



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Simona Jachimovičiūtė

METALŲ JONŲ IR REKOMBINANTINIŲ AUGIMO HORMONŲ SĄVEIKA

**THE INTERACTION OF METAL IONS WITH RECOMBINANT GROWTH
HORMONES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslo kryptis

Vilnius, 2008

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(Parašas)

(vardas, pavardė)

(Data)

Simona Jachimovičiūtė

METALŲ JONŲ IR REKOMBINANTINIŲ AUGIMO HORMONŲ SĄVEIKA

**THE INTERACTION OF METAL IONS WITH RECOMBINANT GROWTH
HORMONES**

Baigiamasis magistro darbas

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerijos mokslų kryptis

Vadovas doc. dr. J. Sereikaitė

(Parašas)

(Data)

Vadovas dr. D. Matulis

(Parašas)

(Data)

Konsultantas doc. dr. A. Kaulakienė

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2008

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU
Katedros vedėjas

(parašas)

Technologijos mokslų studijų sritis

Bioinžinerija mokslo kryptis

Bioinžinerija studijų programa, valstybinis kodas 62405T201

Bioinžinerija specializacija

(vardas, pavardė)

200_____

**BAIGIAMOJO MAGISTRO DARBO
UŽDUOTIS**

200.....Nr.

Vilnius

Studentei

Simonai Jachimovičiūtei

Baigiamojo darbo tema: **METALŲ JONŲ IR REKOMBINANTINIŲ AUGIMO HORMONŲ
SĄVEIKA**

patvirtinta 200...m. d. dekanų įsakymu Nr.

Baigiamojo darbo užbaigimo terminas 200...m. d.

BAIGIAMOJO DARBO UŽDUOTIS:

Rekombinantinių kiaulės, audinės, žmogaus augimo hormonų ir įvairių metalų jonų sąveikos tyrimas izoterminės titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais.

Vadovas
(parašas)

doc. dr. Jolanta Sereikaitė

Vadovas
(parašas)

dr. D. Matulis

Užduotį gavau
(parašas)

Simona Jachimovičiūtė

.....
(data)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas
Fundamentinių mokslų fakultetas
Chemijos ir bioinžinerijos katedra

ISBN ISSN
Egz. sk.
Data-....-....

Bioinžinerijos studijų programos baigiamasis magistro darbas

Pavadinimas: **Metalų jonų ir rekombinantinių augimo hormonų sąveika**

Autorė: **Simona Jachimovičiūtė**

Vadovai: **doc. dr. J. Sereikaitė**

dr. D. Matulis

Kalba

x	Lietuvių
	Užsienio

Anotacija

Darbas skirtas rekombinantinių kiaulės, audinės, žmogaus augimo hormonų ir skirtingų metalų jonų sąveikos tyrimui. Pasirinkti tie katijonai, kurių įtaka rAH, raAH, rŽAH oligomerinei struktūrai vandeniniame tirpale yra žinoma. Terminio poslinkio metodu nustatyta, kad Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} destabilizuoja rekombinantinius kiaulės, audinės augimo hormonus. Panaudojant baltymų terminio stabilizavimo ir destabilizavimo ligandais modelį apskaičiuotos šių metalų jonų ir nenatyrvių augimo hormonų jungimosi konstantos. Tuo tarpu Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} stabilizuoja rekombinantinį žmogaus augimo hormoną, tačiau yra ribinės metalų jonų koncentracijos, kurias viršijus baltymas destabilizuojamas. Mn^{2+} nesijungia su rekombinantiniais kiaulės, audinės AH. Mn^{2+} ir Cu^{2+} neturi įtakos rŽAH stabilumui, tačiau didesnės šių jonų koncentracijos taip pat destabilizuoja šį baltymą. Izoterminio titravimo kalorimetrija nustatyta Zn^{2+} jungimosi su natyviais rekombinantiniais kiaulės, audinės augimo hormonais stochiometrija, jungimosi konstantos, stebimi entalpijos pokyčiai. Taip pat ITK eksperimentais patvirtinama, kad vieno cinko jono jungimasis su viena rŽAH molekule yra kooperatyvus.

Darbą sudaro 6 dalys: įvadas, literatūros apžvalga, metodinė dalis, rezultatai ir jų aptarimas, išvados, literatūros sąrašas.

Darbo apimtis – 88 p. teksto, 34 pav., 5 lent., 167 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai: audinės augimo hormonas (aAH), kiaulės augimo hormonas (kAH), žmogaus augimo hormonas (žAH), metalų jonai, izoterminė tiravimo kalorimetrija (ITK), terminio poslinkio metodas, baltymų stabilizavimas.

Vilnius Gediminas Technical University
Fundamental Science faculty
Chemistry and bioengineering department

ISBN ISSN
No. of copies.
Date-....-....

Bioengineering study programme master thesis

Title: **The Interaction of Metal Ions with Recombinant Growth Hormones**

Author: **Simona Jachimovičiūtė**

Academic supervisors: **dr. J. Sereikaitė**

dr. D. Matulis

Language

☐	Lithuanian
☒	English

Annotation

The purpose of this final work is to investigate the interaction of different metal ions with recombinant porcine, mink, human growth hormones. Cations which influence on the oligomeric structures of recombinant human, porcine, mink growth hormones in water are known were chosen. Using thermal shift assay it is determined that Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} destabilize recombinant porcine and mink growth hormones. A quantitative model of protein thermal stabilization and destabilization by ligand was used to determine these metal ions binding constants to the unfolded states of the rpGH, rmGH. Conversely Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} stabilize recombinant human growth hormone but there are critical concentrations of metal ions. When the Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} concentrations exceed their critical concentrations these metal ions destabilize rhGH. Mn^{2+} do not interact with recombinant porcine, mink growth hormones. Mn^{2+} and Cu^{2+} do not effect the stability of rhGH, but bigger concentrations of these two metal ions also destabilize recombinant human growth hormone. Also stoichiometry, constants and enthalpies of Zn^{2+} binding to native rpGH and rmGH are determined directly by isothermal titration calorimetry. Additionally ITC experiments confirm that one zinc ion binds in a cooperative manner to one recombinant human growth hormone molecule.

Structure: introduction, part of theory, part of experiments, results and discussion, conclusions, references.

Thesis consist of: 88 p. text, 34 pictures, 5 tables, 167 bibliographical entries.

Keywords: mink growth hormone (mGH), porcine growth hormone (pGH), human growth hormone (hGH), metal ions, isothermal titration calorimetry (ITC), thermal shift assay, proteins stabilization.

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslų numeris	Paveikslų pavadinimas	Puslapis
1	Rekombinantinio kiaulės augimo hormono aminorūgščių seka	15
2	Erdvinė rekombinantinio kAH struktūra pagal baltymo kristalo rentgenostruktūrinę analizę	15
3	Rekombinantinio audinės augimo hormono aminorūgščių seka	17
4	Teorinė rekombinantinio audinės augimo hormono erdvinė struktūra	18
5	Rekombinantinio žmogaus augimo hormono aminorūgščių seka	19
6	Erdvinė rekombinantinio žmogaus augimo hormono struktūra pagal baltymo kristalo rentgenostruktūrinę analizę	19
7	Zn ²⁺ jungimosi vieta žmogaus augimo hormono ir prolaktino receptoriaus komplekse	22
8	Erdvinė rekombinantinio žmogaus augimo hormono struktūra ir metalo jono jungimosi vieta baltyme	23
9	0,05 mg/ml antros karboanhidrazės ir ANS tirpalo, esant įvairioms metazolamido koncentracijoms, kaitinto 1°C/min greičiu, fluorescencijos intensyvumai	24
10	Teorinės titravimo kreivės esant įvairioms c faktoriaus reikšmėms	30
11	50 µM <i>E.coli</i> tioredoksino izoterminio titravimo 500 µM CdCl ₂ tirpalu kreivė (0,1 M MOPS, pH 7,5, injekuota po 7 µl 25 °C temperatūroje)	31
12	10 µM KaUreE izoterminio titravimo 0,63 mM Ni ²⁺ tirpalu kreivė (0,1 M Tris-HCl, pH 7,45, 25 °C temperatūroje)	32
13	Vario jonų tirpalo izoterminio titravimo 50 nM apoazurino tirpalu kreivė (pH 7,0, 25 °C temperatūroje)	33
14	Rekombinantinių kiaulės (A, D), audinės (B, E), žmogaus (C, F) AH grynumo įvertinimas SDS-PAGE (15 %) metodu (A, B, C) ir RP-HPLC analize (kolonėlė „Protein C4“, 250 × 4,6 mm, Vydac) (D, E, F)	50
15	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų, esančių vandeniniuose tirpaluose, išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo dapoksilo [®] sulfonato koncentracijų	51
16	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų 100 mM buferinių tirpalų pH reikšmių	52

17	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo natrio chlorido koncentracijos	53
18	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) AH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo dimetilsulfoksido ir glicerolio koncentracijų	54
19	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) AH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo pridėtų reagentų koncentracijų	55
20	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 100 mM skirtingų anijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai	56
21	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 100 mM skirtingų katijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai	56
22	Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 5 mM skirtingų katijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai	57
23	rkAH (A), raAH (B), ržAH (C) esant esant 5 mM reduktorių ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai	58
24	Rekombinantinio kiaulės augimo hormono ir dapoksilo [®] sulfonato komplekso fluorescencijos intensyvumų priklausomybės nuo temperatūros nesant ir esant 1000 μ M, 62,5 μ M, 3,9 μ M ZnSO ₄ 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5	59
25	Rekombinantinio kiaulės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	60
26	Rekombinantinio audinės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	62
27	Rekombinantinio žmogaus augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	63
28	Skirtingų koncentracijų rekombinantinio žmogaus augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų	64

	koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	
29	Skirtingų koncentracijų rkAH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	65
30	Skirtingų koncentracijų rekombinantinio audinės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių	66
31	Rekombinantinio kiaulės augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} integruoti duomenys	68
32	rkAH izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (galios pokyčiai) (A) ir integruoti (galios pokyčiai perskaičiuoti į šilumos kiekio pokyčius) (B) duomenys, esant optimalioms eksperimento sąlygoms: baltymo koncentracija – 100 μ M, NaCl koncentracija – 50 mM, Zn^{2+} - 1000 μ M (injekuota kas 3 min. po 10 μ l), 50 mM Tris-HCl (dializės) buferinis tirpalas, pH 7,5	69
33	Rekombinantinio audinės augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (A) ir integruoti (B) duomenys	70
34	Rekombinantinio žmogaus augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (A) ir integruoti (B) duomenys	70

Lentelės numeris	Lentelės pavadinimas	Puslapis
1	Žmogaus antrosios apo-CA izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu titruojant metalų jonų tirpalais ir pusiausvriosios dializės metodu gauti parametrai	34
2	Įvairių reagentų skirtingų koncentracijų supilimo į RL – PGR plokštelę schema	44
3	Galutinės ržAH ir $ZnSO_4$, $ZnCl_2$ koncentracijos plokštelėje, tiriant Zn^{2+} įtaką šio baltymo terminiam stabilumui	47
4	rkAH dimerų, susiūtų TAT, procentins kiekis (nuo viso įnešto į elektroforezinio gelio takelį rkAH kiekio) ^a , esant įvairiems katijonams (dimerų kiekis yra apskaičiuotas atėmus dimerų kiekį, esantį kontroliniame reakcijos mišinyje be Zn^{2+} jonų)	61
5	ržAH dimerų, susiūtų TAT, procentins kiekis (nuo viso įnešto į elektroforezinio gelio takelį ržAH kiekio) ^a , esant įvairiems katijonams	64

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AH – augimo hormonas

rkAH – rekombinantinis kiaulės augimo hormonas

ržAH – rekombinantinis žmogaus augimo hormonas

raAH – rekombinantinis audinės augimo hormonas

SDS – natrio dodecilsulfatas

SDS-PAGE – baltymų elektroforezė poliakrilamidiniame gelyje denatūruojančiomis sąlygomis

FTIR – Fouriero transformacijos infraraudonoji spektroskopija

TAT - 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazinas

Gu-HCl – guanidino hidrochloridas

Dapoksilo[®] sulfonatas – 4-[5-[4-(dimetilamino)fenil]-2-oksazolil-benzensulfonatas

ANS – 1-anilino-8-naftaleno sulfonatas

ITK – izoterminio titravimo kalorimetrija

H144*UreE – UreE iš *Klebsiella aerogenes* turinti modifikuotą 144 aminorūgštį

KaUreE – UreE iš *K. aerogenes*

BpUreE – UreE iš *Bacillus pasteurii*

CA II – karboanhidrazė II

Tris-HCl – tris(hidroksimetil)aminometanas

EDTA – etilendiamintetraacto rūgšties dinatrio druska

PMSF – fenilmetilsulfonilfluoridas

GSH – redukuotas glutationas

GSSG – oksiduotas glutationas

TFA – trifluoracto rūgštis

APS – amonio peroksodisulfatas

CBB R-250 - dažas Coomassie Brilliant Blue R 250

BIS - N,N' – metil - bis - akrilamidas

DTT – ditioneitolis

DMSO – dimetilsulfoksidas

TEMED - N,N,N',N' – tetrametiletilendiaminas

PVDF – polivinilidendifluoridas

OV – optiniai vienetai

RL-PGR – realaus laiko polimerazinė grandininė reakcija

RP-HPLC – atvirkščių fazių didelio slėgio skysčių chromatografija

TURINYS

IVADAS	13
1. LITERATŪROS APŽVALGA	15
1.1. Bendra augimo hormonų charakteristika.....	15
1.1.1. Rekombinantinis kiaulės augimo hormonas ir jo savybės	15
1.1.2. Rekombinantinis audinės augimo hormonas ir jo savybės.....	17
1.1.3. Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas ir jo savybės.....	19
1.1.4. Augimo hormonai ir metalų jonai	22
1.2. Baltymų ir ligandų jungimosi tyrimai terminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais	24
1.2.1. Terminio poslinkio metodas	24
1.2.1.1. Ligandų jungimosi su baltymais konstantų nustatymas baltymų terminio stabilizavimo ir destabilizavimo ligandais modeliu	27
1.2.2. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas	29
1.2.2.1. Izoterminės titravimo kalorimetrijos panaudojimas baltymo ir metalo jono sąveikos tyrimui	30
1.2.2.2. Baltymų ir metalų jonų sąveikų tyrimo izotermine titravimo kalorimetrija pavyzdžiai	31
2. METODINĖ DALIS	36
2.1. Medžiagos ir prietaisai.....	36
2.1.1. Medžiagos.....	36
2.1.2. Prietaisai	38
2.1.3. Kompiuterinės programos	39
2.2. Tyrimo metodai	39
2.2.1. Rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų gryninimas	39
2.2.1.1. Biomasės ardymas	39
2.2.1.2. Intarpinių kūnelių plovimas	39
2.2.1.3. Intarpinių kūnelių tirpinimas	40
2.2.1.4. Rekombinantinių hormonų renatūravimas	40
2.2.1.5. Rekombinantinių baltymų gryninimas gelfiltracija bei jonų mainų, hidrofobinės sąveikos chromatografiniais metodais.....	40
2.2.2. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų grynumo nustatymas ..	41
2.2.2.1. Atvirkščių fazių didelio slėgio skysčių chromatografija	41
2.2.2.2. SDS – PAGE	41
2.2.3. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono koncentravimas	43
2.2.4. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų spektrofotometrinis koncentracijos nustatymas.....	44
2.2.5. Įvairių reagentų įtakos rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui tyrimas	44
2.2.6. Metalų jonų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui	46
2.2.7. Zn^{2+} įtakos rekombinantinių žmogaus, kiaulės, audinės augimo hormonų terminiam stabilumui, esant skirtingoms baltymų koncentracijoms, tyrimas.....	47
2.2.8. Zn^{2+} ir rekombinantinių žmogaus, kiaulės, audinės augimo hormonų sąveikos parametrų nustatymas izoterminio titravimo kalorimetrija	49
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	50
3.1. Įvairių reagentų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui	52

3.2. Metalų jonų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų stabilumui	59
3.3. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų izoterminis titravimas Zn^{2+} tirpalu.....	68
IŠVADOS.....	73
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	74

IVADAS

Hormonai yra biologiškai aktyvios, gyvybiškai būtinos, įvairios cheminės struktūros medžiagos. Augimo hormonai (AH), dar vadinami somatotropiniais, yra baltyminiai hormonai, kuriuos sintetina gausiausios priekinės hipofizės dalies acidofilinės ląstelės somatotrofai [1].

Riebalų ir angliavandenių apykaita, baltymų, DNR ir RNR sintezė, ląstelių proliferacija – tai fiziologiniai procesai, kuriuos kontroliuoja augimo hormonai [2, 3, 4, 5, 6, 7]. Tačiau pagrindinė jų funkcija - somatinio augimo skatinimas [8].

Augimo hormonų biologinėms funkcijoms yra svarbūs metalų jonai [9-12], tačiau iki šiol nėra tiksliai žinoma, kaip metalų jonai lemia augimo hormonų išskyrimą iš hipofizio liaukos ir AH sukeltus ląstelinius atsakus [13-21].

Dėl AH atliekamų funkcijų ir dėl atsiradusios galimybės gaminti rekombinantinius augimo hormonus (rAH), pastarieji baltymai naudojami medicinoje, žemės ūkyje, gyvulininkystėje, zootechninėje gamyboje ir kitose srityse [22-25]. Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas (rŽAH) panaudojamas sprendžiant problemas susijusias su vaikų žemaūgiškumu, bei siekiama jį pritaikyti kaulų lūžiams, nudegimams, sužalojimams ir kitoms ligoms gydyti [3, 26]. Žinant audinės augimo hormono teigiamą poveikį žiurkėms ir jaučio augimo hormono – audinėms yra manoma, kad rekombinantinis audinės augimo hormonas (raAH) gali būti panaudojamas audinės kailių gamyboje [27, 28]. Rekombinantiai kiaulės augimo hormonai (rkAH) panaudojami gyvulininkystėje Australijoje (1993m.), Meksikoje (2000 m.), Naujojoje Zelandijoje (2001 m.), nes skatina kiaulių augimą ir baltymų sintezę bei mažina riebalų kaupimąsi [29-33]. Suprantama, kad didelėms fermoms reikalinga tokia šių augimo hormonų formuluotė, kurios injekcija aprūpintų organizmą atitinkamu baltymu kuo ilgiau ir svarbiausia kuriose baltymas išliktų stabilus.

1992 m. buvo nustatyta, kad Zn^{2+} , Co^{2+} jungdamiesi su žmogaus augimo hormonu stabilizuoja baltymo struktūrą [34-36]. Vėliau, 2000 m. buvo parodyta, kad Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} , Au^{3+} , Au^{+} , Pd^{2+} , Ni^{2+} , Pt^{2+} sąveikauja su ŽAH ir skatina jo dimerizaciją. Žmogaus augimo hormono stabilizavimas cinko jonais imtas plačiai taikyti tobulinant šio baltymo vaistinę formuluotę [34, 35, 37-42]. Tobulinant jaučio AH vaistinę formuluotę pastebėta, kad šis baltymas taip pat stabilesnis su divalenčiu cinku (Zn^{2+}) [43]. Tuo tarpu metalų jonų poveikis rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų stabilumui nėra žinomas.

Rekombinantinio žAH aminorūgščių sekos homologiškumas su rekombinantiniais kiaulės ir audinės AH atitinkamai yra 68 % ir 66,7 % [44]. Evoliuciniu požiūriu metalų jonų sąveika su rekombinantiniais kiaulės ir audinės augimo hormonais yra įdomi, nes yra keleta svarbių žAH ir kiaulės, audinės AH skirtumų. Pavyzdžiui, tik žmogaus ir kitų primatų augimo hormonams būdingas laktogeninis aktyvumas [8]. Dėl šios priežasties ir norint išsiaiškinti, ar metalų jonai gali būti taip pat panaudojami tobulinant ir rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų vaistines formuluotes, šiame darbe tiriama skirtingų metalų jonų ir rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų sąveika.

Darbo tikslas: rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų ir įvairių metalų jonų sąveikos tyrimas.

Darbo uždaviniai:

- Parinkti rekombinantinių kiaulės, audinės, žmogaus AH ir metalų jonų sąveikos tyrimo sąlygas ir nustatyti hormonų saugojimui panaudojamų ligandų įtaką šių baltymų stabilumui;
- nustatyti skirtingų metalų jonų įtaką rekombinantinių kiaulės, audinės, žmogaus augimo hormonų stabilumui terminio poslinkio metodu;
- nustatyti Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} jungimosi su nenatyviais rkAH, raAH konstantas.
- nustatyti Zn^{2+} ir natyvių rekombinantinių kiaulės, audinės augimo hormonų jungimosi konstantą, stebimą entalpijos pokytį ir jungimosi vietų skaičių izotermine titravimo kalorimetrija;
- patvirtinti, ar vieno cinko jono jungimasis su viena ržAH molekule yra kooperatyvus.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Bendra augimo hormonų charakteristika

Augimo hormonai yra baltyminiai hormonai, kuriuos gamina gausiausios priekinės hipofizės dalies acidofilinės ląstelės somatotrofai [1]. Šių hormonų struktūroje yra dvi disulfidinės jungtys, o N- ir C-gale – fenilalaninai. Žinduolių augimo hormonų pirminei struktūrai būdingas rūšinis specifiškumas, todėl žmogaus organizme veikia tik žmogaus ir aukštesniųjų žinduolių hormonas [8].

Yra žinoma, kad augimo hormonai skatina aminorūgščių pernašą į raumenines ląsteles ir baltymų gamybą jose. Padidėja DNR, RNR gamybos intensyvumas, didėja raumenų masė. Taip pat šie hormonai skatina ilgųjų kaulų augimą epifizinių plokštelių srityse, lipolizę, aktyvindamas triacilgliceridų lipazę, riebalų rūgščių oksidaciją kepenyse, bei susidariusios energijos panaudojimą organizmo augimo procesams. Augimo hormonai yra svarbūs angliavandenių apykaitai: jie lėtina gliukozės pernašą ir oksidaciją raumenų ir riebalų ląstelėse, skatina gliukoneogenezę iš aminorūgščių kepenų ląstelėse ir didina glikogeno kiekį jose [1]. Žmogaus ir aukštesniųjų žinduolių hormonams būdingas ir laktogeninis aktyvumas [8].

Ilgą laikotarpį vieninteliu kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų šaltiniu buvo jų hipofizio liaukos, tačiau buvo gaunami maži augimo hormonų kiekiai ir pats išskyrimas buvo labai brangus. Šiuo metu įvairūs augimo hormonai yra gaminami biosintezės būdu, panaudojant bakterijų [45, 46], mielių [47], vabzdžių [48] ir žinduolių ląstelių kultūras [49].

1.1.1. Rekombinantinis kiaulės augimo hormonas ir jo savybės

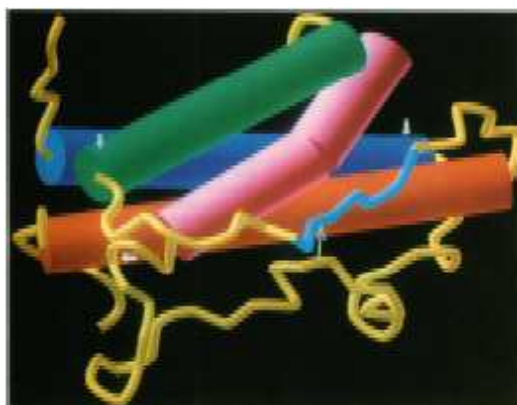
Rekombinantinio kiaulės augimo hormono aminorūgščių seką dėl N-gale esančio metionino sudaro 191 aminorūgštis (1 pav.) [50].

Rekombinantinis kiaulės augimo hormonas (rkAH) yra ~ 22 000 Da molekulinės masės baltymas [51]. Molekulė sudaryta iš vienos polipeptidinės grandinės.

Pirmą kartą rekombinantinis kiaulės augimo hormonas iškristalintas 1948 m. [52]. Tretinė struktūra pasklepta 1987 m. (2 pav.) [23], tačiau šiuo metu dėl nežinomų priežasčių rkAH tretinės struktūros nėra jokiose baltymų struktūrų duomenų bazėse.

Met - Phe - Pro - Ala - Met - Pro - Leu - Ser - Ser - Leu - Phe - Ala - Asn - Ala - Val - Leu - Arg - Ala - Gln - His -	10	20
Leu - His - Gln - Leu - Ala - Ala - Asp - Thr - Tyr - Lys - Gln - Phe - Gln - Arg - Ala - Tyr - Ile - Pro - Gln - Gly -	30	40
Gln - Arg - Tyr - Ser - Ile - Gln - Asn - Ala - Gln - Ala - Ala - Phe - Cys - Phe - Ser - Gln - Thr - Ile - Pro - Ala -	50	60
Pro - Thr - Gly - Lys - Asp - Gln - Ala - Gln - Gln - Arg - Ser - Asp - Val - Gln - Leu - Leu - Arg - Phe - Ser - Leu -	70	80
Leu - Leu - Ile - Gln - Ser - Trp - Leu - Gly - Pro - Val - Gln - Phe - Leu - Ser - Arg - Val - Phe - Thr - Asn - Ser -	90	100
Leu - Val - Phe - Gly - Thr - Ser - Asp - Arg - Val - Tyr - Gln - Lys - Leu - Lys - Asp - Leu - Gln - Gln - Gly - Ile -	110	120
Gln - Ala - Leu - Met - Arg - Gln - Leu - Gln - Asp - Gly - Ser - Pro - Arg - Ala - Gly - Gln - Thr - Leu - Lys - Gln -	130	140
Thr - Tyr - Asp - Lys - Phe - Asp - Thr - Asn - Leu - Arg - Ser - Asp - Asp - Ala - Leu - Leu - Lys - Asn - Tyr - Gly -	150	160
Leu - Leu - Ser - Cys - Phe - Lys - Lys - Asp - Leu - His - Lys - Ala - Gln - Thr - Tyr - Leu - Arg - Val - Met - Lys -	170	180
Cys - Arg - Arg - Phe - Val - Gln - Ser - Ser - Cys - Ala - Phe	190	

1 pav. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono aminorūgščių seka [50]



2 pav. Erdvinė rekombinantinio kAH struktūra pagal baltymo kristalo rentgenostruktūrinę analizę. Kiekviena iš keturių α spiralių pavaizduota cilindro formos vamzdeliu, visa kita – netaisyklingos struktūros. Taip pat pavaizduota ir viena disulfidinė jungtis, o kitos – nesimato. N-galas lokalizuotas kairiame, viršutiniame paveiksluko kampe, o C-galas – kairiame, apatiniame kampe [23]

Baltymas sudarytas iš keturių α spiralių: dvi spiralinės sudarytos iš ~ 20 aminorūgščių, kitos dvi – iš ~ 30 aminorūgščių. Į minėtų spiralių sudėtį įeina 54 % aminorūgščių. Aminorūgščių grandinėje yra 4 cisteino radikalai, tarp kurių merkaptų grupių (-SH) susidaro du disulfidiniai tilteliai: Cys-53 ir Cys-164 bei tarp Cys-181 ir Cys-189 [23].

Rekombinantinis kiaulės augimo hormonas yra nestabilus vandeninėje terpėje [53] ir yra linkęs agreguotis [54]. Temperatūra [54], didelės baltymo koncentracijos, rūgštiniai ir šarminiai tirpalai lemia kiaulės augimo hormono agregaciją [53]. Kiaulės augimo hormono agregaciją lemia hidrofobinės sąveikos tarp molekulių, todėl yra labai svarbi baltymo tirpalo pH reikšmė. Rekombinantinis kAH (baltymo koncentracija 4 mg/ml, inkubuojama 15 dienų + 37°C temperatūroje) visiškai denatūruojamas, esant tirpalo pH reikšmei žemesnei nei 4; šarminiuose tirpaluose rekombinantinis kiaulės augimo hormonas agreguojasi, taip prarandama monomerinė rkAH forma. Šis hormonas stabiliausias, esant neutraliam tirpalo pH [53].

Rekombinantinis kiaulės augimo hormonas yra linkęs greičiau agreguotis, esant didelėms baltymo koncentracijoms. Kai rkAH koncentracija 16 mg/ml, 40 % monomerinės baltymo formos išlieka po 28 dienų inkubacijos + 37°C temperatūroje, o 60 % monomerinės baltymo formos – kai baltymo koncentracija 0,5 mg/ml. Taip pat pastebėta, kad rekombinantinio kiaulės augimo hormono agregacija sulėtėja po 15 dienų [53].

rkAH (baltymo koncentracija 4 mg/ml, + 37°C temperatūroje) stabilizuoja natrio dodecilsulfatas (SDS), kai šio detergento koncentracija didesnė nei 0,5 %. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono stabilizavimui šlapalas yra efektyvus esant visom trim koncentracijom: 0,1 M, 0,5 M, 1 M [53].

Maltozės, sacharozės, gliukozės panaudojimas yra kitas būdas baltymams stabilizuoti. Liofilizavimo metu minėti junginiai gali pakeisti vandenį ir suformuoti vandenilinius ryšius su išdžiovintu baltymu. Gliukozė stabilizuoja rekombinantinį kiaulės augimo hormoną (baltymo koncentracija 4 mg/ml, + 37°C temperatūroje) esant 1 % koncentracijai, o sacharozė – 5 % koncentracijai [53].

1.1.2. Rekombinantinis audinės augimo hormonas ir jo savybės

Yra tik keletas literatūrinių duomenų apie raAH. 1990 m. Buvo klonuotas ir sekvenuotas audinės augimo hormono genas [44, 55]. 2007 m. Lietuvoje Vilniaus Gedimino technikos universitete buvo sukonstruotas *Escherichia coli* kamienas, produkuojantis audinės augimo hormoną, ir sukurta šio biologiškai aktyvaus hormono gryninimo schema [56].

raAH aminorūgščių seką sudaro 191 aminorūgštis (3 pav.) [57]. Rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų aminorūgščių sekos skiriasi tik keturiomis aminorūgštimis (3 pav.

pažymėtos raudonai). Rekombinantinio aAH aminorūgščių grandinėje keturių cisteinų išsidėstymas būdingas augimo hormonams, turintiems du disulfidinius tiltelius [57, 58].

```

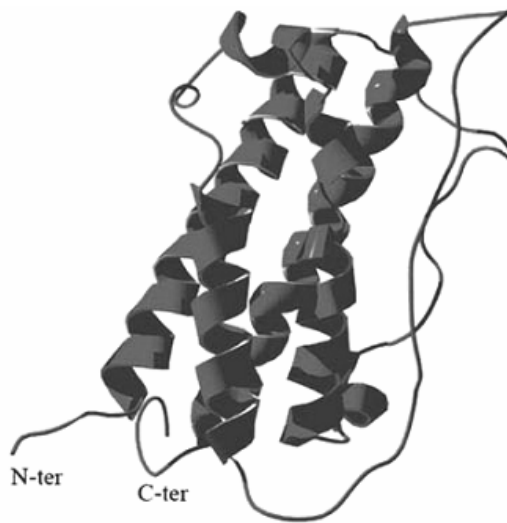
Met - Phe - Pro - Ala - Met - Pro - Leu - Ser - Ser - Leu - Phe - Ala - Asn - Ala - Val - Leu - Arg - Ala - Gln - His -
10 20
Leu - His - Gln - Leu - Ala - Ala - Asp - Thr - Tyr - Lys - Asp - Phe - Glu - Arg - Ala - Tyr - Ile - Pro - Glu - Gly -
30 40
Gln - Arg - Tyr - Ser - Ile - Gln - Asn - Ala - Gln - Ala - Ala - Phe - Cys - Phe - Ser - Glu - Thr - Ile - Pro - Ala -
50 60
Pro - Thr - Gly - Lys - Asp - Glu - Ala - Gln - Gln - Arg - Ser - Asp - Met - Glu - Leu - Leu - Arg - Phe - Ser - Leu -
70 80
Leu - Leu - Ile - Gln - Ser - Trp - Leu - Gly - Pro - Val - Gln - Phe - Leu - Ser - Arg - Val - Phe - Thr - Asn - Ser -
90 100
Leu - Val - Phe - Gly - Thr - Ser - Asp - Arg - Val - Tyr - Glu - Lys - Leu - Lys - Asp - Leu - Glu - Glu - Gly - Ile -
110 120
Gln - Ala - Leu - Met - Arg - Glu - Leu - Glu - Asp - Gly - Ser - Pro - Arg - Ala - Gly - Pro - Ile - Leu - Lys - Gln -
130 140
Thr - Tyr - Asp - Lys - Phe - Asp - Thr - Asn - Leu - Arg - Ser - Asp - Asp - Ala - Leu - Leu - Lys - Asn - Tyr - Gly -
150 160
Leu - Leu - Ser - Cys - Phe - Lys - Lys - Asp - Leu - His - Lys - Ala - Glu - Thr - Tyr - Leu - Arg - Val - Met - Lys -
170 180
Cys - Arg - Arg - Phe - Val - Glu - Ser - Ser - Cys - Ala - Phe
190

```

3 pav. Rekombinantinio audinės augimo hormono aminorūgščių seka [57]

Fouriero transformacijos infraraudonąją spektroskopiją (angl. Fourier transform infrared, FTIR) (20 °C temperatūroje, pH 8,5) ir baltymų aminorūgščių sekos analizės PORTER, PROF, PROTEUS programomis nustatyta, kad šį hormoną sudaro tik α spiralės. Tai patvirtina ir 4 pav. pateikta teorinė rekombinantinio aAH erdvinė struktūra, gauta SWISS-MODEL programa, panaudojant žinomos tretinės struktūros baltymų sekas (1bp3A.pdb, 1hwgA.pdb, 3hhrA.pdb, 1hwhA.pdb, 1hgu.pdb), kurių homologija su raAH aminorūgščių seka yra didesnė nei 60 % [57].

