

VILNIAUS UNIVERSITETAS  
Biofizikos ir Biochemijos katedra

Biochemijos studijų programos studentas

Zigmantas Toleikis

Magistrinis darbas

**Baltymų – ligandų jungimosi tyrimas, aukštame slėgyje**

Darbo vadovas  
Dr. D. Matulis

Vilnius 2009

## Turinys

Sutrumpinimai .....	3
ĮVADAS .....	4
1. LITERATŪROS APŽVALGA .....	5
1.1 HSA, rhCAI, Hsp90 struktūros ir jungimasis su ligandais .....	5
1.2 ANS jungimasis ir fluorescencija .....	6
1.3 Baltymų temperatūrinis stabilumas, $T_m$ ir ligandų jungimasis .....	8
1.3.1 Baltymų temperatūrinis stabilumas ir $T_m$ .....	8
1.3.2 Baltymų – ligandų jungimosi nustatymas .....	9
1.4 Aukšto slėgio įtaka baltymams ir jungimuisi su ligandais.....	11
1.4.1 Tūrio pokyčiai denatūruojant baltymus.....	11
1.4.2 Tūrio pokyčiai ligandams jungiantis prie baltymų .....	12
1.4.3 Suspaudžiamumas.....	13
1.4.4 Metastabilios būsenos formavimasis, veikiant baltymus slėgiu .....	17
1.4.5 ANS - baltymų jungimasis, esant aukštam slėgiui .....	18
1.4.6 Slėginio ir temperatūrinio baltymų stabilumų palyginimas .....	18
1.4.7 Grįžtamos ir negrįžtamos baltymų denatūracijos fazių diagrama .....	19
1.4.8 Baltymo – ligando komplekso lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio.....	21
1.4.9 Baltymų – slopiklių jungimosi slėginis modelis.....	22
1.4.10 Slėginio modelio jungimosi parametrai .....	25
1.4.11 Baltymų išsivyniojimo slėginis modelis .....	26
2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI .....	28
2.1 Naudotos medžiagos.....	28
2.2 Tirpalų ruošimas .....	28
2.3 Baltymų denatūracijos temperatūrinio poslinkio fluorescencijos metodas .....	29
2.4 Slėginės baltymų denatūracijos nustatymas.....	29
2.5 Jungimosi konstantos nustatymas.....	30
3. <b>EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS</b> .....	31
3.1 Slėginės denatūracijos eksperimentai.....	31
3.1.1 ANS įtaka HSA stabilumui ir jungimasis .....	31

3.1.2 HSA slėginė denatūracija ir renatūracija.....	33
3.1.3 Guanidino įtaka HSA stabilumui.....	34
3.1.4 HSA ir HSA – dodekanoato išsivyniojimo tranzicijos.....	36
3.1.5 HSA – dekanato jungimasis stebint triptofano fluorescenciją.....	37
3.1.6 HSA – DK, DDK jungimosi palyginimas.....	39
3.1.7 HSA, HSA – DK komplekso $P_m$ priklausomybė nuo temperatūros.....	40
3.1.8 HSA, HSA – tiroksinas slėginė denatūracija .....	41
3.2 Temperatūros poslinkio eksperimentai .....	43
3.2.1 HSA - DK, DDK jungimasis temperatūros poslinkio metodu.....	43
3.2.2 HSA – dodekanoato jungimasis su ir be ANS.....	43
3.3 Terminis poslinkis prie aukšto slėgio .....	45
3.3.1 rhHsp90N temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui.....	45
3.3.2 rhHsp90N temperatūrinė denatūracija, aukštame slėgyje esant radisikolio .....	46
3.3.3 Hsp90N – radisikolio jungimasis prie aukšto slėgio .....	47
3.3.4 rhCAI $T_m$ kitimo priklausomybė nuo slėgio ir metazolamido .....	48
3.3.5 rhCAI – metazolamido jungimasis, esant aukštam slėgiui .....	50
SUMMARY.....	52
<b>NAUDOTA LITERATŪRA .....</b>	<b>54</b>

## **Sutrumpinimai**

ANS – 8-anilino-1- naftaleno sulfonatas

DK – dekanooatas

DDK – dodekanoatas

HSA – žmogaus serumo albuminas (human serum albumin)

rhHsp90N – rekombinantinis žmogaus karščio šoko baltymo 90 N-galiniis domenas (heat shock protein)

rhCAI – rekombinantinė žmogaus (rh) pirma (izoforma) karboanhidrazė (carbonic anhydrase)

GndHCl – guanidino vandenilio chloridas

METZ - metazolamidas

## ĮVADAS

Temperatūros, slėgio ir tirpiklio įtakojamos baltymo denatūracijos tranzicijos charakterizavimas termodinaminiais parametrais leidžia suprasti baltymų stabilumą (Dubins, Filfil et al. 2003). Slėgio poveikio charakterizavimas termodinaminėmis parametrais, tokiais kaip tūris, suspaudžiamumas, plėtimasis, papildydamos temperatūros poveikį apibūdinančius parametrus: entropiją, entalpiją, šiluminę talpą, leidžia plačiau apibūdinti tiriamas sistemas (Silva and Weber 1993; Heremans and Smeller 1998), suprasti jų struktūros pokyčių, vykdomų reakcijų ir jungimosi su įvairiais ligandais reakcijų mechanizmus. Iki šiol mažai žinoma kaip baltymai veikiami aukštu slėgiu sąveikauja su ligandais, tad mano **darbo tikslas – nustatyti aukšto slėgio poveikį baltymų – ligandų jungimuisi**. Naudojant baltymų denatūracijos ir jungimosi su ligandais fizikinį modelį iš fluorescencijos duomenų galima nustatyti denatūracijos ir jungimosi nuo slėgio priklausomas termodinamines charakteristikas. Teisingai interpretuojant nustatytas charakteristikas galima geriau suprasti baltymų – ligandų jungimąsi.

Šiame darbe tirti baltymų stabilumą ir jungimąsi, esant aukštam slėgiui, buvo pasirinkti trys baltymai: žmogaus serumo albuminas (HSA), rekombinantinė žmogaus karboanhidrזė I (rhCAI) ir šiluminio šoko baltymo N - galinis domenas (Hsp90N). Šie baltymai yra įdomūs dėl ląstelėje vykdomų svarbių funkcijų, kurių sutrikimai, įtakoja įvairių ligų, tokių kaip glaukoma ar vėžiniai susirgimai, atsiradimą. Šių baltymų aktyvumo sutrikimus, galima sumažinti slopikliais, kurie jungiasi baltymų aktyviajame centre ir stabdo jų katalizuojamas reakcijas. Nepaisant slopiklių stipraus jungimosi prie baltymų, jų neselektyvus jungimasis organizme sukelia daug pašalinių poveikių, todėl stengiamasi sukurti slopiklių, kurie būtų veiklūs mažomis koncentracijomis ir pasižymėtų dideliu selektyvumu norimiems baltymams ir jų izoformoms.

