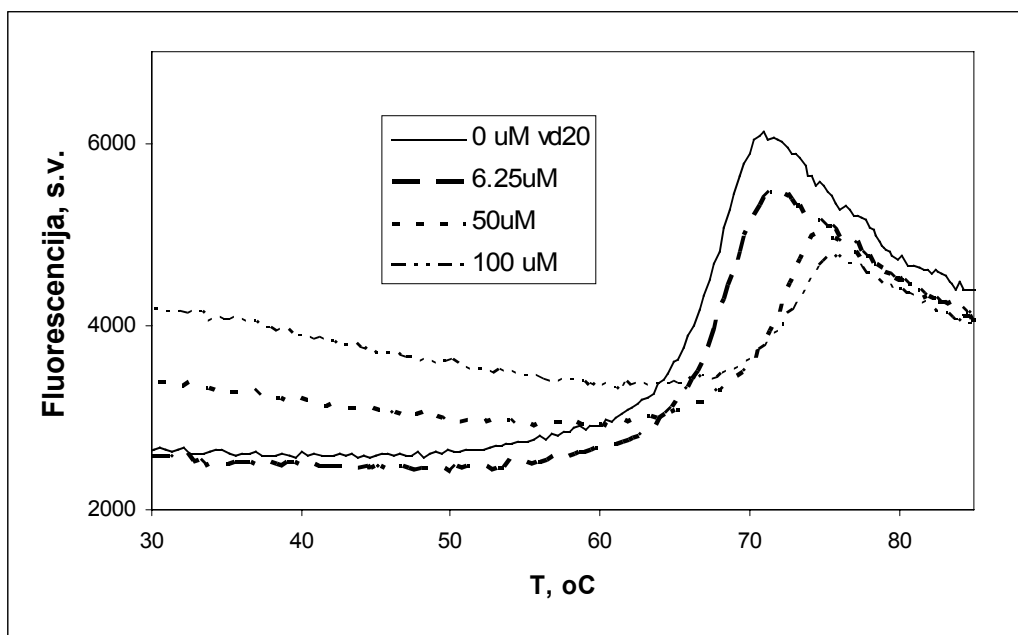
4.1.5.1 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) stabilizavimas, esant skirtingos koncentracijos (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 μM) vd6.



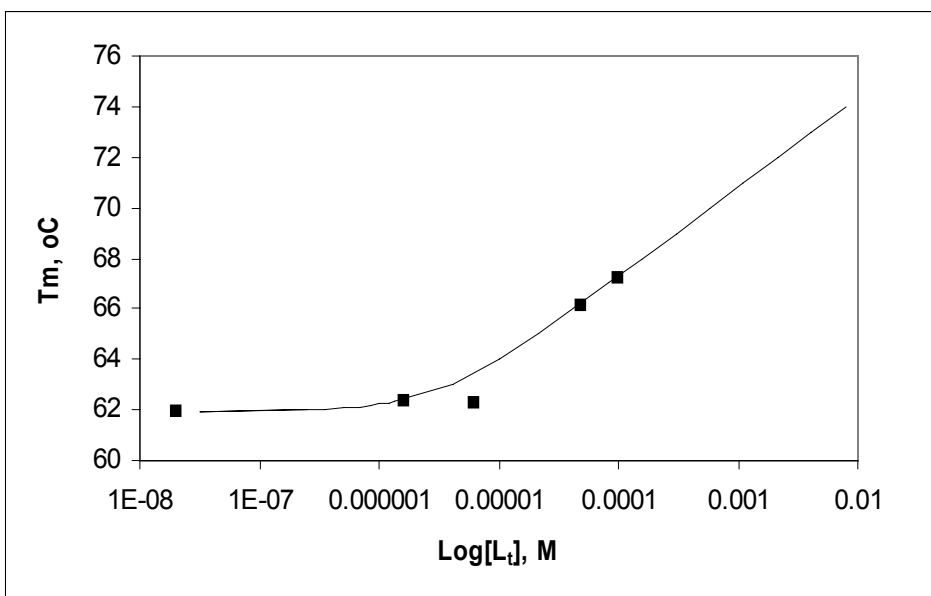
4.1.5.2. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) lydimosi temperatūros (T_m) kitimas priklausantis nuo vd6 koncentracijos (L_t). Taškai žymi eksperimentinius duomenis per kuriuos nubrėžta teorinė kreivė. VD6 jungimosi konstanta $K_b = 7 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, disociacijos konstanta $K_d = 1,4 \mu\text{M}$, išsisukimo entalpija $\Delta_u H_{Tr} = 170 \text{ kcal/mol}$, baltymo koncentracija $P_t = 3.4 \mu\text{M}$.

4.1.6VD20 – bCAII jungimasis

Tiriant bCAII, VD20 jungimąsi, kaitinant tirpalą (3,4 μM , 0-400 μM VD20 ištirpintas DMSO, 50 μM ANS, 50 mM fosfatinis buferis, pH=7) iki 80 $^{\circ}\text{C}$, 2 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ greičiu, buvo matuojama ANS fluorescencija. Didinant ligando koncentraciją fluorescencijos kreivės slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį (4.1.6.1 pav.). Šis poslinkis rodo bCAII stabilizavimą, todėl baltymas denatūruoja prie aukštesnės temperatūros. Iš gautų fluorescencinių kreivių buvo nustatytos baltymo lydymosi temperatūros (T_m), esant skirtingoms ligando koncentracijoms. Baltymo lydymosi temperatūros priklausomybę nuo VD20 koncentracijos, aproksimuojant teorine kreive (14) (4.1.6.2 pav.), nustatyta jungimosi konstanta: $K_b = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$.



4.1.6.1 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) temperatūrinė denatūracija ir vd20 įtaka stabilizuojant baltymą, kai ligando koncentracija tirpale: 0 μM , 6,25 μM , 50 μM , 100 μM .



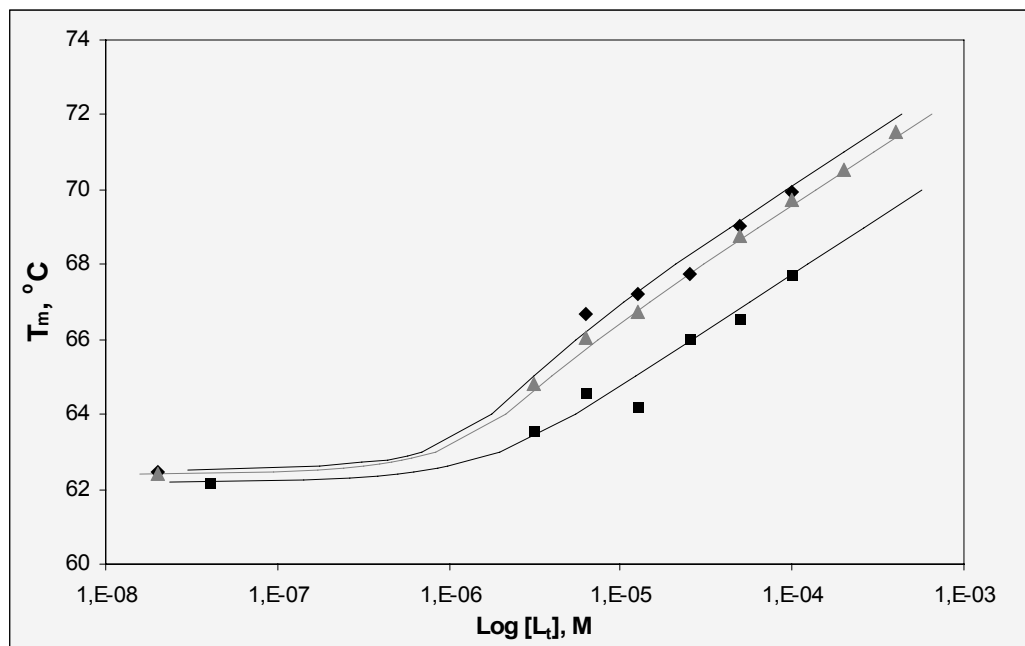
4.1.6.2 pav. Jaučio II karboanhidrazės (bCAII) lydimosi temperatūros (T_m) kitimas priklausantis nuo vd20 koncentracijos (L_t). Taškai žymi eksperimentinius duomenis ir per juos nubrėžta teorinė kreivė. VD20-bCAII jungimosi konstanta $K_b = 6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, disociacijos konstanta $K_d = 1.7 \text{ } \mu\text{M}$, kai išsisukimo entalpija $\Delta_u H_{Tr} = 170 \text{ kcal/mol}$ ir baltymo koncentracija $P_t = 3.4 \text{ } \mu\text{M}$.