Rekombinantiniam audinės augimo hormonui būdingas mažesnis imunologinis aktyvumas nei rekombinantiniam kiaulės augimo hormonui. Pastebėta, kad raAH yra labai linkęs agreguotis nei rkAH [57]. Panaudojant cheminio susiuviklio 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazinu ir SDS-PAGE metodus, nustatyta, kad rekombinantinis audinės augimo hormonas (baltymo koncentracija 14 μ M, susiuviklio koncentracija 1920 μ M, inkubuojama 3 val. +30 °C temperatūroje, pH 9,2) vandeniniame tirpale yra tiek monomerinės, tiek dimerinės formos [59].



4 pav. Teorinė rekombinantinio audinės augimo hormono erdvinė struktūra [57]

raAH ir rkAH saugojimas užšaldžius ar $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ esant 5% glicerolio ir šių baltymų renatūracijos terpės (pH 8 ar 9) nelemia šių hormonų antrinių struktūrų, jų biologinį ir imunologinį aktyvumą. Minėtų augimo hormonų antrinės struktūros kinta juos liofilizuojant, dėl to sumažėja raAH biologinis ir imunologinis aktyvumas [57].

1.1.3. Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas ir jo savybės

Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas yra $\sim 22\text{ kDa}$ molekulinės masės, viengrandis 191 aminorūgšties ilgio baltymas (5 pav.) [37, 60, 61].

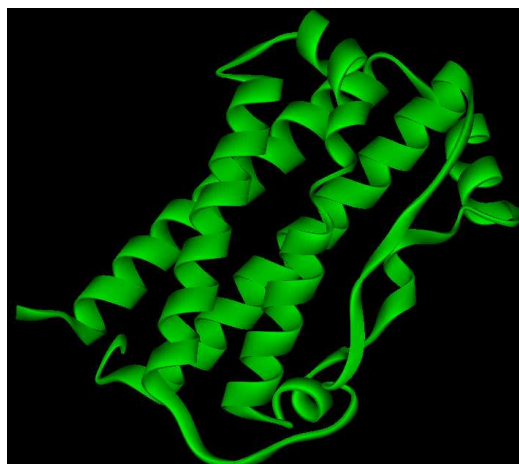
Pirmą kartą rekombinantinis žmogaus augimo hormonas iškristalintas 1991 m. [62]. 1994 m. Pasklepta jo tretinė struktūra (6 pav.) [63]. Šiuo metu tiek gamtinio, tiek rekombinantinio žmogaus augimo hormonų struktūros pateiktos makromolekulių duomenų bazėse.

55 % hormono aminorūgščių sudaro keturias α spirales. rŽAH taip pat turi du disulfidinius tiltelius, kurie susidaro tarp Cys-53 ir Cys-165 ir tarp Cys-182 ir Cys-189 merkaptų grupių [64].

Rekombinantinio ŽAH aminorūgščių sekos homologiškumas su rekombinantiniais kiaulės ir audinės AH atitinkamai yra 68 % ir 66,7 %, o rekombinantinio kiaulės – su raAH yra 98,4 % [44].

	10		20
Met - Phe - Pro - Thr - Ile - Pro - Leu - Ser - Arg - Leu - Phe - Asp - Asn - Ala - Met - Leu - Arg - Ala - His - Arg -			
	30		40
Leu - His - Gln - Leu - Ala - Phe - Asp - Thr - Tyr - Gln - Gln - Phe - Gln - Gln - Ala - Tyr - Ile - Pro - Lys - Gln -			
	50		60
Gln - Lys - Tyr - Ser - Phe - Leu - Gln - Asn - Pro - Gln - Thr - Ser - Leu - Cys - Phe - Ser - Gln - Ser - Ile - Pro -			
	70		80
Thr - Pro - Ser - Asn - Arg - Gln - Gln - Thr - Gln - Gln - Lys - Ser - Asn - Leu - Gln - Leu - Leu - Arg - Ile - Ser -			
	90		100
Leu - Leu - Ile - Gln - Ser - Thr - Leu - Gln - Pro - Val - Gln - Phe - Leu - Arg - Ser - Val - Phe - Ala - Asn - Ser -			
	110		120
Leu - Val - Tyr - Gly - Ala - Ser - Asp - Ser - Asn - Val - Tyr - Asp - Leu - Leu - Lys - Asp - Leu - Gln - Gln - Gly -			
	130		140
Ile - Gln - Thr - Leu - Met - Gly - Arg - Leu - Gln - Asp - Gly - Ser - Pro - Arg - Thr - Gly - Gln - Ile - Phe - Lys -			
	150		160
Gln - Thr - Tyr - Ser - Lys - Phe - Asp - Thr - Asn - Ser - His - Asn - Asp - Asp - Ala - Leu - Leu - Lys - Asn - Tyr -			
	170		180
Gly - Leu - Leu - Tyr - Cys - Phe - Arg - Lys - Asp - Met - Asp - Lys - Val - Gln - Thr - Phe - Leu - Arg - Ile - Val -			
	190		
Gln - Cys - Arg - Ser - Val - Gln - Gly - Ser - Cys - Gly - Phe			

5 pav. Rekombinantinio žmogaus augimo hormono aminorūgščių seka. Pirminę šio baltymo struktūrą, dėl N-gale esančio metionino, sudaro 192 aminorūgštys [65]



6 pav. Erdvinė rekombinantinio žmogaus augimo hormono struktūra pagal baltymo kristalo rentgenostruktūrinę analizę [66]

Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas yra stabilus baltymas, kurio erdvinė struktūra nesikeičia esant tirpalų pH reikšmėms 2 – 11 [67, 68]. Esant tirpalo pH reikšmei 4,3 ir mažesnei, kinta hormono (baltymo koncentracija 0,7 – 1 mM, + 32°C temperatūroje) tretinė struktūra (kinta tarp kilpų tam tikrų aminorūgščių šoninių radikalų vandeniliniai ryšiai ir elektrostatinės sąveikos), tačiau antrinė struktūra išlieka nepažeista [69 – 71]. ržAH (baltymo koncentracija 11,1 mg/ml)

terminis stabilumas mažėja esant rūgštinuose tirpaluose (pH 4,2 ir mažesniams), tirpaluose, kurių terpė artima neutraliai (pH 6,8, 7,4 ir 8,3), – nekinta, o šarminiuose tirpaluose (pH iki 9,3) – didėja [72].

Rekombinantinio žmogaus augimo hormono erdvinę struktūrą lemia organiniai tirpikliai. rŽAH (baltymo koncentracijos 0,2 ir 1,0 mg/ml, pH 7,0) antrinė struktūra išlieka nepažeista esant 50 % ir mažesnės koncentracijos etanolio vandeniniuose tirpaluose. Baltymo tretinė struktūra kinta, kai šio alkoholio koncentracija didesnė nei 20 % [73].

rŽAH (baltymo koncentracija 0,1 mg/ml) erdvinę struktūrą irsta esant 4,0 – 5,5 M guanidino hidroklorido koncentracijai, esant 5,5 M ir didesnei Gu-HCl koncentracijai, baltymas visiškai denatūruojamas [58, 74].

Rekombinantinis ŽAH (baltymo koncentracija 0,5 mg/ml, pH 6,5, 45 °C temperatūroje) agreguoja esant 10 – 40 % propanolio koncentracijai. Pastebėta, kad šių agregatų susidaro mažiau esant kambario temperatūrai [75].

Didelės rekombinantinio žmogaus augimo hormono koncentracijos taip pat skatina baltymo agregaciją [58]. Baltymų agregacijos slopinimui dažnai panaudojami detergentai. Tvinas-20, tvinas-40 ir tvinas-80 yra nejoniniai detergentai, kurie neleidžia rekombinantiniam ŽAH agreguoti. Efektyviausiai hormono agregaciją slopina Tvinas-20 (junginio koncentracija 225 µM, pH 6,0), kai junginio ir baltymo molinis santykis didesnis nei 4. Manoma, kad minėti junginiai slopina hormono agregaciją dėl to, kad sąveikauja su hidrofobinėmis baltymo dalimis [76].

Manitolis, sorbitolis, laktozė, trehalozė ir celobiozė taip pat mažina rŽAH agregaciją ir stabilizuoja hormono antrinę struktūrą. Liofilizavimo metu minėti junginiai gali pakeisti vandenį ir suformuoti vandenilinius ryšius su išdžiovintu rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu. Manitolis, sorbitolis efektyviausiai mažina rŽAH agregaciją (baltymo koncentracija 1 mg/ml, pH, 7,2, 28 dienas + 50°C temperatūroje) esant atitinkamai 1 : 131 moliniams santykiams, o laktozė, trehalozė ir celobiozė – 131 : 1 moliniams santykiams [77].

Rekombinantinio žmogaus augimo hormono stabilizavimas hidrofiliniais ciklodekstrinais priklauso ne tik nuo šių junginių struktūrų, savybių, bet ir nuo denatūracijos būdų. Po cheminės (4,5 M GuHCl, baltymo koncentracija 4,73 mg/ml, pH 5,0, inkubuota 12 valandų) ir terminės (keliant temperatūrą nuo 10 °C iki 105 °C 1 °C /min greičiu, baltymo koncentracija 3,54 mg/ml, pH 8,1) rŽAH denatūracijų, renatūruojant šiuos hormonus 4 valandas 25 °C temperatūroje jų agregaciją efektyviausiai mažina šakotų grandinių beta-ciklodekstrinai (6-O-maltozil-β-ciklodekstrinas, 6-O-(4-O-D-gliukuronil)-D-gliukozil-β-ciklodekstrinas, 6-O-D-manozil-β-ciklodekstrinas) bei 2,6-di-O-metil-β-ciklodekstrinas. O po rekombinantinių žmogaus augimo hormonų denatūracijos purtant (1

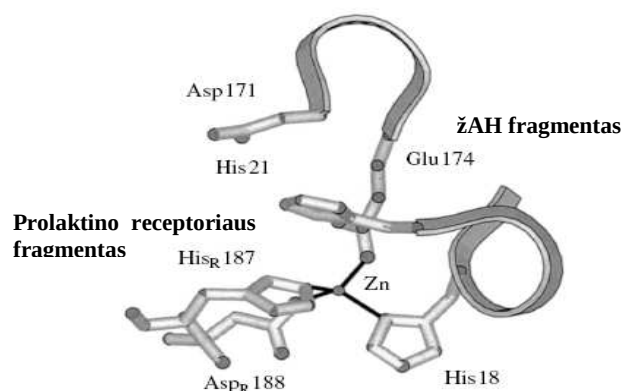
min., baltymo koncentracija 1,18 mg/ml, pH 8,1), renatūruojant šiuos hormonus 30 minučių kambario temperatūroje - 2-hidroksipropil- β -ciklodekstrinas ir dimetil- β -ciklodekstrinas. Minėti junginiai stabdo r β AH agregaciją, nes sąveikauja su hidrofobinėmis baltymo dalimis [78]. Rūgštinėje terpėje, esant 1 M NaCl, r β AH agregaciją (baltymo koncentracija 22 μ M, pH 2,5, inkubuota 1 valandą 25 °C temperatūroje) efektyviausiai slopina mono-glikozil- β -ciklodekstrinas ir mono-maltozil- β -ciklodekstrinas. Branduolio magnetinio rezonanso tyrimai patvirtino, kad šie junginiai jungiasi su baltymo aromatinėmis aminorūgštimis [79].

1.1.4. Augimo hormonai ir metalų jonai

Cinkas yra mikroelementas, būtinas nukleorūgščių metabolizmui ir baltymų sintezei. Šis mikroelementas yra kofaktorius daugiau nei 70 metalo fermentų tokių kaip: šarminės fosfatės, karboanhidrazių, karboksipeptidazių ir kt [11]. 1934 m. Pirmą kartą nustatyta, kad šis metalo jonas yra būtinas gyvūnų augimui [11, 80]. Augimo sulėtėjimas susijęs su cinko trūkumu žmogaus organizme [25, 81]. Vienuose literatūriniuose šaltiniuose [82-84, 14, 85, 86] teigiama, kad, esant cinko, vario, geležies, kadmio, chromo, magnio jonų trūkumui, žiurkės, kiaulės ir jaučio organizmuose sumažėja cirkuliuojančio augimo hormono koncentracija, kituose [14, 87-90] – padidėja šio AH koncentracija. Iki šiol nėra tiksliai žinoma, kaip metalų jonai lemia augimo hormonų išskyrimą iš hipofizio liaukos [13-20] ir AH sukeltus ląstelinius atsakus [21].

Žmogaus augimo hormonas, prieš išskiriant jį iš hipofizio liaukos, yra sintetinamas ir saugomas tam tikrose somatotrofų granulėse [36]. Histocheminė hipofizio liaukos analizė rodo, kad šiose granulėse yra didelės cinko jonų koncentracijos [13, 36, 87]. Hipofizio liaukoje aptinkami ir vario jonai, kurie taip pat skatina augimą [9, 91].

Stipriam žmogaus augimo hormono jungimuisi su žmogaus prolaktino receptoriumi yra būtinas cinko jonas [11]. 50 μ M ZnCl₂ šią sąveiką sustiprina 8000 kartų. Scatchardo analizės rezultatai parodė, kad vienam β AH ir prolaktino receptoriaus kompleksui susidaryti reikia vieno cinko jono [12]. Susidarant šiam kompleksui, cinko jonas jungiasi su prolaktino receptoriaus Asp-187 ir His-188 bei β AH His-18 ir Glu-174 (7 pav.). Zn²⁺ nesijungia su β AH His-21, tačiau yra manoma, kad ši aminorūgštis lemia augimo hormono Glu-174 išsidėstymą erdvėje [10, 63]. Kitų metalų jonų (Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Co²⁺) poveikis β AH ir prolaktino receptoriaus sąveikos stiprumui kur kas mažesnis [10].



7 pav. Zn^{2+} jungimosi vieta žmogaus augimo hormono ir prolaktino receptoriaus komplekse [92]

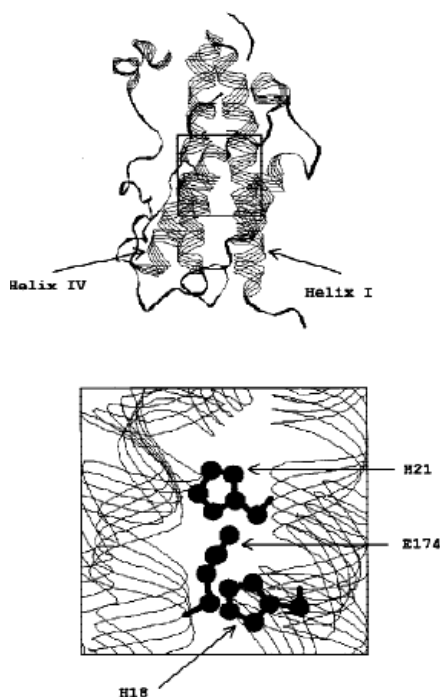
B. C. Cunninghamas ir kt. įrodė, kad esant didesnei nei $1 \mu\text{M}$ žAH koncentracijai, cinko jonai skatina žmogaus AH dimero susidarymą. Vienam žAH dimerui susidaryti kooperatyviu būdu reikia dviejų Zn^{2+} . Scatchardo analizės rezultatai parodė, kad Zn^{2+} formuoja kompleksą su žAH santykiu 1:1 [12]. Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^+ , Au^{3+} , Au^+ , Pd^{2+} , Ni^{2+} , Pt^{2+} taip pat ne tik sudaro kompleksą su žAH, t.y. sąveikauja, bet ir skatina jo dimerizaciją. Kai kurie metalų jonai (Ni^{2+} , Ag^+ , Au^{3+} , Hg^{2+}) su žAH sudaro tiek dimerus, tiek aukštesnius oligomerus [93].

Manoma, kad Zn^{2+} - žAH bei Cu^{2+} - žAH dimerai – pagrindinės *in vivo* saugomos žmogaus augimo hormono formos [9, 12]. Šios dimerinės žmogaus augimo hormono formos pasižymi didesniu stabilumu nei monomerinės denatūruojant Gn-HCl [12, 36].

1992 m. B. C. Cunninghamo ir kt. paskelbtame patente patvirtinama, kad Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} jungdamiesi su žAH stabilizuoja baltymo struktūrą [34-36]. Mutagenezine analize nustatyta, kad divalenčių metalų jonų jungimosi vieta žAH sudaro pirmos spiralės His-18, His-21 ir ketvirtos spiralės Glu-174 (8 pav.) [12, 67]. Yra žinoma, kad Zn^{2+} - žAH dimeruose baltymo antrinė struktūra išlieka nepažeista, o tretinė – nežymiai kinta [94].

B. C. Cunninghamo ir kt. patente taip pat teigiama, kad liofilizuotos ar skystos žmogaus augimo hormono vaistinės formuluotės, turinčios Zn^{2+} - žAH dimerų, ilgą laiką gali būti saugomos 37°C ir žemesnėje temperatūroje, išvengiant baltymo denatūravimo, proteolizės ir agregacijos [36]. Remiantis šiuo patentu žmogaus augimo hormono stabilizavimas cinko jonais imtas plačiai taikyti tobulinant šio baltymo vaistinę formuluotę [34, 35, 37-42].

Tobulinant jaučio AH vaistinę formuluotę pastebėta, kad šis baltymas stabilesnis su divalenčiu cinku (Zn^{2+}) [43]. Nustatyta, kad divalentis metalo jonas jungiasi su jaučio augimo hormono His-22 ir His-170 [95].



8 pav. Erdvinė rekombinantinio žmogaus augimo hormono struktūra ir metalo jono jungimosi vieta baltyme [67]

Metalų jonų poveikis rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų stabilumui nėra žinomas.

1.2. Baltymų ir ligandų jungimosi tyrimai terminio poslinkio ir izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais

1.2.1. Terminio poslinkio metodas

Kiekvieno baltymo stabilumą lemia temperatūra. Baltymo stabilumo priklausomybė nuo temperatūros gali būti matuojama terminio poslinkio metodu, skirtuminė žvalgos kalorimetrija, žiediniu dichroizmu, spektrofluorimetrija ir kt. [96, 97]. Terminio poslinkio metodu baltymo terminis stabilumas tiriamas matuojant solvatochrominio dažo (pvz., 1-anilino-8-naftaleno sulfonatas (ANS) ar 4-[5-[4-(dimetilamino)fenil]-2-oksazolil-benzensulfonatas (dapoksilo[®] sulfonatas) fluorescencijos intensyvumo pokyčius. Baltymas išsivynioja keliant tiriamojo makromolekulės tirpalo, turinčio šio dažo, temperatūrą. Atsiveria naujos baltymo hidrofobinės

vietos, su kuriomis solvatochrominis dažas jungiasi ir fluoresuoja stipriau negu vandeniniame tirpale [98]. Baltymo – dažo komplekso fluorescencija, esant bet kuriai temperatūrai, aprašoma:

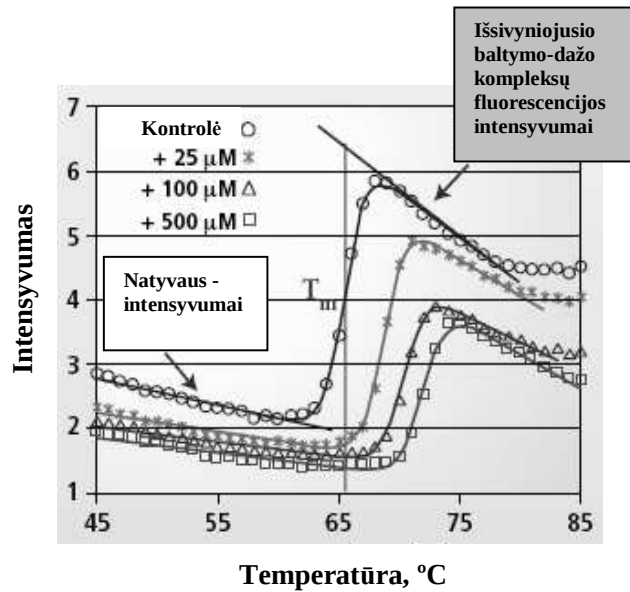
$$y = y_N + \frac{y_U - y_N}{1 + e^{\frac{d_U G}{RT}}}; \quad (1)$$

kur $d_U G$ - baltymo išsivyniojimo Gibso energijos pokytis. y_N ir y_U atitinkamai yra natyvaus ir išsivyniojusio baltymo-dažo komplekso fluorescencijos. Šių fluorescencijų tiesinės priklausomybės (9 pav.) nuo temperatūrų aprašomos:

$$y_N = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m); \quad (2)$$

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

kur y_{N,T_m} ir y_{U,T_m} atitinkamai yra natyvaus ir išsivyniojusio baltymo – dažo kompleksų fluorescencijų intensyvumų reikšmės, esant baltymo išsivyniojimo temperatūrai (T_m), o m_N ir m_U jų fluorescencijų tiesių nuokrypio kampai.



9 pav. 0,05 mg/ml antros karboanhidrazės ir ANS tirpalo, esant įvairioms metazolamido koncentracijoms, kaitinto 1°C/min greičiu, fluorescencijos intensyvumai [97]

Iš (1), (2) ir (3) lygčių gaunama:

$$y = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{d_U G}{RT}}}. \quad (4)$$

Yra žinoma, kad baltymo išsivyniojimo laisvosios Gibso energijos pokytis gali būti aprašomas:

$$d_U G = d_U H_{T_r} - T d_U S_{T_r} = d_U H_{T_r} + d_U C_p (T - T_r) - T (d_U S_{T_r} + d_U C_p \ln(\frac{T}{T_r})); \quad (5)$$

kur T_r yra pasirinkta temperatūra, kuriai esant yra žinomi baltymo išsivyniojimo termodinaminių parametrų pokyčiai entropijos ($d_U S_{T_r}$), entalpijos ($d_U H_{T_r}$), šiluminės talpos ($d_U C_p$).

Kai pasirinkta temperatūra yra lygi baltymo išsivyniojimo temperatūrai (T_m), išsivyniojimo konstanta lygi 1, o laisvosios Gibso energijos pokytis – nuliui. Tuomet gaunama tokia lygybė:

$$d_U S_{T_m} = \frac{d_U H_{T_m}}{T_m}. \quad (6)$$

Iš (4), (5) ir (6) lygčių gaunama:

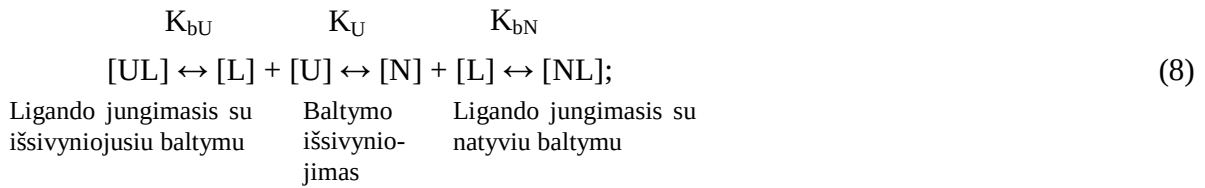
$$y = y_{N,T_m} + m_N (T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{d_U H_{T_m}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{d_U C_p}{R} \left(\frac{T_m}{T} - 1 + \ln \frac{T}{T_m} \right)}}. \quad (7)$$

Glutninant šią šešių parametrų funkciją ($d_U H_{T_m}, y_{U,T_m}, y_{N,T_m}, m_U, m_N, T_m$), esant fluorescencijos intensyvumo priklausomybei nuo temperatūros sužinoma baltymo išsivyniojimo temperatūros reikšmė [96].

Atitinkamo ligando jungimasis gali padidinti baltymo terminį stabilumą arba jį destabilizuoti. Ligandais vadinami substratai, inhibitoriai, metalų jonai, sintetiniai analogai, baltymai ir kt. Ligandai, kurie sąveikauja su natyviu baltymu, stabilizuoja jį, makromolekulės išsivyniojimo temperatūros reikšmė padidėja, o kurie destabilizuoja - mažina baltymo T_m . Makromolekulės išsivyniojimo temperatūros pokytis yra proporcingas laisvo ligando koncentracijai ir jo jungimosi giminingumui. Tai panaudojama baltymų ir ligandų jungimosi konstantoms nustatyti [99, 100]. Tam gaunamos baltymų T_m reikšmės esant skirtingoms ligandų koncentracijoms. Braižomos priklausomybės tarp šių išsivyniojimo temperatūrų ir ligandų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. Ligandų jungimosi su baltymais konstantos gaunamos panaudojant modelius, susiejančius ligandų sukeltus baltymų terminį stabilumą pokyčius su jų jungimosi konstantomis [101].

1.2.1.1. Ligandų jungimosi su baltymais konstantų nustatymas baltymų terminio stabilizavimo ir destabilizavimo ligandais modeliu

Baltymų išsivyniojimo temperatūros padidėja, prisijungus daugeliui ligandų. Taip pat yra ligandų, kurie destabilizuoja šias makromolekules. Šie ligandai stipriau jungiasi su išsivyniojusiais baltymais nei su natyviais. P. Cimpermano ir kt. publikacijoje [102] ligando jungimasis su dvejomis baltymo formomis vaizduojamas tokia schema:



kur $[UL]$ yra išsivyniojusio baltymo ir ligando komplekso, $[U]$ – išsivyniojusio baltymo, $[L]$ – laisvo ligando, $[N]$ – natyvaus baltymo ir $[NL]$ – natyvaus baltymo ir ligando komplekso koncentracijos. K_U yra baltymo išsivyniojimo pusiausvyrinė konstanta nesant ligando, kuri aprašoma:

$$K_U = \frac{[U]}{[L]}. \quad (9)$$

Ligando jungimosi su natyviu ir išsivyniojusi baltymu konstantos aprašomos:

$$K_{bN} = \frac{[NL]}{[N][L]}; \quad (10)$$

$$K_{bU} = \frac{[UL]}{[U][L]}. \quad (11)$$

Bendri baltymo ir ligando kiekiai išreiškiami:

$$P_t = [N] + [U] + [NL] + [UL]; \quad (12)$$

$$L_t = [L] + [NL] + [UL]. \quad (13)$$

Išsivyniojusio baltymo frakcija gali būti aprašoma:

$$f_U = \frac{[U] + [UL]}{P_t}. \quad (14)$$

Sprendžiant (9 – 14) lygčių sistemą, gaunama bendro ligando kiekio išraiška:

$$L_t = (f_U + K_U (f_U - 1)) \left(\frac{P_t (K_{bN} + K_{bU} K_U)}{K_U (K_{bU} - K_{bN})} + \frac{1}{K_U K_{bU} - f_U (K_{bN} + K_{bU} K_U)} \right). \quad (15)$$

Ši lygtis suspaprastėja, esant baltymo išsivyniojimo temperatūrai (T_m), nes tuomet išsivyniojusio baltymo frakcija lygi 0,5 ($f_U = 0,5$). Gaunama pusiausvyros konstantų ir bendrų baltymo, ligando kiekių priklausomybė:

$$L_t = (1 - K_{U-T_m}) \left(\frac{P_t}{2} \frac{K_{bN-T_m} + K_{bU-T_m} K_{U-T_m}}{K_{U-T_m} (K_{bU-T_m} - K_{bN-T_m})} + \frac{1}{K_{U-T_m} K_{bU-T_m} - K_{bN-T_m}} \right). \quad (16)$$

Yra žinoma, kad baltymo išsivyniojimo pusiausvyros konstantos priklausomybė nuo temperatūros aprašoma:

$$K_U = e^{-d_U G_T / RT} = e^{-(d_U H_T - T d_U S_T) / RT} = e^{-(d_U H_T + d_U C_p (T - T_r) - T (d_U S_{Tr} + d_U C_p \ln(T / T_r))) / RT}; \quad (17)$$

kur $d_U G_T$, $d_U H_T$, $d_U S_T$ ir $d_U C_p$ yra atitinkamai baltymo išsivyniojimo laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija ir šiluminė talpa. R – universalioji dujų konstanta. T_r – baltymo išsivyniojimo temperatūra nesant ligando. Ligando jungimosi su natyviu ir išsivyniojusi baltymu konstantų priklausomybės nuo temperatūros aprašomos:

$$K_{bN} = e^{-d_{bN} G_T / RT} = e^{-(d_{bN} H_T - T d_{bN} S_T) / RT} = e^{-(d_{bN} H_{T_0} + d_{bN} C_p (T - T_0) - T (d_{bN} S_{T_0} + d_{bN} C_p \ln(T / T_0))) / RT}; \quad (18)$$

$$K_{bU} = e^{-d_{bU} G_T / RT} = e^{-(d_{bU} H_T - T d_{bU} S_T) / RT} = e^{-(d_{bU} H_{T_0} + d_{bU} C_p (T - T_0) - T (d_{bU} S_{T_0} + d_{bU} C_p \ln(T / T_0))) / RT}; \quad (19)$$

kur $d_{bN} G_T$, $d_{bN} H_T$, $d_{bN} S_T$, $d_{bN} C_p$ ir $d_{bU} G_T$, $d_{bU} H_T$, $d_{bU} S_T$, $d_{bU} C_p$ atitinkamai yra ligando jungimosi su natyviu ir išsivyniojusi baltymu laisvoji Gibso energija, entalpija, entropija, šiluminė talpa. T_0 – temperatūra, kuriai esant nustatomos ligando jungimosi konstantos. Iš (16 – 19) lygčių gaunama:

$$L_t = \left(1 - e^{-(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m / T_r))) / RT_m} \right) \times \left[\frac{P_t}{2} \frac{e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m} + e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m}}{e^{-(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m / T_r))) / RT_m} (e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m} - e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m}})} + \frac{1}{e^{-(\Delta_U H_{Tr} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{Tr} + \Delta_U C_p \ln(T_m / T_r))) / RT_m} e^{-(\Delta_{bU} H_{T_0} + \Delta_{bU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bU} S_{T_0} + \Delta_{bU} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m} - e^{-(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m / T_0))) / RT_m}} \right]. \quad (20)$$

Šia lygtimi aprašoma ligando jungimosi su dvejomis baltymo formomis ir makromolekulės išsivyniojimo termodinaminių parametrų priklausomybės bei susieja šiuos parametrus su bendrais baltymo ir ligando kiekiais. Todėl (20) lygtimi glotninami baltymų išsivyniojimo temperatūrų reikšmių priklausomybės nuo ligandų koncentracijų dešimtainių logaritmų duomenys, norint nustatyti jungimosi konstantas [102].