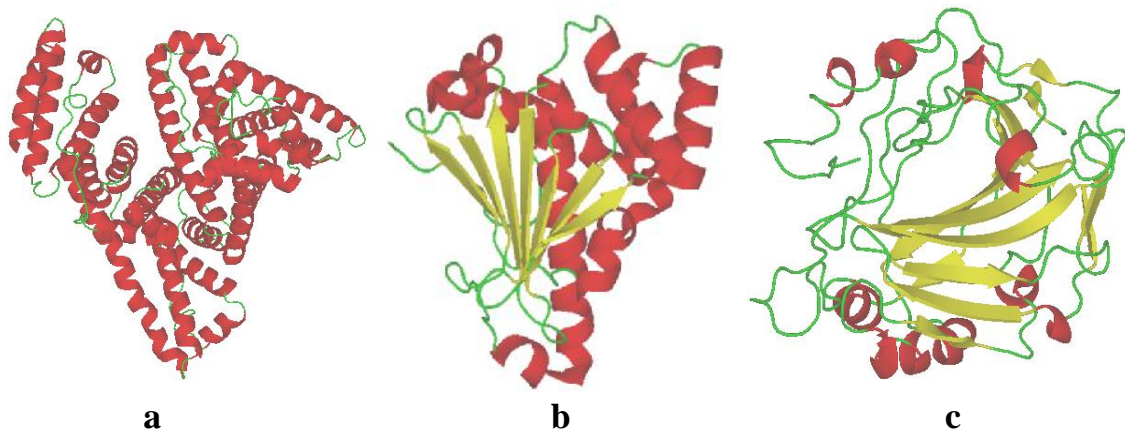
Siekiant įgyvendinti darbo tikslą, reikėjo įvykdyti **darbo uždavinius**:

- 1) nustatyti sąlygas, prie kurių matuojant stacionarią fluorescenciją aukštame slėgyje iki 4000 atm galima stebėti pasirinktų baltymų išsivyniojimo tranzicijas;
- 2) nustatyti pasirinktų baltymų - ligandų jungimosi parametrus slėgio poslinkio fluorescencijos metodu;
- 3) nustatyti, kaip aukštas slėgis keičia rhCAI ir rhHsp90N denatūraciją aukšta temperatūra;
- 4) nustatyti, kaip aukštas slėgis keičia pasirinktų baltymų - ligandų jungimosi konstantą.

## 1. LITERATŪROS APŽVALGA

### 1.1 HSA, rhCAI, Hsp90 struktūros ir jungimasis su ligandais

Žmogaus serumo albuminas yra labiausiai paplitęs tirpus baltymas žmogaus organizme. Jo pagrindinė fiziologinė funkcija organizme yra transportuoti įvairius anijonus įskaitant ir laisvąsias riebalų rūgštis (Saifer and Goldman 1961). Daugiausia jo randama kraujo serume, limfoje, garuojančių audinių paviršiuje, ląstelių audinių skystyje, ir kituose gyvo organizmo skysčiuose. Žmogaus serumo albuminas sudarytas iš vienos 585 a.r. 66,5 kDa grandinės, kuri susivyniodama sudaro 28  $\alpha$ -spirales (67 % visų a.r. liekanų), sujungtas kilpomis (1 pav. a). Struktūra sutvirtinta 17 difulfidinių tiltelių (Peters 1996). Nemažai žinoma apie struktūroje išskiriamų trijų domenų struktūrinius pokyčius, baltymą veikiant cheminiais reagentais. Baltymo paviršius vandenyje beveik lygiom dalim sudarytas iš hidrofobinių ir hidrofilinių amino rūgščių.



**Pav. 1.** a) Žmogaus serumo albumino (HSA, pdb: 1AO6) b) žmogaus karščio šoko baltymo 90 N-galio domeno (Hsp90N, pdb: 2CCS) ir c) žmogaus pirmosios karboanhidrazės (hCAI, pdb: 1AZM) tretinės struktūros. Struktūrų paveikslai paruošti PyMol programa.

Žmogaus serumo albuminas struktūriškai ir funkciškai labai gerai ištyrinėtas baltymas, tačiau iki šiol mažai kas žinoma apie šio baltymo nuo slėgio priklausomus parametrus. Viename šaltinyje nagrinėjamas adiabatinio suspaudžiamumo koeficiento ir dalinio specifinio tūrio priklausomybė nuo ligando koncentracijos (Barbosa S., Taboada P. et al. 2003). Buvo nagrinėta HSA atskirų domenų denatūracija aukštu slėgiu ir urėja nustatant, kad trečiąjį domeną galima denatūruoti slėgiu iki 400 MPa, kai pirmajame ir antrajame domenuose nepastebėti struktūriniai pokyčiai (Tanaka, Nishizawa et al. 1997).