4.1.7bCAII- sulfonamidinių slopiklių jungimosi palyginimas

Ištirtas penkių sulfonamidų jungimasis su bCAII ir nustatytos jungimosi konstantos (eksperimentų atlikimas apibūdintas prieš tai pateiktuose skyreliuose). Rezultatai pateikti 4.1.7.1 lentelėje. Skirtingų sulfonamidų T_m verčių priklausomybė nuo ligando koncentracijos, eksperimentiniai duomenys aproksimuoti teorinio modelio kreive (14) pateikti 4.1.7.2 paveiksle.

4.1.7.1 lentelė. bCAII- sulfonamidinių slopiklių jungimosi konstantos ir išsisukimo entalpijos.

Sulfonamido pavadinimas	Jungimosi konstanta ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$)	Disociacijos konstanta (μM)	Išsisukimo entalpija (kcal/mol)
ACZ	3,5	0,3	170
PFS	2,5	0,4	170
VD5	0,5	2	170
VD6	0,7	1,4	170
VD20	0,6	1,7	170



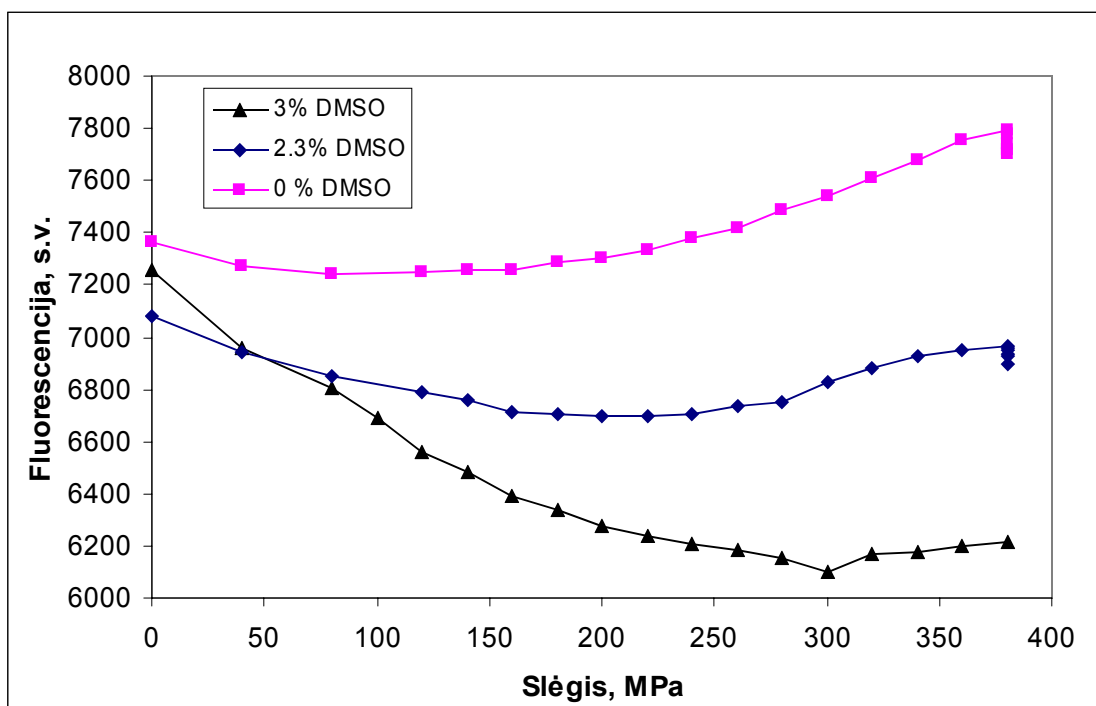
4.1.7.2.pav. bCAII T_m kitimo priklausomybė nuo skirtingų sulfonamidų: (♦) ACZ, (▲) PFS, (■) VD6, koncentracijų (L₁).

4.2 Slėginiai eksperimentai

4.2.1 Slėgio įtaka ANS fluorescencijai, esant DMSO

Didinant ANS tirpalo (60mM acetatiniame buferyje, kai pH=4, esant 0-3% DMSO, 50 μ M ANS), su skirtingu kiekiu DMSO, slėgį buvo matuojama fluorescencija. Slėgis didinamas žingsniais kas 2 minutes po 20MPa ir ISS PC1 spektrofluorimetru (ISS PC1 Photon Counting Spectrofluorometer) žadinant ANS tirpalą 380nm šviesa, matuojama 480 nm fluorescencija.

Eksperimentu norėta nustatyti kaip nedideli DMSO kiekiai buferiniame tirpale įtakoja ANS fluorescencijos kitimo priklausomybę nuo slėgio. Pastebėta, jog nesant DMSO, didinant slėgį iki 380 MPa, ANS fluorescuoja didėja, o esant 3% DMSO, ANS fluorescencija mažėja iki 300MPa, o aukštesniame slėgyje beveik nekinta (4.2.1.1 pav.). Fluorescencijos didėjimas acetatiniame buferyje, nesant DMSO, galėjo įvykti, dėl slėgiu sukulto, buferio pH pokyčio.

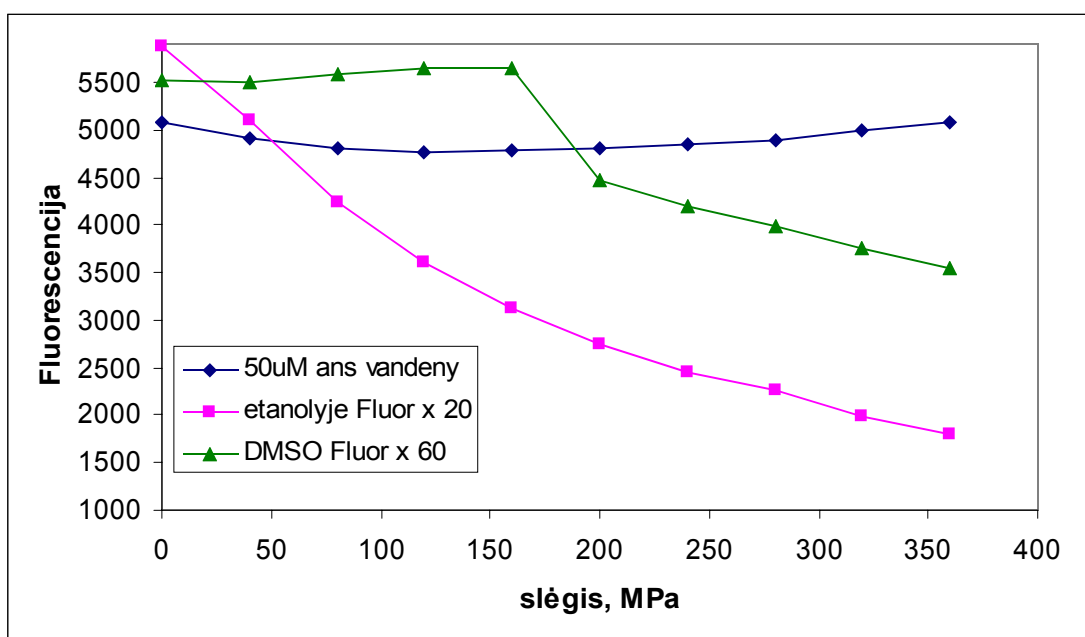


4.2.1.1pav. Slėgio įtaka ANS fluorescencijai acetatiniame buferyje, kai pH=4, esant DMSO.