1.2.2. Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas

Baltymų ir ligandų sąveikos tyrimui naudojami įvairūs metodai: kapiliarinė elektroforezė, analitinė gelfiltracija, pusiausviroji dializė, žiedinis dichroizmas, ultracentrifugavimas, izoterminio titravimo kalorimetrija (ITK), įvairūs spektroskopiniai, fluorescenciniai tyrimai, skirtuminė žvalgos kalorimetrija, paviršiaus plazmonų rezonansas ir kt. [103]. Dauguma šių metodų makromolekulės ir ligando sąveikos termodinaminiai parametrai nustatomi netiesiogiai, t.y. remiantis teorinėmis prielaidomis. Pavyzdžiui, entalpiją galima nustatyti vant Hoffo analize – matuojant jungimosi konstantos priklausomybę nuo temperatūros [104-106]. Izoterminio titravimo kalorimetrija (angl. isothermal titration calorimetry) – tai metodas, kuriuo tiesiogiai išmatuojama kiekvienos reakcijos metu išskiriama ar sugerama šiluma, dėl naujai susidarantių ar suardomų nekovalentinių jungčių sąveikaujant makromolekulei su ligandu [107, 108]. Biotechnologijoje šis metodas plačiai naudojamas, norint nustatyti jungimosi giminingumą (jungimosi konstantą), reakcijos stochiometriją [103, 108]. Jungimosi laisvąją Gibso energiją, entropiją galima apskaičiuoti panaudojant ITK gautus rezultatus ir termodinamines lygtis:

$$dG = -RT \ln K_b; \quad (21)$$

$$dG = dH - TdS; \quad (22)$$

kur dG , dS , dH atitinkamai yra Gibso energijos, entropijos, entalpijos pokyčiai. R – universalioji dujų konstanta, T – absoliučioji temperatūra kelvinais, K_b – jungimosi konstanta. Teoriškai vienu izoterminio tiravimo kalorimetrijos eksperimentu galima nustatyti penkis ligando ir makromolekulės sąveikos parametrus (dG , dS , dH , K_b ir reakcijos stochiometriją) [103, 109], kurie svarbūs, norint suprasti jų jungimosi mechanizmą, giminingumą, ligando sukeltus makromolekulės konformacinius pokyčius, jų įtaką makromolekulės funkcijoms, stabilumui ir kt. [110-113]. Dėl to izoterminio titravimo kalorimetrija naudojama ir vaistų kūrimo pramonėje [107, 108, 110, 111, 114-117].

ITK yra universalus metodas, naudojamas įvairių sąveikų tyrimui: antikūno-antigeno [118-120], baltymo – peptido [121, 122], lipido – baltymo [123-125], baltymo – receptoriaus [126-128], baltymo – angliavandenio [129, 130], baltymo – nukleino rūgšties [131, 132], baltymo – baltymo [133-135], baltymo – mažo molekulinio svorio molekulės, vaisto [110, 136-138] ir kt. Pastaruoju metu izoterminio titravimo kalorimetrija plačiai naudojama tiriant metalų jonų ir makromolekulių sąveikas [105, 109, 139-152].

1.2.2.1. Izoterminės titravimo kalorimetrijos panaudojimas baltymo ir metalo jono sąveikos tyrimui

Kalorimetriniam eksperimente paprastai baltymas (P) titruojamas metalo jonų (M) tirpalu.

Grįžtamas P ir M jungimasis aprašomas:



Jei makromolekulėje yra vieno tipo, identiški ir tarpusavyje nesąveikaujantys metalo jono surišimo centrai, tuomet M jungimosi su P konstanta aprašoma:

$$K_b = \frac{\Theta}{(1-\Theta)[M]}; \quad (24)$$

kur Θ yra dydis, nurodantis, kokia makromolekulių dalis yra susirišta su metalo jonais. $[M]$ yra laisvų metalo jonų koncentracija [109, 114]. Žinoma, kad laisvų metalų jonų koncentracija susijusi su bendromis metalų jonų $[M_T]$ ir makromolekulių $[P_T]$ koncentracijomis tokia lygtimi:

$$[M] = [M_T] - n\Theta[P_T]; \quad (25)$$

kur n yra makromolekulės ir metalo jono jungimosi stochiometrija. Iš (24) ir (25) lygčių gaunama:

$$\Theta^2 - \Theta \left(1 + \frac{1}{nK_b[M_T]} + \frac{[M_T]}{n[P_T]} \right) + \frac{[M_T]}{n[P_T]} = 0; \quad (26)$$

kurios vienintelis prasmingas sprendinys yra:

$$\Theta = \frac{1}{2} \left(1 + \frac{1}{nK_b[P_T]} + \frac{[M_T]}{n[P_T]} - \sqrt{\left(1 + \frac{1}{nK_b[P_T]} + \frac{[M_T]}{n[P_T]} \right)^2 - \frac{4[M_T]}{n[P_T]}} \right). \quad (27)$$

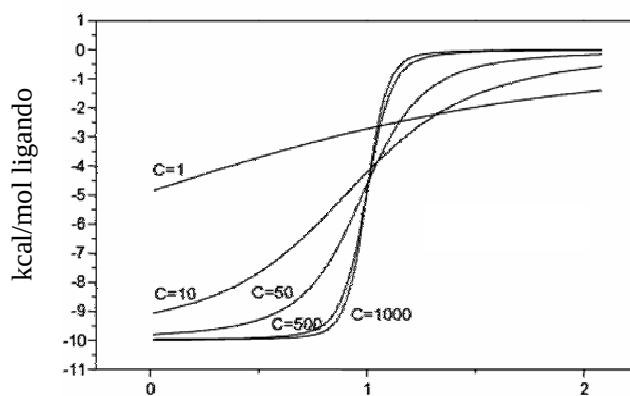
Kalorimetriniame eksperimente stebimas šilumos pokytis (dq) [112], vykstantis paprastai į makromolekulės tirpalą išvirkšiant metalo jonų tirpalą. Šio pokyčio dydis priklauso nuo reakcijos tūrio (V_0), reagentų koncentracijų, molinės jungimosi entalpijos (ΔH), jungimosi konstantos, stochiometrijos ir prieš tai pridėto metalo jonų kiekio. Šilumos kiekis po i -osios injekcijos aprašomas:

$$q_i = n[P_T]V_0 dH(\Theta_i - \Theta_{i-1}). \quad (28)$$

Sigmoidinė kreivė pagal (28) diferencialinę lygtį gali būti glotninama prie titravimo duomenų (dq_i priklausomybė nuo $[L_T]/[M_T]$). Taip nustatoma jungimosi entalpija, konstanta ir stochiometrija [113, 153].

Norint gauti tikslias jungimosi konstantos ir laisvosios Gibso energijos reikšmes yra svarbus c faktorius [154], kurio reikšmė turi būti intervale nuo 5 iki 500 (10 pav.). c faktorius yra proporcingas makromolekulės koncentracijai kiuvetėje ($[M_T]$) ir jungimosi konstantai:

$$c = [M_T]K_b. \quad (29)$$



Ligando ir makromolekulės molinis santykis

10 pav. Teorinės titravimo kreivės esant įvairioms c faktoriaus reikšmėms [54]

Kalorimetriniu eksperimentu matuojama šiluma susideda iš jungimosi, makromolekulės skiedimo, maišymo ir kitų šilumų, todėl pašalinės šilumos pašalinamos kontroliniu eksperimentu: buferinio tirpalo titravimu metalo jonų tirpalu [107, 153].

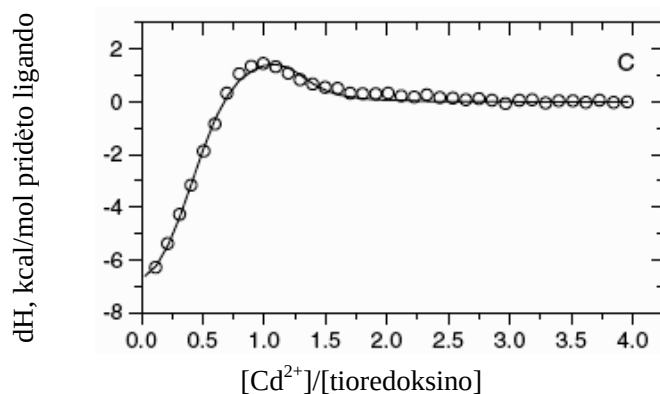
1.2.2.2. Baltymų ir metalų jonų sąveikų tyrimo izotermine titravimo kalorimetrija pavyzdžiai

Baltymų ir metalų jonų sąveikos tiriamos norint išsiaiškinti mechanizmus atsakingus už įvairių metalų jonų kiekių atsiradimus reikiama momentais tam tikrose organizmo vietose, metalų jonų jungimosi giminingumus, jų poveikį baltymų stabilumui, funkcijoms, sunkiųjų metalų jonų detoksikacijos mechanizmus ir kt. [155, 156]. Baltymus, kurių sąveikos su metalų jonais yra tiriamos panaudojant ITK, galima suskirstyti į dvi grupes. Pirmai grupei priskiriami baltymai: a) saugantys metalų jonus (pvz., feritinas), b) aprūpinantys metalo baltymus ir ląsteles metalų jonais (pvz., UreE bei YiiP), c) nešikliai (pvz., albuminas, transferinas), d) dalyvaujantys metalų jonų detoksikacijoje (pvz., tioredoksinas, MerR, CusF). Antrą grupę sudaro metalo baltymai

(konkavalinas A, karboanhidrazės, azurinas), t.y. baltymai, kurių funkcijų atlikimui būtini metalų jonai.

Yiip yra apie 130 kDa molekulinio svorio *Escherichia coli* baltymas. Kalorimetriniu eksperimentu (baltymo koncentracija 0,032 – 0,09 mM, titranto koncentracija 1 – 3 mM, pH 7,0, 25 °C temperatūroje) nustatyta, kad šis baltymas turi vieną bendrą Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} jungimosi vietą. Zn^{2+} , Hg^{2+} , Cd^{2+} stebimos jungimosi su šia vieta konstantos ir entalpijos pokyčiai atitinkamai yra 3 μ M, 1,04 nM, 0,12 μ M ir -4,5 kcal/mol, -22,5 kcal/mol, -6,5 kcal/mol. Iš gautų rezultatų matoma, kad Hg^{2+} jungiasi kur kas stipriau ir šio metalo jono jungimasis sukelia didesnius baltymo struktūros pokyčius nei Cd^{2+} ar Zn^{2+} . Taip pat kalorimetriniu eksperimentu nustatyta, kad jungiantis vienam Cd^{2+} su bendra jungimosi vieta išlaisvinama 1,23 protono. Taip gali būti dėl dalinės histidino imidazolo ir cisteino tiolinės grupių protonizacijos esant neutraliai pH reikšmei. Be aukščiau minėtos bendros jungimosi vietos, su kuria jungiasi Hg^{2+} , Cd^{2+} bei Zn^{2+} , baltymas dar turi ir atskiras šių metalų jonų jungimosi vietas. Hg^{2+} , Cd^{2+} bei Zn^{2+} jungimosi su šiomis vietomis entalpijos pokyčiai atitinkamai yra -4,1 kcal/mol, -6,1 kcal/mol, +12,5 kcal/mol. Matoma, kad Zn^{2+} jungimasis sukelia didesnius baltymo struktūros pokyčius [157].

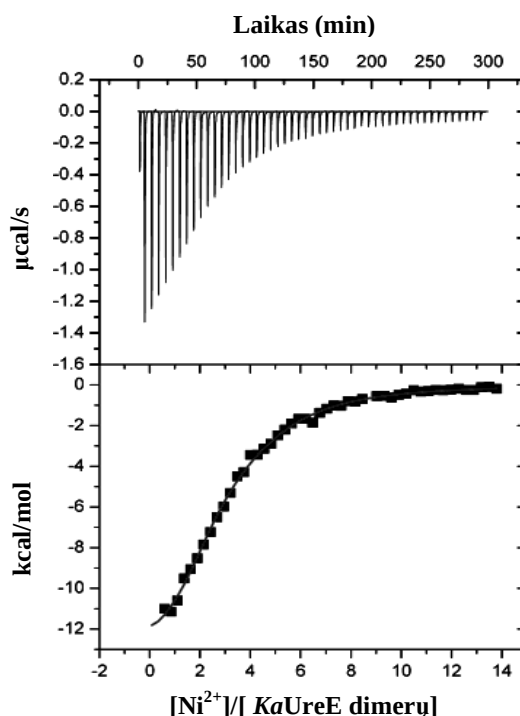
E. coli tioredoksinas yra mažo molekulinio svorio (11,7 kDa) fermentas. Manoma, kad šis baltymas dalyvauja Cd^{2+} detoksikacijoje. Tirta *E. coli* tioredoksino sąveika su kadmio jonais, esant pH reikšmėms 6,4, 7,5, 8,0, panaudojant ITK (fermento koncentracija kiuvetėje 14 – 50 μ M, Cd^{2+} koncentracija švirkšte 150 – 2000 μ M, 25 °C temperatūroje) (11 pav.).



11 pav. 50 μ M *E.coli* tioredoksino izoterminio titravimo 500 μ M $CdCl_2$ tirpalu kreivė (0,1 M MOPS, pH 7,5, injekuota po 7 μ l 25 °C temperatūroje) [151]

Nustatyta, kad fermentas turi du Cd^{2+} surišimo centrus, esant pH reikšmėms 7,5 ar 8,0. Šio metalo jono ir pirmojo metalo jono surišimo centro egzoterminio jungimosi entalpijos pokytis yra -13,7 kJ/mol, jungimosi konstanta $1,03 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$, o antrajame surišimo centre vyksta endoterminė sąveika - +48,5 kJ/mol, jungimosi konstanta $1,11 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Taip pat nustatyta, kad jungiantis Cd^{2+} prie pirmojo ar antrojo metalo jono surišimo centro išsiskiria apie 1 protoną [151].

UreE yra metalo šaperonas, kuris aprūpina apoureazės aktyvų centrą nikelio jonais. ITK (baltymo koncentracija kiuvetėje 6 – 25 μM , metalų jonų koncentracija švirkšte 0,25 – 1 mM, pH 7,45, 25°C temperatūroje) tirta Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} sąveika su H144*UreE iš *Klebsiella aerogenes*, Ni^{2+} su UreE iš *K. Aerogenes* (KaUreE) ir UreE iš *Bacillus pasteurii* (BpUreE) (12 pav.).

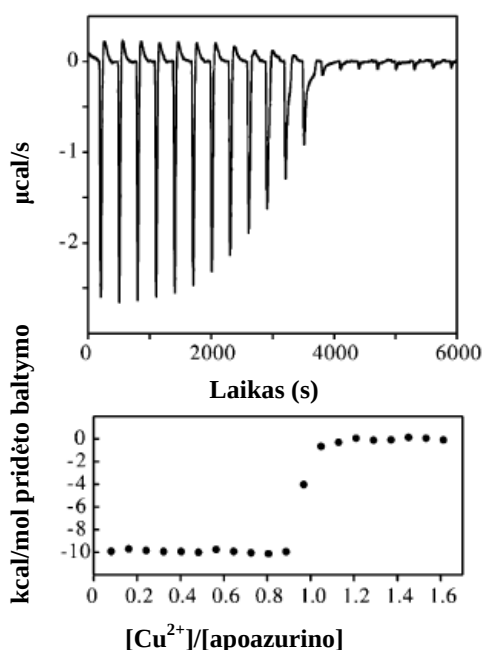


12 pav. 10 μM KaUreE izoterminio titravimo 0,63 mM Ni^{2+} tirpalu kreivė (0,1 M Tris-HCl, pH 7,45, 25 °C temperatūroje) [150]

Nustatyta, kad 2 Ni^{2+} jungiasi su BpUreE, tačiau 5,0 – 5,5 – su KaUreE dimerais. Du nikelio, vario, cinko jonai jungiasi ir su H144*UreE dimeru. Esant didesnei nei 10 μM šio baltymo koncentracijai, formuojasi H144*UreE tetrameras (dimerų dimeras), kuriame trys Cu^{2+} ar Ni^{2+} susijungę su vienu baltymo dimeru. Nikelio jonų su KaUreE jungimąsi lemia entalpinės jėgos ($dH = -14 \text{ kcal/mol}$, $dS = -8 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$), o su BpUreE – entropinės ($dH = -3 \text{ kcal/mol}$, $dS = +26 \text{ cal/mol} \cdot \text{K}$). Šie rezultatai rodo, kad Ni^{2+} yra skirtingai koordinuojami šiuose baltymuose. Nikelio ir vario jonų

jungimosi su H144*UreE, esant mažesnei nei 10 μM baltymo koncentracijai, mažų, neigiamų šiluminių talpų pokyčių reikšmės (atitinkamai -30 kcal/mol·K ir -70 kcal/mol·K) susijusios su mažais baltymo struktūros pokyčiais, t.y. su šių metalų jonų ir tam tikrų baltymo paviršiuje esančių aminorūgščių radikalų sąveikomis [150].

Azurinas yra metalo baltymas, kuris stipriai jungiasi su Cu^{2+} . Tiriant vario jonų jungimąsi su apoazurinu izoterminio titravimo kalorimetriniu eksperimentu (baltymo koncentracija švirkšte 50 nM, pH 7,0, 25°C temperatūroje), apskaičiuota $4 \cdot 10^{13} \text{ M}^{-1}$ jungimosi konstanta ir nustatytas $-10,2 \pm 1,6$ kcal/mol entalpijos pokytis. Gauti Cu^{2+} tirpalo titravimo baltymo tirpalu duomenys, panaudoti apskaičiuojant jungimosi metu vykstančių dviejų reakcijų greičio konstantas bei entalpijos, entropijos pokyčius ($k_1 = 2,2 \pm 1,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, $k_2 = 0,024 \pm 0,010 \text{ s}^{-1}$, $dH_1 = -19 \pm 3$ kcal/mol, $dH_2 = +9 \pm 3$ kcal/mol). Šie rezultatai rodo, kad $\text{Cu}(\text{OH}_2)_5^{2+}$ jungiasi su apoazurinu, išsiskiriant vienai ar dviem vandens molekulėms ($dS_1 = -8 \pm 10$ cal/mol·K). Yra žinoma, kad vienos hidratacinio apvalkalo vandens molekulės išlaisvinimo iš metalo jono komplekso entropijos pokytis yra lygus 9,5 cal/mol·K. Šios Cu-OH₂ jungtys pakeičiamos stipresnėmis ar papildomomis jungtimis tarp baltymo ir Cu^{2+} , todėl yra tokia didelė reakcijos entalpijos pokyčio reikšmė. Esant tokiai tarpinei apoazurino formai, lėtai vyksta baltymo konformaciniai pokyčiai (kalorimetrinio eksperimento kreivėje (13 pav.) matomos išsiplėtusios po kiekvienos injekcijos vykstančių endoterminių porcesų smailės), išsiskiriant likusioms 4 ± 1 vandens molekulėms iš metalo jono komplekso ($dS_2 \geq +37 \pm 10$ cal/mol·K), baltymui įgaunant jo natūralią būseną [158].



13 pav. Vario jonų tirpalo izoterminio titravimo 50 nM apoazurino tirpalu kreivė (pH 7,0, 25 °C temperatūroje) [158]

Karboanhidrazės (CA) yra cinko metalofermentai, katalizuojantys grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją. Izoterminė titravimo kalorimetrija panaudota tiriant Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} sąveikas su žmogaus apo-CAII (baltymo koncentracija kiuvetėje 50 – 303 μM , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} tirpalų koncentracijos švirkšte 2 – 5 mM, pH 7,0, 25 °C temperatūroje) [159]. Gauti rezultatai pateikti 1 lentelėje.

1 lentelė. Žmogaus antrosios apo-CA izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu titruojant metalų jonų tirpalais ir pusiausvyrosios dializės metodu gauti parametrai [159]

Metalo jonas	$K_{\text{jung.}} (M^{-1})^a$	$dH_{\text{steb.}} (kcal/mol)$	Stechiometrija
Co^{2+}	$(5 \pm 3,5) \cdot 10^7$	-18 ± 1	1
Zn^{2+}	$(1,2 \pm 0,2) \cdot 10^{12}$	$-8,6 \pm 0,2$	1
Cu^{2+}	$(5,9 \pm 1,4) \cdot 10^{13}$	$-5 \pm 0,2$	2

^a – pusiausvyrosios dializės rezultatai

Cu^{2+} su apo-CAII jungiasi greičiau ir stipriau, o Co^{2+} lėčiau ir silpniau nei Zn^{2+} . Yra žinoma, kad du vario jonai jungiasi su šiuo fermentu. Žmogaus apo-CAII ir antrojo Cu^{2+} silpnescio jungimosi konstanta yra $1 \cdot 10^5 M^{-1}$ ir stebimas entalpijos pokytis yra $-2,5 \pm 0,4 kcal/mol$. Be to, tik esant didesnėms nei 250 μM fermento koncentracijoms, šiame baltyme aptinkamos ir dvi Co^{2+} jungimosi vietos [159].

2. METODINĖ DALIS

2.1. Medžiagos ir prietaisai

2.1.1. Medžiagos

1. Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas	SICOR Biotech
2. Tris(hidroksimetil)aminometanas (Tris-HCl)	BIO – RAD
3. EDTA	Sigma
4. Fenilmetilsulfonilfluoridas (PMSF)	Fluka
5. Natrio chloridas (NaCl)	Reachim
6. Šlapalas	Reachim, Lachema
7. Redukuotas glutationas (GSH)	Roche
8. Oksiduotas glutationas (GSSG)	Roche
9. Sefadeksas G – 25	Pharmacia Fine Chemicals
10. Q – sefarozė	Amersham Biosciences
11. Fenilsefarozė	Amersham Biosciences
12. Trifluoracto rūgštis (TFA)	Merck
13. Acetonitrilas	Roth
14. Akrilamidas (C_3H_5NO)	Fluka
15. Bis (N,N' – metil – bis – akrilamidas) (BIS) $((CH_2 : CHCONH_2)_2CH_2)$	BIO – RAD
16. Natrio dodecilsulfatas (SDS) $(C_{12}H_{25}O_4S \times Na)$	Serva
17. Amonio persulfatas (APS)	BIO – RAD
18. Glicinas	BIO – RAD
19. Glicerolis	Fluka
20. Bromfenolio mėlis	BIO – RAD
21. β – merkptoetanolis	BIO – RAD
22. Coomassie Brilliant Blue R – 250 (CBB R – 250)	BIO – RAD
23. Etanolis	Vilniaus degtinė
24. Ledinė acto rūgštis	Lachema

25. Vario chloridas ($\text{CuCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Fisher Scientific
26. Mangano chlorides ($\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	Allied Chemical
27. Kobalto chloridas ($\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Aldrich
28. Cinko chloridas (ZnCl_2)	Merck
29. Cinko sulfatas ($\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)	Mallinckrodt
30. Nikelio chloridas ($\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Reachim
31. Kadmio nitratas ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$)	Mallinckrodt
32. Dapoksilo sulfonatas (dapoksilas)	Molecular Probes
33. L-cisteinas	Sigma
34. Ditiotreitolis (DTT)	Sigma
35. Magnio chloridas ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Mallinckrodt
36. Kalcio chloridas (CaCl_2)	Carl Roth
37. Stroncio chloridas ($\text{SrCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)	Mallinckrodt
38. Bario chloridas ($\text{BaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$)	Columbus Chemical
39. Kalio chloridas (KCl)	Merck
40. Ličio chloridas (LiCl)	Roth
41. Natrio tiocianatas (NaSCN)	Fluka
42. Natrio fluoridas (NaF)	Sigma
43. Natrio bromidas (NaBr)	Allied Chemical
44. Natrio jodidas (NaI)	Fisher Scientific
45. Natrio sulfatas (Na_2SO_4)	Roth
46. Natrio nitratas (NaNO_3)	Reachim
47. Natrio hidro karbonatas (NaHCO_3)	Carl Roth
48. Gliukozė	Carl Roth
49. Dimetilsulfoksidą (DMSO)	Roth
50. Guanidino hidrochloridas (Gu-HCl)	Fluka
51. HEPES	Biochrom
52. Natrio fosfatas ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$)	Fisher Scientific
53. Natrio citratas	Carl Roth
54. Dinatrio karbonatas (Na_2CO_3)	Roth
55. Imidazolas	Sigma

56. Natrio sukcinatas	Reachim
57. Natrio acetatas (CH ₃ COONa)	Serva
58. Natrio formatas (NaHCOO)	Mallinckrodt
59. PIPES	Roth

2.1.2. Prietaisai

1. Ultragarsinis dezintegratorius „Vibra cell VCX 750”	SONICS
2. Centrifugos	Hettich, Eppendorf 5810R
3. Šaldymo spinta	GILSON – 852
4. Magnetinė maišyklė	MM 3M
5. Gradifrac baltymų chromatografinė sistema	Pharmacia Biotech
6. Atvirkščių fazių chromatografinė kolonėlė “Protein C4”	Vydac
7. UV detektorius „Waters 2487 Dual λ 8. absorbance detector”	Waters
9. Baltymų elektroforezės sistema	Labtech
10. Srovės šaltinis	Consort 1200 V-500 mA E815
11. pH – metras	METTLER TOLEDO
12. Didelio efektyvumo chromatografijos sistema	Waters
13. Automatinės pipetės	GILSON
14. Spektrofotometras „Ultrospec 4000”	Pharmacia Biotech
15. „Centriplus YM - 3“ koncentravimo mėgintuvėliai	MILLIPORE
16. Svarstyklės	SCALTEC SPO 61 (Max 3100 g, d = 0,1 g)
17. Realus laiko polimerazinės grandininės reakcijos plokštelės	Thermo Scientific
18. Analitinės svarstyklės	SCALTEC SBA 31 (Max 220 g, d = 0,0001 g)
19. Nano-ITC III CSC 5300	Calorimetry Sciences Corporation
20. Realus laiko polimerazinės grandininės	BIO – RAD

reakcijos įrenginys „iCycler iQ Real Time Detection System“	
---	--

2.1.3. Kompiuterinės programos

1. Waters Breeze
2. Microsoft Office programinė įranga
3. ThermoFluor⁺⁺
4. BindWorks 3.1
5. Analyse
6. CSC Analyze
7. Origin 7.0
8. Viewer Lite
9. ITC Run

2.2. Tyrimo metodai

2.2.1. Rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų gryninimas

2.2.1.1. Biomasės ardymas

4 g atitinkamų, rekombinantinių *E.coli* ląstelių biomasės suspenduojama 40 ml ardymo buferiniame tirpale pH 7,2, turinčio 0,1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF. Ardoma 5 minutes ultragarsiniu dezintegratoriumi šaldant (maksimali temperatūra 10 °C). Suardytų ląstelių suspensija centrifuguojama 25 minutes 4 °C temperatūroje (10000 aps./min).

2.2.1.2. Intarpinių kūnelių plovimas

Supernatantas nupilamas, nuosėdos suspenduojamos 40 ml vandens. Suspensija centrifuguojama 25 minutes 4 °C temperatūroje (10000 aps./min). Supernatantas nupilamas, nuosėdos suspenduojamos 40 ml buferiniame tirpale pH 9,0, turinčio 0,1 M Tris-HCl, 2 M šlapalo, 5

mM EDTA, 1M NaCl, 1 mM PMSF. Suspensija analogiškai centrifuguojama. Supernatantas nupilamas, nuosėdos suspenduojamos 40 ml vandens. Ši suspensija analogiškai centrifuguojama.

2.2.1.3. Intarpnių kūnelių tirpinimas

Supernatantas nupilamas, nuosėdos suspenduojamos 40 ml tirpinimo buferiniame tirpale pH 9,0, turinčio 0,1 M Tris-HCl, 8 M šlapalo, 20 mM GSH. Suspensija homogenizuojama homogenizatoriumi. Gautas tirpalas 20 minučių lėtai maišomas 4 °C temperatūroje. Tuomet jis 25 minutes centrifuguojamas 4 °C temperatūroje (10000 aps./min).

2.2.1.4. Rekombinantinių hormonų renatūravimas

Supernatantas skiedžiamas renatūravimo buferiniu tirpalu pH 9,0, turinčiu 0,1 M Tris-HCl, 6 mM GSSG, iki galutinės 3 M šlapalo koncentracijos ([GSH] + [GSSG] = 11 mM, [GSH] : [GSSG] = 2 : 1). Renatūracija atliekama lėtai maišant baltymo tirpalą 4 °C temperatūroje. Po 20 val. tirpalas 25 minutes centrifuguojamas 4 °C temperatūroje (10000 aps./min).

2.2.1.5. Rekombinantinių baltymų gryninimas gelfiltracija bei jonų mainų, hidrofobinės sąveikos chromatografiniais metodais

Gelfiltracinė kolona, pripildyta 400 ml (2,5 x 80,5 cm) G-25 sefadekso, lygsvarinama 4 tūriais 25 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5 1,5 ml/min greičiu. Užnešus po renatūravimo gautą tirpalą, kolona plaunama tuo pačiu buferiniu tirpalu. Baltymai detektuojami esant 280 nm bangos ilgiui. Tikslinio baltymo frakcijos apjungiamos.

Stiklinė kolona, pripildyta 60 ml (2,5 x 11,8 cm) Q sefarozės, lygsvarinama 15 tūrių 25 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5 2,0 ml/min greičiu. Užnešus po gelfiltracijos apjungtas frakcijas, kolona plaunama tuo pačiu buferiniu tirpalu. Baltymai desorbuojami linijiniu gradientu didinant NaCl koncentraciją 25 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 8,5:

- 1 kolonos tūriu NaCl koncentracija kinta nuo 0 M iki 0,15 M;
- 2 kolonos tūriais NaCl koncentracija kinta nuo 0,15 M iki 0,3 M;
- 1,2 kolonos tūriais NaCl koncentracija kinta nuo 0,3 M iki 1 M.

Baltymai detektuojami esant 280 nm bangos ilgiui. Tikslinio baltymo frakcijos apjungiamos. Į gautą tirpalą pridedama NaCl iki 2 M galutinės koncentracijos.

Stiklinė kolonėlė, pripildyta 25 ml (1,5 x 13,7 cm) fenilsefarožės, lygsvarinama 15 tūrių 25 mM Tris-HCl buferiniu tirpalu pH 8,5, turinčiu 2 M NaCl, 1,0 ml/min greičiu. Užnešus po jonų mainų chromatografijos apjungtas frakcijas, kolonėlė plaunama tuo pačiu buferiniu tirpalu. Tikslinio baltymo desorbcija atliekama 10 kolonėlės tūrių linijiniu gradientu, mažinant NaCl koncentraciją (nuo 0,8 M iki 0,2 M) 25 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 8,5. Baltymai detektuojami esant 280 nm bangos ilgiui. Tikslinio baltymo frakcijos apjungiamos, išmatuojamas gauto tirpalo tūris ir paimamas mėginys baltymo koncentracijai matuoti.