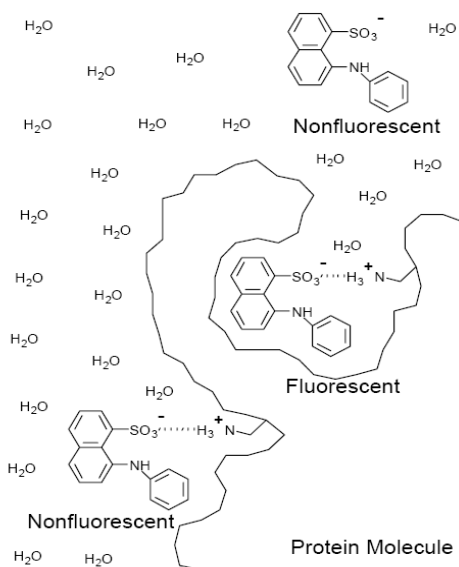
Karščio šoko baltymas 90 (Hsp90, angl. k., heat shock protein 90) yra 90 kDa šaperonas, apsaugantis naujai ekspresuotus baltymus „klientus“ nuo klaidingo susisukimo, agregacijos ir tarpusavio sąveikos. Normaliomis sąlygomis Hsp90 sudaro 1-2% ląstelėje esančių baltymų, tačiau streso sąlygomis, jų kiekis padvigubėja. Padidėjusi šių baltymų ekspresija audiniuose, kurie atakuojami karščiu, sunkiaisiais metalais, padidėjusiu rūgštingumu, deguonies trūkumu, padidina ląstelių išlikimą. Hsp90 padeda išlikti ne tik sveikom bet ir piktybinėm (vėžinėm) ląstelėm. Hsp90 vėžinėse ląstelėse pasižymi dideliu ATP- aziniu aktyvumu. Hsp90 sudarytas iš trijų domenų: C – galinio, vidurinio ir N – galinio. N – galinis domenas pasižymi ATP – aziniu aktyvumu ir košaperoninų jungimusi. Jis turi specifinį ATP jungimosi centrą prie kurio gali jungtis struktūriškai nepanašūs natūralūs ligandai: geldanamycinas ir radisikolis, pusiau sintetiniai ir sintetiniai junginiai. Šios medžiagos jungdamos stipriau nei natūralūs nukleotidai, sustabdo ATP jungimąsi ir tokiu būdu keičia natūralias baltymo funkcijas. N – galinis domenas sudarytas iš  $\alpha$  – spiralių ir  $\beta$  – klostės, sudarytos iš 7 antilygiagrečių  $\beta$  – grandinių (Pav. 1 b). Labai gerai ištyrinėtas šio domeno jungimasis su radisikoliu, tačiau neatlikta jokių tyrimų kaip aukštas slėgis gali įtakoti šį jungimąsi.

Karboanhidrazės yra fermentai katalizuojantys anglies dvideginio vartimą angliarūgšte grįžtamąją reakciją. Jų aktyvumą slopina sulfonamidiniai junginiai. Žinduoliuose išskiriama 14 skirtingų karboanhidrazių izoformų (Pastorekova, Casini et al. 2004). Pirmoji žmogaus karboanhidrazė (hCAI) yra citoplazminis fermentas sudarytas iš  $\beta$  – klostės, keleto trumpų spiralių ir didelės nestruktūrizuotos dalies (Pav. 7 c). Nors CAI struktūriškai ir funkciškai gerai ištyrinėtas baltymas, bei daug žinoma apie šio baltymo jungimąsi su sulfonamidiniais slopikliais, tačiau niekad nenagrinėtas aukšto slėgio poveikis CAI struktūriniais pokyčiams ir CAI – ligandų jungimuisi.

## **1.2 ANS jungimasis ir fluorescencija**

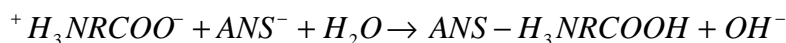
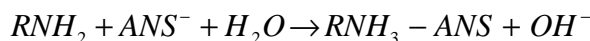
ANS (8-anilino-1-naftaleno sulfonatas) yra fluorescuojantis dažas, naudojamas baltymų ir biologinių membranų tyrimuose. Kalorimetriniu metodu buvo nustatyta, kad ANS jungiasi prie baltymo katijoninių grupių (His, Arg, Lys) sudarydami jonų poras. ANS anijonai prie baltymų jungiasi dviem būdais: 1) aplinkoje,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

Kalorimetriškai buvo nustatytas, ANS jungimasis prie jaučio kraujo serumo albumino (BSA), kuris labai panašus į vėliau nustatytą, bet nepublikuotą ANS jungimąsi prie bCAII. BSA turi 100 ANS prisijungimo centrų, iš kurių 5 apsupti hidrofobinės aplinkos ir 95 – vandens. Aplinkos dielektrinė skvarba, įtakoja ANS fluorescenciją, todėl hidrofobinėje terpėje ANS fluorescuoja stipriau, nei vandenyje. Kintant terpės, pH nuo 4 iki 2, baltyme padidėja atitinkamai nuo 4 iki 12 ANS jungimosi centrų, kuriuos supa hidrofobinė aplinka. Dėl šios priežasties tirpalo, fluorescencija išauga.



**Pav. 2.** Du ANS prisijungimo prie baltymo būdai. Prisijungęs ANS gali fluorescuoti arba ne fluorescuoti. Fluorescenciją nulemia terpė supanti anilino naftaleno grupę. Jei šią grupę supa vanduo, tai ANS beveik ne fluorescuoja, jei hidrofobinė terpė, tai ANS fluorescencija intensyvi (Matulis, Baumann et al. 1999).

ANS anijonai, prisijungę prie baltymo vandens apsuptyje, veikia kaip matricą formuojantys ir baltymą apsaugantys junginiai, ir vadinami matriciniais ligandais. Šie ligandai pasižymi stipriai jungimusi, kuris sukelia baltymo konformacinius pokyčius ir apsaugą. Matriciniai ligandai prisijungę prie baltymo sukelia terpės pH padidėjimą, todėl padidėja baltymo lydymosi temperatūra ( $T_m$ ). Minėtas pH padidėjimas įvyksta dėl ANS anijonų prisijungimo prie baltymo teigiamai įkrautų šoninių grandinių arba karboksilo grupių protonizacijos:



Baltymo molekulė, stengdamasi neutralizuoti sutrikdytą krūvių pusiausvyrą, iš hidrolizuoto vandens prisijungia protonų, bet nepaisant to, baltymas lieka įkrautas neigiamai, nes vandenilio



jonų prisijungia dvigubai mažiau nei ANS anijonų. Sumažėjus elektrostatiniai stūmos jėgai tarp teigiamų krūvių, molekulė susitraukia (Matulis, Baumann et al. 1999).

### 1.3 Baltymų temperatūrinis stabilumas, $T_m$ ir ligandų jungimasis

#### 1.3.1 Baltymų temperatūrinis stabilumas ir $T_m$

Tiriant baltymų temperatūrinį stabilumą, didinant temperatūrą, matuojami baltymo struktūrą įtakojantys parametrai. Temperatūra pilnai denatūravus baltymą, iš išsivyniojimo tranzicijos galima nustatyti baltymo lydymosi temperatūrą ( $T_m$ ), kuriai esant baltymo išsivyniojimo grįžamoji reakcija yra pusiausvyros būsenoje, kurioje natyvaus ir išsisukusio baltymo struktūrų, laisvosios energijos yra lygios ( $\Delta G = G_U - G_N = 0$ , čia  $G_U$  – išsisukusios ir  $G_N$  - natyvios baltymo būsenų laisvosios energijos).