4.2.2 ANS fluorescencijos kitimas skirtinguose tirpikliuose, kintant slėgiui

Buvo paruošta 50 μM ANS tirpalas skirtinguose tirpikliuose: vandeny, etanolyje ir DMSO. Slėgis buvo didinamas kas 2 minutes po 20 MPa ir ISS PC1 spektrofluorimetru matuojama 480 nm fluorescencija.

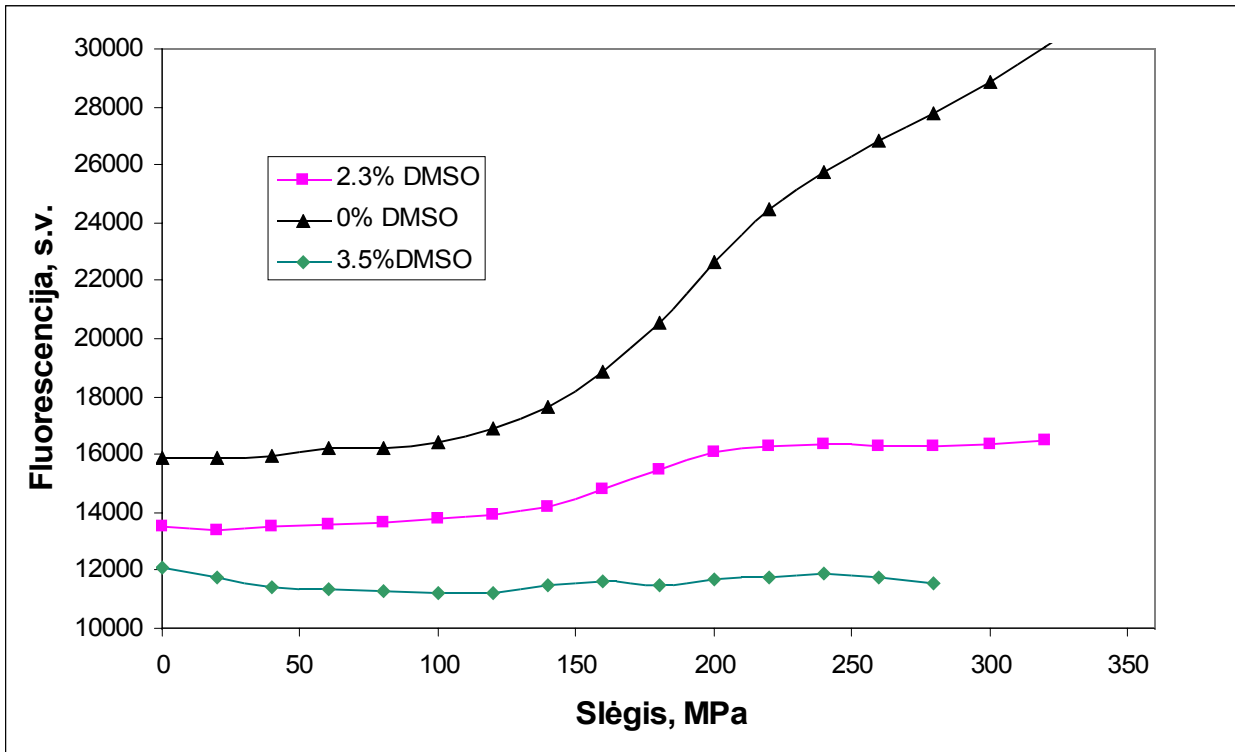
Eksperimentu norėta nustatyti aukšto slėgio įtaką ANS fluorescencijai skirtinguose tirpikliuose. Veikiant ANS tirpalą slėgiu iki 360 MPa, pastebėta, jog vandeny ANS fluorescencija nežymiai mažėja iki 150 MPa, o prie aukštesnio slėgio nežymiai didėja, etanolyje - smarkiai mažėja, o DMSO – didėja iki 150 MPa ir ženkliai mažėja prie aukštesnio slėgio (4.2.2.1 pav.).



4.2.2.1 pav. ANS, esančio skirtinguose tirpikliuose, fluorescencijos priklausomybė nuo slėgio. Fluor (fluorescencija) x 20, reiškia, jog ANS fluorescencija 20 kartų intensyvesnė, nei pavaizduota paveiksle.

4.2.3 DMSO įtaka CA slėginei denatūracijai

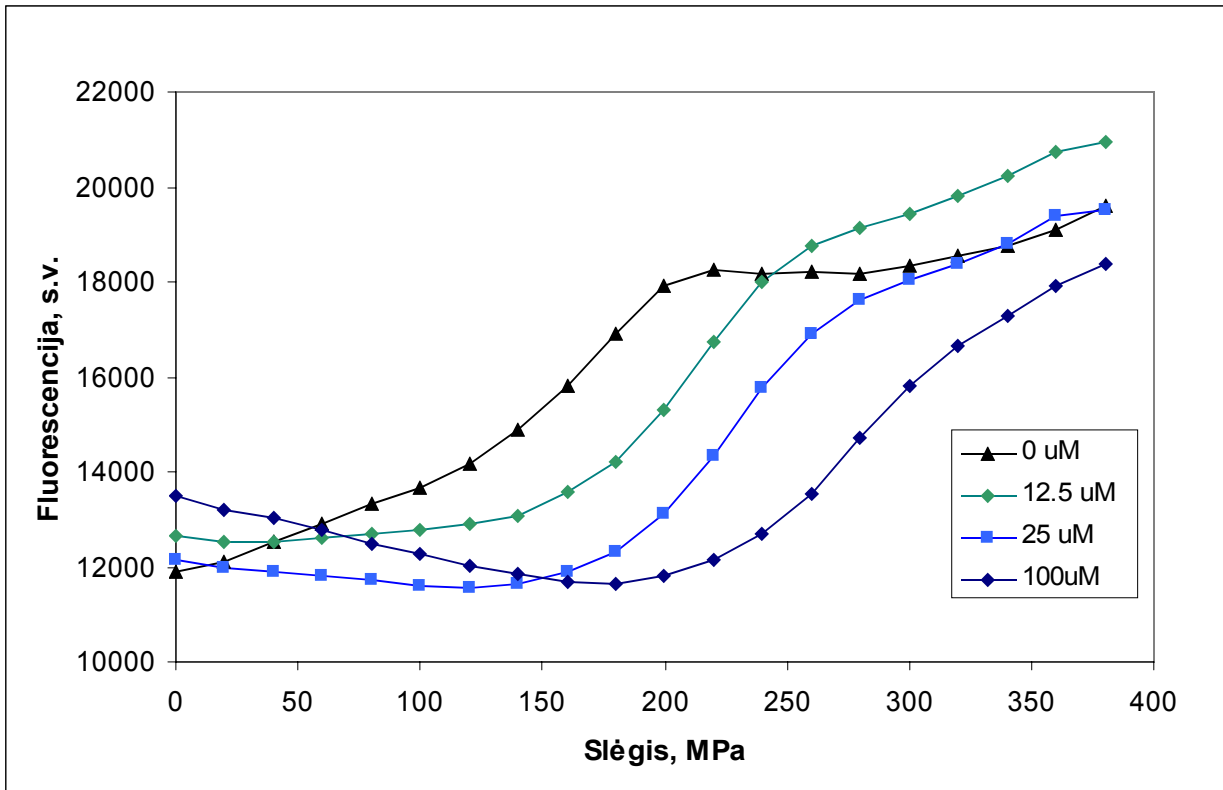
Norint nustatyti DMSO įtaką karboanhidrazės (CA) slėginei denatūracijai, buvo matuojama fluorescencija didinant slėgį iki 320 MPa. Tiriamą baltymo tirpalą sudarė: 3 μM CA, 50 μM ANS, 0-3.5% DMSO, 50 mM acetatinis buferis, pH=4 buvo veikiamas slėgiu, ir fiksuojama 480 nm fluorescencija. Pastebėta, jog 2.3% DMSO, smarkiai mažina CA tirpalo fluorescenciją, o kai tirpale yra 3.5% DMSO, pastebimo fluorescencijos kitimo nebelieka (4.2.3.1 pav.).