2.2.2. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų grynumo nustatymas

2.2.2.1. Atvirkščių fazių didelio slėgio skysčių chromatografija

Naudojami tirpikliai: A – 0,1 % TFA vandenyje, B - 0,1 % TFA acetonitrile. Atvirkščių fazių „Protein C4” (250 x 4,6 mm, “Vydac”) kolona lygsvarinama 9 % B tirpikliu 1 ml/min greičiu. Užnešus analizuojamo baltymo tirpalą, jo desorbcija atliekama linijiniu gradientu:

- 3 min, B tirpiklio koncentracija kinta nuo 9 % iki 41 %;
- 10 min, B tirpiklio koncentracija kinta nuo 41 % iki 49 %;
- 40 min, B tirpiklio koncentracija kinta nuo 49 % iki 58 %;
- 10 min, B tirpiklio koncentracija kinta nuo 58 % iki 68 %;
- 1 min, B tirpiklio koncentracija kinta nuo 68 % iki 81 %.

Absorbcija matuojama 215 nm bangoje, naudojant „Waters 2487 Dual λ“ detektorių, o duomenys analizuojami panaudojant „Waters Breeze“ chromatografinę programą.

2.2.2.2. SDS – PAGE

Naudojami tirpalai:

- 30% akrilamidas + BIS

Vandenyje ištirpinama 29,2 g akrilamido ir 0,8 g BIS (N,N' – Metilen – bis – akrilamidas) ir praskiedžiama iki 100 ml.

- 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

70 ml vandens ištirpinama 18,15 g Tris-HCl (hidroksimetil) – aminometano. Tirpalo pH turi būti 8,8. Praskiedžiama iki 100 ml.

- 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8

70 ml vandens ištirpinama 6,0 g Tris-HCl (hidroksimetil) – aminometano. Tirpalo pH turi būti 6,8. Praskiedžiama iki 100 ml.

- 10% natrio dodecilsulfatas (SDS)

50 ml vandens ištirpinama 5,0 g natrio dodecilsulfato.

- 10% amonio persulfatas (APS)

1 ml vandens ištirpinama 100 mg amonio persulfato.

- Elektrodinis buferinis tirpalas (penkis kartus koncentruotas)

Vandenyje ištirpinama 30 g Tris-HCl (hidroksimetil) – aminometano, 144 g glicino, 10 g natrio dodecilsulfato ir praskiedžiama iki 2 l. Tirpalo pH turi būti 8,3 – 8,6; koreguoti negalima. Laikoma 4°C temperaturoje. Prieš naudojimą tirpalas distiliuotu vandeniu skiedžiamas 5 kartus.

- Pavyzdžio buferinis tirpalas (keturis kartus koncentruotas)

8 ml vandens ištirpinama 800 mg natrio dodecilsulfato (SDS), įpilama 2,5 ml 1 M Tris-HCl, pH 6, 8,4 ml glicerolio ir 0,1 ml 0,5% Bromfenolio mėlio. Tirpalas užšaldomas.

- Redukuotas pavyzdžio buferinis tirpalas

Į 30 µl keturis kartus koncentruoto pavyzdžio buferinio tirpalo dedama 10 µl β – merkaptioetanolio.

- Neredukuotas pavyzdžio buferinis tirpalas

Į 30 µl keturis kartus koncentruoto pavyzdžio buferinio tirpalo dedama 10 µl distiliuoto vandens.

- Dažas Coomassie Brilliant Blue R 250 (CBB R – 250)

200 ml etanolio tirpinama 0,5 g CBB R – 250, pridedama 50 ml ledinės acto rūgšties ir praskiedžiama vandeniu iki 0,5 l.

- Blukalas

Sumaišoma 300 ml etanolio, 100 ml ledinės acto rūgšties ir praskiedžiama vandeniu iki 1 l.

Mėginio paruošimas:

Į tris dalis mėginio (baltymo) tirpalo dedama 1 dalis redukuoto ar neredukuoto pavyzdžio buferinio tirpalo. Pavirinama 5 minutes.

Gelių paruošimas:

Skiriamasis 15 % poliakrilamidinis gelis

5 ml 30% akrilamidas + BIS;
2,5 ml 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8;
2,3 ml H₂O;
0,1 ml 10% SDS;
0,1 ml APS;
0,01 ml TEMED.

Koncentruojantis 4% poliakrilamidinis gelis

1,3 ml 30% akrilamidas + BIS;
2,5 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8;
6,1 ml H₂O;
0,1 ml 10% SDS;
0,05 ml APS;
0,01 ml TEMED.

Paruoštas skiriamąjio gelio tirpalas pilamas į sukonstruotą formą iki tam tikros, pažymėtos vietos ir atsargiai užpilama vandens. Polimerizacija vyksta apie 40 min.

Ant sustingusio skiriamąjio gelio pilamas koncentruojančio gelio tirpalas ir įstatomos šukos. Polimerizacija vyksta apie 1 val. Jai pasibaigus, šukos ištraukiamos, šulinėliai praplaunami praskiestu penkis kartus koncentruotu elektrodiniu buferiniu tirpalu ir forma įstatoma į aparatą.

Formos ir aparato rezervuarai užpildomi vienkartinio elektrodiniu buferiniu tirpalu, gautu 200 ml penkis kartus koncentruotą buferinį tirpalą praskiedus iki 1 l. Į šulinėlius įnešami mėginiai. Elektroforezė vykdoma pastovios srovės režime: 20 min teka 20 mA srovė, po to iki elektroforezės pabaigos – 25 mA srovė. Dažo frontui priartėjus 0,5 cm iki apatinio stiklo krašto, laukiama apie 5 min ir srovės šaltinis išjungiamas.

Nupjovus koncentruojantį gelį, skiriamasis dedamas į vonelę su CBB R – 250 dažų. Dažoma per naktį. Vėliau gelis blukinamas blukalo tirpale.

2.2.3. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono koncentravimas

Rekombinantiniai kiaulės ir audinės augimo hormonai koncentruojami naudojant „Centriplus“ koncentravimo mėgintuvėlius turinčius membraną praleidžiančią ne didesnius kaip 3000 Da junginius. Koncentruojama iki norimo baltymo kiekio vienam mililitre 4 °C temperatūroje ir 3000 g, pastoviai papildant viršutinį mėgintuvėlio rezervuarą atitinkamo baltymo tirpalu.

2.2.4. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų spektrofotometrinis koncentracijos nustatymas

Atitinkamo baltymo tirpalas išdializuotas per naktį 50 mM Trisi-HCl buferiniame tirpale pH 7,5 perfiltruojamas per 0,2 µm porų PVDF „Carl Roth“ filtrą. Matuojamos filtrato sugertys, esant 280 nm ir 340 nm bangų ilgiams, panaudojant „Milli Q“ vandenį kaip kontrolę. Baltymo tirpalo sugertis gaunama iš optinio tankio reikšmės esant 280 nm bangos ilgiui atėmus optinio tankio reikšmę, gautą 340 nm bangoje [153]. Hormono koncentracija apskaičiuojama pagal Beerio – Lamberto dėsnį:

$$A = C \cdot \varepsilon \cdot l$$

kur A – baltymo sugertis, OV; ε – jo ekstinkcijos koeficientas, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$, gautas „ProtParam“ programa, panaudojant pirminę baltymo seką ($\varepsilon_{kAH} = 15930 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, $\varepsilon_{aAH} = 15930 M^{-1} \cdot cm^{-1}$, $\varepsilon_{zAH} = 17420 M^{-1} \cdot cm^{-1}$); l – kiuvetės ilgis, cm; C – molinė baltymo koncentracija, M.

2.2.5. Įvairių reagentų įtakos rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui tyrimas

Į realaus laiko polimerazinės grandininės reakcijos (RL – PGR) plokštelės 76 šulinėlius įpilama po 5 µl paruoštų įvairių reagentų skirtingų koncentracijų vandeninių tirpalų. Dar trys plokštelės šulinėliai, turintys po 5 µl „Milli Q“ vandens, yra kontroliniai (2 lentelė). Į 79 šios plokštelės šulinėlius įpilama 5 µl 40 µM rekombinantinio žmogaus augimo hormono, prieš tai išdializuoto 50 mM Trisi-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5, praskiesto vandeniu iki reikiamos baltymo koncentracijos ir turinčio 200 µM dapoksilo[®] sulfonato. Į kiekvieną plokštelės šulinėlį įpylama 2,5 µl silikoninės alyvos ir ji centrifuguojama 1 min 1000 aps/min greičiu. RL – PGR įrenginyje plokštelė kaitinama nuo 25 °C iki 97 °C 1 °C/min greičiu ir matuojamas dapoksilo sulfonato fluorescencijos intensyvumas kiekviename šulinėlyje. Duomenys apdorojami „ThermoFluor⁺⁺“ programa, gaunamos baltymo išsivyniojimo temperatūros, esant įvairių koncentracijų skirtingiems reagentams ir jiems nesant.

Analogiškai atliekami eksperimentai su 20 µM rekombinantinių kiaulės, audinės augimo hormonų vandeniniais tirpalais, turinčiais 100 µM dapoksilo sulfonato. Kiekvienas eksperimentas kartojamas po tris kartus.

2 lentelė. Įvairių reagentų skirtingų koncentracijų supilimo į RL – PGR plokštelę schema

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	5 mM NaCl	15 mM NaCl	50 mM NaCl	150 mM NaCl	500 mM NaCl	1 M NaCl	100 mM Tris-HCl, pH 7,0	100 mM Tris-HCl, pH 7,5	100 mM Tris-HCl, pH 8,0	100 mM Tris-HCl, pH 8,5	100 mM Tris-HCl, pH 9,0	100 mM glicino, pH 9,5
B	5 mM MgCl ₂	5 mM CaCl ₂	5 mM SrCl ₂	5 mM BaCl ₂	5 mM cisteino	5 mM DTT	100 mM HEPES, pH 6,5	100 mM HEPES, pH 7,5	100 mM HEPES, pH 8,5	100 mM natrio fosfato, pH 6,0	100 mM natrio fosfato, pH 7,0	100 mM natrio fosfato, pH 8,0
C	100 mM KCl	100 mM LiCl	100 mM NaCl	100 mM NaSCN	100 mM NaF	100 mM NaBr	100 mM natrio citrato, pH 3,5	100 mM natrio citrato, pH 4,5	100 mM natrio citrato, pH 5,5	100 mM natrio citrato, pH 6,5	100 mM natrio citrato, pH 7,5	100 mM natrio karbonato, pH 10,0
D	100 mM NaI	100 mM Na ₂ SO ₄	100 mM NaNO ₃	100 mM NaHCO ₃	100 mM gliukozės	vandens	100 mM MES, pH 5,0	100 mM MES, pH 6,0	100 mM MES, pH 7,0	100 mM PIPES, pH 6,5	100 mM PIPES, pH 7,5	vandens
E	2 % DMSO	5 % DMSO	10 % DMSO	2% glicerolio	5 % glicerolio	10 % glicerolio	100 mM imidazolo, pH 7,0	200 mM imidazolo, pH 7,0	300 mM imidazolo, pH 7,0	100 mM natrio sukcinato, pH 6,5	100 mM natrio sukcinato, pH 7,0	100 mM CH ₃ COONa, pH 4,0
F	0,05 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 % DMSO	0,1 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 % DMSO	0,15 mM dapoksilo sulfonato, 0,5 % DMSO	250 mM šlapalo	500 mM šlapalo	1 M šlapalo	100 mM CH ₃ COONa, pH 4,5	100 mM CH ₃ COONa, pH 5,0	100 mM CH ₃ COONa, pH 5,5	100 mM Natrio formiato, pH 3,0	100 mM Natrio formiato, pH 3,5	100 mM Natrio formiato, pH 4,0
G	2 M šlapalo	250 mM Gu-HCl	500 mM Gu-HCl	1000 mM Gu-HCl	2000 mM Gu-HCl	vandens	-	-	-	-	-	-

2.2.6. Metalų jonų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui

Iš 4 mM MnCl₂, CoCl₂, NiCl₂, Cd(NO₃)₂, CuCl₂, ZnCl₂, ZnSO₄ tirpalų 50 mM Tris-HCl buferiniuose tirpaluose pH 7,5, skiedžiant juos šiuo buferiniu tirpalu, RL – PGR plokštelės šulinėliuose paruošiama po 10 µl 2000 µM, 1000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62,5 µM, 31,2 µM, 15,6 µM, 7,8 µM, 3,9 µM, 1,9 µM šių metalų jonų tirpalų. Į plokštelės dvylikto kontrolinio stulpelio šulinėlius įpilama 10 µl 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo pH 7,5. Į kitos analogiškos plokštelės kiekvieną šulinėlį įpilama 5 µl atitinkamo tirpalo iš paruoštos plokštelės ir 5 µl 40 µM rekombinantinio žmogaus augimo hormono tirpalo 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5, turinčio 100 mM NaCl ir 200 µM dapoksilo sulfonato. Į kiekvieną gautos plokštelės šulinėlį įpylama 2,5 µl silikoninės alyvos ir ji centrifuguojama 1 min 1000 aps/min greičiu. Po to RL – PGR įrenginyje plokštelė kaitinama nuo 25 °C iki 97 °C 1 °C/min greičiu ir matuojamas dapoksilo sulfonato fluorescencijos intensyvumas kiekviename šulinėlyje. Duomenys apdorojami „ThermoFluor⁺“ programa, gaunamos baltymo išsivyniojimo temperatūros, esant įvairių koncentracijų metalų jonams ir jiems nesant. Eksperimentas kartojamas tris kartus. Braižomos priklausomybės tarp baltymo vidurkinių išsivyniojimo temperatūrų ir metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių, panaudojant Microsoft[®] Office Excel 2003 programą.

Analogiškai atliekami eksperimentai su 20 µM rekombinantinių kiaulės, audinės augimo hormonų tirpalais 50 mM Tris-HCl buferiniuose tirpaluose pH 7,5, turinčiais 100 mM NaCl ir 100 µM dapoksilo sulfonato. Metalų jonų jungimosi su rK₁AH, rA₁AH konstantos gaunamos

$$L_i = \left(1 - e^{-\left(\Delta_{U_i} H_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_{U_i} S_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p \ln(T_m/T_r)) \right) / RT_m} \right) \times \left[\frac{P_i}{2} \frac{e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} + e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} e^{-\left(\Delta_{U_i} H_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_{U_i} S_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p \ln(T_m/T_r)) \right) / RT_m}}{e^{-\left(\Delta_{U_i} H_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_{U_i} S_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p \ln(T_m/T_r)) \right) / RT_m} \left(e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} - e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} \right)} - e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} \right] + \frac{1}{e^{-\left(\Delta_{U_i} H_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_{U_i} S_{T_r} + \Delta_{U_i} C_p \ln(T_m/T_r)) \right) / RT_m} e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m} - e^{-\left(\Delta_{M_i} H_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{M_i} S_{T_0} + \Delta_{M_i} C_p \ln(T_m/T_0)) \right) / RT_m}}}$$

lygtį (1.2.1.1. skyrius) glotninant prie gautų duomenų mažiausių kvadratų metodu Origin 7.0 programa.

2.2.7. Zn^{2+} įtakos rekombinantinių žmogaus, kiaulės, audinės augimo hormonų terminiam stabilumui, esant skirtingoms baltymų koncentracijoms, tyrimas

Į RL – PGR plokštelės A – D eilučių 11 šulinėlių įpilama po 5 μ l 2000 μ M, 1000 μ M, 500 μ M, 250 μ M, 125 μ M, 62,5 μ M, 31,2 μ M, 15,6 μ M, 7,8 μ M, 3,9 μ M, 1,9 μ M $ZnSO_4$ tirpalų 50 mM Tris-HCl buferiniuose tirpaluose pH 7,5. Į šios plokštelės E – H eilučių šulinėlius analogiškai įpilama tokių pačių koncentracijų $ZnCl_2$ tirpalų 50 mM Tris-HCl buferiniuose tirpaluose pH 7,5. Plokštelės dvylikto stulpelio šulinėliai, turintys po 5 μ l 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo pH 7,5, yra kontroliniai. Paruošiama 150 μ l 80 μ M, 40 μ M, 20 μ M bei 10 μ M rekombinantinio žmogaus augimo hormono tirpalų 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5, turinčių 100 mM NaCl ir 200 μ M dapoksilo sulfonato. Po 5 μ l šių baltymo tirpalų atitinkamai įpilama į plokštelės A ir E, B ir F, C ir G bei D ir H eilučių šulinėlius. Galutinės baltymo ir $ZnSO_4$, $ZnCl_2$ koncentracijos plokštelėje pateiktos 3 lentelėje. Į kiekvieną gautos plokštelės šulinėlį įpilama 2,5 μ l silikoninės alyvos ir ji centrifuguojama 1 min 1000 aps/min greičiu. Po to RL – PGR įrenginyje plokštelė kaitinama nuo 25 $^{\circ}$ C iki 97 $^{\circ}$ C 1 $^{\circ}$ C/min greičiu ir matuojamas dapoksilo sulfonato fluorescencijos intensyvumas kiekviename šulinėlyje. Duomenys apdorojami „ThermoFluor⁺⁺“ programa, gaunamos baltymo išsivyniojimo temperatūros, esant įvairioms Zn^{2+} koncentracijoms ir jiems nesant.

Analogiškai atliekami eksperimentai su tokiais pačiais rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų tirpalais. Kiekvienas eksperimentas kartojamas po tris kartus.

3 lentelė. Galutinės rŽAH ir ZnSO₄, ZnCl₂ koncentracijos plokštelėje, tiriant Zn²⁺ įtaką šio baltymo terminiam stabilumui

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	40 µM rŽAH, 1000 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 500 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 250 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 125 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 62,5 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 31,2 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 15,6 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 7,8 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 3,9 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 1,9 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 1,0 µM ZnSO ₄	40 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
B	20 µM rŽAH, 1000 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 500 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 250 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 125 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 62,5 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 31,2 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 15,6 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 7,8 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 3,9 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 1,9 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 1,0 µM ZnSO ₄	20 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
C	10 µM rŽAH, 1000 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 500 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 250 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 125 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 62,5 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 31,2 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 15,6 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 7,8 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 3,9 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 1,9 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 1,0 µM ZnSO ₄	10 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
D	5 µM rŽAH, 1000 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 500 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 250 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 125 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 62,5 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 31,2 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 15,6 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 7,8 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 3,9 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 1,9 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 1,0 µM ZnSO ₄	5 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
E	40 µM rŽAH, 1000 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 500 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 250 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 125 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 62,5 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 31,2 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 15,6 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 7,8 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 3,9 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 1,9 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 1,0 µM ZnCl ₂	40 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
F	20 µM rŽAH, 1000 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 500 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 250 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 125 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 62,5 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 31,2 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 15,6 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 7,8 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 3,9 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 1,9 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 1,0 µM ZnCl ₂	20 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
G	10 µM rŽAH, 1000 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 500 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 250 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 125 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 62,5 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 31,2 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 15,6 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 7,8 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 3,9 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 1,9 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 1,0 µM ZnCl ₂	10 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5
H	5 µM rŽAH, 1000 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 500 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 250 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 125 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 62,5 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 31,2 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 15,6 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 7,8 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 3,9 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 1,9 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 1,0 µM ZnCl ₂	5 µM rŽAH, 50 mM Tris- HCl pH 7,5

2.2.8. Zn^{2+} ir rekombinantinių žmogaus, kiaulės, audinės augimo hormonų sąveikos parametrų nustatymas izoterminio titravimo kalorimetrija

Izoterminio titravimo kalorimetro lyginamoji kiuvetė užpildoma „Milli Q“ vandeniu. 1,5 ml nudujinto vakuuminiame inde 10 μM , 45 μM , 63 μM , 74 μM , 80 μM , 100 μM ar 130 μM rekombinantinio kiaulės augimo hormono tirpalo išdializuoto 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5, turinčio 50 mM NaCl, pilama į mėginio kiuvetę. Atitinkamai 100 μM , 450 μM , 630 μM , 740 μM , 800 μM , 1000 μM ar 1300 μM nudujintu Zn^{2+} tirpalu dializės 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5, turinčiu 50 mM NaCl, užpildomas 250 μl švirkštas, kuris įtvirtinamas biuretėje ir įmerkiamas į mėginio kiuvetę. Įjungiamas baltymo tirpalo kiuvetėje 150 sūk./min. greičiu maišymas. Nusistovėjus bazinei linijai (po 45 – 60 min.), kas 180 ar 240 s į mėginio kiuvetę injekuojama po 10 μl cinko jonų tirpalo. ITCRun programa registruojami šiluminiai pokyčiai vykstantys kiuvetėje po kiekvienos injekcijos.

Analogiškai atliekami kontroliniai eksperimentai vietoj rKAH tirpalo įpilant atitinkamą kiekį dializės 50 mM Tris-HCl buferinio tirpalo pH 7,5.

Pradiniai Zn^{2+} jungimosi su hormonu duomenys gaunami iš rekombinantinio kAH izoterminio titravimo cinko jonų tirpalo duomenų atimant kontrolinio eksperimento duomenis BindWorks 3.1.5 programoma. Gauti pradiniai duomenys integruojami CSCAnalyze programa. Zn^{2+} jungimosi su rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu konstanta, stochiometrija ir stebimas entalpijos pokytis nustatomi $q_i = n[P_T]V_0 dH(\Theta_i - \Theta_{i-1})$ lygtį (1.2.2.1. skyrius) glotninant prie gautų duomenų CSCAnalyze programa.

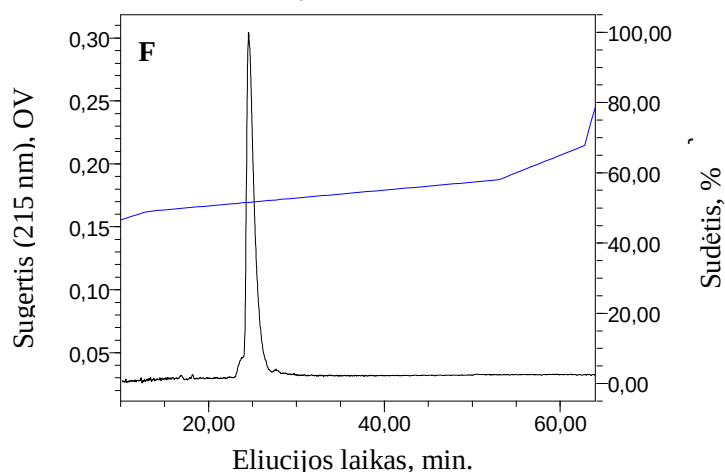
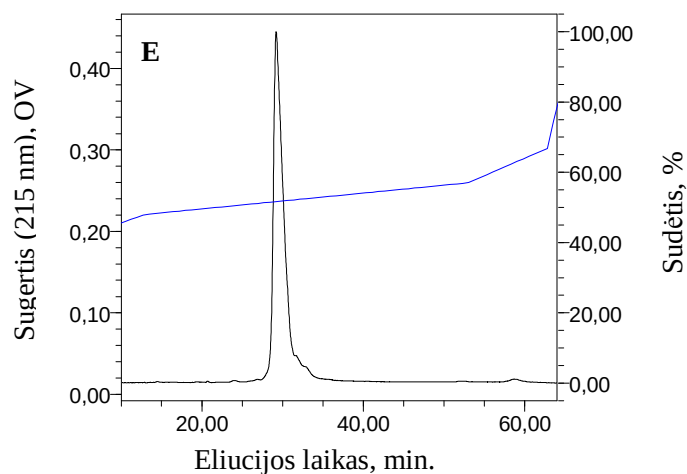
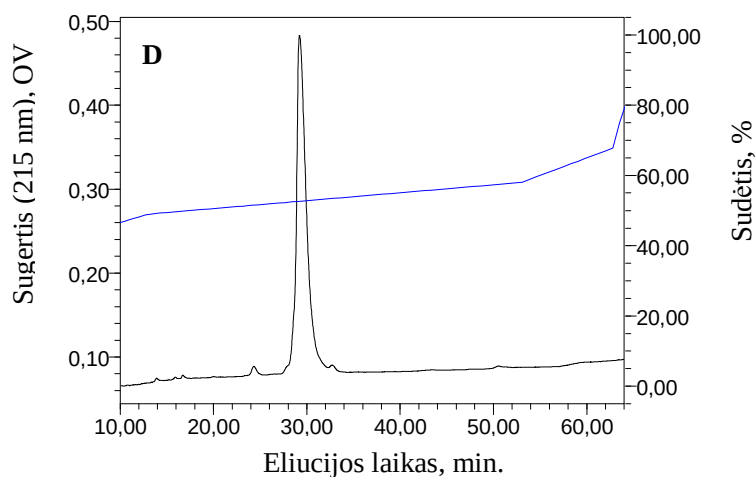
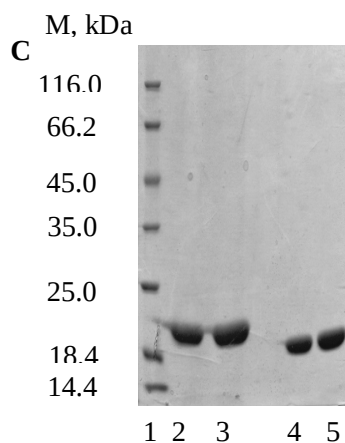
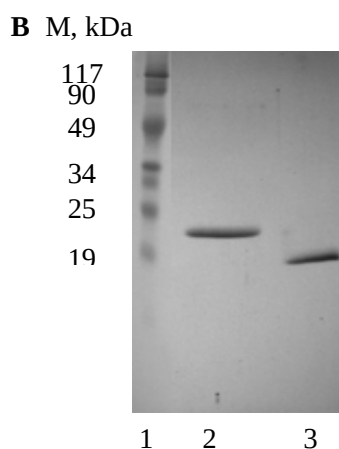
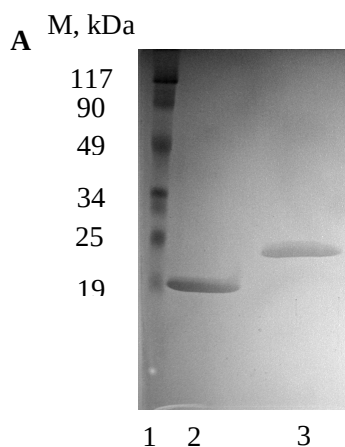
Analogiškai atliekami eksperimentai su rekombinantiniais 63 μM , 100 μM audinės ir 100 μM , 110 μM žmogaus augimo hormonų tirpalais, injekuojant į juos kas 180 s 10 kartų didesnės nei hormono koncentracijos Zn^{2+} tirpalą.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

1992 m. B. C. Cunninghamas ir kt. nustatė, kad Zn^{2+} , Co^{2+} jungdamiesi su žmogaus augimo hormonu stabilizuoja baltymo struktūrą [34-36]. Vėliau, 2000 m. buvo parodyta, kad Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{+} , Au^{3+} , Au^{+} , Pd^{2+} , Ni^{2+} , Pt^{2+} sąveikauja su žAH ir skatina jo dimerizaciją. Žmogaus augimo hormono stabilizavimas cinko jonais imtas plačiai taikyti tobulinant šio baltymo vaistinę formuluotę [34, 35, 37-42]. Taip pat daugėja publikacijų, kuriose tiriamos ržAH ir skirtingų metalų jonų sąveikos, nustatomi jų jungimosi su baltymu kinetiniai ir termodinaminiai parametrai, jų įtaka baltymo erdvinei struktūrai [160-164].

Rekombinantinio žAH aminorūgščių sekos homologiškumas su rekombinantiniais kiaulės ir audinės AH atitinkamai yra 68 % ir 66,7 % [44]. Evoliuciniu požiūriu metalų jonų sąveika su rekombinantiniais kiaulės ir audinės augimo hormonais yra įdomi, nes yra keleta svarbių žAH ir kiaulės, audinės AH skirtumų. Pavyzdžiui, tik žmogaus ir kitų primatų augimo hormonams būdingas laktogeninis aktyvumas [8]. Dėl šios priežasties ir norint išsiaiškinti, ar metalų jonai gali būti taip pat panaudojami tobulinant ir rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų vaistines formuluotes, šiame darbe tiriama skirtingų metalų jonų ir rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų sąveika.

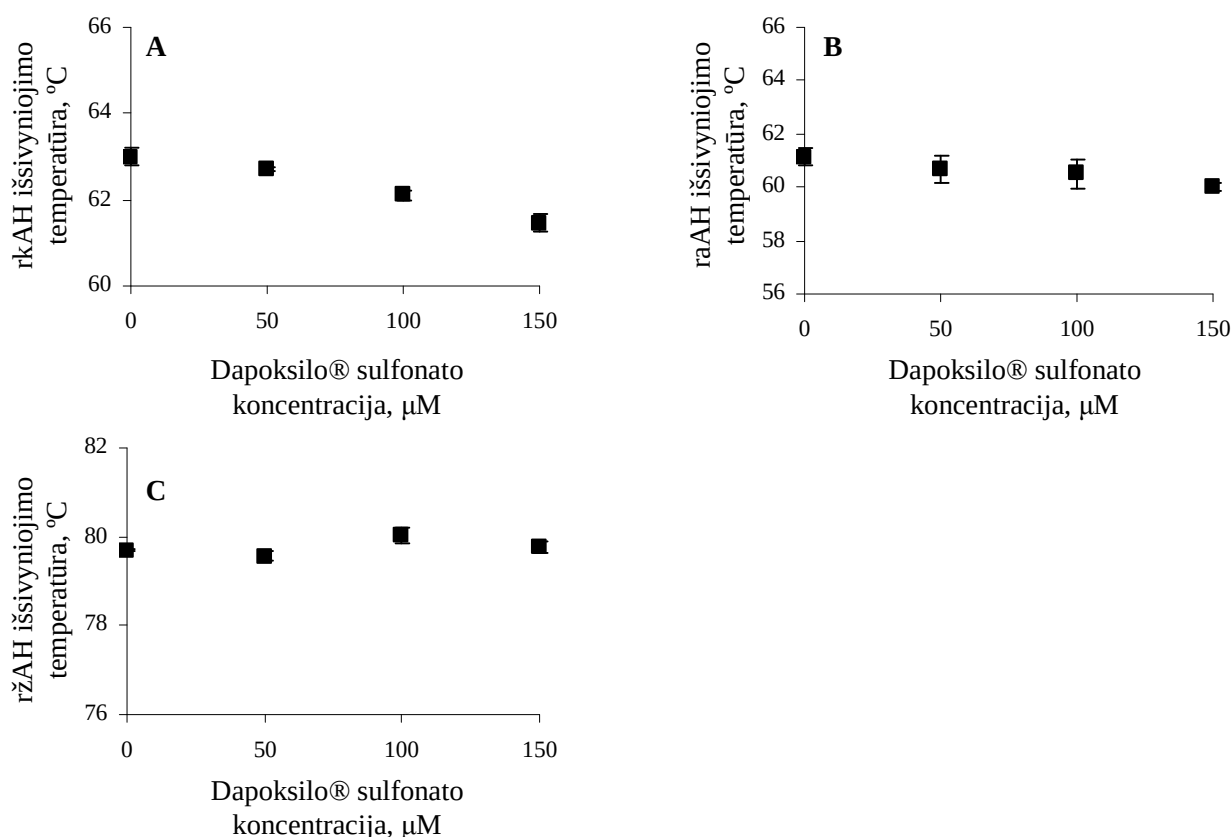
Tiriant makromolekulių ir ligandų sąveikas yra labai svarbu, kad būtų naudojami gryną medžiagų tirpalai [153], todėl visi tirpalai, reikalingi tiriant metalų jonų ir rekombinantinių augimo hormonų sąveiką, ruošti naudojant „Milli Q“ vandenį, o baltymų grynumas įvertintas SDS-PAGE metodu ir RP-HPLC analize (14 pav. A, B, C). Eksperimentai atlikti naudojant raAH ir rkAH, kurių grynumas ne mažesnis nei 96 %, ržAH - 99 %.