Baltymo lydymosi temperatūros nustatymui yra sukurta nemažai metodų (kalorimetriniai, optiniai). Vienas iš optinių baltymo stabilumo ir  $T_m$  nustatymo metodų yra fluorescencinis. Šiuo metodu matuojamas baltymo temperatūrinis stabilumas, stebint baltymo struktūroje esančio triptofano arba prikabintų dažų (pvz. ANS) fluorescenciją. Stebima fluorescencija gali būti apibūdinama lygtimi:

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

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

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

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

Čia  $y_{F,T_m}$  ir  $y_{U,T_m}$  yra natyvaus ir išsivyniojusio baltymo (arba prisijungusio florescuojančio dažo) fluorescencija lydymosi temperatūros taške,  $m_U$  ir  $m_F$ , atitinkamai, denatūravusio ir natyvaus baltymo fluorescencijos koeficientai priklausantys nuo tiesinės temperatūros (jų pokytis keičia tiesių  $y_{F(T)}$  ir  $y_{U(T)}$  pokrypio kampa).

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

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

Čia  $T_r$  yra baltymo lydimosi temperatūra ( $T_m$ ), kai tirpale nėra ligando,  $T$  – absoliutinė temperatūra. Pateiktoje lygtyje tariama, kad šiluminė talpa, esant mažam temperatūriniam pokyčiui, nepakinta.

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

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

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

### 1.3.2 Baltymų – ligandų jungimosi nustatymas

Klasikinis metodas nustatyti ligandų jungimosi giningumą yra tiriant jų poveikį baltymų stabilumui, veikiant denatūraciją sukeliančiais cheminiais junginiais arba aukšta temperatūra. Šis būdas tirti baltymų stabilumą yra patogus dėl pakankamai gerai iširtos cheminės ir terminės baltymų denatūracijos ir sukurtų ši reiškinį aiškinančių modelių. Surinktus duomenis galima nagrinėti reakcijų pusiausvyros ar kinetikos aspektais.

D. Matulis ir kiti (Matulis, Kranz et al. 2005), bei P. Cimperman ir k.t (Cimperman, Baranauskienė et al. 2008) nagrinėjo kaip prisijungę ligandai paslenka baltymo išsivyniojimo reakcijos pusiausvyrą ir išvedė baltymo – ligando jungimosi nustatymą apibūdinančias lygtis. Prie natyvaus baltymo prisijungę ligandai, paslenka grįžtamosios denatūravusio – natyvaus baltymo reakcijos pusiausvyrą natyvaus baltymo susidarymo kryptimi:



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

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

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

Reiktų paminėti, kad  $\Delta G_{(T)} = 0$ , kai  $T = T_m$ , tuomet  $\Delta_U G_{T_m} = -RT \ln(1 + K_b [L_t])$ . Pusiausvyros konstantas, kurios nusako balymo stabilumą ir ligando jungimąsi, (7) lygtyje, galima išreikšti laisvosiomis energijomis :

$$K_{U_{T_m}} = \frac{[U]}{[N]} = e^{\frac{-\Delta_U G_{(T_m)}}{RT_m}} = e^{-(\Delta_U H_{(T_m)} - T_m \Delta_U S_{(T_m)})/RT_m} = e^{-(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))/RT_m} \quad (9)$$

$$K_{b_{T_m}} = \frac{[NL_b]}{[N][L]} = e^{\frac{-\Delta_b G_{(T_m)}}{RT_m}} = e^{-(\Delta_b H_{(T_m)} - T_m \Delta_b S_{(T_m)})/RT_m} = e^{-(\Delta_b H_{T_0} + \Delta_b C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_b S_{T_0} + \Delta_b C_p \ln(T_m/T_0)))/RT_m} \quad (10)$$

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

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

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

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

Naudojant 11, 12, 9 ir 10 lygtis, galima išreikšti bendrą ligando koncentraciją ( $L_t$ ):

$$L_t = (K_{U_{T_m}} - 1) \left( \frac{P_t}{2K_{U_{T_m}}} + \frac{1}{K_{b_{T_m}}} \right) \quad (13)$$

Perrašant šią lygtį pasinaudojus 9 ir 10 lygtimis galima išreikšti bendrą ligando koncentraciją ( $L_t$ ) reikalingą padidinti balymo lydymosi temperatūrą nuo  $T_r$  (kai tirpale nėra ligando) iki  $T_m$  (esant ligando):

$$L_t = \left( e^{-\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))}{RT_m}} - 1 \right) \times \left[ \frac{P_t}{2} \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_U H_{T_r} + \Delta_U C_p (T_m - T_r) - T_m (\Delta_U S_{T_r} + \Delta_U C_p \ln(T_m/T_r)))}{RT_m}}} + \frac{1}{e^{-\frac{(\Delta_{bN} H_{T_0} + \Delta_{bN} C_p (T_m - T_0) - T_m (\Delta_{bN} S_{T_0} + \Delta_{bN} C_p \ln(T_m/T_0)))}{RT_m}}} \right] \quad (14)$$

Šia lygtimi modeliuojant  $T_m$  priklausomybę nuo ligando koncentracijos nustatomi baltymo – ligando jungimosi parametrai.

#### 1.4 Aukšto slėgio įtaka baltymams ir jungimuisi su ligandais

Baltymų stabilumas priklauso nuo temperatūros, slėgio, hidratacinės talpos ir tirpiklio savybių (Mitra, Smolin et al. 2006). Jau senokai žinoma, kad aukštas slėgis denatūroja baltymus ir įtakoja reakcijos pusiausvyrą. Slėgis pakeičia reakcijos pusiausvyrą į mažesnio tūrio sistemos būseną (Boonyaratanakornkit, Park et al. 2002). Dažniausiai uždaroje sistemoje kintant slėgiui, kinta ne tik tūris, bet ir suspaudžiamumas, kuriuo galima apibūdinti sistemos savybes. Šiame skyrelyje bus kalbama apie tūrio ir suspaudžiamumo pokyčius baltymus veikiant aukštu slėgiu, slėgio įtaką baltymų temperatūriniam stabilumui ir baltymų - ligandų sąveikos fizikinį modelį, esant aukštam slėgiui.

##### 1.4.1 Tūrio pokyčiai denatūruojant baltymus

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

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

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

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

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

$\Delta V_{hidratacijos}$  yra tirpalo tūrio pokytis, atsirandantis dėl tirpinio (pvz. baltymo molekulių) sąveikos su tirpikliu.  $V_{ertmių}$  – susivyniojusio baltymo struktūroje esančios tuščios ertmės.