4.2.3.1 pav. DMSO įtaka 3 μM CA tirpalo (3 μM CA, 50 μM ANS, 0-2.3% DMSO, 50mM acetatinis buferis, pH=4) denatūracijai.

4.2.4 CA slėginė denatūracija, esant acetazolamidui

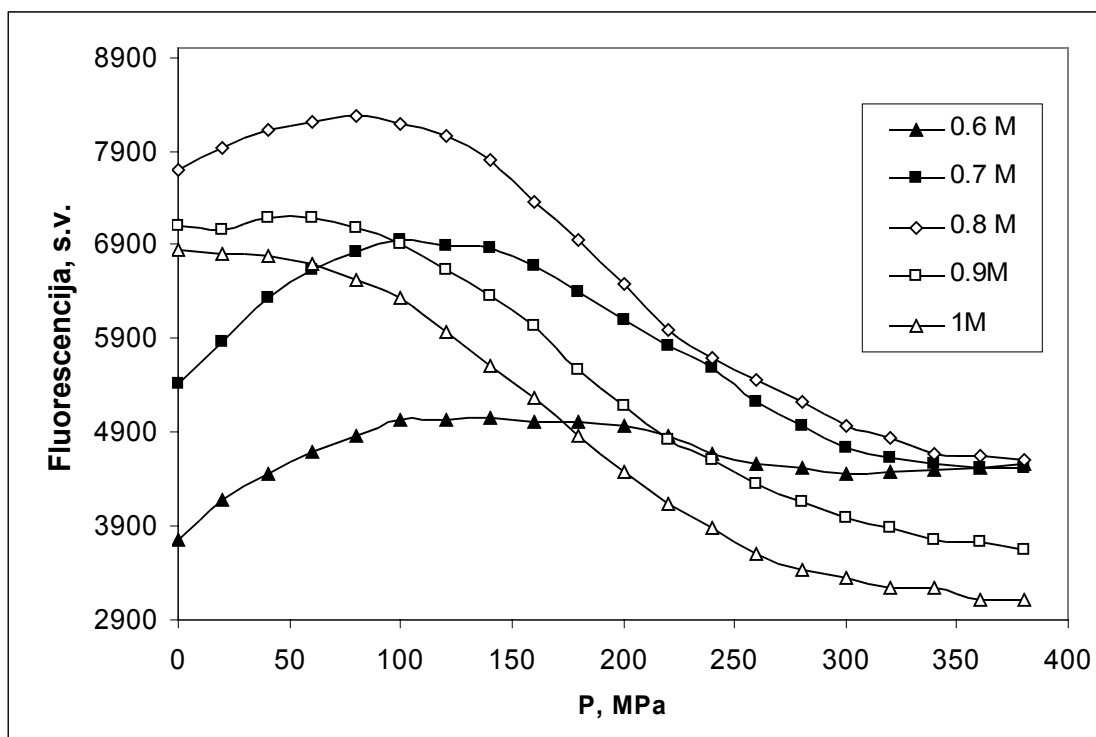
Veikiant karboanhidrazės (CA) tirpalą (3 μM CA, 50 μM ANS, 2.3% DMSO, 0-100 μM acetazolamido (ACZ), 50mM acetatinis buferis, pH=4) aukštu slėgiu iki 400 MPa buvo užfiksuotos ANS fluorescencijos kitimo kreivės, panašus į baltymo išsisukimo tranziciją (4.2.4.1 pav.). Fluorescencijos kreivėse su ACZ pastebėta, jog kuo tirpale daugiau acetazolamido tuo slėgiamas baltymas labiau stabilizuojamas ir išsisukimo tranzicija slenkasi į aukštesnio slėgio sritį (4.2.4.1 pav.). Tad ACZ stabilizuoja ne tik temperatūra veikiamą CA, kaip buvo parodyta anksčiau, bet ir apsaugo nuo slėginės denatūracijos.



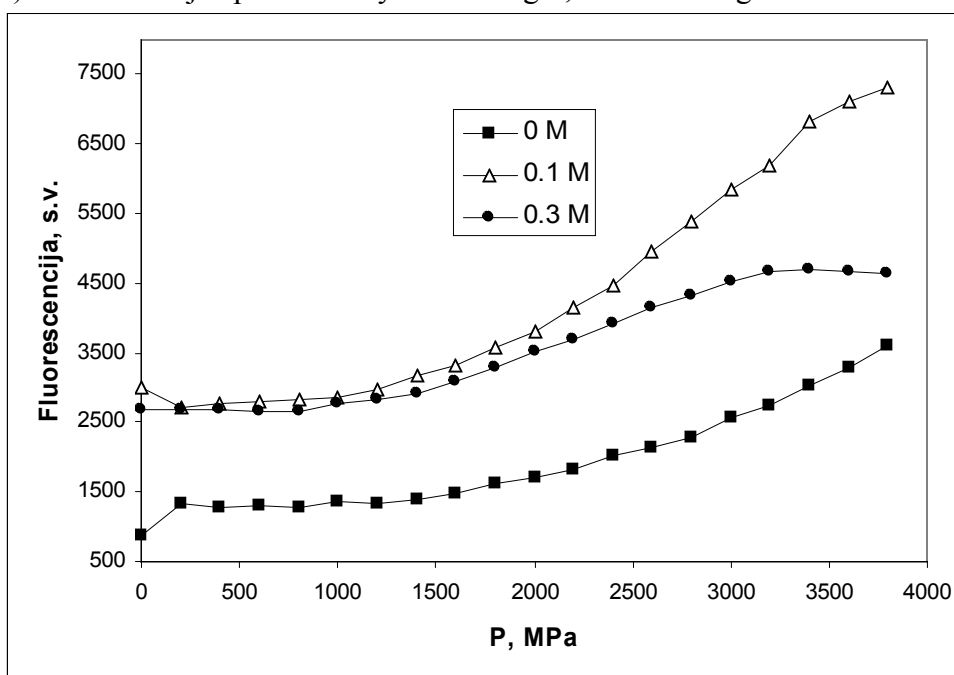
4.2.4.1 pav. CA slėginė denatūracija, esant skirtingos koncentracijos (0; 12.5; 25; 100μM) acetazolamidui.

4.2.5 GuanCl įtaka Hsp90N slėginei denatūracijai.

Hsp90N nedenatūruoja veikiant aukštu slėgiu iki 400 MPa. Šio baltymo išsisukimo tranziciją, panašią į temperatūra veikiamo baltymo tranziciją, pavyko užfiksuoti naudojant iki denatūracinę 0,3 M GuanCl koncentraciją ir aukštą slėgį iki 400 MPa (4.2.5.2 pav.). Naudojant mažesnę GuanCl koncentraciją nustatyta nepilna, o su didesniu GuanCl kiekiu nuo 0,6-0,8 M sunku pasakyti ar matoma nepilna, ar pakitusi baltymo tranzicijos forma (4.2.5.1 pav.). Temperatūrinės denatūracijos metodu nustatyta, jog Hsp90N denatūruoja esant 0,9-1M GuanCl, tad 4.2.5.1 pav. matomos denatūravusio baltymo fluorescencijos pokyčiai. Atliekant slėginės Hsp90N denatūracijos eksperimentus, slėgis buvo didinamas žingsniais po 20MPa kas 2min. Tiriamą tirpalą sudarė: 3 μM Hsp90N, 50 μM ANS, 10mM Bis-tris buferis, pH=7 ir 0.1-1 M GuanHCl.



4.2.5.1 pav. Hsp90N tirpalo (3 μ M Hsp90N, 56 μ M ANS, 10mM Bis-tris buferis, pH=7, 0.6-1 M GuanCl) fluorescencijos priklausomybė nuo slėgio, esant skirtingai GuanCl koncentracijai.