14 pav. Rekombinantinių kiaulės (A, D), audinės (B, E), žmogaus (C, F) AH grynumo įvertinimas SDS-PAGE (15 %) metodu (A, B, C) ir RP-HPLC analize (kolonėlė „Protein C4“, 250 × 4,6 mm, Vydac) (D, E, F). (A) 1 takelis – molekulinų masių standartai, 2 ir 3 – įnešta 6 µg rkAH atitinkamai neredukuotomis ir redukuotomis sąlygomis. (B) 1 takelis – molekulinų masių standartai, 2 ir 3 – įnešta 4 µg raAH atitinkamai redukuotomis ir neredukuotomis sąlygomis. (C) 1 takelis – molekulinų masių standartai, 2 ir 3 – atitinkamai įnešta 10 µg ir 15 µg rŽAH redukuotomis sąlygomis, 4 ir 5 - atitinkamai įnešta 10 µg ir 15 µg rŽAH neredukuotomis sąlygomis

3.1. Įvairių reagentų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui

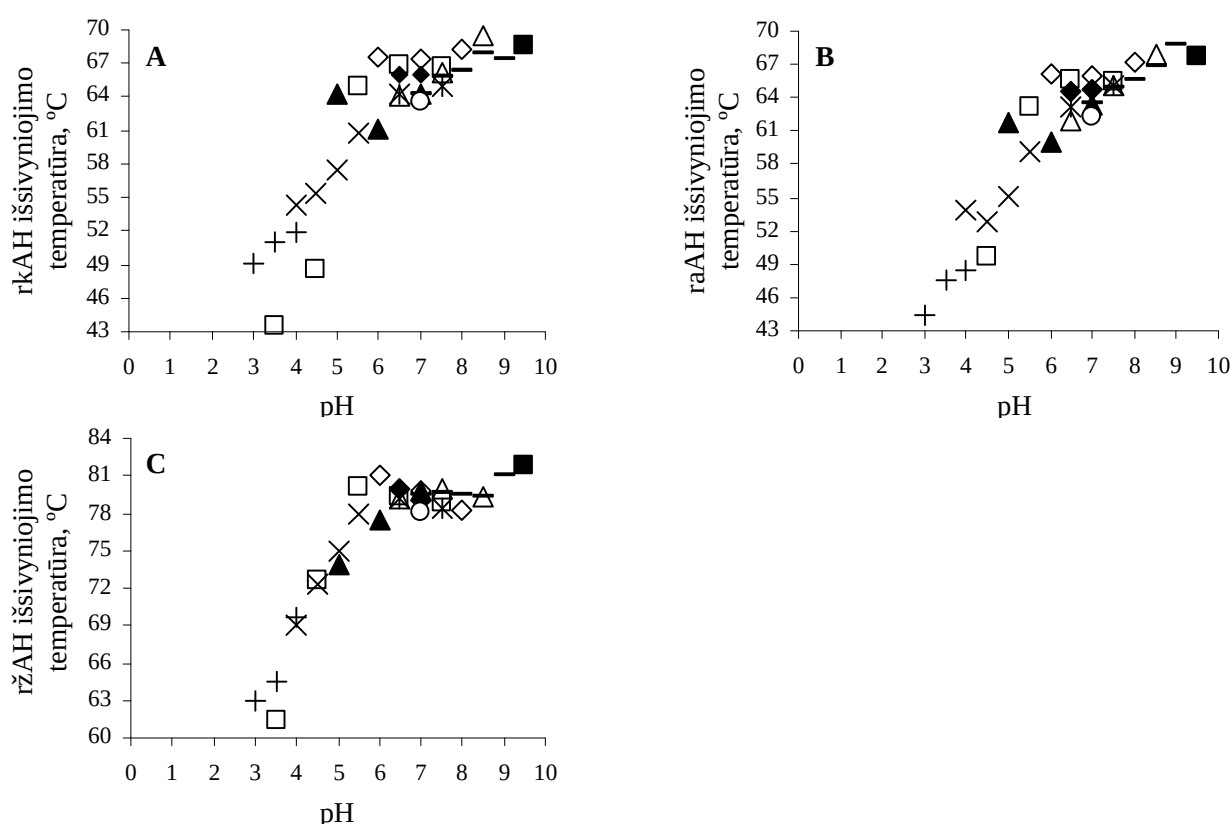
Norint tirti metalų jonų ir trijų rekombinantinių augimo hormonų sąveiką terminio poslinkio ir izoterminės titravimo kalorimetrijos metodais, paranku prieš nustatant eksperimentines sąlygas pasižiūrėti, kokie ligandai ir kokios jų koncentracijos stabilizuoja ar destabilizuoja šiuos augimo hormonus. Kadangi terminio poslinkio metodu hormonų terminis stabilumas tiriamas matuojant dapoksilo® sulfonato ir baltymo komplekso fluorescencijos intensyvumo pokyčius keliant temperatūrą, buvo tirta šio solvatochrominio dažo įtaka rekombinantiniams kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonams. Rekombinantiniai kiaulės ir audinės AH nežymiai destabilizuojami esant 150 μM solvatochrominio dažo koncentracijai (šių baltymų išsivyniojimo temperatūros sumažėja apie 1,3 $^{\circ}\text{C}$), tačiau esant tokiam ar mažesniai dažo kiekiui rekombinantinio žAH stabilumas nekinta (15 pav. A, B, C).



15 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų, esančių vandeniniuose tirpaluose, išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo dapoksilo® sulfonato koncentracijų. (A), (B) rkAH, raAH koncentracija - 10 μM , pradinė dapoksilo® sulfonato - 50 μM ; (C) ržAH koncentracija - 20 μM , šio dažo - 100 μM . Abscisių ašyje atidėtos dažo koncentracijos, neįskaitant jo pradinės koncentracijos

Dėl šios priežasties tiriant metalų jonų įtaką rekombinantinių kiaulės, audinės, žmogaus augimo hormonų terminiam stabilumui terminio poslinkio metodu naudotos galutinės 50 μM ir 100 μM dapoksilo[®] sulfonato koncentracijos.

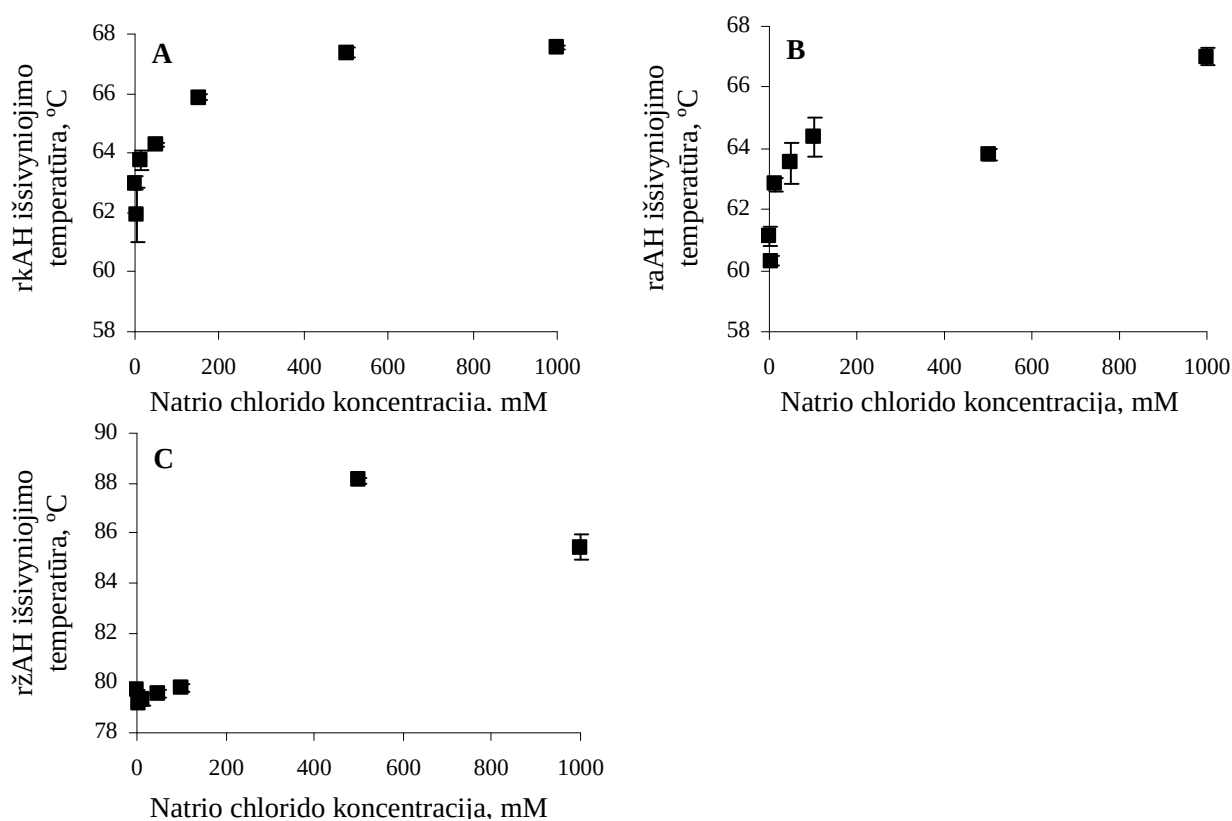
Taip pat ištirtas šių rekombinantinių augimo hormonų stabilumas įvairiose pH reikšmėse ir buferinėse sistemose. Rekombinantiniai kaulės ir audinės augimo hormonai destabilizuojami esant rūgštinėje terpėje (pH 5,0 ir mažiau), o stabilizuojami tirpaluose, kurių pH reikšmės yra 6,5 - 9,5 (16 pav. A, B). ržAH terminis stabilumas mažėja esant rūgštiniuose tirpaluose (pH 5,0 ir mažesniai), tirpaluose, kurių pH reikšmės yra 6,5 - 9,5 – praktiškai nekinta (16 pav. C).



16 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų 100 mM buferinių tirpalų pH reikšmių. ◇ - natrio fosfatas, pH 6,0, 7,0, 8,0; ◆ - natrio sukcinatas, pH 6,0, 5,0, 7,0; + - natrio formiatas, pH 3,0, 3,5, 4,0; * - PIPES, pH 6,5, 7,5; × - natrio acetatas, pH 4,0, 4,5, 5,0, 5,5; ○ – imidazolas, pH 7,0; ▲ – MES, pH 5,0, 6,0, 7,0; □ – natrio citratas, pH 3,5, 4,5, 5,5, 6,5, 7,5; ■ – glicinas, pH 9,5; △ – HEPES, pH 6,5, 7,5, 8,5; — - Tris-HCl, pH 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0. (A), (B) rkAH, raAH koncentracija - 10 μM (0,22 mg/ml); (C) ržAH koncentracija - 20 μM (0,45 mg/ml). Išsivyniojimo temperatūrų variacijos koeficientas neviršija 9 %

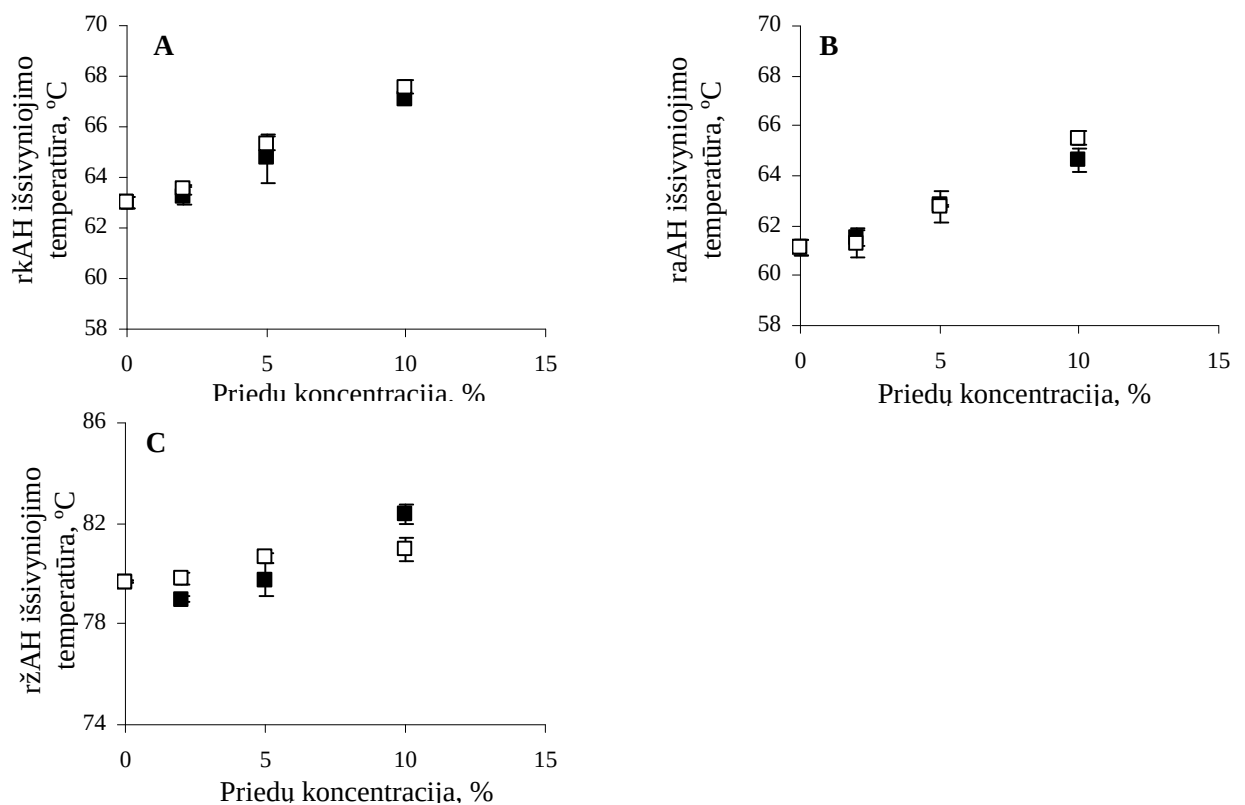
Atsižvelgus į gautus rezultatus ir žinant, kad gyvūnų kraujo pH yra 7,2-7,4 [166], terminio poslinkio ir ITK eksperimentuose naudoti 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5 išdializuoti rekombinantiniai kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonai.

rkAH, raAH, ržAH stabilumas didėja didėjant natrio chlorido koncentracijoms (17 pav. A, B, C). Ypač joninės jėgos didinimas įtakoja rekombinantinio žAH terminį stabilumą. Mažesnės šios druskos koncentracijos neįtakoja hormonų terminio stabilumo. Todėl norint sumažinti nespecifinių sąveikų tikimybę atliekant izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio eksperimentus rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų mėginiai buvo ruošiami taip, kad galutinė natrio chlorido koncentracija būtų 50 mM.



17 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo natrio chlorido koncentracijos. (A), (B) rkAH, raAH koncentracija - 10 μ M; (C) ržAH koncentracija - 20 μ M

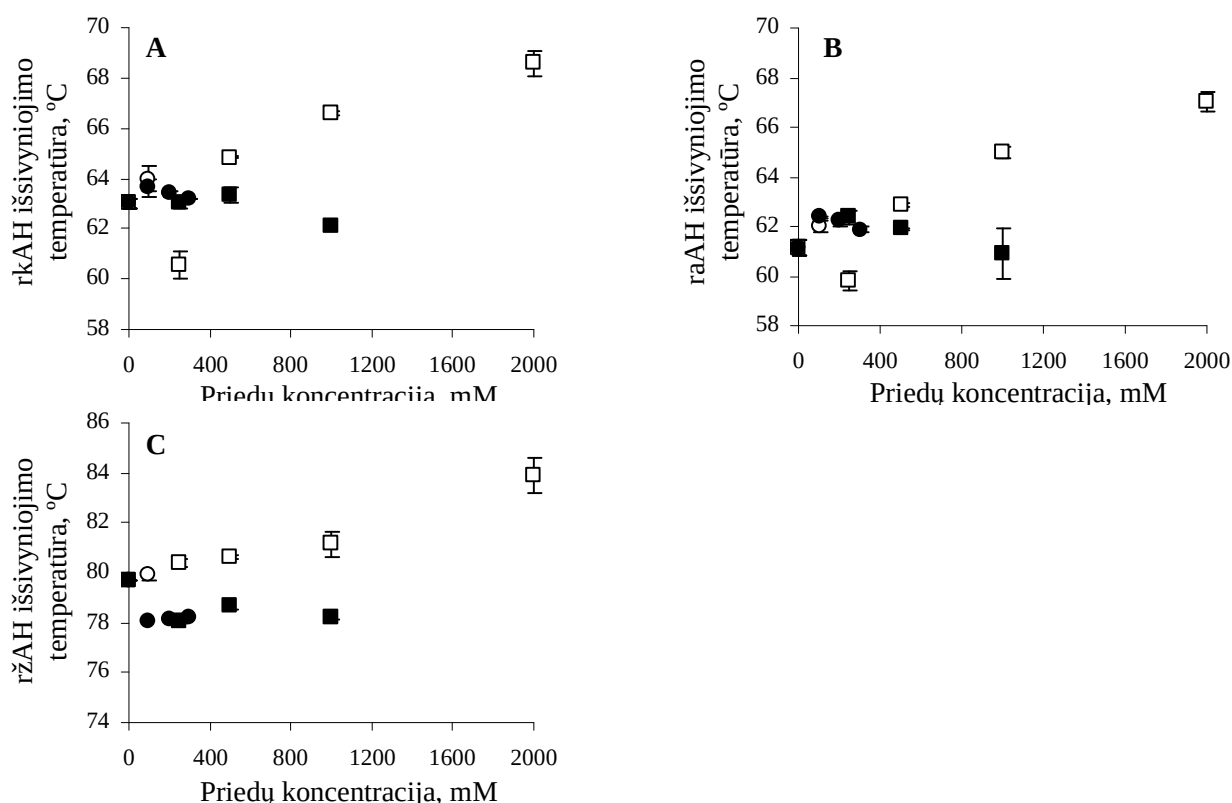
Dimetilsulfoksidą ir glicerolį stabilizuoja rkAH, raAH (baltymų koncentracija – 10 μ M) esant nuo 5 % iki 10 % jų koncentracijoms (18 pav. A, B), o ržAH (baltymų koncentracija – 20 μ M) - esant 10 % šių reagentų koncentracijoms (18 pav. C).



18 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) AH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo dimetilsulfoksido ir glicerolio koncentracijų. ■ – DMSO, □ – glicerolis. (A), (B) rkAH, raAH koncentracija - 10 μ M; (C) rŽAH koncentracija - 20 μ M

Kadangi šiame darbe naudojami augimo hormonai gryninami iš intarpinių *E. coli* kūnelių panaudojant šlapalą, buvo tirta denatūrantų įtaka šiems baltymams. Nustatyta, kad esant iki 1 M guanidino hidroklorido koncentracijai rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų stabilumas nekinta, o iki 2 M šlapalo koncentracijos stabilizuoja šiuos baltymus (19 pav. A, B, C). Taip pat nustatyta, kad esant 100 mM gliukozės koncentracijai ir iki 300 mM imidazolo koncentracijoms visų trijų rekombinantinių augimo hormonų terminis stabilumas nekinta (19 pav. A, B, C).

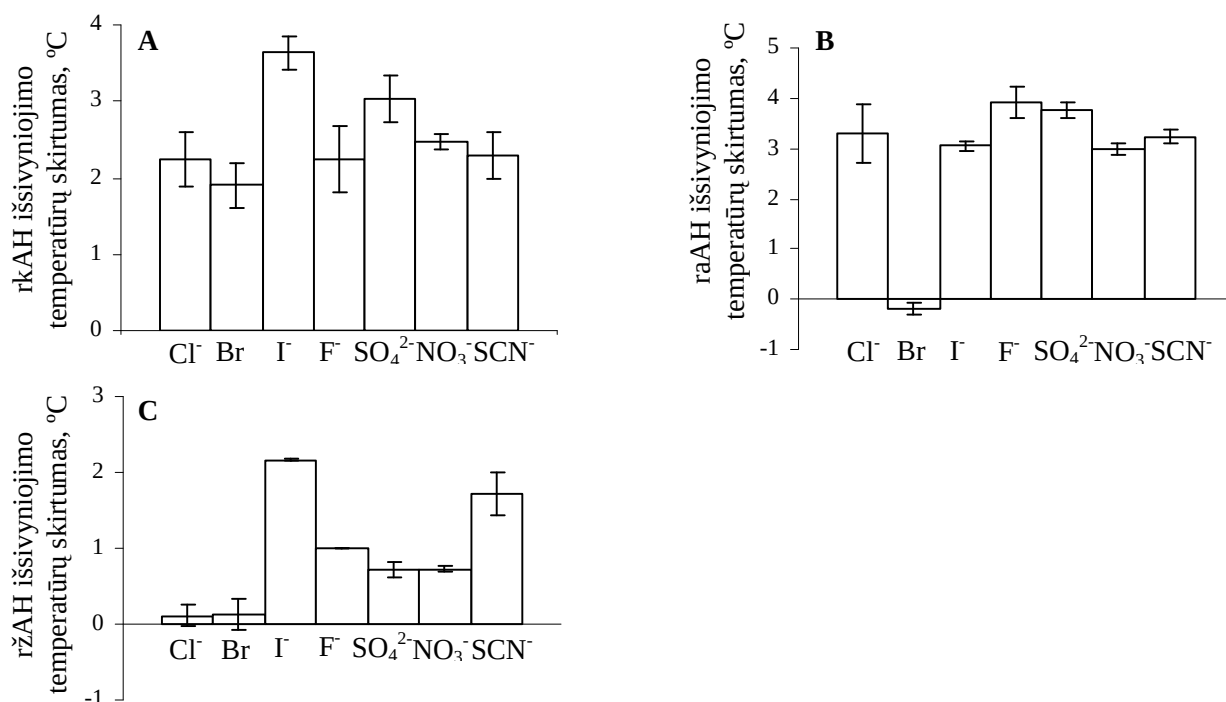
20 pav. A, B, C pateikti trijų augimo hormonų išsivyniojimo temperatūrų skirtumai esant 100 mM skirtingų anijonų ir jiems nesant. Kaip matyti, Cl^- , Br^- , I^- , F^- , SO_4^{2-} , NO_3^- , SCN^- stabilizuoja rkAH. Šie anijonai stabilizuoja ir raAH, tačiau išskyrus Br^- . Tuo tarpu rŽAH stabilizavimas I^- , SCN^- yra mažesnis lyginant su rekombinantiniais kiaulės ir audinės augimo hormonais. Be to, Cl^- , Br^- , F^- , SO_4^{2-} , NO_3^- ko gero neįtakoja rekombinantinio ŽAH terminio stabilumo.



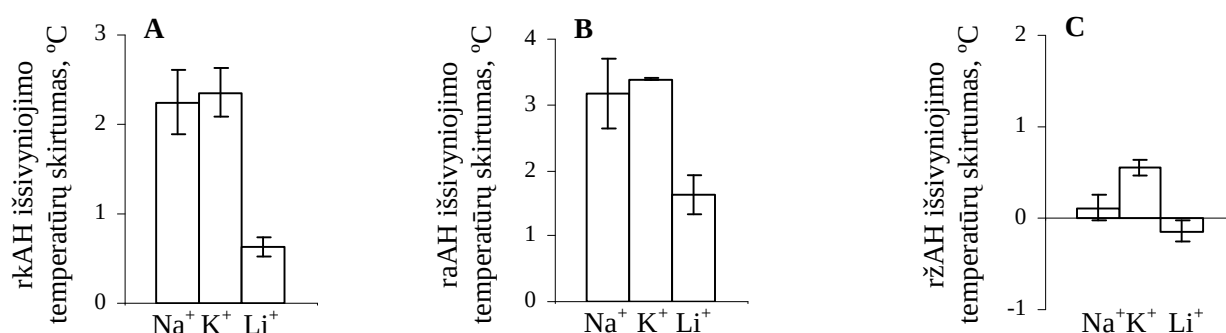
19 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) AH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybė nuo pridėtų reagentų koncentracijų. ■ – guanidino hidrochloridas, □ – šlapalas, ● – imidazolas, ○ - gliukozė. (A), (B) rkAH, raAH koncentracija - 10 μ M; (C) rŽAH koncentracija - 20 μ M

Buvo tiriama, kaip kinta rkAH, raAH, rŽAH išsivyniojimo temperatūros, esant ir 100 mM K^+ , Na^+ ir Li^+ koncentracijoms. Iš 21 pav. C pateiktų rezultatų matoma, kad šie katijonai neįtakoja rekombinantinio ŽAH terminio stabilumo. Rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų terminį stabilumą didina K^+ , mažiau Na^+ , tačiau esant 100 mM Li^+ koncentracijai šių baltymų išsivyniojimo temperatūros nekinta (21 pav. A, B).

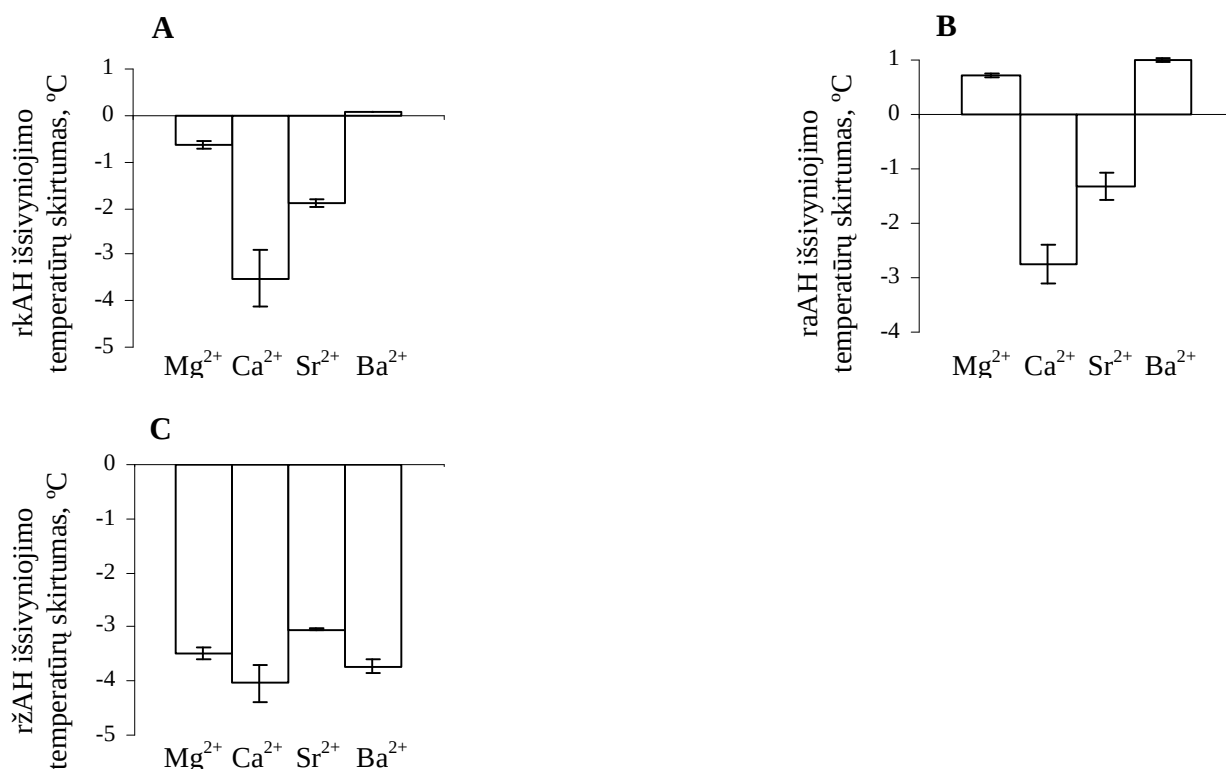
Taip pat nustatyta, kad rkAH ir raAH išsivyniojimo temperatūros nekinta, atitinkamai esant 5 mM Mg^{2+} , Ba^{2+} ir 5 mM Sr^{2+} , Mg^{2+} , Ba^{2+} koncentracijoms. Tokie patys Ca^{2+} kiekiai destabilizuoja rekombinantinį audinės augimo hormoną ir tokie patys Ca^{2+} , Sr^{2+} - rekombinantinį kiaulės augimo hormoną (22 pav. A, B). Rekombinantinio ŽAH stabilumą mažina visi minėti katijonai (22 pav. C).



20 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 100 mM skirtingų anijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai. (A), (B) rkAH, raAH išsivyniojimo temperatūros vandenyje atitinkamai – $(63,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, $(61,1 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$, baltymų koncentracija - 10 μM ; (C) ržAH išsivyniojimo temperatūra vandenyje – $(79,7 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, baltymo koncentracija - 20 μM . Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 3 identiška atliktų eksperimentų. Panaudotos natrio druskos

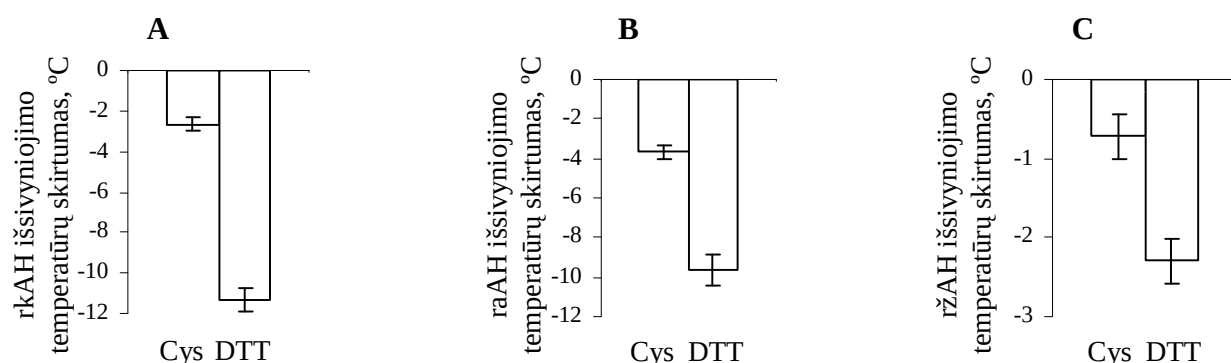


21 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 100 mM skirtingų katijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai. (A), (B) rkAH, raAH išsivyniojimo temperatūros vandenyje atitinkamai – $(63,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, $(61,1 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$, baltymų koncentracija - 10 μM ; (C) ržAH išsivyniojimo temperatūra vandenyje – $(79,7 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, baltymo koncentracija - 20 μM . Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 3 identiška atliktų eksperimentų



22 pav. Rekombinantinių kiaulės (A), audinės (B), žmogaus (C) augimo hormonų esant 5 mM skirtingų katijonų ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai. (A), (B) rkAH, raAH išsivyniojimo temperatūros vandenyje atitinkamai – $(63,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, $(61,1 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$, baltymų koncentracija - 10 μM ; (C) rŽAH išsivyniojimo temperatūra vandenyje – $(79,7 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, baltymo koncentracija - 20 μM . Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 3 identišškai atliktų eksperimentų

rkAH, raAH išsivyniojimo temperatūros mažėja, esant 5 mM cisteino ir 5 mM ditiotreitolio koncentracijoms (23 pav. A, B), kadangi suardomi augimo hormonų struktūrą stabilizuojantys disulfidiniai tilteliai. Esant 5 mM cisteino koncentracijai rekombinantinio žmogaus augimo hormono terminis stabilumas lyginant su rekombinantiniais kiaulės ir audinės augimo hormonais praktiškai nekinta, o esant tokiai pačiai DTT koncentracijai šio baltymo terminis stabilumas mažėja (23 pav. C). Tai rodo, kad rekombinantinis ŽAH yra stabilesnis baltymas nei rekombinantiniai kiaulės, audinės augimo hormonai.