Tirpalą veikiant slėgiu arba temperatūra,  $V_{atomų}$  nekinta, todėl tirpalo suspaudžiamumas ir plėtimasis priklauso nuo  $V_{ertmių}$  ir  $\Delta V_{hidratacijos}$ . Kiekvieno iš pastarųjų narių indelį į suspaudžiamumo koeficiento reikšmę sunku įvertinti, todėl daromos prielaidos, kurias sunku patikrinti eksperimentiškai (Heremans and Smeller 1998). Ultragarsiniu tyrimo metodu yra nustatomas pilnas molinis tūris, kuomet kitais metodais (spektroskopiniais, BMR, Rentgeno spindulių kristalografija) galima nustatyti tik lokalius, įvykstančius baltymo viduje, tūrio pokyčius. Baltymo tirpalą veikiant slėgiu, tūrio pokytis atsiranda dėl molekulėse esančių vidinių ertmių. Šis tūrio pokytis yra gana mažas, siekiantis apytiksliai 1% viso baltymo tūrio. Baltymų išsivyniojimo reakcijos aukštame slėgyje tūrio pokytis yra neigiamas.

Eksperimentais su stafilokoko nukleazės mutantais buvo parodyta, kad aktyvacijos ir pusiausvyros tūrių pokyčiai nepriklauso nuo guanidino koncentracijos.

#### 1.4.2 Tūrio pokyčiai ligandams jungiantis prie baltymų

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

$$\Delta V = - \frac{RT d \ln K_L}{dp} \quad (31)$$

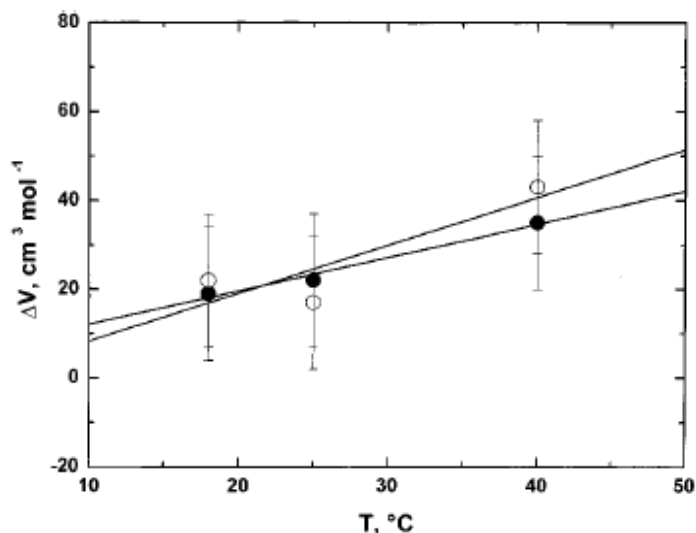
čia  $K_L$  – ligando jungimosi pusiausvyros konstanta.

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

$$\Delta V_D = \left( \frac{\partial T_m}{\partial P} \right) \frac{\Delta H_{vH}}{T_m} \quad (32)$$

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

$$\Delta V = \Delta V_D(P) - \Delta V_D(PL) \quad (33)$$



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

Pirmieji tūrio pokyčiai jungiantis deguoniui ir etilizocianatui prie ferohemoglobino buvo atlikti, nustatant aukšto hidrostatinio slėgio įtaką jungimosi konstantai (Suzuki 1972). Iš jos apskaičiuoti ligandų jungimosi tūrio pokyčiai: deguonies  $\Delta V=0$ , etilizocianato  $\Delta V= -23$  ml/mol. Eksperimentais su ribonukleazės A ir dviem prie jos besijungiančiais ligandais (3-CMP, 2-CMP) buvo parodyta jungimosi tūrių pokyčių priklausomybė nuo temperatūros (3 pav.) (Dubins, Filfil Jr. et al. 2000). Prie didesnės temperatūros ligandų jungimosi tūrių pokyčiai yra didesni. Jungiantis 2'-CMP prie ribonukleazės A,  $\Delta V$  padidėja nuo  $19 \pm 15 \text{ cm}^3 \times \text{mol}^{-1}$ , esant  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  iki  $35 \pm 15 \text{ cm}^3 \times \text{mol}^{-1}$ , esant  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ , ir jungiantis 3'-CMP,  $\Delta V$  padidėja nuo  $22 \pm 15 \text{ cm}^3 \times \text{mol}^{-1}$ , esant  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  iki  $43 \pm 15 \text{ cm}^3 \times \text{mol}^{-1}$ , esant  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  (Prehoda, Mooberry et al. 1998; Dubins, Filfil Jr. et al. 2000).

### 1.4.3 Suspaudžiamumas

Vienas iš svarbių parametrų apibūdinčių tiriamos terpės savybes yra jos suspaudžiamumas. Jis parodo sistemos kompaktiškumą ir hidrataciją. Tiriamos sistemos gali būti apibūdinamos adiabatiniu ir izoterminiu suspaudžiamumais (Chalikian 2003). Izoterminis sistemos suspaudžiamumas ( $K_T$ ) apibūdinamas, kaip tūrio pokytis, dėl pakitusio slėgio, esant pastoviai temperatūrai (Taulier and Chalikian 2002):

$$K_T = b_T V_i = - \left( \frac{\partial V_i}{\partial P} \right)_T \quad (18)$$

Čia  $T$  yra absoliuti temperatūra,  $b_T = -V_i^{-1}(\partial V_i / \partial P)_T$  – izoterminio suspaudžiamumo koeficientas. Analogiškai išreškiamas ir adiabatinis suspaudžiamumas, esant pastoviai entropijai:

$$K_S = b_S V_i = -\left(\frac{\partial V_i}{\partial P}\right)_S \quad (19)$$

Kur  $S$  – entropija,  $b_S = -V_i^{-1}(\partial V_i / \partial P)_S$  - adiabatinio suspaudžiamumo koeficientas.

Ryšys tarp suspaudžiamumo koeficientų išreiškiamas lygtimi:

$$b_T = b_S + \frac{a^2 T}{r C_p} \quad (20)$$

Čia  $a = -V_i^{-1}(\partial V_i / \partial T)_P$  - temperatūrinio plėtimosi koeficientas,  $\rho$  – tankis,  $C_p$  – specifinė šiluminė talpa prie pastovaus slėgio,  $T$  – temperatūra. Buvo atlikta daugybė skaičiavimų, siekiant įvertinti globulinių baltymų suspaudžiamumą. Įvertintos baltymų vidinės struktūros suspaudžiamumo koeficientų vertės ( $\beta_T, \beta_S$ ) skirstosi nuo  $1 \times 10^{-7}$  iki  $3 \times 10^{-7} \text{ bar}^{-1}$ . Skirtumas tarp baltymų izoterminio ir adiabatinio suspaudžiamumo koeficientų yra skaičiavimo paklaidų ribose, todėl jų verčių negalima griežtai atskirti (Taulier and Chalikian 2002).