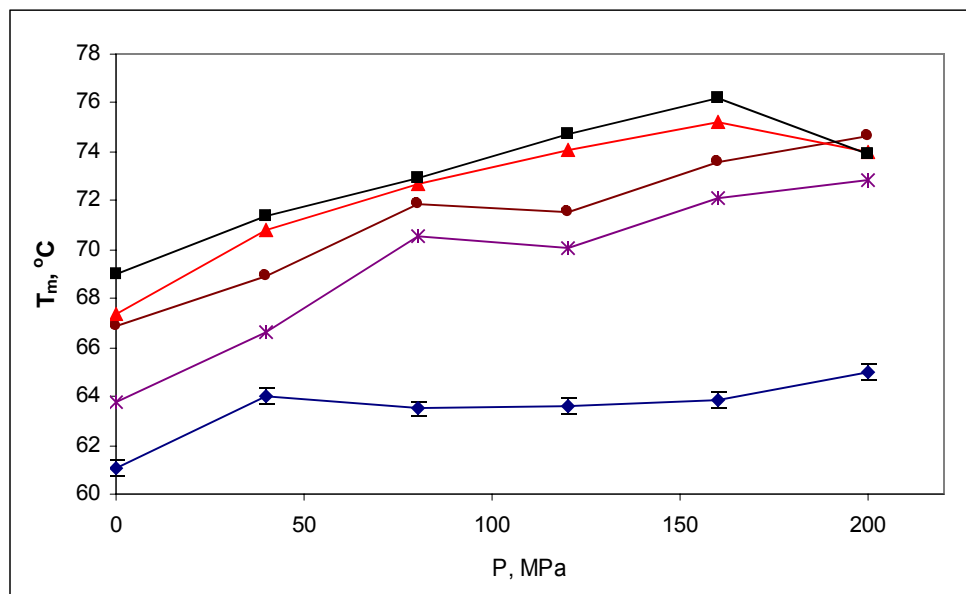
4.2.5.2 pav. Hsp90N tirpalo (3 μ M Hsp90N, 50 μ M ANS, 10mM Bis-tris buferis, pH=7, 0-0.3 M GuanCl) fluorescencijos priklausomybė nuo slėgio.

4.2.6rhCAI T_m kitimo priklausomybė nuo slėgio ir METZ

Norint nustatyti slėgio poveikį rhCAI ir rhCAI-METZ komplekso lydymosi temperatūrų kitimui, buvo atlikti slėginiai temperatūrinės denatūracijos eksperimentai. Tiriamas tirpalas (3μM rhCAI, 50 μM ANS, 50mM fosfatinis, buferis (pH=7), 1,8% DMSO, 0-200 μM METZ), suspaustas iki norimo pastovaus slėgio, kaitinamas iki 85°C ir viso kaitinimo metu, žadinant tirpalą 380nm šviesa, matuojama 480 nm fluorescencija. Gauti fluorescenciniai duomenys aproksimuojami teoriniu modeliu (6), nustatant T_m.

Tirpale nesant METZ, aukštas slėgis iki 40 MPa stabilizuoja temperatūra denatūruojamą rhCAI, 4 °C padidindamas T_m, tačiau toliau didinant slėgį iki 160 MPa lydymosi temperatūra išlieka nepakitusi, o nuo 160 iki 200 MPa T_m vėl nežymiai (per 1 °C) padidėja (4.7.1.1). Aukšto slėgio stabilizuojamąjį poveikį galima aiškinti literatūroje aptiktu pastebėjimu, jog padidėjusi temperatūra padidina išsisukusio baltymo sistemos tūrį daugiau nei susisukusio (Desai, Panick et al. 1999), o slėgiu yra skatinama reakcija, kurios metu sistemos tūris sumažėtų. Eksperimentais su citochromu c, taip pat buvo pastebėta, jog aukštas slėgis iki 2200 bar stabilizuoja temperatūra veikiamą baltymą, padidindamas jo lydymosi temperatūrą per 13 °C (kai pH=4.3) (Dubins, Filfil et al. 2003)

Tiriamą tirpalą su pasirinkta 6,25-12,5 μM METZ koncentracija, veikiant slėgiu iki 200 MPa pastebėtas rhCAI – METZ komplekso stabilizavimas per 9-7 °C, suslėgtą tirpalą denatūruojant aukšta temperatūra iki 80 °C (4.2.6.1 pav.; 4.2.6.2 laetelė). Tirpalo su 50-100 μM METZ, stabilizuojamasis slėgio poveikis buvo pastebėtas iki 160MPa, o tirpalą suslėgus iki 200 MPa ir kaitinant iki 80 °C buvo pastebėtas rhCAI – METZ komplekso nedidelis destabilizavimas, kai T_m sumažėjo per 0,5 °C, lyginant su T_m prie 160 MPa (4.2.6.1 pav.; 4.2.6.2 laetelė). Šių eksperimentų rezultatai leidžia teigti, jog aukštas slėgis nežymiai stabilizuoja rhCAI ir smarkiai stabilizuoja rhCAI – METZ kompleksą.



4.2.6.1 pav. rhCAI ir komplekso su METZ, T_m priklausomybė nuo slėgio, kai tirpale skirtinga METZ koncentracija (0 μM (♦), 6,25 μM (*), 12,5 μM (●), 50 μM (▲), 100 μM (■))

4.2.6.2 lentelė. rhCAI T_m vertės prie atmosferos ir aukšto slėgio, kai tirpale skirtinga METZ koncentracija.

P, MPa	Tm, °C, kai atitinkama METZ koncentracija (μM):				
	0	6,25	12,5	50	100
0,1	61,08	63,75	66,89	67,34	69,04
40	64,01	66,65	68,91	70,77	71,37
80	63,49	70,54	71,86	72,65	73,25
120	63,59	70,06	71,50	74,05	74,75
160	63,72	72,10	73,55	75,38	76,22
200	64,99	72,85	74,64	73,98	73,93

4.2.7 rhCAI jungimasis su metazolamidu (METZ), esant aukštam slėgiui

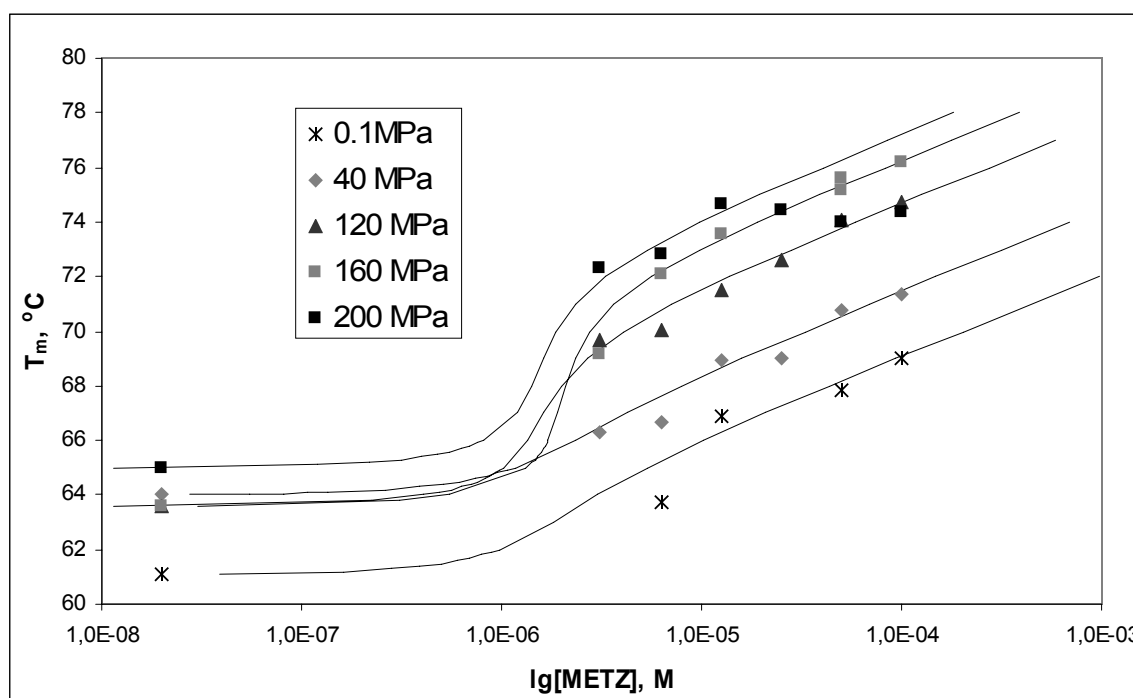
Eksperimentu norėta nustatyti aukšto slėgio įtaką rhCAI (rekombinantinė hCAI, 24 frakcijos) ir METZ jungimuisi. Šiam tikslui rhCAI-METZ tirpalas (3 μM rhCAI, 50 μM ANS, 50 mM fosfatinis, buferis (pH=7), 1,8% DMSO, 0-200 μM) buvo kaitinamas iki 85°C, esant aukštam slėgiui. Viso kaitinimo metu, tirpalas buvo žadinamas 380 nm šviesa ir fiksuojama 480 nm fluorescencija. Fluorescencinius duomenis aproksimavus teorine kreive (6), nustatytant T_m vertes. T_m priklausomybės nuo METZ koncentracijos, eksperimentinius duomenis aproksimavus teorine kreive (14) (4.2.7.2 pav.), nustatytos rhCAI, METZ jungimosi konstantos (K_b), prie skirtingo slėgio (4.2.7.1 lentelė). Pastebėtas 7 kart stipresnis rhCAI ir METZ jungimasis, esant