23 pav. rkAH (A), raAH (B), ržAH (C) esant esant 5 mM reduktorių ir jiems nesant išsivyniojimo temperatūrų skirtumai. (A), (B) rkAH, raAH išsivyniojimo temperatūros vandenyje atitinkamai – $(63,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, $(61,1 \pm 0,3) ^\circ\text{C}$, baltymų koncentracija - 10 μM ; (C) ržAH išsivyniojimo temperatūra vandenyje – $(79,7 \pm 0,1) ^\circ\text{C}$, baltymo koncentracija - 20 μM . Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 3 identiška atliktų eksperimentų

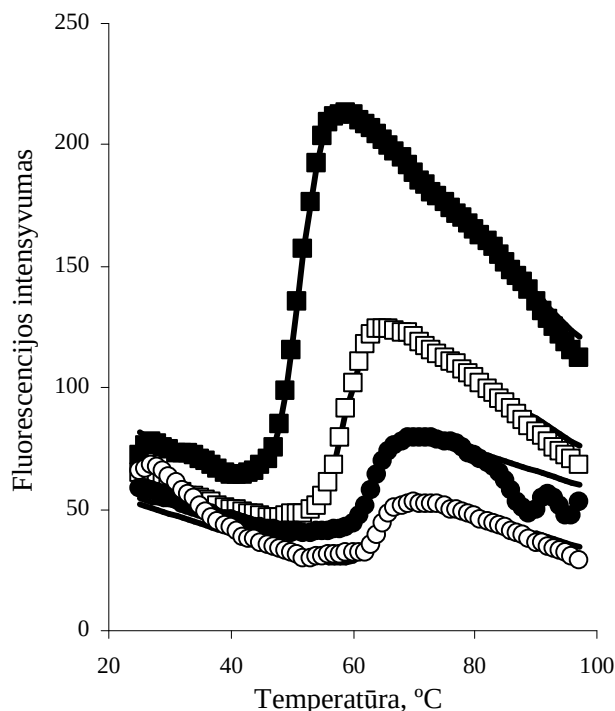
3.2. Metalų jonų įtaka rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų stabilumui

Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Mn^{2+} ir trijų rekombinantinių AH sąveika tirta terminio poslinkio metodu ne tik norint sužinoti metalų jonų įtaką baltymų terminiam stabilumui, bet taip pat norint nustatyti šių katijonų jungimosi su hormonais konstantas. Pasirinkti tie metalų jonai, kurie buvo panaudoti tiriant metalų jonų įtaką rekombinantinių žmogaus, kiaulės ir audinės augimo hormonų oligomerizacijai vandeniniame tirpale [93, 59, 165].

Keliant temperatūrą $1 ^\circ\text{C}/\text{min}$. greičiu, pirmiausia buvo matuojami 10 μM rkAH ir dapoksilo sulfonato komplekso fluorescencijos intensyvumai, nesant ir esant nuo 0,98 μM iki 1000 μM metalų jonų koncentracijoms. Šio hormono ir solvatochrominio dažo komplekso fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo temperatūros duomenis glotninant

$$y = y_{N,T_m} + m_N(T - T_m) + \frac{y_{U,T_m} - y_{N,T_m} + (m_U - m_N)(T - T_m)}{1 + e^{\frac{d_U H_{T_m}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right) - \frac{d_U C_p}{R} \left(\frac{T_m}{T} - 1 + \ln \frac{T}{T_m} \right)}} \quad (7)$$

lygtimi (1.2.1. skyrius) „ThermoFluor⁺⁺“ programa ($d_U C_p = 2500 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$, $R = 1,9872 \text{ cal/mol}\cdot\text{K}$), gaunamos baltymo išsivyniojimo temperatūros, esant atitinkamoms eksperimentinėms sąlygoms. 24 pav. pateikti rKAH denatūracijos kreivių pavyzdžiai.



24 pav. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono ir dapoksilo[®] sulfonato komplekso fluorescencijos intensyvumų priklausomybės nuo temperatūros nesant ir esant 1000 μM, 62,5 μM, 3,9 μM ZnSO₄ 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5. Galutinė rKAH koncentracija - 10 μM, dapoksilo[®] sulfonato - 50 μM, ■ - 1000 μM ZnSO₄, □ - 62,5 μM ZnSO₄, ● - 3,9 μM ZnSO₄, ○ - 0 μM ZnSO₄.

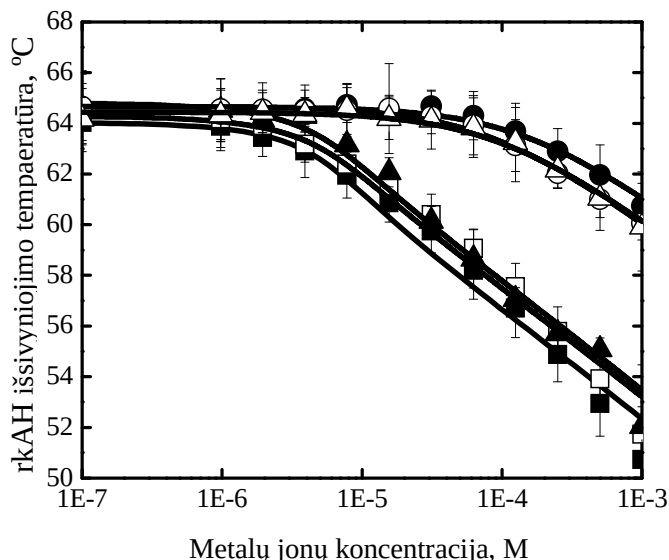
Norint nustatyti Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} jungimosi su rekombinantiniu kAH konstantas, braižomos hormono vidurkinių išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių ir gauti duomenys glotninami

$$L_t = \left(1 - e^{-\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))}{RT_m}} \right) \quad (20)$$

$$\times \left[\frac{P_1}{2} \frac{e^{-\frac{(\Delta_{KH} H_{T_0} + \Delta_{KH} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KH} S_{T_0} + \Delta_{KH} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}} + e^{-\frac{(\Delta_{KU} H_{T_0} + \Delta_{KU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KU} S_{T_0} + \Delta_{KU} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}}}{e^{-\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))}{RT_m}}} \left(e^{-\frac{(\Delta_{KH} H_{T_0} + \Delta_{KH} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KH} S_{T_0} + \Delta_{KH} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}} - e^{-\frac{(\Delta_{KU} H_{T_0} + \Delta_{KU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KU} S_{T_0} + \Delta_{KU} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}} \right) \right]$$

$$+ \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))}{RT_m}} e^{-\frac{(\Delta_{KH} H_{T_0} + \Delta_{KH} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KH} S_{T_0} + \Delta_{KH} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}} - e^{-\frac{(\Delta_{KU} H_{T_0} + \Delta_{KU} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{KU} S_{T_0} + \Delta_{KU} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}}}$$

lygtimi (1.2.1.1. skyrius). Iš gautų duomenų, pateiktų 25 pav. matoma, kad Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} destabilizuoja rKAH, t.y. šie metalų jonai stipriau jungiasi su nenatyvia baltymo forma.



25 pav. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. Galutinė baltymo koncentracija - 10 μM , NaCl – 50 mM, solvatochrominio dažo -50 μM , 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5. ■ - ZnSO_4 , □ - ZnCl_2 , Δ - NiCl_2 , ○ – $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$, ● – CoCl_2 , ▲ – CuCl_2 . Konstantos gautos, panaudojant tokias parametrų reikšmes: $d_uH_{T_r} = 630 \text{ kJ/mol}$, $d_{bu}H_{T_0} = -21 \text{ kJ/mol}$, $T_r = 64,5 \text{ }^\circ\text{C}$, $d_uC_p = 10 \text{ kJ/(mol}\cdot\text{K)}$, $d_{bN}C_p = -1,3 \text{ kJ/(mol}\cdot\text{K)}$

Labiausiai baltymą destabilizuoja cinko jonai. Pavyzdžiui, esant 15,6 μM , 62,5 μM ZnSO_4 , rekombinantinio kiaulės augimo hormono išsivyniojimo temperatūra sumažėja atitinkamai apie 3 ir 6 $^\circ\text{C}$ (25 pav.). Esant ZnSO_4 ir ZnCl_2 , Zn^{2+} jungimosi su nenatyviu rekombinanitniu kAH jungimosi konstantos atitinkamai yra $(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ir $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$. Gana didelė Zn^{2+} jungimosi konstanta rodo, kad rKAH turi cinko jungimosi vietą, kuri prieinama šioms jonams baltymui esant nenatyvioje būsenoje. Nors cinko jonas stipriau jungiasi su nenatyvia hormono forma, tačiau gali būti, kad šis metalo jonas jungiasi ir su natyvia baltymo forma. Kadangi Zn^{2+} ir nenatyvios rKAH formos jungimosi konstanta yra kur kas didesnė nei šio metalo jono ir natyvios baltymo formos jungimosi konstanta (K_{bN}), todėl (20) lygtimi nustatyta K_{bN} nėra tiksli. Zn^{2+} ir natyvios rKAH formos jungimosi konstanta gali būti nuo 0 iki 10^4 M^{-1} . Kitus metalų jonus galima išdėstyti rekombinantinio kiaulės augimo hormono destabilizavimo mažėjimo tvarka: Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} . Atitinkamai jų jungimosi su nenatyviu šiuo hormonu konstantos yra: $(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $(3,9 \pm$

$0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(4,8 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinė paklaida ir gauti iš 3 identiška atliktų eksperimentų. Baltymo išsivyniojimo temperatūrų pokyčiai esant skirtingoms MnCl_2 koncentracijoms yra maži, todėl gali būti, kad šis metalo jonas nesijungia su rkAH. Yra žinoma, kad Mn^{2+} neskatinama ir ržAH dimerų susidarymo [93].

Bakalauriniame darbe panaudojant cheminio susiuviklio 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazino ir SDS-PAGE metodus tirta Zn^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} įtaka rekombinantinio kiaulės augimo hormono oligomerizacijai vandeniniam tirpale. Nustatyta, kad efektyviausiai rkAH dimerų susidarymą skatina cinko ir vario jonai, mažiau efektyvūs yra nikelio, kadmio jonai (4 lentelė) [165]. Taigi, kuo metalo jonas stipriau jungiasi su rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu, tuo daugiau baltymas yra destabilizuojamas ir tuo daugiau susidaro jo dimerinės formos.

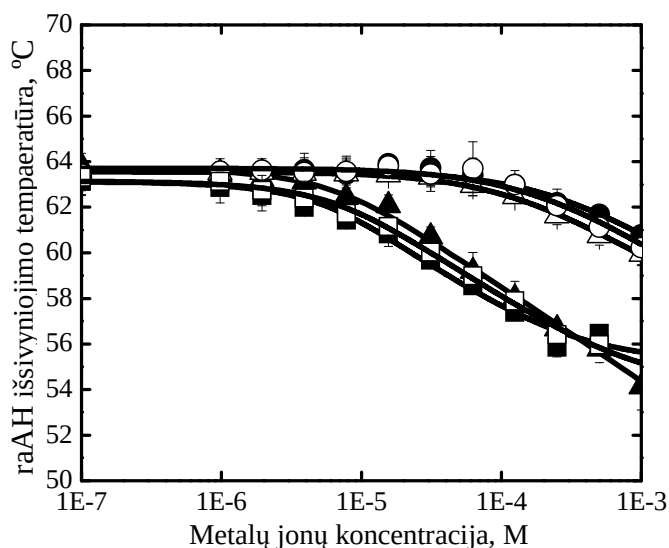
4 lentelė. rkAH dimerų, susiūtų TAT, procentins kiekis (nuo viso įnešto į elektroforezinio gelio takelį rkAH kiekio)^a, esant įvairiems katijonams (dimerų kiekis yra apskaičiuotas atėmus dimerų kiekį, esantį kontroliniame reakcijos mišinyje be Zn^{2+} jonų) [165]

Katijonas	[rkAH]/[katijono] molinis santykis	
	1 : 10	1 : 100
Zn^{2+}	$13,9 \pm 3,8^b$	$14,4 \pm 0,8^b$
Cu^{2+}	$9,4 \pm 3,4^b$	-
Ni^{2+}	$7,2 \pm 1,0^b$	$7,3 \pm 1,4^b$
Cd^{2+}	$4,9 \pm 1,1^b$	$9,6 \pm 1,5^b$

^a – pH 9,2, 3 val. 30°C temperatūroje, rkAH koncentracija – 14 μM . ^b – Standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti iš 3 identiška atliktų eksperimentų.

Analogiškai atlikus eksperimentą su rekombinantiniu audinės augimo hormonu, stebimas šio baltymo destabilizavimas esant Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} (26 pav.). Šie metalų jonai taip pat stipriau jungiasi su nenatyvia baltymo forma. A. Statkutės magistro darbe panaudojant cheminio susiuviklio 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazino ir SDS-PAGE metodus nustatyta, kad esant Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} susidaro rekombinantinio audinės augimo hormono aukštesni oligomerai [59]. Atitinkamai jų jungimosi su nenatyviu šiuo hormonu konstantos yra: $(9,9 \pm 1,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (esant ZnSO_4) ir $(6,7 \pm 0,8) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (esant ZnCl_2), $(6,9 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinė paklaida ir gauti iš 3 identiška atliktų eksperimentų. Nors rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų pirminės struktūros skiriasi tik trimis aminorūgštimis, iš gautų rezultatų matoma, kad metalo jonai silpniau

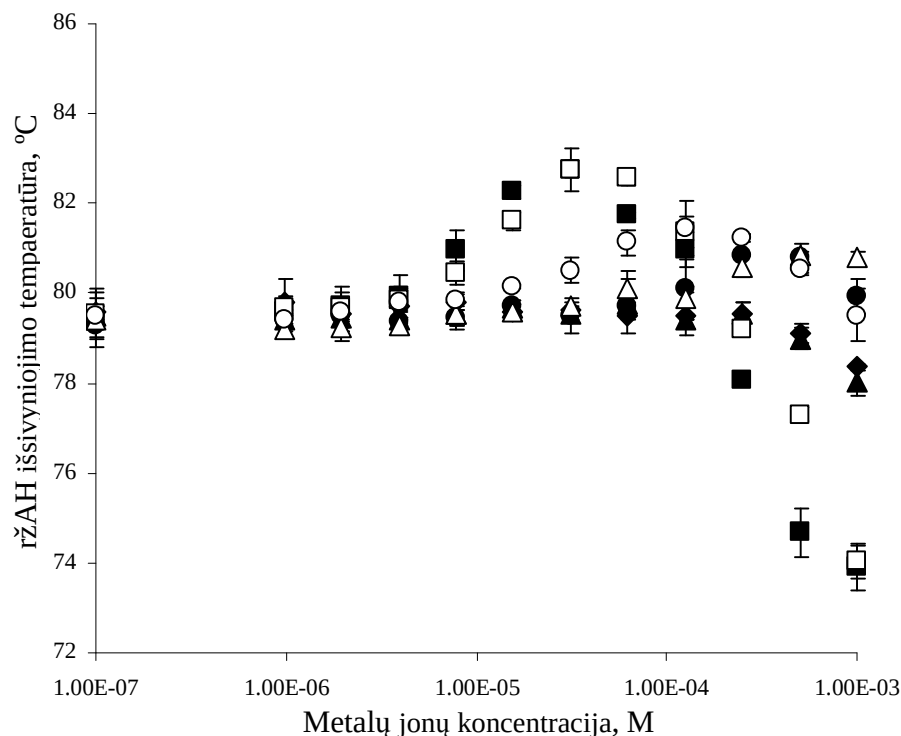
jungiasi su nenatyviu raAH nei su nenatyviu rkAH. Nors labiausiai rekombinantinį audinės augimo hormoną destabilizuojantis cinko jonas jungiasi su nenatyvia šio baltymo forma, tačiau gali būti, kad šis metalo jonas taip pat jungiasi ir su natyvia baltymo forma. Dėl aukščiau minėtos priežasties (20) lygtimi nustatoma Zn^{2+} ir natyvios raAH formos jungimosi konstanta nėra tiksli, tačiau jos reikšmė gali būti nuo 0 iki 10^5 M^{-1} . Taip pat dėl aukščiau minėtų priežasčių gali būti, kad Mn^{2+} nesijungia ir su rekombinantiniu aAH.



26 pav. Rekombinantinio audinės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. Galutinė baltymo koncentracija - 10 μM , NaCl – 50 mM, solvatochrominio dažo -50 μM , 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5. ■ - $ZnSO_4$, □ - $ZnCl_2$, Δ - $NiCl_2$, ○ – $Cd(NO_3)_2$, ● – $CoCl_2$, ▲ – $CuCl_2$. Konstantos gautos, panaudojant tokias parametrų reikšmes: $d_uH_{Tr} = 630 \text{ kJ/mol}$, $d_{bu}H_{T0} = -21 \text{ kJ/mol}$, $T_r = 63,4 \text{ }^\circ\text{C}$, $d_uC_p = 10 \text{ kJ/(mol}\cdot\text{K)}$, $d_{bN}C_p = -1,3 \text{ kJ/(mol}\cdot\text{K)}$

Tokiomis pačiomis sąlygomis atlikus eksperimentą su 20 μM rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu pirmiausiai pastebėta, kad šis baltymas yra kur kas stabilesnis nei rekombinantiniai kiaulės ir audinės augimo hormonai. 20 μM rekombinantinio žAH 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5 išsivyniojimo temperatūra yra $(79,5 \pm 0,3) \text{ }^\circ\text{C}$, o 10 μM rekombinantinių kiaulės ir audinės AH tame pačiame buferiniame tirpale atitinkamai – $(64,4 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$ ir $(63,4 \pm 0,4) \text{ }^\circ\text{C}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 21 identiška atliktų eksperimentų. Iš 27 pav. pateiktų rezultatų matyti, kad Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} ir Ni^{2+} stabilizuoja ržAH

esant šių metalų jonų įvairiems mažesnių koncentracijų intervalams, tačiau esant didesnėms katijonų koncentracijoms baltymas destabilizuojamas.



27 pav. Rekombinantinio žmogaus augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų metalų jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. Galutinė baltymo koncentracija - 20 μ M, NaCl – 50 mM, solvatochrominio dažo – 100 μ M, 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5. ■ - ZnSO₄, □ - ZnCl₂, Δ - NiCl₂, ○ – Cd(NO₃)₂, ● – CoCl₂, ▲ – CuCl₂, ◆ - MnCl₂

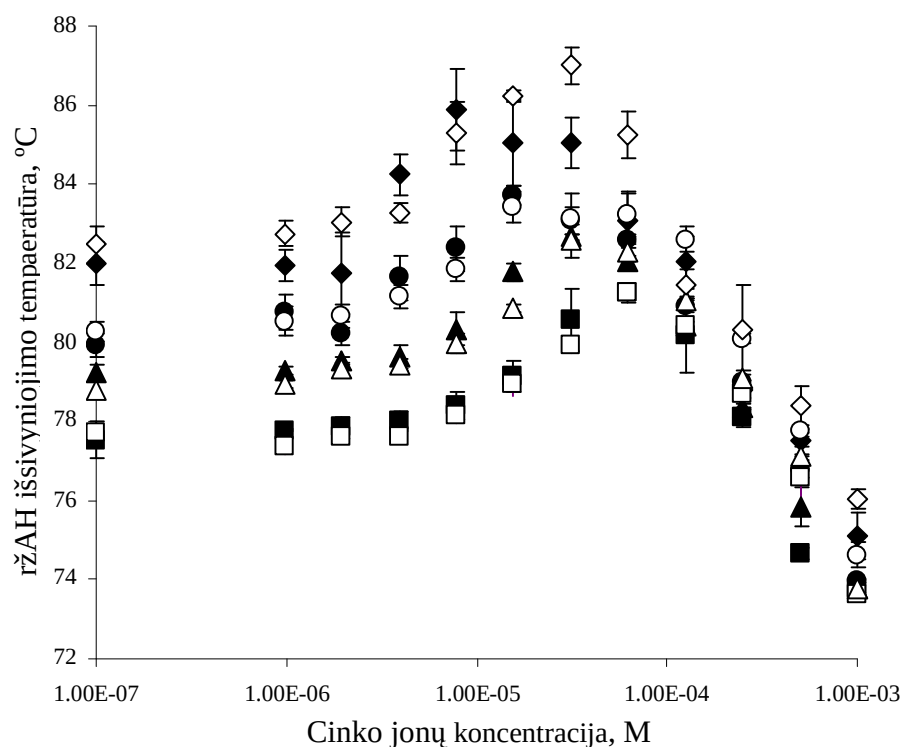
G. Dienys ir kt., tiriant rekombinantinio žmogaus augimo hormono oligomerinę būseną vandeniniame tirpale, panaudojant baltymo subvienetų susiuvimą cheminiu susiuvikliu TAT ir SDS-PAGE metodą, nustatė, kad efektyviausiai šio hormono dimerų susidarymą skatina cinko ir kadmio jonai, mažiau efektyvūs yra nikelio, kobalto jonai (5 lentelė) [93]. Tuo tarpu Mn^{2+} ir Cu^{2+} panašu, kad neturi įtakos rZAH stabilumui, tačiau esant 250 μ M ir didesnėms šių katijonų koncentracijoms baltymas taip pat destabilizuojamas. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} stabilizuoja rekombinantinį žmogaus augimo hormoną, tačiau didėjant jų koncentracijoms pradeda destabilizuoti baltymą, dėl to modelio, panaudoto rekombinantinių kiaulės, audinės augimo hormonų ir metalų jonų jungimosi konstantų nustatymui taikyti negalima.

5 lentelė. rŽAH dimerų, susiūtų TAT, procentins kiekis (nuo viso įnešto į elektroforezinio gelio takelį rŽAH kiekio)^a, esant įvairiems katijonams [93]

Katijonas	[rŽAH] : [katijono] molinis santykis	
	1 : 1	1 : 10
Zn ²⁺	69,4 ± 1,8 ^b	67,7 ± 2,7 ^b
Cd ²⁺	61,2 ± 5,9	76,2 ± 7,6
Co ²⁺	8,5 ± 1,9	18,3 ± 1,1
Ni ²⁺	2,6 ± 1,9	10,8 ± 4,5

^a – pH 9,2, 3 val. 30°C temperatūroje, rŽAH koncentracija – 14 μM. ^b – Standartiniai nuokrypiai apskaičiuoti iš 3 identiška atliktų eksperimentų.

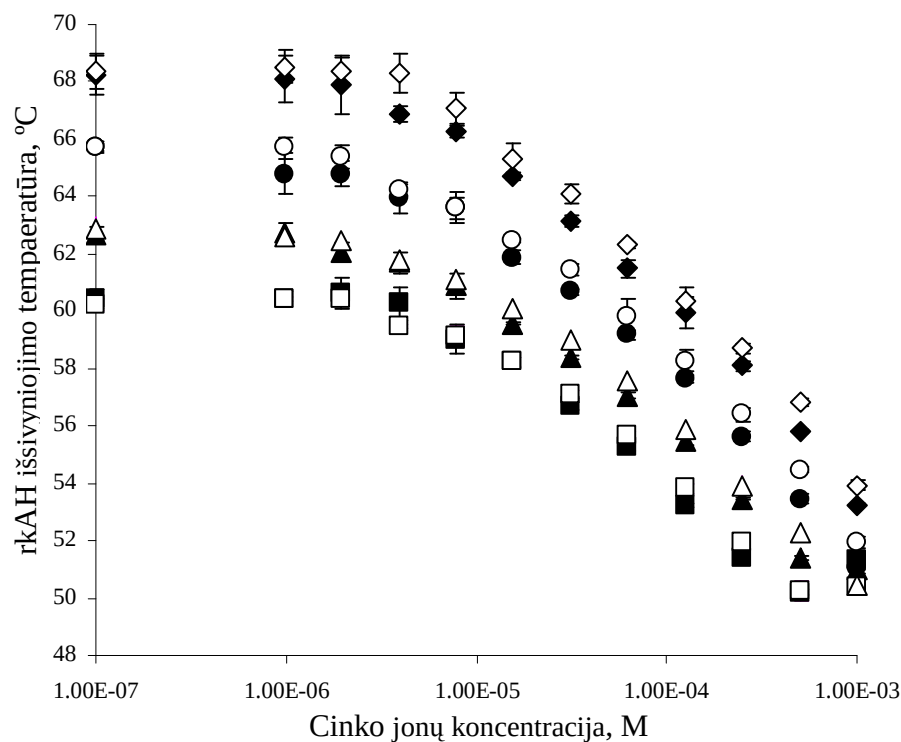
Norint įsitikinti, kad metalų jonų įtaka rŽAH stabilumui priklauso nuo hormono ir katijono molinio santykio ir atsižvelgus, kad iš visų katijonų labiausiai rŽAH stabilizuoja cinko jonai, buvo tirta įvairių Zn²⁺ koncentracijų įtaka rekombinantinio žmogaus augimo hormono stabilumui, esant 40 μM, 20 μM, 10 μM ir 5 μM baltymo koncentracijoms. Iš 28 pav. matoma, kad rŽAH yra stabilesnis esant mažesnėms jo koncentracijoms.



28 pav. Skirtingų koncentracijų rekombinantinio žmogaus augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. ■, □ – 40 μM rŽAH, ▲, Δ – 20 μM rŽAH, ●, ○ – 10 μM rŽAH, ◆, ◇ – 5 μM rŽAH. ■, ▲, ●, ◆ – ZnSO₄, □, Δ, ○, ◇ – ZnCl₂. Galutinė natrio chlorido koncentracija – 50 mM, solvatochrominio dažo -100 μM, 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5

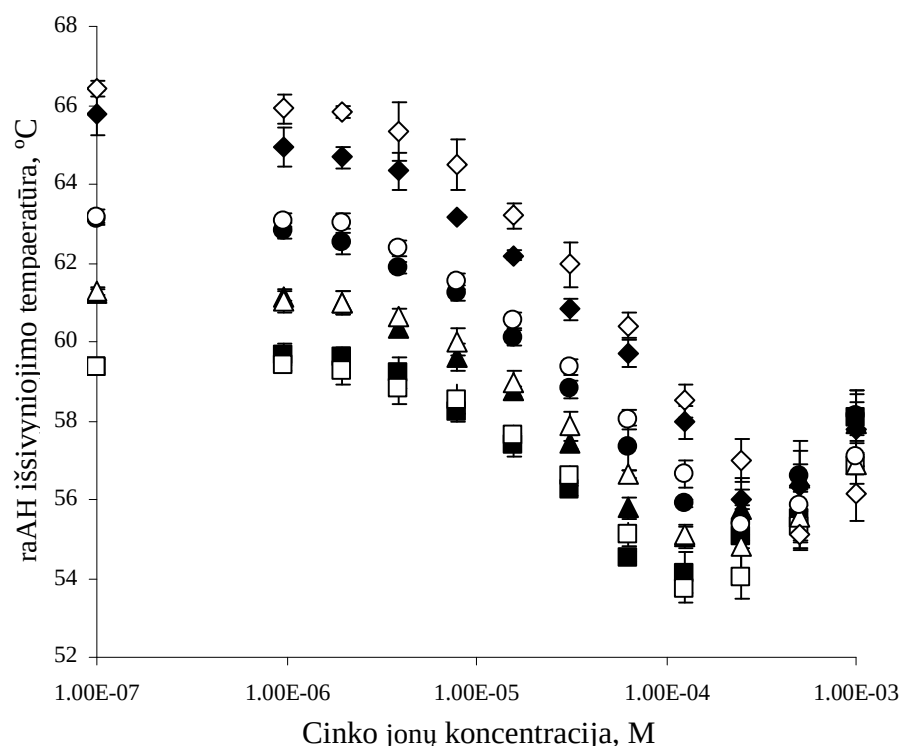
40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM rekombinantinio rkAH 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5 išsivyniojimo temperatūros atitinkamai yra $(77,6 \pm 0,2)^\circ\text{C}$, $(79,1 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, $(80,1 \pm 0,3)^\circ\text{C}$, $(82,2 \pm 0,5)^\circ\text{C}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 6 identiškai atliktų eksperimentų. Taip pat paaiškėjo, kad esant iki 10-kartinio molinio Zn^{2+} pertekliaus, lyginant su rkAH koncentracija, cinko jonai stabilizuoja šį baltymą. Efektyviausiai baltymas stailizuojamas, esant rkAH ir Zn^{2+} moliniam santykiui 1 : 1,6 (28 pav.). Mažos šių jonų koncentracijos stabilizuoja baltymą, o didelės destabilizuoja, todėl galima manyti, kad cinko jonai yra tikrai svarbūs šio hormono biologinėms funkcijoms.

Analogiškai atlikus eksperimentus su rekombinantiniais kiaulės ir audinės augimo hormonais, iš gautų duomenų (29, 30 pav.) matoma, kad šie baltymai taip pat yra stabilesni esant mažesnėms jų koncentracijoms, t.y. didesnės hormonų koncentracijos skatina jų agregaciją.



29 pav. Skirtingų koncentracijų rkAH išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. ■, □ – 40 μM rkAH , ▲, △ – 20 μM rkAH , ●, ○ – 10 μM rkAH , ◆, ◇ – 5 μM rkAH . ■, ▲, ●, ◆ – ZnSO_4 , □, △, ○, ◇ – ZnCl_2 . Galutinė natrio chlorido koncentracija – 50 mM, solvatochrominio dažo – 100 μM , 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5

40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM rekombinantinio rAH 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale pH 7,5 išsivyniojimo temperatūros yra ($60,3 \pm 0,3$) $^{\circ}\text{C}$, ($62,8 \pm 0,3$) $^{\circ}\text{C}$, ($65,7 \pm 0,1$) $^{\circ}\text{C}$, ($68,3 \pm 0,6$) $^{\circ}\text{C}$, o raAH – atitinkamai yra ($59,4 \pm 0,2$) $^{\circ}\text{C}$, ($61,3 \pm 0,1$) $^{\circ}\text{C}$, ($63,1 \pm 0,1$) $^{\circ}\text{C}$, ($66,1 \pm 0,5$) $^{\circ}\text{C}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 6 identiška atliktų eksperimentų. Zn^{2+} tik destabilizuoja rekombinantinį kiaulės augimo hormoną. Kuo didesnis molinis cinko jonų perteklius, lyginant su rAH koncentracija, tuo labiau baltymas destabilizuojamas šiuo metalo jonu (29 pav.). Ta pati tendencija matoma ir rekombinantinio audinės augimo hormono destabilizavime Zn^{2+} . Tačiau, esant skirtingoms raAH koncentracijoms, yra ribinės cinko jonų koncentracijos, kurias viršijus vyksta kiti procesai (30 pav.). Tai gali būti Zn^{2+} jungimasis su rekombinantinio aAH joninėmis grupėmis, baltymo agregacija, išsodinimas. Šie procesai nėra tokie aktualūs, nes jie vyksta esant labai didelėms cinko jonų koncentracijoms, kurios tikriausiai didesnės nei fiziologinės Zn^{2+} koncentracijos.



30 pav. Skirtingų koncentracijų rekombinantinio audinės augimo hormono išsivyniojimo temperatūrų priklausomybės nuo skirtingų cinko jonų koncentracijų dešimtainių logaritmų reikšmių. ■, □ – 40 μM raAH, ▲, Δ – 20 μM raAH, ●, ○ – 10 μM raAH, ◆, ◇ – 5 μM raAH. ■, ▲, ●, ◆ – ZnSO_4 , □, Δ, ○, ◇ – ZnCl_2 . Galutinė natrio chlorido koncentracija – 50 mM, solvatochrominio dažo -100 μM , 50 mM Tris-HCl buferinis tirpalas, pH 7,5

3.3. Rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus augimo hormonų izoterminis titravimas Zn^{2+} tirpalu

Zn^{2+} yra biologiškai svarbus mikroelementas. Nustatyta, kad šis metalo jonas yra būtinas gyvūnų augimui [11, 80]. Zn^{2+} sąveikauja su žmogaus augimo hormonu ir stabilizuoja jo struktūrą. Manoma, kad Zn^{2+} - žAH dimerai – pagrindinė *in vivo* saugomo žmogaus augimo hormono forma [9, 12]. Pastebėta, kad jaučio augimo hormonas taip pat stabilesnis su dvivalenčiu cinku.