Lentelėje 1 pateikta keletas izoterminio suspaudžiamumo koeficiento verčių. Neigiamas aminorugščių suspaudžiamumas susidaro dėl tirpinio – tirpiklio sąveikos pokyčių. Tūščios ertmės (susidarančios dėl baltymo netobulo susivyniojimo) baltymo natyvioje struktūroje kompensuoja neigiamą aminorugščių suspaudžiamumą, todėl baltymo suspaudžiamumas yra teigiamas (Heremans and Smeller 1998). Čia šiek tiek skiriasi baltymų suspaudžiamumo koeficiento reikšmės, nei pateiktos Taulier ir Chalikian, kur  $\beta_T$  gali būti nuo 10 1/Mbar iki 30 1/Mbar (Taulier and Chalikian 2002).

**Lentelė 1.** Keletas izoterminio suspaudžiamumo koeficiento verčių (Heremans and Smeller 1998)

	$\beta_T, 1/\text{Mbar}$
Vanduo	45,8
Amino rūgštys	nuo -0,28 iki -0,62
Baltymai	2 – 15
Baltyme esančių ertmių	250

Atliekant skysčio (tirpalo, tirpiklio) tankio ( $\rho$ ) ir ultragarso greičio ( $U$ ) matavimus, adiabatinių suspaudžiamumo koeficientą ( $\beta_S$ ) galima nustatyti, naudojant Niutono-Laplaso lygtį:

$$b_s = r^{-1}U^{-2} \quad (21)$$

Gekko ir Hasegawa (Gekko and Hasegawa 1986) pagal adiabatinio suspaudžiamumo temperatūrinę priklausomybę apskaičiavo baltymo struktūroje esančias tuščias ertmes ir hidrataciją. Kylant temperatūrai jaučio serumo albumino ir lizozimo adiabatinis suspaudžiamumas mažėjo. Žemoje temperatūroje sumažėjęs suspaudžiamumas buvo interpretuotas kaip baltymo molekulėje esančių ertmių sumažėjimas. Glicildipeptido adiabatinio suspaudžiamumo padidėjimas (tapimas mažiau neigiamu), dėl pakilusios temperatūros, buvo interpretuotas kaip vandens ir jo apsuptų įkraudų galinių grupių elektrostrikcijos sumažėjimas (Heremans and Smeller 1998).

Baltymai tirpiklyje gali būti apibūdinami daliniu moliniu ( $K^o$ ) ir specifiniu daliniu moliniu ( $k^o$ ) suspaudžiamumais. Izoterminis ir adiabatinis daliniai moliniai suspaudžiamumai išreiškiami, priklausomybėmis:

$$K_T^o = \left( \frac{\partial K_T}{\partial N} \right)_{T,P} \quad (22)$$

$$K_S^o = \left( \frac{\partial K_S}{\partial N} \right)_{T,P} \quad (23)$$

kur  $N$  – tiriamos medžiagos (tirpinio) kiekis moliais. Norint palyginti skirtingos molekulinės masės ( $M$ ) baltymus, naudojamas dalinis specifinis izoterminis  $k_T^o = K_T^o / M$  ir dalinis specifinis adiabatinis  $k_S^o = K_S^o / M$  suspaudžiamumai.

Dalinis molinis adiabatinis suspaudžiamumas ( $K_S^o$ ) gali būti nustatomas skirtinguose tirpaluose, matuojant jų tankį ir ultragarso greitį. Žinant  $K_S^o$  galima apskaičiuoti dalinį molinį izoterminį suspaudžiamumą  $K_T^o$  (Chalikian 2003). Izoterminio suspaudžiamumo pokytį ( $\Delta K_T$ ), susijusį su slėgio įtakojama tranzicija, galima nustatyti ne tik iš tankio ir garso greičio matavimo, bet ir iš spektroskopinių duomenų (Heremans and Smeller 1998; Prehoda, Mooberry et al. 1998). Spektroskopiniai metodai (pvz. liuminescenciniai) leidžia įvertinti suspaudžiamumą baltymo viduje, kuris yra skirtingas nei nustatytas ultragarsiniais metodais. Liuminescenciniais metodais yra matuojami atstumo pokyčiai, tarp baltymo molekulėje esančių atomų. Šie pokyčiai atsiranda dėl vidinių baltymo ertmių suspaudžiamumo, kuomet ultragarsiniais matavimais aptinkami ne tik vidiniai baltymo plyšiai, bet ir hidratacija (Heremans and Smeller 1998).



Daliniu specifiniu adiabatiniu suspaudžiamumu, galima apibūdinti baltymų tarpines būsenas (Chalikian and Breslauer 1996). Jis sudarytas iš teigiamo baltymo molekulės ( $k_M$ ) ir neigiamos hidratacijos ( $k_h$ ) suspaudžiamumo dedamųjų:

$$k_s^o = k_M + k_h \quad (24)$$

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

$$k_M = \frac{b_M V_M}{M} \quad (25)$$

$M$  – baltymo molekulinė masė.

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

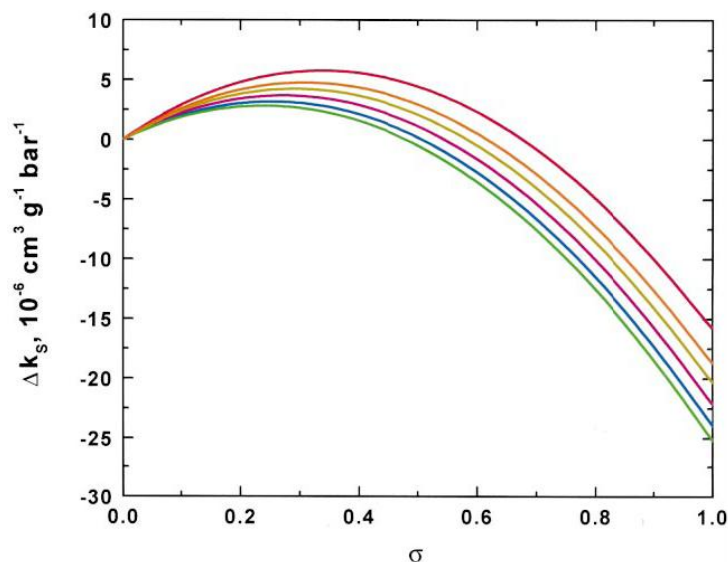
$$k_h = M^{-1} \sum_i S_{Ai} K_{Si} \quad (26)$$