120MPa ir 20 kart stipresnis, esant 160 ar 200 MPa (4.2.7.1 lentelė) lyginant su jungimusi, esant atmosferos slėgiui (4.2.7.1 lentelė).

Esant 200 MPa slėgiui, buvo pastebėtas rhCAI tirpalo įsisotinimas METZ, kuomet didinant METZ koncentraciją nuo 12,5 iki 200 μM T_m nebekito, nors prie mažesnio slėgio – didėjo (4.2.7.2 pav.). Modelis (14), kuris buvo naudojamas nustatyti jungimosi konstantą (K_b), neaprašo sistemos, kurioje pasiekama tirpalo įsisotinimo ligandu riba, todėl jungimosi konstanta buvo nustatyta iš didėjančios T_m priklausomybės nuo METZ koncentracijos, ignoruojant nekintančias T_m vertes (4.2.7.2 pav.).

4.2.7.1 lentelė. rhCAI, jungimosi (K_b) ir disociacijos (K_d) konstantos, kai išsisukimo entalpija 170 kcal/mol.

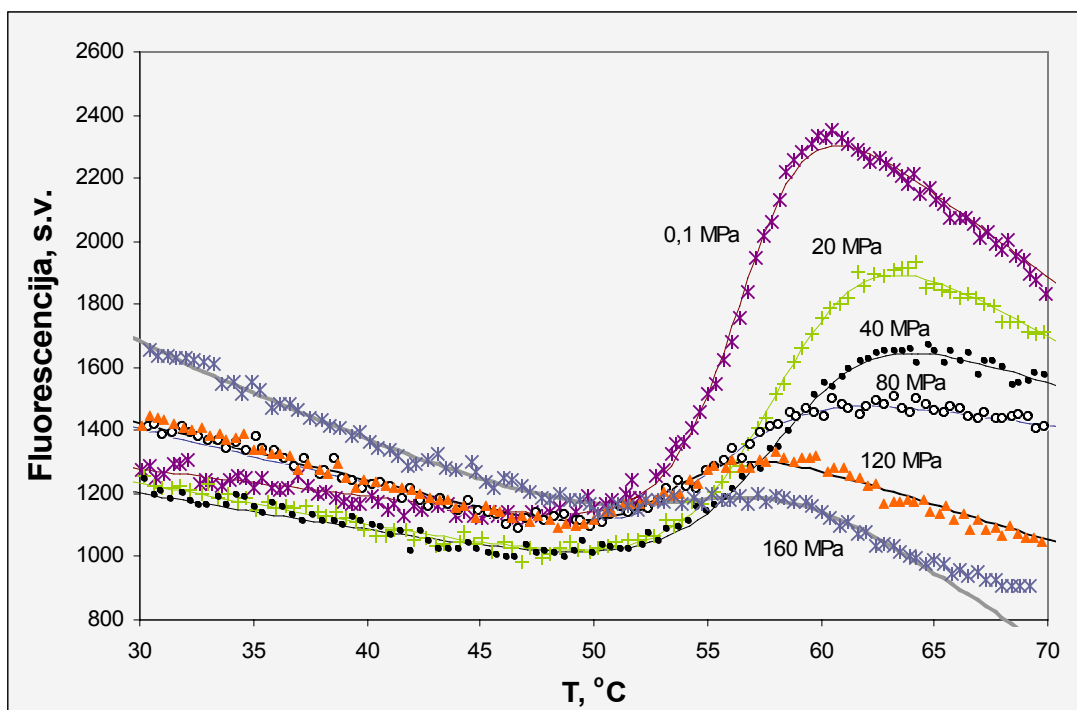
Slėgis (MPa)	K_b , ($\times 10^6 \text{ M}^{-1}$)	K_d (μM)
0,1	5	0.2
40	3	0.3
120	50	0.02
160	170	0.006
200	110	0.009



4.2.7.2 pav. rhCAI T_m priklausomybė nuo ligando (METZ) koncentracijos, esant aukštam slėgiui.

4.2.8 Hsp90N temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui

Aukštu slėgiu veikiamą Hsp90N (ekspresuota biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje) tirpalą (8 μM Hsp90Nterm, 50 μM ANS (ištirpintas vandeny), 10mM bis-tris buferis, pH=7), denatūruojant temperatūra iki 75 $^{\circ}\text{C}$ buvo pastebėtas baltymo stabilizavimas iki 40 MPa ir destabilizavimas, esant didesniam slėgiui. (4.2.9.3 pav.). Aukštas slėgis padidina tiriamo tirpalo fluorescenciją, iki 30 $^{\circ}\text{C}$ (4.2.8.1 pav.). Šis padidėjimas galėjo įvykti dėl pakitusios baltymo struktūros prie kurios prisijungė daugiau ANS molekulių arba ANS molekulės pakitusioje struktūroje „surado“ hidrofobinių paviršių, kuriuose ANS fluorescuoja intensyviau. Keliant suslėgto tirpalo temperatūrą, dėl šiame darbe nenagrinėtų priežasčių, fluorescencija krinta iki baltymo tranzicijos ir po jos (4.2.8.1 pav.). Aukštas slėgis sumažina ir tranzicijos fluorescenciją.

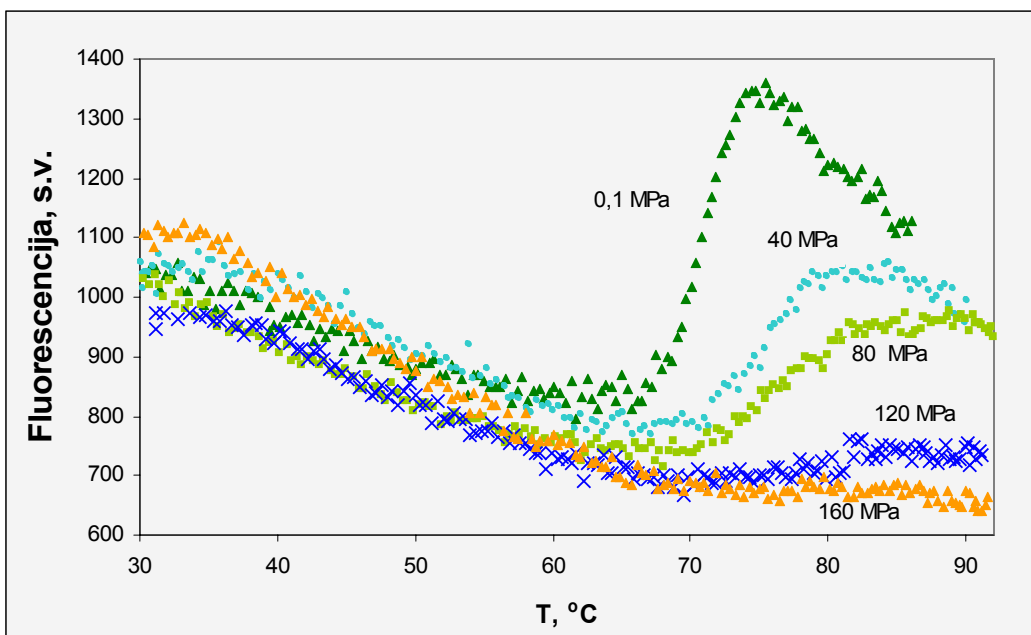


4.2.8.1 pav. Slėgio įtaka Hsp90N temperatūrinei denatūracijai.