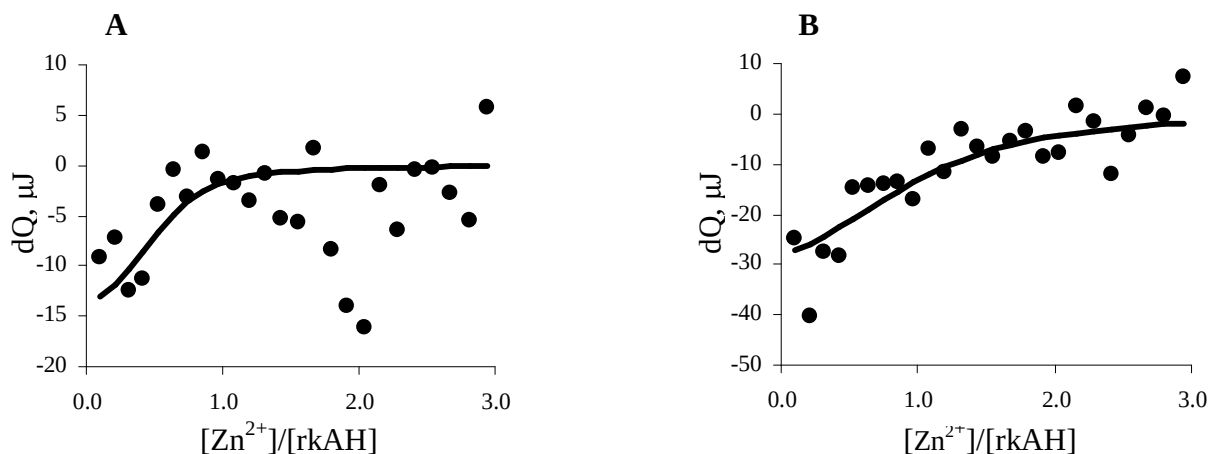
Kadangi šis metalo jonas yra svarbus augimo hormonų biologinėms funkcijoms, šiame darbe izoterminio titravimo kalorimetrija buvo matuojama rekombinantinių kiaulės, audinės ir žmogaus AH jungimosi su Zn^{2+} metu išskiriama šiluma 25 °C temperatūroje. Pireš pradėdant eksperimentus Vilniaus universiteto chemijos fakultete absorbcinės spektroskopijos metodu nustatyta, kad izoterminio titravimo kalorimetrijos matavimams ruošiamuose rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų mėginiuose nėra cinko jonų, o 2,23 mg/ml ržAH mėginyje aptikta 0,04 µg/ml Zn^{2+} . Tai sudaro 0,6 % baltymo dalį.

ITK eksperimentai turi būti atliekami taip, kad eksperimento pabaigoje makromolekulėje esančios ligando jungimosi vietos būtų pilnai išotintos. Taip pat išotinimas ligandu turi įvykti ne iš karto, norint gauti daugiau eksperimentinių taškų, todėl izoterminio titravimo metu ligando tirpalas į makromolekulės tirpalą injekuojamas ne dideliais kiekiais [153]. Kai baltymo ir ligando jungimosi stochiometrija lygi 1, rekomenduojama pradinius ITK eksperimentus atlikti esant 10-kartiniam moliniam ligando pertekliui, lyginant su makromolekulės koncentracija [103]. Yra žinoma, kad vienas Zn^{2+} jungiasi su viena žAH molekule [12]. Rekombinantinių kiaulės, audinės augimo hormonų aminorūgščių sekų homologiškumas su rekombinantinio žmogaus augimo hormono atitinkamai yra 68 % ir 66,7 %, todėl šiame darbe izoterminės titravimo kalorimetrijos eksperimentai buvo atlikti esant 10-kartiniam Zn^{2+} moliniam pertekliui, lyginant su augimo hormonų koncentracija. Taip pat dėl šios priežasties Zn^{2+} jungimosi su rekombinantiniais augimo hormonais konstantos, stochiometrijos, stebimo entalpijos pokyčio nustatymui naudota vieno nepriklausomo jungimosi centro modelio lygtis (1.2.2.1. skyrius):

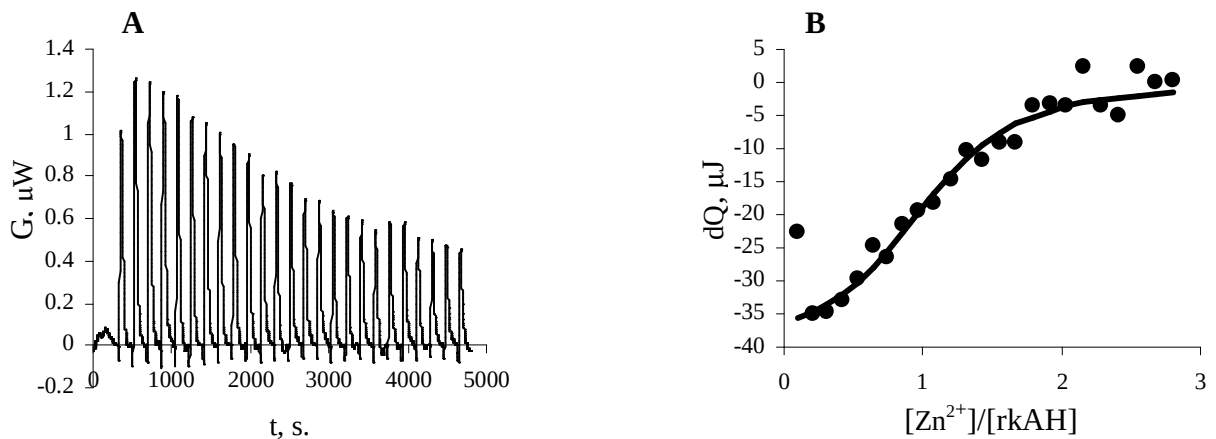
$$q_i = n[P_T]V_0 dH(\Theta_i - \Theta_{i-1}). \quad (28)$$

Pirmieji izoterminio titravimo eksperimentai buvo atlikti su rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu, esant mažesnėms nei 50 µM baltymo koncentracijoms. Esant šioms sąlygoms, gauti išsibarstę rKAH izoterminio titravimo cinko jonais rezultatai, stebimi maži šilumos pokyčiai kiekvienos injekcijos metu (31 pav. A). Taip pat atlikus eksperimentą, pastebėta, kad jungimosi

konstantos reikšmė nebus didelė. Norint tiksliai nustatyti ligando jungimosi su makromolekule konstantą ir esant ne dideliam makromolekulės ir ligando giminingumui, ITK eksperimentai atliekami su didesne makromolekulės koncentracija [153]. Suprantant, kad esant didesnei rekombinantinio kiaulės augimo hormono koncentracijai po kiekvienos injekcijos bus gaunami ir didesni šiluminiai pokyčiai, tolimesni tyrimai atlikti su didesnėmis šio baltymo koncentracijomis. Įsitikinta, kad esant didesnėms šio hormono koncentracijoms (didinant c faktoriaus reikšmę) gaunami mažiau išsibarstę duomenys (31 pav. B). Parinkta optimali rekombinantinio kiaulės augimo hormono koncentracija ITK eksperimentams - 100 μM (32 pav. A, B). Taip pat iš gautų izoterminės titravimo kalorimetrijos eksperimentų, kai Zn^{2+} tirpalas injekuotas į rkAH tirpalą kas 3 min. ir kas 4 min., pradinių duomenų nustatyta, kad 3 minutės yra pakankamas laiko kiekis sistemos terminės pusiausvyros susidarymui po kiekvienos injekcijos. Iš 12 identiškai atliktų rkAH izoterminio titravimo cinko jonais eksperimentų, esant baltymo koncentracijai 100 μM , natrio chlorido koncentracijai – 50 mM, Zn^{2+} (titranto) tirpalo koncentracijai - 1000 μM , kurį injekuojant kas 3 min. po 10 μl , nustatyta, kad Zn^{2+} jungimosi su natyviu rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu stochiometrija yra $0,85 \pm 0,22$, jungimosi konstanta $(6,7 \pm 1,7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, o stebimas entalpijos pokytis – $-4,1 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis.

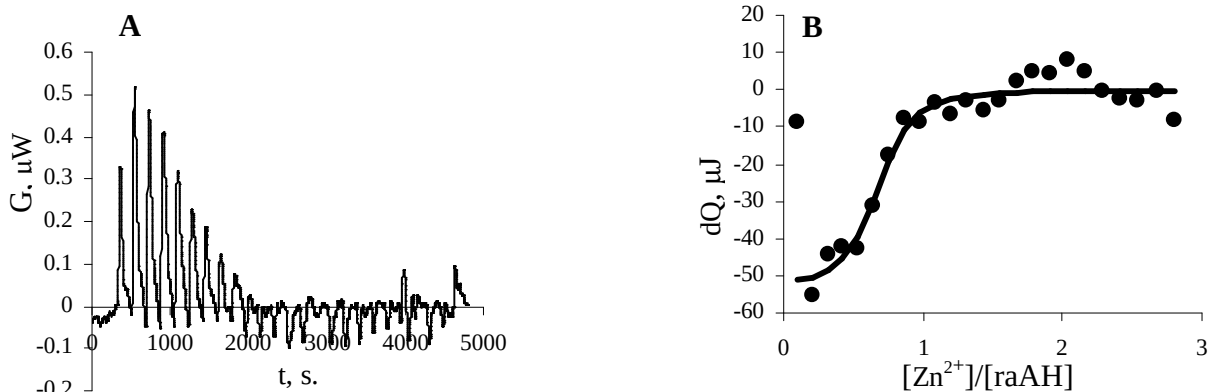


31 pav. Rekombinantinio kiaulės augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} integruoti duomenys. (A) baltymo koncentracija – 45 μM , NaCl koncentracija – 50 mM, Zn^{2+} - 450 μM (injekuota kas 3 min. po 10 μl), 50 mM Tris-HCl, pH 7,5; (B) baltymo koncentracija – 63 μM , NaCl koncentracija – 50 mM, Zn^{2+} - 630 μM (injekuota kas 3 min. po 10 μl), 50 mM Tris-HCl, pH 7,5. Taškai atitinka eksperimentinius duomenis, kreivė – teorinį modelį



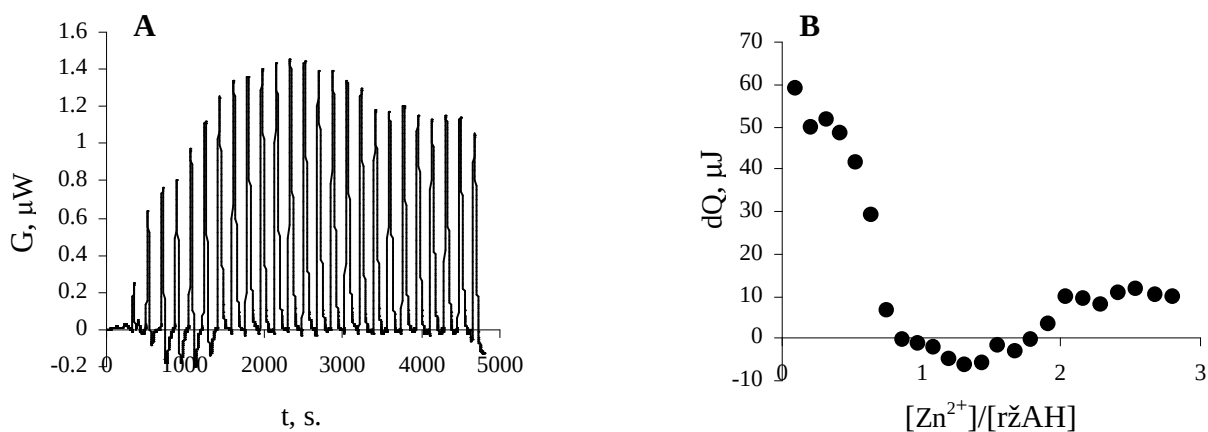
32 pav. rkAH izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (galios pokyčiai) (A) ir integruoti (galios pokyčiai perskaičiuoti į šilumos kiekio pokyčius) (B) duomenys, esant optimalioms eksperimento sąlygoms: baltymo koncentracija – 100 μM , NaCl koncentracija – 50 mM, Zn^{2+} - 1000 μM (injekuota kas 3 min. po 10 μl), 50 mM Tris-HCl (dializės) buferinis tirpalas, pH 7,5

Tokiomis pačiomis eksperimentinėmis sąlygomis titruojant rekombinantinį audinės augimo hormoną Zn^{2+} nustatyta, kad šio metalo jungimosi su hormonu jungimosi konstanta yra $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, stochiometrija - $0,61 \pm 0,09$, stebimas entalpijos pokytis - $-4,6 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}$. Rezultatai pateikti kaip vidurkis $\pm$ standartinis nuokrypis ir gauti iš 8 identišškai atliktų eksperimentų. Nors rekombinantinių kiaulės ir audinės augimo hormonų aminorūgščių sekos skiriasi tik keturiomis aminorūgštimis, tačiau lyginant tokiais pačiomis sąlygomis atliktus rkAH (32 pav. A) ir raAH (33 pav. A) izoterminio titravimo Zn^{2+} eksperimentų pradinius duomenis, galima manyti, kad rekombinantinis audinės augimo hormonas po 1700 s. agreguoja (po 1700 s. smailių formos nėra tipiškos). A. Statkutės magistro darbe panaudojant cheminio susiuviklio 1,3,5-triakriloil-heksahidro-s-triazino ir SDS-PAGE metodus nustatyta, kad Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} skatina rekombinantinio audinės augimo hormono aukštesnių oligomerų susidarymą. Taip pat ji eksperimentiškai nustatė, kad raAH vandeniniame tirpale dominuoja baltymo dimerinė forma. Todėl galima manyti, kad, atliekant izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimentus, rekombinantinio aAH dimerai prisijungia po vieną cinko joną susidarant aukštesniems oligomerams, dėl to rekombinantinio audinės augimo hormono jungimosi su Zn^{2+} stochiometrijos vertė yra per pus mažesnė lyginant su rkAH jungimosi su šiuo jonu stochiometrija.



33 pav. Rekombinantinio audinės augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (A) ir integruoti (B) duomenys. Eksperimentinės sąlygos: baltymo koncentracija - 100 μM , NaCl – 50 mM, Zn^{2+} tirpalo - 1000 μM , injekuojama kas 3 min. po 10 μl , 50 mM Tris-HCl (dializės) buferinis tirpalas, pH 7,5

34 pav. A pateikti 100 μM rekombinantinio žmogaus augimo hormono izoterminio titravimo 1000 μM Zn^{2+} tirpalu, turinčio 50 mM natrio chlorido, pradiniai duomenys. 10 μl titranto buvo injekuojama kas 3 min. Zn^{2+} ir ržAH jungimasis tirtas taip pat 50 mM Tris-HCl buferiniame tirpale, pH 7,5.



34 pav. Rekombinantinio žmogaus augimo hormono izoterminio titravimo 25 °C temperatūroje Zn^{2+} pradiniai (A) ir integruoti (B) duomenys. Eksperimentinės sąlygos: baltymo koncentracija - 100 μM , NaCl – 50 mM, Zn^{2+} (titranto) tirpalo - 1000 μM , injekuojama kas 3 min. po 10 μl , 50 mM Tris-HCl (dializės) buferinis tirpalas, pH 7,5

Iš gautų pradinių duomenų matoma, kad vienintelio rekombinantio žAH jungimasis su cinku yra kooperatyvus, nes po pirmųjų injekcijų išsiskiria nedideli šilumos kiekiai, vėliau jie palaipsniui didėja (palaipsniui didėja smailių plotai), o galiausiai tokiu būdu ima mažėti [167], t.y. Zn^{2+} jungimasis vyksta ne iš karto. Panašu, kad tai vyksta 8 – 16 injekcijų metu. Jungimosi metu išsiskiria daugiau šilumos (stebimos aukštesnės smailės), nes vyksta rekombinantinio žmogaus augimo hormono struktūriniai pokyčiai. Norint nustatyti Zn^{2+} ir ržAH jungimosi konstantą, stebimą entalpijos pokytį būtinas kitas modelis, įvertinantis kooperatyvų jungimąsi [153]. Tačiau šio metalo jono ir hormono jungimosi stochiometriją galima apskaičiuoti iš rekombinantinio žAH isoterminio titravimo cinko jonų tirpalu integruotų duomenų. Manoma, kad Zn^{2+} jungimasis su rekombinantiniu žmogaus augimo hormonu prasideda nuo 8 injekcijos, po kurios cinko jonų ir ržAH molinis santykis yra lygus 0,86, ir Zn^{2+} jungiasi su baltymu iki 16 injekcijos, po kurio šio metalo jonų ir hormono molinis santykis yra lygus 1,8. Todėl stochiometrija yra lygi 16 ir 8 injekcijų $[Zn^{2+}]/[r\text{žAH}]$ molinių santykių skirtumui (34 pav. B). Apskaičiuota rekombinantinio žmogaus augimo hormono jungimosi su Zn^{2+} stochiometrija yra 0,94. Gauti rezultatai patvirtina B. C. Cunninghamo ir kt. Scatchardo analize gautus rezultatus, kad žAH dimeras susidaro jungiantis dviem cinko jonams kooperatyviu būdu [12].

A. A. Saboury`o ir kt. publikacijose, kuriose rekombinantins žmogaus augimo hormonas titruojamas Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} ir Cu^{2+} , nėra užsimenama apie kooperatyvų šių jonų jungimąsi, tačiau yra nustatyta, kad ržAH turi daugiau nei vieną šių jonų jungimosi vietą [160-164]. Gali būti, kad tik Zn^{2+} jungimasis su šiuo baltymu yra kooperatyvus.

IŠVADOS

1. Rekombinantinis žmogaus augimo hormonas yra kur kas stabilesnis nei rekombinantiniai kiaulės, audinės augimo hormonai.
2. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} destabilizuoja rkAH. Atitinkamai jų jungimosi su nenatyviu šiuo hormonu konstantos yra: $(2,4 \pm 0,5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ ir $(1,8 \pm 0,3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$ (esant ZnSO_4 ir ZnCl_2), $(2,0 \pm 0,3) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, $(3,9 \pm 0,5) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(4,8 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(2,5 \pm 0,6) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Kuo metalo jonas stipriau jungiasi su rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu, tuo daugiau baltymas yra destabilizuojamas ir tuo daugiau susidaro jo dimerinės formos.
3. Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} destabilizuoja raAH. Atitinkamai jų jungimosi su nenatyviu šiuo hormonu konstantos yra: $(9,9 \pm 1,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (esant ZnSO_4) ir $(6,7 \pm 0,8) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ (esant ZnCl_2), $(6,9 \pm 0,5) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, $(1,4 \pm 0,4) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$.
4. Zn^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} stabilizuoja rekombinantinį žmogaus augimo hormoną, tačiau yra ribinės metalų jonų koncentracijos, kurias viršijus baltymas destabilizuojamas.
5. Mn^{2+} nesijungia su rekombinantiniais kiaulės, audinės AH. Mn^{2+} ir Cu^{2+} neturi įtakos ržAH stabilumui, tačiau didesnės šių jonų koncentracijos taip pat destabilizuoja šį baltymą.
6. Zn^{2+} jungimosi su natyviu rekombinantiniu kiaulės augimo hormonu stochiometrija yra $0,85 \pm 0,22$, jungimosi konstanta $(6,7 \pm 1,7) \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$, o stebimas entalpijos pokytis – $-4,1 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}$.
7. Rekombinantinio audinės augimo hormono jungimosi su Zn^{2+} konstanta yra $(3,8 \pm 0,4) \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$, stochiometrija - $0,61 \pm 0,09$, stebimas entalpijos pokytis - $-4,6 \pm 0,8 \text{ kJ/mol}$.
8. ITK eksperimentai patvirtina, kad Zn^{2+} ir ržAH jungimasis yra kooperatyvus ir kad vieno baltymo molekulė jungiasi su vienu cinko jonu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. PRAŠKEVIČIUS, A.; IVANOVIEŅĖ, L.; STASIŪNIEŅĖ, N.; BURNECKIENĖ, J.; RODOVIČIUS, H.; LUKOŠEVIČIUS, L.; KONDRATAS, D. *Biochemija*. Kaunas: KMU, 2003.
2. RAMSAY, T. G.; MITCHELL, A. D.; RICHARDS, M. P. Uncoupling protein expression in skeletal muscle and adipose tissue in response to *in vivo* porcine somatotropin treatment. *Domestic Animal Endocrinology*, 2008, spausdinamas.
3. FILIKOV, A. V.; HAYES, R. J.; LUO, P.; STARK, D. M.; CHAN, C.; KUNDU, A.; DAHIYAT, B. I. Computational stabilization of human growth hormone. *Protein Science*, 2002, nr. 11, p. 1452-1461.
4. WELNIAK, L. A.; SUN, R.; MURPHY, W. J. The role of growth hormone in T-cell development and reconstitution. *Journal of Leukocyte Biology*, 2002, nr. 71, p. 381-387.
5. DONAHUE, A. N.; ASCHNER, M.; LASH, L. H.; SYVERSEN, T.; SONNTAG, W. E. Growth hormone administration to aged animals reduces disulfide glutathione levels in hippocampus. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2006, nr. 127, p. 57-63.
6. TSUNEKAWA, B.; WADA, M.; IKEDA, M.; UCHIDA, H.; NAITO, N.; HONJO, M. The 20-Kilodalton (kDa) Human Growth Hormone (hGH) Differs from the 22-kDa hGH in the Effect on the Human Prolactin Receptor. *The Endocrine Society*, 1999, nr. 140, p. 3909-3918.
7. KOLBECK, S.; BAIL, H.; SCHMIDMAIER, G.; ALQUIZA, M.; RAUN, K.; KAPPELGARD, A.; FLYVBJERG, A.; HAAS, N.; RASCHKE, M. Homologous growth hormone accelerates bone healing—a biomechanical and histological study. *Bone*, 2003, nr. 33, p. 628-637.
8. SCHULGA, A. A.; MAKAROV, A. A.; LEVICHKIN, I. V.; BELOUSOVA, Y. V.; LOBACHOV, V. M.; PROTASEVICH, I. I.; PACE, C. N.; KIRPICHNIKOV, M. P. Increased stability of human growth hormone with reduced lactogenic potency. *FEBS Letters*, 2002, nr. 528, p. 257-260.
9. DANNIES, P. S. Mechanisms for storage of prolactin and growth hormone in secretory granules. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2002, nr. 76, p. 6-13.

10. CUNNINGHAM, B. C.; BASS, S.; FUH, G.; WELLS, J. A. Zinc Mediation of the Binding of Human Growth Hormone to the Human Prolactin Receptor. *Science*, 1990, nr. 250, p. 1709-1712.
11. DATTANI, M. T.; HINDMARSH, P. C.; BROOK, C. G. D.; ROBINSON, I. C. A. F.; WEIR, T.; MARSHALL, N. J. Enhancement of Growth Hormone Bioactivity by Zinc in the Eluted Stain Assay System. *Endocrinology*, 1993, nr. 133, p. 2803-2808.
12. CUNNINGHAM, B. C.; MULKERRIN, M. G.; WELLS, J. A. Dimerization of Human Growth Hormone by Zinc. *Science*, 1991, nr. 253, p. 545-548.
13. THORLACIUS-USSING, O. Zinc in the anterior pituitary of rat: a histochemical and analytical work. *Neuroendocrinology*, 1998, nr. 45, p. 222-242.
14. ROTH, H.P.; KIRCHGESSNER, M. Influence of alimentary zinc deficiency on the concentration of growth hormone (GH), insulin-like growth factor I (IGF-I) and insulin in the serum of force-fed rats. *Hormone metabolic research*, 1994, nr. 26, p. 404-408.
15. LAFUENTE, A.; BLANCO, A.; MARQUEZ, N.; ALVAREZ-DEMANUEL, E.; ESQUIFINO, A. I. Effects of acute and subchronic cadmium administration on pituitary hormone secretion in rat. *Revista espanola de fisiologia*, 1997, nr. 53, p. 265-269.
16. LAFUENTE, A.; MARQUEZ, N.; PAZO, D.; ESQUIFINO, A. I. Cadmium effects on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *Journal of physiology and biochemistry*, 2001, nr. 57, p. 231-236.
17. HAN, X. Y.; HUANG, Q. C.; LIU, B. J. XU, Z. R.; WANG, Y. Z. Changes of Porcine Growth Hormone and Pituitary Nitrogen Monoxide Production as a Response to Cadmium Toxicity. *Biological Trace Element Research*, 2007, nr. 119, p. 128-136.
18. LAFUENTE, A.; CARRACEDO, A. G.; MARQUEZ, N.; PAZO, D.; ESQUIFINO, A. I. Oral cadmium exposure throughout puberty does not inhibit secretion of prolactin, GH and ACTH through dopamine metabolism changes in male rat. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*, 2002, nr. 15, p. 249-254.
19. LAFUENTE, A.; MARQUEZ, N.; PAZO, D.; ESQUIFINO, A. Effects of subchronic alternating cadmium exposure on dopamine turnover and plasma levels of prolactin, GH and ACTH. *BioMetals*, 2000, nr. 13, p. 47-55.
20. ILIEV, D.; WITTEKINDT, N. E.; RANKE, M. B.; BINDER, G. *In vitro* analysis of hGH secretion in the presence of mutations of amino acids involved in zinc binding. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2007, nr. 39, p. 163-167.

21. MARCHI, B.; BURLANDO, B.; PANFOLI, I.; DONDERO, F.; VIARENGO, A.; GALLO, G. Heavy metal interference with growth hormone signalling in trout hepatoma cells RTH-149. *BioMetals*, 2005, nr. 18, p. 179-190.
22. NARGUND, R. P.; PATCHETT, A. A.; BACH, M. A.; MURPHY, M. G.; SMITH, R. G. Peptidomimetic Growth Hormone Secretagogues. Design Considerations and Therapeutic Potential. *Journal of Medicinal chemistry*, 1998, nr. 41, p. 3103-3127.
23. ABDEL-MEGUID, S. S.; SHIEH, H.-S.; SMITH, W. W.; DAYRINGER, H. E.; VIOLAND, B. N.; BENTLE, L. A. Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1987, nr. 84, p. 6434-6437.
24. CARLACCI, L.; CHOU, K.-C.; MAGGIORA, G. M. A Heuristic Approach to Predicting the Tertiary Structure of Bovine Somatotropin. *Biochemistry*, 1991, nr. 30, p. 4389-4398.
25. PRASAD, A. S. Discovery of Human Zinc Deficiency: Impact on Human Health. *Nutrition*, 2001, nr. 17, p. 685-687.
26. RASCHKE, M. J.; BAIL, H.; WINDHAGEN, H. J.; KOLBECK, S. F.; WEILER, A.; RAUN, K.; KAPPELGARD, A.; SKIAERBAEK, C.; HAAS, N. P. Recombinant Growth Hormone Accelerates Bone Regenerate Consolidation in Distraction Osteogenesis. *Bone*, 1999, nr. 24, p. 81-88.
27. ERNST, L. K.; TYUTYUNNIK N. N. The effect of gene-engineering somatotropin on mink physiological state in postnatal ontogenesis and in lactation period. *Sel'skhoz biol.*, 2002, nr. 27, p. 66– 3.
28. VENUGOPAL, T.; MATHAVAN, S.; PANDIAN T. J. Molecular cloning of growth hormone encoding cDNA of Indian major carps by a modified rapid amplification of cDNA ends strategy. *Journal of Biosciences*, 2002, nr. 27, p. 261–272.
29. ROBINSON, D. Competitiveness and the Outlook for Hog Farms in Nova Scotia. *Agriculture and Fisheries*, 2005, June, p. 1-26.
30. OUYANG, J.; WANG, J.; DENG, R.; LONG, Q.; WANG, X. High-level expression, purification, and characterization of porcine somatotropin in *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purification*, 2003, nr. 32, p. 28-34.
31. ETHERTON, T. D. Somatotrophic function: The somatomedin hypothesis revisited. *Journal of Animal Science.*, 2004, nr. 82, p. E239-E244.

32. PINEL, G.; ANDRE, F.; BIZEC, B. Discrimination of Recombinant and Pituitary-Derived Bovine and Porcine Growth Hormones by Peptide Mass Mapping. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2004, nr. 52, p. 407-414.
33. KLINDT, J.; BUONOMO, F. C.; YEN, J. T.; BAILE, C. A. Growth performance, carcass characteristics, and sensory attributes of boars administered porcine somatotropin by sustained-release implant for different lengths. *Journal of Animal Science*, 1995, nr. 73, p. 3585-3595.
34. PUTNEY, S. D. Encapsulation of proteins for improved delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 1998, nr. 2, p. 548-552.
35. JOHNSON, O. L.; JAWOROWICZ, W.; CLELAND, J. L.; BAILEY, L. CHARNIS, M.; DUENAS, E.; WU, C.; SHEPARD, D.; MAGIL, S.; LAST, T.; JONES, A. J. S.; PUTNEY, S. D. The Stabilization and Encapsulation of Human Growth Hormone into Biodegradable Microspheres. *Pharmaceutical Research*, 1997, nr. 14, p. 730-735.
36. STABLE GROWTH HORMONE METAL ION FORMULATIONS. WO/1992/017200. Internete: PATENTSCOPE®, 1992. Interneto prieiga <http://www.wipo.int/pctdb/en/wo.jsp?wo=1992017200&IA=WO1992017200&DISPLAY=STATUS>.
37. LEE, H. J.; RILEY, G.; JOHNSON, O.; CLELAND, J. L.; KIM, N; CHARNIS, M.; BAILEY, L.; DUENAS, E.; SHAHZAMANI, A.; MARIAN, M.; JONES, A. J. S.; PUTNEY, S. *In Vivo* Characterization of Sustained-Release Formulations of Human Growth Hormone. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1997, nr. 281, p. 1431-1439.
38. CLELAND, J. L.; JOHNSON, O. L.; PUTNEY, S.; JONES, A. J. S. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1997, nr. 28, p. 71-84.
39. YUH-FUN MAA, Y. F.; NGUYEN, P. A. T.; HSU, S. W. Spray-Drying of Air-Liquid Interface Sensitive Recombinant Human Growth Hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1997, nr. 87, p. 152- 159.
40. TAKADA, S.; YAMAGATA, Y.; MISAKI, M.; TAIRA, K.; KUROKAWA, T. Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. *Journal of Controlled Release*, 2003, nr. 88, p. 229-242.
41. YAMAGATA, Y.; MISAKI, M.; KUROKAWA, T.; TAIRA, K.; TAKADA, S. Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules

- containing recombinant human growth hormone. *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, nr. 251, p. 133-141.
42. COSTANTINO, H. R.; JOHNSON, O. L.; ZALE, S. E. Relationship between Encapsulated Drug Particle Size and Initial Release of Recombinant Human Growth Hormone from Biodegradable Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, nr. 93, p. 2624–2634.
 43. PROLONGED RELEASE OF BIOLOGICALLY ACTIVE SOMATOTROPIN. 5,013,713. United States Patent, 1991, 13 p.
 44. HARADA, Y.; TATSUMI, H.; NAKANO, E.; UMEZU, M. Cloning and sequence analysis of mink growth hormone cDNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 1990, nr. 173, p. 1200-1204.
 45. CHEN, H. C.; HWANG, C. F.; MOU, D. G. High-density Escherichia coli cultivation process for hyperexpression of recombinant porcine growth hormone. *Enzyme and microbial technology*, 1992, nr. 14, p. 321-326.
 46. MAHONY, D. J.; WANG, H. Y.; CONNELL, D. J.; JIA, F.; ZHOU, S. W.; YIN, D.; QI, S. The effect of phage T7 lysozyme on the production of biologically active porcine somatotropin in Escherichia coli from a gene transcribed by T7 RNA polymerase. *Gene*, 1990, nr. 91, p. 275-279.
 47. JO, J. M.; LEE, T. H.; JEONG, H.; LEE, Y. B.; LEE, T. G.; PARK, Y., HAN, K.B. Method for the production of porcine growth hormone using a synthetic gene in yeast cells. *Biotechnology advances*, 1997, nr. 16, p. 949-960.
 48. KATO, Y.; SATO, I.; IHARA, T.; TOMIZAWA, K.; MORI, J.; GESHI, M., NAGAI, T.; OKUDA, K.; KATO, T.; UEDA, S. Expression and purification of biologically active porcine follicle-stimulating hormone in insect cells bearing a baculovirus vector. *Journal of molecular endocrinology*, 1998, nr. 20, p. 55-65.
 49. HWANG, L.H.; CHEN, B. F.; LEE, P. J.; HO, S. Y.; LIU, J. J. Use of helper-free retroviral vector to direct a high expression of porcine growth hormone in mouse fibroblast cells. *Biotechnology and applied biochemistry*, 1992, nr. 16, p. 171-181.
 50. ZVIRBLIS, G. S.; GORBULEV, V. G.; RUBTSOV, P. M.; CHORNOV, B. K.; GOLOVA, J. B.; POZMOGOVA, G. E.; SKRYABIN, K. G.; BAYEV, A. A. Genetic engineering of peptide hormones. III. The cloning of the porcine growth hormone cDNA and the construction of the gene suitable for the hormone expression in bacteria. *Molecular biology (Russia)*, 1988, nr. 22, p. 145-150.