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

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

Globuliniams baltymams,  $\sum_i S_{Ai} K_{Si}$  narys yra neigiamas, o atskirų a.r. liekanų  $K_{Si}$  ženklas

priklauso nuo eksperimento sąlygų ir tiriamo a.r. liekanos tipo. (Taulier and Chalikian 2002)



**Pav. 4.** Skirtingos molekulinės masės baltymų, teoriškai apskaičiuoto specifinio adiabatinio suspaudžiamumo pokyčio ( $\Delta k_s$ ) kitimas baltymui denatūruojant ( $\sigma$  – denatūracijos laipsnis). Sumodeliuotose kreivėse einant nuo viršutinės kreivės link apatinės, skaičiavimams buvo naudota baltymų molekulinė masė atitinkamai: 0 kDa

(raudona), 15 kDa (oranžinė), 20 kDa (geltona), 30 kDa (rožinė), 50 kDa (mėlyna) ir 80 kDa (žalia). (Taulier and Chalikian 2002)

Spektroskopiniais slėginės baltymų denatūracijos eksperimentais nustatyti, specifiniai daliniai baltymo išsivyniojimo suspaudžiamumo pokyčiai ( $\Delta k_T$ ) yra teigiami (išskyrus metmioglobina) (lentelė 2). Tai reiškia, kad išsisukusio baltymo specifinis dalinis suspaudžiamumas yra didesnis, nei natyvaus baltymo. Tokių duomenų paaiškinimui, buvo iškeltos kelios hipotezės, kurių pagrindinė mintis, kad šiuose eksperimentuose galėjo būti aptiktos tarpinės išsivyniojimo būsenos, kaip tirpstančios globulės būsenos, o modeliai pagal kuriuos skaičiuotas  $\Delta k_T$  aprašo slėginę baltymų denatūraciją, be tarpinių būsenų. (Taulier and Chalikian 2002)

**Lentelė 2.** Skirtingų baltymų slėginės baltymų denatūracijos specifiniai suspaudžiamumų pokyčiai, tarp natyvaus ir išsivyniojusio baltymo (Taulier and Chalikian 2002). Iš minėto šaltinio paimtoje lentelėje pridėtas papildomas stulpelis, kai slėgio vienetai perskaičiuoti į  $\text{cal/cm}^3$  priiman, kad  $1 \text{ bar} = 1 \text{ atm} = 1/41 \text{ cal/cm}^3$  (Hawley 1971)

Baltymas/slėginė tranzicija	$\Delta k_T, 10^{-6} \text{ cm}^3/(\text{g} \times \text{bar})$	$\Delta k_T, 10^{-6} \text{ cm}^6/(\text{g} \times \text{cal})$
Ribonukleazė A (pH=2-4, T=20-50 °C)	0,7-1,5	28,7 – 61,5
Chimotripsinogenas (pH=2.07, T=0 °C)	1,2	49,2
Metmioglobinas (pH=4-6, T=20 °C)	-0,2	-8,2
Ribonukleazė A (pH=2, T= 22°C)	1,1	45,1
Stafilokoko nukleazė (pH=7, T=45 °C)	2,4	98,4
Stafilokoko nukleazė (pH=5,3, T=24 °C)	0,9	36,9

#### 1.4.4 Metastabilios būsenos formavimasis, veikiant baltymus slėgiu

Veikiant baltymą slėgiu, galima stebėti išsivyniojančio baltymo tarpines, metastabilias būsenas, kurių negalima aptikti kitais metodais. Jos gali atitikti trumpalaikes tarpines būsenas, vykstant baltymo susivyniojimo procesui. Su daugeliu literatūroje aprašytų tirtų baltymų: apolipoproteinu A-I, arc represoriumi, apomioglobinu,  $\alpha$ -laktalbuminu, kreatino kinaze ir modeliniu trim spiralėm surištu baltymu, esant aukštam slėgiui buvo aptiktos tarpinės būsenos, pavadintos besilydančiąja globule (angl. molten globule). Ši būsenos pasižymi mažesne išsivyniojimo energija, nei pilnai išsivyniojęs baltymas. Ji nustatyta aukštą slėgį kombinuojant su įvairia (priklausomai nuo baltymo stabilumo) guanidino (Gnd) koncentracija. Pavyzdžiui, eksperimentais su žmogaus apolipoproteinu A-I nustatyta slėgiu veikiamo baltymo energijos būsenos, mažesnė nei baltymą denatūruojant 2M Gnd (Mantulin and Pownall 1985).

Atlikti slėginiai eksperimentai su lizocimu, naudojant skirtingas Gnd koncentracijas ir temperatūrą, leidžia manyti, kad lizocimas, esant tam tikroms sąlygoms, linkęs pereiti į nepilno susivyniojimo būseną (Sasahara and Nitta 1999). Kreatino kinazės 43 kDa dimeras tampa nebeaktyvus prie 1,5 katm, o prie 6,5 katm slėgio arba 0,8 M Gnd (prie normalaus atmosferos slėgio) pereina į dalinai susivyniojusio baltymo būseną. Baltymui denatūruoti, reikia 1,5 M Gnd ir slėgio iki 6,5 katm (Zhou, Zhu et al. 2000).

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

#### **1.4.5 ANS - baltymų jungimasis, esant aukštam slėgiui**

Veikiant baltymus slėgiu, hidrofobinių grupių išsisukimą į vandenį galima stebėti naudojant hidrofobinį dažą ANS. Stebint fluorescencijos intensyvumo spektrus, mažinant suslėgto baltymo ir ANS tirpalo slėgį, buvo pastebėtas ANS prisijungimo negrįžtamumas. Atlikti fluorescenciniai - slėginiai eksperimentai su laukinio tipo rekombinantine žmogaus acetilcholinesteraze (rHuAChE) ir jos mutantais su prisijungusiu ANS parodė skirtingą baltymų atsparumą slėgiui. Parodyta, kad slėgis stabilizuoja ANS – baltymo kompleksą. Fluorescenciniuose eksperimentuose rHuAChE mutantas su pakeistomis šešiomis aminorūgštimis buvo nejautrus slėgiui, tačiau atlikus elektroforezės slėginius eksperimentus pastebėtas skirtingas mutanto atsparumas slėgiui, esant ir nesant ANS. ANS stabilizavo aukštu slėgiu veikiamo baltymo struktūrą (Clery-Barraud, Ordentlich et al. 2002).