4.2.9 Hsp90N - radisikolis komplekso temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui

Radisikolis stipriai stabilizuoja Hsp90 baltymą padidindamas per T_m per 13 $^{\circ}\text{C}$, esant atmosferos slėgiui ir stabilizavimas dar daugiau padidėja, veikiant Hsp90N- radisikolio kompleksą aukštu slėgiu iki 160 MPa, kai radisikolio koncentracija 20 μM (4.2.9.2 pav). Suslėgus Hsp90N, radisikolio tirpalą (8 μM Hsp90N, 20 μM radisikolis, 50 μM ANS, 10mM bis-tris buferis, pH=7)

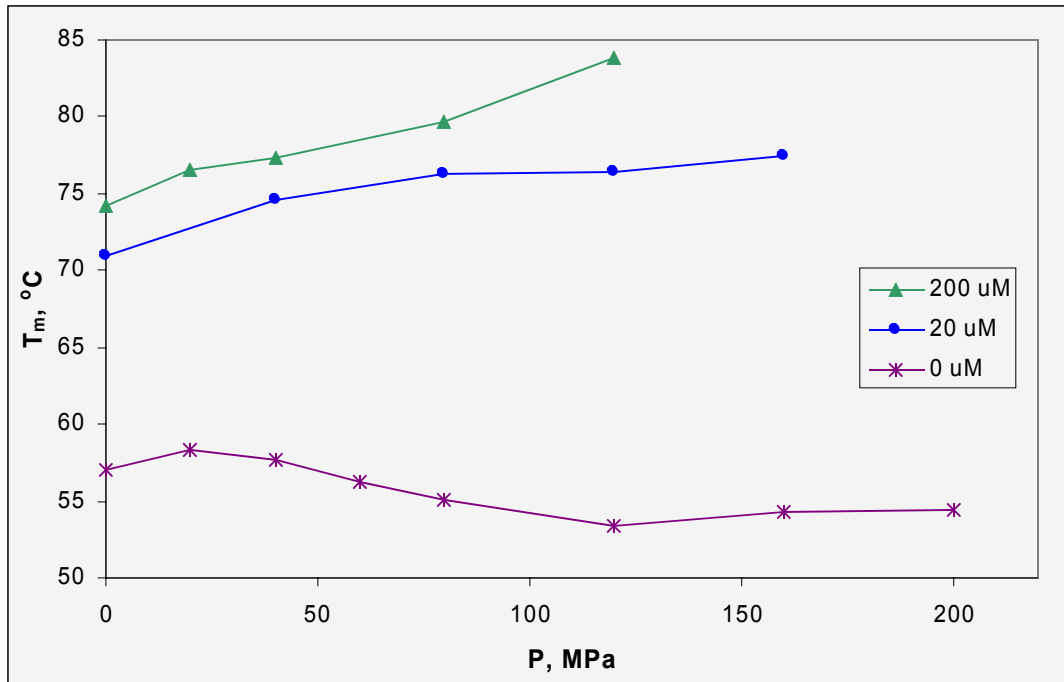
40; 80; 120; 160 MPa slėgiu, ir jį kaitinant iki 95 °C buvo matuojama 480 nm fluorescencija. Eksperimentiniuose duomenyse pastebėta, jog aukštas slėgis mažina kaitinamo baltymo tirpalo fluorescenciją (4.2.9.1). Nustačius Hsp90N – radisikolio komplekso T_m, pastebėta, jog aukštas slėgis iki 160 MPa stabilizuoja temperatūra veikiamą kompleksą, padidindamas T_m nuo 71 iki 77.4 °C (4.2.9.3). Panašus slėgio poveikis baltymo- ligando temperatūriniam stabilizavimui, pastebėtas su karboanhidraze ir METZ (4.2.6. skyrelis).



4.2.9.1 pav. Hsp90N-radisikolis komplekso temperatūrinė denatūracija, esant 0.1; 40; 80; 120 MPa slėgiui.

4.2.9.2 Lentelė. Hsp90N lydymosi temperatūros (T_m) kitimas baltymą vaikiant slėgiu, nesant radisikolio (T_{m1}) ir esant 20 μM radisikolio (T_{m2}). $\Delta T_m = T_{m2} - T_{m1}$.

P, MPa	T _{m1} , °C	T _{m2} , °C	ΔT_m , °C
0,1	57,0	71,0	14,0
20	58,3		
40	57,7	74,6	16,8
60	56,2		
80	55,1	76,3	21,1
120	53,4	76,4	23,0
160	54,3	77,4	23,1
200	54,4		



4.2.9.3 pav. Hsp90N T_m priklausomybė nuo slėgio, esant 0 μM , 20 ir 200 μM radisikolio koncentracijai baltymo tirpale.

IŠVADOS

1. Tirtus bCAII sulfonamidinius slopiklius, pagal jungimosi konstantų reikšmių didėjimą, galima išrikiuoti į eilę: ACZ >PFS >VD20 >VD6 >VD5
2. Nedideli kiekiai (1-4%) DMSO aukšto slėgio eksperimentuose, gana smarkiai įtakoja ANS fluorescenciją.
3. Didėjant slėgiui ANS fluorescencija vandenį nekinta, o DMSO ir etanolyje smarkiai mažėja.
4. Aukštu slėgiu iki 400 MPa, esant nedidelioms GuanCl koncentracijoms, galima stebėti Hsp90N išsisukimo tranziciją.
5. Esant aukštam slėgiui iki 200MPa rhCAI ir METZ jungimasis stiprėja.
6. Aukštas slėgis padidina CA ir Hsp90N kompleksų su ligandais lydymosi temperatūras.
7. ACZ stabilizuoja slėgiu veikiamą karboanhidrazę.

Baltymų – ligandų jungimosi tyrimai esant aukštam slėgiui

SANTRAUKA

Temperatūrinės denatūracijos fluorescenciniu metodu buvo tirta trijų baltymų (dvi karboanhidrazės (CA) izoformos (bCAII ir rhCAI) ir Hsp90N) sąveika su ligandais, esant aukštam slėgiui.

Karboanhidrazės yra fermentai katalizuojantys gyvybiškai svarbią anglies dvideginio virtimą angliarūgšte reakciją. Gyvame organizme, jos aktyvumo sutrikimai sukelia įvairias ligas, tokias kaip gliaukoma ir vėžiniai susirgimai. Šio baltymo aktyvumą slopina sulfonamidiniai junginiai, kurių keletas naudojami kaip vaistai gliaukomos ir vėžio gydymui. Šiame darbe buvo tirtas senų ir naujai sukurtų sulfonamidinių slopiklių jungimasis su CA, bei stebėtas šio jungimosi kitimas, esant aukštam slėgiui.

Hsp90 yra šaperonas, dalyvaujantis naujai ekspresuotų baltymų „klientų“ susisukime ir aktyvavime. Hsp90 aktyvumo sutrikimai sukelia vėžinius susirgimus, todėl kuriami vaistai mažinantys jų aktyvumą. Vienas iš geriausiai prie Hsp90 besijungiančių slopiklių yra radisikolis, kurio sintetiniai analogai gali būti naudojami kaip vaistai slopinantys Hsp90 aktyvumą. Šiame darbe tirta Hsp90N slėginė denatūracija, bei Hsp90N ir jo komplekso su radisikoliu temperatūrinis stabilumas, esant aukštam slėgiui. Parodyta, jog Hsp90N stabilumas sumažėja o Hsp90N-radisikolio komplekso padidėja esant slėgiui iki 200 MPa.

Verta paminėti, jog šis darbas yra pirmasis, kuriame tiriamas CA ir Hsp90 slėginis stabilumas ir ligandų jungimasis, esant aukštam slėgiui.