51. CARDAMONE, M.; PURI, N. K.; BRANDON, M. R. Comparing the Refolding and Reoxidation of Recombinant Porcine Growth Hormone from a Urea Denatured State and from Escherichia coli Inclusion Bodies. *Biochemistry*, 1995, nr. 34, p. 5773-5794.
52. ABDEL-MEGUID, S. S.; SMITH, W. W.; VIOLAND, B. N.; BENTLE, L. A. Crystallization of methionyl porcine somatotropin, a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Journal of molecular biology*, 1986, nr. 192, p. 159-160.
53. FAN, K.; SEVOIAN, M.; GONZALES, D. Instability Studies of Porcine Somatotropin in Aqueous Solutions and the Possible Reagents for Its Stabilization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2000, nr. 48, p. 5685-5691.
54. CHARMAN, S. A.; MASON, K. L.; CHARMAN, W. N. Techniques for Assessing the Effects of Pharmaceutical Excipients on the Aggregation of Porcine Growth Hormone. *Pharmaceutical research*, 1993, nr. 10, p. 954-962.
55. SHOJI, K.; OHARA, E.; WATAHIKI, M.; YONEDA, Y. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the mink growth hormone. *Nucleic Acids Research*, 1990, nr. 18, p. 6424.
56. SEREIKAITĖ, J.; STATKUTĖ, A.; MORKUNAS, M.; RADZEVICIUS, K.; BORROMEO, V.; Secchi, C.; BUMELIS, V.-A. Production of recombinant mink growth hormone in *E. coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, nr. 74, p. 316–323.
57. BORROMEO, V.; SEREIKAITĖ, J.; BUMELIS, V.-A.; SECCHI, C.; SCIRE, A.; AUSILI, A.; D'AURIA, S.; TANFANI, F. Mink Growth Hormone Structural–Functional Relationships: Effects of Renaturing and Storage Conditions. *The Protein Journal*, 2007, nr. 74, p. 316-323.
58. BREMS, D. N.; BROWN, P. L.; BECKERLL, G. W. Equilibrium Denaturation of Human Growth Hormone and Its Cysteine-modified Forms. *The Journal of Biological Chemistry*, 1990, nr. 265, p. 5504-5511.
59. STATKUTĖ, A. *Rekombinantinio audinės augimo hormono gryninimas iš intarpinių Escherichia coli kūnelių ir jo oligomerinės struktūros tyrimas: magistro darbas*. Vilnius: VGTU, 2007, 69 p.
60. MANI, J. C.; BRAS, J. M.; AGUT, C.; PAU, B.; VITA, N.; FERRARA, P.; BAYOL, A. Accurate Topological Comparison of Two Recombinant Human Growth Hormones by Optical Surface Plasmon Resonance. *Analytical Biochemistry*, 1997, nr. 248, p. 50-62.
61. VELAGA, S. P.; CARLFORS, J. Supercritical Fluids Processing of Recombinant Human Growth Hormone. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2005, nr. 31, p. 135–149.

62. CUNNINGHAM, B. C.; ULTSCH, M.; VOS, A. M.; MULKERRIN, M. G.; CLAUSER, K. R.; WELLS, J. A. Dimerization of the extracellular domains of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. *Science*, 1991, nr. 254, p. 821-825.
63. SOMERS, W.; ULTSCH, M.; VOS, A. M.; KOSSIAKOFF, A. A. The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex. *Nature*, 1994, nr. 372, p. 478-481.
64. DEMBOWSKY, K.; STADLER, P. *Novel Therapeutic Proteins*. Germany: WILEY-VCH, 2001.
65. Human Growth Hormone. 2008 05 05. Interneto prieiga <http://beta.uniprot.org/uniprot/P01241>.
66. Human Growth Hormone Structure. 2008 04 15. Interneto prieiga <http://www.rcsb.org/pdb/cgi/explore.cgi?pdbId=1HWG-erv>.
67. HOVORKA, S. W.; HONG, J.; CLELAND, J. L.; SCHONEICH, C. Metal-catalyzed oxidation of human growth hormone: modulation by solvent-induced changes of protein conformation. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, nr. 90, p. 58-69.
_jau kazkur cituotas sitas straipsnis
68. GOMEZ-ORELLANA, I.; VARIANO, B.; MIURA-FRABONI, J.; MILSTEIN, S.; PATON, D. R. Thermodynamic characterization of an intermediate state of human growth hormone. *Protein Science*, 1998, nr. 7, p. 1352-1358.
69. FELIPPIS, M. R.; KILCOMONS, M. A.; LENTS, M. P.; YOUNGMAN, K. M.; HAVEL, H. A. Acid stabilization of human growth hormone equilibrium folding intermediates. *Biochimica et biophysica acta*, 1995, nr. 1247, p. 35-45.
70. KASIMOVA, M. R.; KRISTENSEN, S. M.; HOWE, P. W. A.; CHRISTENSEN, T.; MATTHIESEN, F.; PETERSEN, J.; SORENSEN, H. H.; LED, J. J. NMR Studies of the Backbone Flexibility and Structure of Human Growth Hormone: A Comparison of High and Low pH Conformations. *Journal of molecular biology*, 2002, nr. 318, p. 679-695.
71. ABILDGAARD, F.; JORGENSEN, A. M. M.; LED, J. J.; CHRISTENSEN, T.; JENSEN, E. B.; JUNKER, F.; DALBOGE, H. Characterization of Tertiary Interactions in a Folded Protein by NMR Methods: Studies of pH-Induced Structural Changes in Human Growth Hormone. *Biochemistry*, 1992, nr. 31, p. 8587-8596.
72. CAUCHY, M.; D'AOUST, S.; DAWSON, B.; RODE, H.; HEFFORD, M. A. Thermal Stability: A Means to Assure Tertiary Structure in Therapeutic Proteins. *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 2002, nr. 30, p. 175-185.

73. SUKUMAR, M.; STORMS, S. M.; FELIPPIS, M. R. Non-native Intermediate Conformational States of Human Growth Hormone in the Presence of Organic Solvents. *Pharmaceutical Research*, 2005, nr. 22, p. 789-796.
74. BAM, N. B.; CLELAND, J. L.; RANDOLPH, T. W. Molten globule intermediate of recombinant human growth hormone: stabilization with surfactants. *Biotechnology progress*, 1996, nr. 12, p. 801-809.
75. OROSZLAN, P.; WICAR, S.; TESHIMA, G.; WU, S.-L.; HANCOCK, W. S.; KARGER, B. L. Conformational Effects in the Reversed-Phase Chromatographic Behavior of Recombinant Human Growth Hormone (rhGH) and N-Methionyl Recombinant Human Growth Hormone (Met-hGH). *Analytical Chemistry*, 1992, nr. 64, p. 1623-1631.
76. BAM, N. B.; CLELAND, J. L.; YANG, J.; MANNING, M. C.; CARPENTER, J. F.; KELLEY, R. F.; RANDOLPH, T. W. Tween Protects Recombinant Human Growth Hormone against Agitation-Induced Damage via Hydrophobic Interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, nr. 87, p. 1554-1559.
77. COSTANTINO, H. R.; CARRASQUILLO, K. G.; CORDERO, R. A.; MUMENTHALER, M.; HSU, C. C.; GRIEBENOW, K. Effect of Excipients on the Stability and Structure of Lyophilized Recombinant Human Growth Hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1998, nr. 87, p. 1412-1420.
78. TAVORNVIPAS, S.; TAJIRI, S.; HIRAYAMA, F.; ARIMA, H.; UEKAMA, K. Effects of Hydrophilic Cyclodextrins on Aggregation of Recombinant Human Growth Hormone. *Pharmaceutical Research*, 2004, nr. 21, p. 2369-2376.
79. OTZEN, D. E.; KNUDSEN, B. R.; AACHMANN, F.; LARSEN, K. L.; WIMMER, R. Structural basis for cyclodextrins' suppression of human growth hormone aggregation. *Protein Science*, 2002, nr. 11, p. 1779-1787.
80. TODD, W. R.; ELWEHJEY, C. A. Zinc in the nutrition of the rat. *The American journal of physiology*, 1934, nr. 107, p. 146-156.
81. SALGUEIRO, M. J.; ZUBILLAGA, M. B.; LYSIONEK, A. E.; CARO, R. A.; WEILL, R.; BOCCIO, J. R. The role of zinc in the growth and development of children. *Nutrition*, 2002, nr. 18, p. 510-519.
82. ROTH, H. P.; KIRCHGESSNER, M. Course of concentration changes of growth hormone igf-1, insulin and c-peptide in serum, pituitary and liver of zinc-deficient rats. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 1997, nr. 77, p. 91-101.

83. LABELLA, F.; DULAR, R.; VIVIAN, S.; QUEEN, G. Pituitary Hormone Releasing or Inhibiting Activity of Metal Ions Present in Hypothalamic Extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1973, nr. 52, p. 786-791.
84. LI, L.; GUO, Z., ZHAO, L. Effects of supplement Zinc on levels of Zinc in serum, growth hormone and hydroxyproline. *Zhonghua zheng xing shao shang wai ke za zhi*, 1998, nr. 14, p. 425-428.
85. DORMER, R. L.; KERBEY, A.L.; McPHERSON, M.; MANLEY, S.; ASHCROFT, S. J. H.; SCHOFIELD, J. G.; RANDLE, P. J. The Effect of Nickel on Secretory Systems. Studies in the Release of Amylase, Insulin and Growth Hormone. *The Biochemical journal*, 1973, nr. 140, p. 135-142.
86. EMERY, R. S.; LUOMA, J.; LIESMAN, J.; THOMAS, J. W.; TUCKER, H. A.; CHAPIN, L. T. Effect of Serum Magnesium and Feed Intake on Serum Growth Hormone Concentrations. *Journal of dairy science*, 1986, nr. 69, p. 1148-1150.
87. McMACDONALD, R. S. The Role of Zinc in Growth and Cell Proliferation. *The Journal of Nutrition*, 2000, nr. 130, p. 1500S-1508S.
88. CALDERONI, A. M.; OLIVEROS, L.; JAHN, G.; ANTON, R.; LUCO, J.; GIMENEZ, M. S. Alterations in the lipid content of pituitary gland and serum prolactin and growth hormone in cadmium treated rats. *BioMetals*, 2005, nr. 18, p. 213-220.
89. CAPERUA, T. J.; CAMPBELL, R. G.; STEELE, N. C. Interrelationships of Exogenous Porcine Growth Hormone Administration and Feed Intake Level Affecting Various Tissue Levels of Iron, Copper, Zinc and Bone Calcium of Growing Pigs. *Journal of Animal Science*, 1989, nr. 67, p. 654-663.
90. ANDERSON, R. A.; BRYDEN, N. A.; EVOCK-CLOVER, C. M.; STEELE, N. C. Beneficial effects of chromium on glucose and lipid variables in control and somatotropin-treated pigs are associated with increased tissue chromium and altered tissue copper, iron, and zinc. *Journal of Animal Science*, 1997, nr. 75, p. 657-661.
91. ZHOU, W.; KORNEGAY, E. T.; LAAR, H.; SWINKELS, J. W.; WONG, E. A.; LINDEMANN, M. D. The role of feed consumption and feed efficiency in copper-stimulated growth. *Journal of Animal Science*, 1994, nr. 72, p. 2385-2394.
92. ANISIMOVA, M. V.; SHULGA, A. A.; LEVICHKIN, I. V.; KIRPICHNIKOV, M. P.; POLYAKOV, K. M.; SKRYABIN, K. G.; VIJAYALAKSHMI, M. A.; VARLAMOV, V. P. The Study of the Metal-Binding Region in Human Growth Hormone Using Immobilized

- Metal Ion Affinity Gel-Electrophoresis. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2001, nr. 27, p. 23–26.
93. DIENYS, G.; SEREIKAITĖ, J.; LUKSA, V.; JARUTĖ, O.; MISTINIENE, E.; BUMELIS, V.-A. Dimerization of Human Growth Hormone in the Presence of Metal Ions. *Bioconjugate chemistry*, 2000, nr. 11, p. 646–651.
 94. YANG, T. H.; CLELAND, J. L.; LAM, X.; MEYER, J. D.; JONES, L. S.; RANDOLPH, T. W.; MANNING, M. C.; CARPENTER, J. F. Effect of Zinc Binding and Precipitation on Structures of Recombinant Human Growth Hormone and Nerve Growth Factor. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000, nr. 89, p. 1480–1485.
 95. HOVORKA, S. W.; WILLIAMS, T. D.; SCHONEICH, C. Characterization of the Metal-Binding Site of Bovine Growth Hormone through Site-Specific Metal-Catalyzed Oxidation and High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical biochemistry*, 2002, nr. 300, p. 206–211.
 96. MATULIS, D.; KRANZ, J. K.; SALEMME, F. R.; TODD, M. J. Thermodynamic Stability of Carbonic Anhydrase: Measurements of Binding Affinity and Stoichiometry Using ThermoFluor. *Biochemistry*, 2005, nr. 44, p. 5258–5266.
 97. TODD, M. J.; SALEMME, F. R. Direct Binding Assays for Pharma Screening. *Genetic engineering news*, 2003, nr. 23.
 98. ERICSSON, U. B.; HALLBERG, B. M.; DETITTA, G. T.; DEKKER, N.; NORDLUND, P. ThermoFluor-based high-throughput stability optimization of proteins for structural studies. *Analytical biochemistry*, 2006, nr. 357, p. 289–298.
 99. PANTOLIANO, M. W.; PETRELLA, E. C.; KWASNOSKI, J. D.; LOBANOV, V. S.; MYSLIK, J.; GRAF, E.; CARVER, T.; ASELM, E.; SPRINGER, B. A.; LANE, P.; SALEMME, F. R. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. *Journal of biomolecular screening*, 2001, nr. 6, p. 429–440.
 100. CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A.; NELEN, M. I. Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor. *Journal of biomolecular screening*, 2006, nr. 11, p. 854–863.
 101. TODD, M. J.; CUMMINGS, M. D.; NELEN, M. I. Affinity assays for decrypting protein targets of unknown function. *Drug discovery today*, 2005, nr. 2, p. 267–273.
 102. CIMPERMAN, P.; BARANAUSKIENE, L.; JACHIMOVICIUTE, S.; JACHNO, J.; TORRESAN, J.; MICHAILOVIENE, V.; MATULIENE, J.; SEREIKAITĖ, J.; BUMELIS, V.; MATULIS, D. A Quantitative Model of Protein Thermal Stabilization and Destabilization by Ligands. *Biophysical journal*, spausdinamas.

103. HARDING, S. E.; CHOWDHRY, B. Z. *Protein-ligand interactions: hydrodynamics and calorimetry*. Oxford: Oxford University press, 2001.
104. HORN, J. R.; RUSSELL, D.; LEWIS, E. A.; MURPHY, K. Van't Hoff and Calorimetric Enthalpies from Isothermal Titration Calorimetry: Are There Significant Discrepancies. *Biochemistry*, 2001, nr. 40, p. 1774–1778.
105. NAGHIBI, H.; TAMURAT, A.; STURTEVANT J. M. Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1995, nr. 92, p. 5597–5599.
106. CHAIRES, J. B. Possible origin of differences between van't Hoff and calorimetric enthalpy estimates. *Biophysical chemistry*, 1997, nr. 64, p. 15–23.
107. HOLDGATE, G. A. Making Cool Drugs Hot: Isothermal Titration Calorimetry as a Tool to Study Binding Energetics. *BioTechniques*, 2001, nr. 31, p. 164-184.
108. DOYLE, M. L. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Current opinion in biotechnology*, 1997, nr. 8, p. 31-35.
109. HONG, L.; BUSH, W. D.; HATCHER, L. Q.; SIMON, J. Determining Thermodynamic Parameters from Isothermal Calorimetric Isotherms of the Binding of Macromolecules to Metal Cations Originally Chelated by a Weak Ligand. *The Journal of physical chemistry*, 2008, nr. 112, p. 604–611.
110. LEAVITT, S.; FREIRE, E. Direct Measurement of Protein Binding Energetics by Isothermal Titration Calorimetry. *Current opinion in structural biology*, 2001, nr. 11, p. 560–566.
111. LADBURY, J. E.; CHOWDHRY, B. Z. Sensing the Heat: the Application of Isothermal Titration Calorimetry to Thermodynamic Studies of Biomolecular Interactions. *Chemistry & Biology*, 1996, nr. 3, p. 791-801.
112. FREIRE, E. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*, 2004, nr. 1, p. 295–299.
113. JELESAROV, I.; BOSSHARD, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of molecular recognition*, 1999, nr. 12, p. 3–18.
114. FREYER, M. W.; LEWIS, E. A. Isothermal Titration Calorimetry: Experimental Design, Data Analysis, and Probing Macromolecule/Ligand Binding and Kinetic Interactions. *Methods in Cell Biology*, 2008, nr. 84, p. 79–113.

115. LADBURY, J. E. Isothermal titration calorimetry: application to structure-based drug design. *Termochimica Acta*, 2001, nr. 380, p. 209–215.
116. HOLDGATE, G. A.; WARD, W. H. J. Measurements of binding thermodynamics in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 2005, nr. 10, p. 1543–1550.
117. SABOURY, A. A. A Review on the Ligand Binding Studies by Isothermal Titration Calorimetry. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 2006, nr. 3, p. 1–21.
118. MURPHY, K. P.; FREIRE, E.; PATERSON, Y. Configurational effects in antibody-antigen interactions studied by microcalorimetry. *Proteins*, 1995, nr. 21, p. 83-90.
119. SCHWARZ, F. P.; TELL, D.; GOLDBAUM, F. A.; MARIUZZA, R. A.; POLJAK, R. J. Thermodynamics of antigen-antibody binding using specific anti-lysozyme antibodies. *European journal of biochemistry*, 1995, nr. 228, p. 388-394.
120. TSUMOTO, K.; OGASAHARA, K.; UEDA, Y.; WATANABE, K.; YUTANI, K.; KUMAGAI, I. Role of Tyr Residues in the Contact Region of Anti-lysozyme Monoclonal Antibody HyHEL10 for Antigen Binding. *The Journal of biological chemistry*, 1995, nr. 270, p. 18551-18557.
121. GRIBENKO, A. V.; GUZMAN-CASADO, M.; LOPEZ, M. M.; MAKHATADZE, G. I. Conformational and thermodynamic properties of peptide binding to the human S100P protein. *Protein science*, 2002, nr. 11, p. 1367–1375.
122. MANDIYAN, V.; O'BRIEN, R.; ZHOU, M.; MARGOLIS, B.; LAMMON, M. A.; STURTEVANT, J. M.; SCHLESSINGER, J. Thermodynamic studies of SHC phosphotyrosine interaction domain recognition of the NPXpY motif. *The Journal of biological chemistry*, 1996, nr. 271, p. 4770-4775.
123. ROLF, B.; OUDENAMPSEN-KRUGER, E.; BORCHERS, T.; FAERGEMAN, N. J.; KNODSEN, J.; LEZIUS, A.; SPENER, F. Analysis of the ligand binding properties of recombinant bovine liver-type fatty acid binding protein. *Biochimica et biophysica acta*, 1995, nr. 1259, p. 245-253.
124. TERZI, E.; HOLZEMANN, G.; SEELIG, J. Self-association of beta-amyloid peptide (I-40) in solution and binding to lipid membranes. *Journal of molecular biology*, 1995, nr. 252, p. 633-642.
125. SEELIG, A.; ALT, T.; LOTZ, S.; HOLZEMANN, G. Binding of substance P agonists to lipid membranes and to the neurokinin-1 receptor. *Biochemistry*, 1996, nr. 35, p. 4365-4374.

126. EVANS, L. J. A.; COOPER, A.; LAKEY, J. H. Direct measurement of the association of a protein with a family of membrane receptors. *Journal of molecular biology*, 1996, nr. 255, p. 559-563.
127. JOHANSON, K.; APPELBAUM, E.; DOYLE, M.; HENSLEY, P.; ZHAO, B.; MEGUID, S. S. A.; YOUNG, P.; COOK, R.; CARR, S.; MATICO, R. Binding interactions of human interleukin-5 with its receptor alpha subunit. *The Journal of biological chemistry*, 1995, nr. 270, p. 9459-9471.
128. PEARCE, K. H.; ULTSCH, M. H.; KELLEY, R. F.; VOS, A. M.; WELLS, J. A. Structural and mutational analysis of affinity-inert contact residues at the growth hormone-receptor interface. *Biochemistry*, 1996, nr. 35, p. 10300-10307.
129. EVANS, S. V.; SIGURSKJOLD, S. W.; JENNINGS, H. J.; BRISSON, J. R.; TO, R.; TSE, W. C.; ALTMAN, E.; FROSCHE, M.; WEISGERBER, C.; KRATZIN, H. D. Evidence for the Extended Helical Nature of Polysaccharide Epitopes. The 2.8 Å Resolution Structure and Thermodynamics of Ligand Binding of an Antigen Binding Fragment Specific for α -(2 $\rightarrow$ 8)-Polysialic Acid. *Biochemistry*, 1995, nr. 34, p. 6737-6744.
130. SCHWARZ, F. P.; MISQIUTH, S.; SUROLIA, A. Effect of substituent on the thermodynamics of D-glucopyranoside binding to concanavalin A, pea (*Pisum sativum*) lectin and lentil (*Lens culinaris*) lectin. *The Biochemical journal*, 1996, nr. 316, p. 123-129.
131. PLUM, G. R.; BRESLAUER, K. J. Calorimetry of proteins and nucleic acids. *Current opinion in structural biology*, 1995, nr. 5, p. 682-690.
132. MERABET, E.; ACKERS, G. K. Calorimetric analysis of λ cI Repressor Binding to DNA Operator Sites. *Biochemistry*, 1995, nr. 34, p. 8554-8563.
133. KRESHECK, G. C.; VITELLO, L. B.; ERMAN, J. E. Calorimetric studies on the interaction of horse ferricytochrome c and yeast cytochrome c peroxidase. *Biochemistry*, 1995, nr. 34, p. 8398-8405.
134. WU, M. L.; MORGAN, W. T. Thermodynamics of heme-induced conformational changes in hemopexin: role of domain-domain interactions. *Protein science*, 1995, nr. 4, p. 29-34.
135. LI, J.; SWANSON, R. V.; SIMON, M. I.; WEISS, R. M. The response regulators CheB and CheY exhibit competitive binding to the kinase CheA. *Biochemistry*, 1995, nr. 34, p. 14626-14636.
136. WEBER, P. C.; PANTOLIANO, M. W.; SIMMONS, D. M.; SALEMME, F. R. Structure-Based Design of Synthetic Azobenzene Ligands for Streptavidin. *Journal of the American Chemical Society*, 1994, nr. 116, p. 2717-2724.

137. XU, Y.; JOHNSON, C. R.; BECKET, D. Thermodynamic analysis of small ligand binding to the Escherichia coli repressor of biotin synthesis. *Biochemistry*, 1996, nr. 35, p. 5509-5517.
138. GORMLEY, N. A.; ORPHANIDES, G.; MEYER, A.; CULLIS, P. M.; MAXWELL, A. The Interaction of Coumarin Antibiotics with Fragments of the DNA Gyrase B Protein. *Biochemistry*, 1996, nr. 35, p. 5083-5092.
139. WETTIG, S. D.; WOOD, D. O.; LEE, J. S. Thermodynamic investigation of M-DNA: a novel metal ion–DNA complex. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2003, nr. 94, p. 94-99.
140. BABU, C. S.; TODOR, D. T.; CASARENO, R.; COWAN, J. A.; LIM, C. A. Combined Experimental and Theoretical Study of Divalent Metal Ion Selectivity and Function in Proteins: Application to *E. coli* Ribonuclease H1. *Journal of the American Chemical Society*, 2003, nr. 125, p. 9318-9328.
141. NIELSEN, A. D.; PUSEY, M. L.; FUGLSANG, C. C.; WESTH, P. A proposed mechanism for the thermal denaturation of a recombinant *Bacillus halmapalus* α -amylase - the effect of calcium ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, nr. 1652, p. 52–63.
142. HENZL, M. T.; AGAH, S. Divalent Ion-binding properties of the Two Avian β -Parvalbumins. *Proteins*, 2006, nr. 62, p. 270–278.
143. ZEROVNIK, E.; SKERGET, K.; TUSEK-ZNIDARIC, M.; LOESCHNER, C.; BRAZIER, M. W.; BROWN, D. R. High affinity copper binding by stefin B (cystatin B) and its role in the inhibition of amyloid fibrillation. *The FEBS journal*, 2006, nr. 273, p. 4250–4263.
144. ZHANG, Y.; WILCOX, D. E. Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin. *Journal of biological inorganic chemistry*, 2002, nr. 7, p. 327–337.
145. LACHENMANN, M. J.; LADBURY, J. E.; DONG, J.; HUANG, K.; CAREY, P.; WEISS, M. A. Why Zinc Fingers Prefer Zinc: Ligand-Field Symmetry and the Hidden Thermodynamics of Metal Ion Selectivity. *Biochemistry*, 2004, nr. 43, p. 13910–13925.
146. SABOURY, A. A. Application of a new method for data analysis of isothermal titration calorimetry in the interaction between human serum albumin and Ni^{2+} . *The Journal chemical thermodynamics*, 2003, nr. 35, p. 1975–1981.
147. MAHMOUDI, A.; NAZARI, K.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; SABOURY, A. A. Enthalphy analysis of horseradish peroxidase in the presence of Ni^{2+} : a stabilization study. *Theoretica chimica acta*, 2002, nr. 385, p. 33–39.

148. WERNIMONT, A. K.; YATSUNYK, L. A.; ROSENZWEIG, A. C. Binding of Copper(I) by the Wilson Disease Protein and Its Copper Chaperone. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, nr. 279, p. 12269–12276.
149. YATSUNYK, L. A.; ROSENZWEIG, A. C. Cu(I) Binding and Transfer by the N Terminus of the Wilson Disease Protein. *Journal of biological chemistry*, 2007, nr. 282, p. 8622–8631.
150. GROSSOEHME, N. E.; MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P., Wilcox D. E. Thermodynamics of Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} Binding to the Urease Metallochaperone UreE. *Biochemistry*, 2007, nr. 46, p. 10506–10516.
151. ROLLIN-GENETET, F.; BERTHOMIEU, C.; DAVIN, A.-H.; QUEMENEUR, E. *Escherichia coli* thioredoxin inhibition by cadmium. *European journal of biochemistry*, 2004, nr. 271, p. 1299–1309.
152. BOU-ABDALLAH, F.; WOODHALL, M. R.; VELAZQUEZ-CAMPOY, A.; ANDREWS, S. C.; CHASTEEN, N. D. Thermodynamic Analysis of Ferrous Ion Binding to *Escherichia coli* Ferritin EcFtnA. *Biochemistry*, 2005, nr. 44, p. 13837–13846.
153. PEROZZO, R.; FOLKERS, G.; SCAPOZZA, L. Thermodynamics of Protein–Ligand Interactions: History, Presence, and Future Aspects. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 2004, nr. 24, p. 1–52.
154. TELLINGHUISEN, J. Isothermal titration calorimetry at very low c. *Analytical Biochemistry*, 2008, nr. 373, p. 95–397.
155. WILCOX, D. E. Isothermal titration calorimetry of metal ions binding to proteins: An overview of recent studies. *Inorganica chimica acta*, 2007, spausdinamas.
156. DUDEV, T.; LIM, C. Metal Binding Affinity and Selectivity in Metalloproteins: Insights from Computational Studies. *Annual review of biophysics*, 2008, nr. 37, p. 97–116.
157. CHAO, Y.; FU, D. Thermodynamic Studies of the Mechanism of Metal Binding to the *Escherichia coli* Zinc Transporter YjiP. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, nr. 279, p. 17173–17180.
158. BLASIE, C. A.; BERG, J. M. Kinetics and Thermodynamics of Copper (II) Binding to Apoazurin. 2003, *Journal of the American Chemical Society*, nr. 125, p. 6866–6867.
159. DITUSA, C. A.; CHRISTENSEN, T.; McCALL, K. A.; FIERKE, C. A.; TOONE, E. J. Thermodynamics of Metal Ion Binding. 1. Metal Ion Binding by Wild-Type Carbonic Anhydrase. 2001, *Biochemistry*, nr. 40, p. 5338–5344.
160. ATRI, M. S.; SABOURY, A. A.; REZAEI-TAVIRANI, M.; SANATI, M. H.; MOOSAVI-

- MOVAHEDI, A. A.; SADEGHI, M.; MANSURI-TORSHIZI, H.; KHODABANDEH, M. Binding properties and conformational change of human growth hormone upon interaction with Fe^{3+} . *Thermochimica Acta*, 2005, nr. 438, p. 178-183.
161. SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; SANATI, M. H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAGHBEEN, K. Effects of calcium binding on the structure and stability of human growth hormone. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2005, nr. 36, p. 305-309.
162. SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; SANATI, M. H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A.; HAKIMELAHI, G. H.; SADEGHI, M. A Thermodynamic Study on the Interaction Between Magnesium Ion and Human Growth Hormone. *Biopolymers*, 2006, nr. 81, p. 120-126.
163. BEHBEHANI, G. R.; SABOURY, A. A. Using a new solvation model for thermodynamic study on the interaction of nickel with human growth hormone. *Thermochimica Acta*, 2007, nr. 452, p. 76-79.
164. SABOURY, A. A.; ATRI, M. S.; SANATI, M. H.; SADEGHI, M. Application of a simple calorimetric data analysis on the binding study of calcium ions by human growth hormone. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 2006, nr. 83, p. 175-179.
165. JACHIMOVIČIŪTĖ, Simona. *Metalų jonų įtaka kiaulės augimo hormono oligomerizacijai*. Bakalauro darbas: VGTU. Vilnius, 2006, 39 p.
166. FAN, K.; SEVOIAN, M.; GONZALES, D. Instability Studies of Porcine Somatotropin in Aqueous Solutions and the Possible Reagents for Its Stabilization. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 2000, nr. 48, p. 5685-5691.
167. MATULIS, D.; ROUZINA, I.; BLOOMFIELD, V. A. Thermodynamics of Cationic Lipid Binding to DNA and DNA Condensation: Roles of Electrostatics and Hydrophobicity. *Journal of the American Chemical Society*, 2002, nr. 124, p. 7331-7342.