Investigations of protein-ligand binding at high pressure

SUMMARY

Carbonic anhydrases (CAs) are wide - spread enzymes which play important physiological and patho – physiological functions. The catalytical active isoforms are strongly inhibited by aromatic and heterocyclic sulfonamides. Hsp90 is an abundant molecular chaperone involved in variety of cellular processes ranging from signal transduction to viral replication. Overactivity of this protein cause cancer, which can be treated with chemical compounds like geldanamycin, radicicol or its derivatives. In this work, CA and Hsp90N were used as model proteins to investigate its binding with ligands at high pressure. These proteins haven't ever been explored at high pressure. In general, understanding the molecular basis of protein stability starts with the thermodynamic characterization of temperature-, pressure- and solvent - induced transition of proteins between their native and their denatured conformation. It was investigated and characterise the stability of CA and Hsp90N and its complexes with specific ligand at high pressure by thermal shift fluorescence assay.

Padėka

Dėkoju savo vadovui Daumantui Matuliui už rūpinimąsi mano žinių, baltymų ir ligandų sąveikos tyrimuose, įgyjimu ir skatinimą moksliniam tobulėjimui, bei visam Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijos kolektyvui už naudingus patarimus, suteiktas žinias, darbingą ir draugišką atmosferą.

Dėkoju savo šeimai už rūpinimąsi mano išsilavinimu ir tvirtą palaikymą rašant šį darbą.

NAUDOTA LITERATŪRA

- Abbate, F., C. T. Supuran, et al. (2002). "Nonaromatic sulfonamide group as an ideal anchor for potent human carbonic anhydrase inhibitors: role of hydrogen-bonding networks in ligand binding and drug design." J Med Chem **45**(17): 3583-7.
- Balny, C., P. Masson, et al. (2002). "High pressure effects on biological macromolecules: from structural changes to alteration of cellular processes." Biochim Biophys Acta **1595**(1-2): 3-10.
- Bondos, S. E., S. Sligar, et al. (2000). "High-pressure denaturation of apomyoglobin." Biochim Biophys Acta **1480**(1-2): 353-64.
- Briganti, F., S. Mangani, et al. (1997). "Carbonic anhydrase activators: X-ray crystallographic and spectroscopic investigations for the interaction of isozymes I and II with histamine." Biochemistry **36**(34): 10384-92.
- Chalikian, T. V. (2003). "Volumetric properties of proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 207-35.
- Chalikian, T. V. and K. J. Breslauer (1996). "Compressibility as a means to detect and characterize globular protein states." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1012-4.
- Chapeaurouge, A., J. S. Johansson, et al. (2001). "Folding intermediates of a model three-helix bundle protein. Pressure and cold denaturation studies." J Biol Chem **276**(18): 14861-6.
- Chaudhury, S., T. R. Welch, et al. (2006). "Hsp90 as a target for drug development." ChemMedChem **1**(12): 1331-40.
- Clare, B. W. and C. T. Supuran (1994). "Carbonic anhydrase activators. 3: structure-activity correlations for a series of isozyme II activators." J Pharm Sci **83**(6): 768-73.
- Clery-Barraud, C., A. Ordentlich, et al. (2002). "Pressure and heat inactivation of recombinant human acetylcholinesterase. Importance of residue E202 for enzyme stability." Eur J Biochem **269**(17): 4297-307.
- Desai, G., G. Panick, et al. (1999). "Pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor." J Mol Biol **288**(3): 461-75.
- Dubins, D. N., R. Filfil, et al. (2003). "Volume and compressibility changes accompanying thermally-induced native-to-unfolded and molten globule-to-unfolded transitions of cytochrome c: a high pressure study." Biochemistry **42**(29): 8671-8.
- Foguel, D., C. R. Robinson, et al. (1999). "Hydrostatic pressure rescues native protein from aggregates." Biotechnol Bioeng **63**(5): 552-8.
- Gorovits, B. M. and P. M. Horowitz (1998). "High hydrostatic pressure can reverse aggregation of protein folding intermediates and facilitate acquisition of native structure." Biochemistry **37**(17): 6132-5.
- Heremans, K. (1982). "High pressure effects on proteins and other biomolecules." Annu Rev Biophys Bioeng **11**: 1-21.
- Heremans, K. and L. Smeller (1998). "Protein structure and dynamics at high pressure." Biochim Biophys Acta **1386**(2): 353-70.
- Hewett-Emmett, D. (2000). "Evolution and distribution of the carbonic anhydrase gene families." Exs(90): 29-76.
- Jackson, S. E., C. Queitsch, et al. (2004). "Hsp90: from structure to phenotype." Nat Struct Mol Biol **11**(12): 1152-5.
- Jonas, J. (2002). "High-resolution nuclear magnetic resonance studies of proteins." Biochim Biophys Acta **1595**(1-2): 145-59.

- Kim, C. Y., D. A. Whittington, et al. (2002). "Structural aspects of isozyme selectivity in the binding of inhibitors to carbonic anhydrases II and IV." *J Med Chem* **45**(4): 888-93.
- Kim, J., S. Felts, et al. (2004). "Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90." *J Biomol Screen* **9**(5): 375-81.
- Mantulin, W. W. and H. J. Pownall (1985). "Reversible folding reactions of human apolipoprotein A-I: pressure and guanidinium chloride effects." *Biochim Biophys Acta* **836**(2): 215-21.
- Matulis, D., C. G. Baumann, et al. (1999). "1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent." *Biopolymers* **49**(6): 451-8.
- Matulis, D., J. K. Kranz, et al. (2005). "Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor." *Biochemistry* **44**(13): 5258-66.
- Matulis, D. and R. Lovrien (1998). "1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation." *Biophys J* **74**(1): 422-9.
- Meersman, F., C. M. Dobson, et al. (2006). "Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions." *Chem Soc Rev* **35**(10): 908-17.
- Mozhaev, V. V., K. Heremans, et al. (1996). "High pressure effects on protein structure and function." *Proteins* **24**(1): 81-91.
- Panda, M., B. M. Gorovits, et al. (2000). "Productive and nonproductive intermediates in the folding of denatured rhodanese." *J Biol Chem* **275**(1): 63-70.
- Pastorekova, S., S. Parkkila, et al. (2004). "Carbonic anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects." *J Enzyme Inhib Med Chem* **19**(3): 199-229.
- Pearl, L. H. and C. Prodromou (2006). "Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery." *Annu Rev Biochem* **75**: 271-94.
- Perrett, S. and J. M. Zhou (2002). "Expanding the pressure technique: insights into protein folding from combined use of pressure and chemical denaturants." *Biochim Biophys Acta* **1595**(1-2): 210-23.
- Prehoda, K. E., E. S. Mooberry, et al. (1998). "Pressure denaturation of proteins: evaluation of compressibility effects." *Biochemistry* **37**(17): 5785-90.
- Roe, S. M., C. Prodromou, et al. (1999). "Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin." *J Med Chem* **42**(2): 260-6.
- Sasahara, K. and K. Nitta (1999). "Pressure-induced unfolding of lysozyme in aqueous guanidinium chloride solution." *Protein Sci* **8**(7): 1469-74.
- Shen, G., M. Wang, et al. (2006). "Design, synthesis, and structure--activity relationships for chimeric inhibitors of Hsp90." *J Org Chem* **71**(20): 7618-31.
- Silva, J. L. and G. Weber (1993). "Pressure stability of proteins." *Annu Rev Phys Chem* **44**: 89-113.
- Supuran, C. T., A. Scozzafava, et al. (2003). "Carbonic anhydrase inhibitors." *Med Res Rev* **23**(2): 146-89.
- Vidugiris, G. J., D. M. Truckses, et al. (1996). "High-pressure denaturation of staphylococcal nuclease proline-to-glycine substitution mutants." *Biochemistry* **35**(12): 3857-64.
- Zhou, J. M., L. Zhu, et al. (2000). "Inactivation of creatine kinase by high pressure may precede dimer dissociation." *Eur J Biochem* **267**(4): 1247-53.
- Zipp, A. and W. Kauzmann (1973). "Pressure denaturation of metmyoglobin." *Biochemistry* **12**(21): 4217-28.