#### **1.4.6 Slėginio ir temperatūrinio baltymų stabilumą palyginimas**

Aukštas hidrostatinis slėgis ir temperatūra yra silpnųjų sąveikų antagonistai. Dažniausiai aukštas slėgis stabilizuoja silpnąsias sąveikas, o aukšta temperatūra jas destabilizuoja. Tačiau, jei

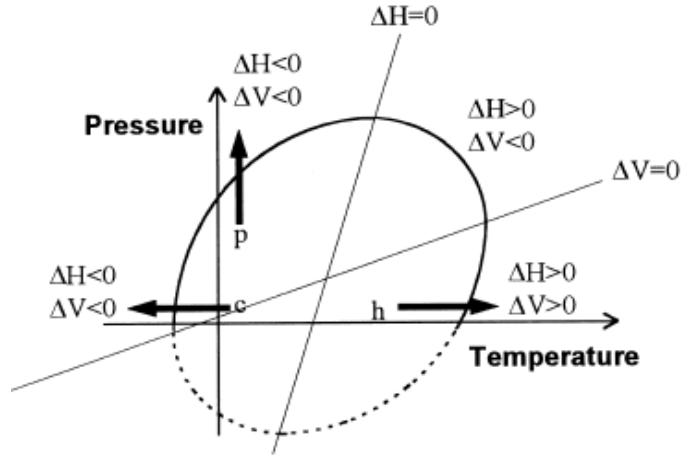
formuojantis hidrofobinei ar elektrostatinei sąveikai įvyksta teigiamas tūrio pokytis, tai ši sąveika slėgiu yra destabilizuojama (Heremans 1982; Mozhaev, Heremans et al. 1996), o temperatūra stabilizuojama. Aukštas slėgis neįtakoja vandenilinių jungčių formavimosi, tačiau temperatūros poveikis nėra palankus šių jungčių susidarymui. Slėgiu stabilizuojamos aromatinių žiedų Stekingo ir krūvių persitvarkymo sąveikos (Mozhaev, Heremans et al. 1996).

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

Slėgio poveikis sukelia sistemos tūrio kitimus, o temperatūra - tūrio ir šiluminės energijos kitimus. Slėgiu denatūruojant baltymus, suspaustas vanduo patenka į baltymo šerdies tuščias ertmes, dėl to pasikeičia baltymo struktūra, bet kompaktiška forma - išlaikoma. Baltymą veikiant temperatūra, jo hidrofobinės grupės atsiveria į vandenį (Lesch, Stadlbauer et al. 2002). Su daugeliu baltymų buvo nustatytas slėginės ir cheminės denatūracijos grįžtamumas, o temperatūra baltymai, dėl agregatų susidarymo, beveik visada denatūruojami negrįžtamai.

#### **1.4.7 Grįžtamos ir negrįžtamos baltymų denatūracijos fazių diagrama**

Baltymams būdinga slėgio – temperatūros (P – T) plokštumoje egzistuojanti elipsinė fazių diagrama. Matematiškai elipsės formą nulemia antros eilės nariai, kurie naudojami aprašant  $\Delta G$  ( $\Delta G = G_D - G_N$ ). Fizikiniu požiūriu, antros eilės nariai yra proporcingi suspaudžiamumo, šiluminės talpos ir šiluminio plėtimosi pokyčiams (atitinkamai  $\Delta\beta$ ,  $\Delta C_p$ ,  $\Delta\alpha$ ) tarp natyvaus (N) ir denatūravusio (D) baltymo. Laisvosios energijos pokytį ( $\Delta G$ ) tarp D ir N galima išreikšti lygtimi (Heremans and Smeller 1998):



**Pav. 5.** Baltymų stabilumo diagrama. Elipsės viduje yra sąlygos prie kurių, baltymas daugiau panašus į natyvų, išorėje – į denatūravusį. Rodyklėmis parodytos dažniausiai naudojamos baltymų denatūracijos (slėginiu (P), šalčiu (C) ir karščiu (h)) ir jų kryptys (Heremans and Smeller 1998)

$$\Delta G = \Delta G_0 - \Delta S_0(T - T_0) - \frac{\Delta C_p}{2T_0}(T - T_0)^2 + \Delta V_0(p - p_0) + \frac{\Delta \hat{b}}{2}(p - p_0)^2 + \Delta \hat{a}(p - p_0)(T - T_0) \quad (27)$$

Čia  $\Delta \hat{b}$  suspaudžiamumo ( $\hat{b} = bV$ ) ir  $\Delta \hat{a}$  šiluminio plėtimosi ( $\hat{a} = aV$ ) faktorių pokyčiai tarp denatūravusio ir natyvaus baltymo. Juos ir  $\Delta C_p$  galima išreikšti lygtimis:

$$\Delta \hat{a} = \left( \frac{\partial \Delta V}{\partial T} \right)_p = \left( \frac{\partial \Delta S}{\partial p} \right)_T \quad (28)$$

$$\Delta \hat{b} = \left( \frac{\partial \Delta V}{\partial P} \right)_T \quad (29)$$

$$\Delta C_p = T \left( \frac{\partial \Delta S}{\partial T} \right)_p \quad (30)$$

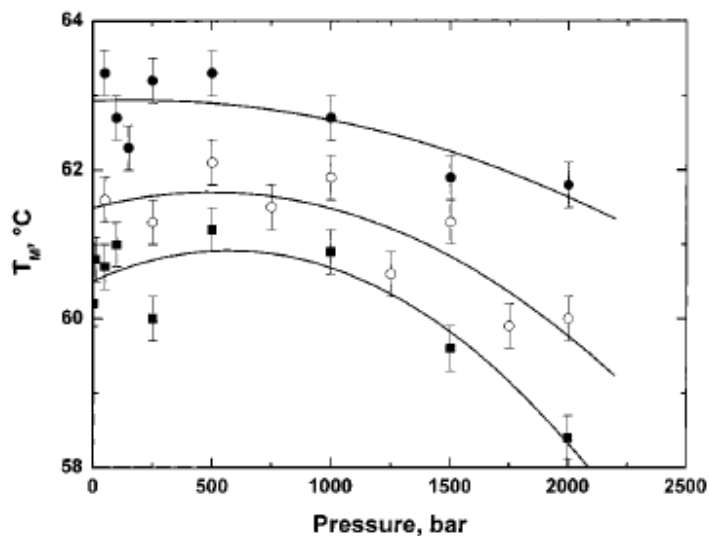
Kreivė bus elipsė, kai 27 lygtyje koeficientai:  $-\hat{a} > \Delta C_p \Delta \hat{b} / T_0$ . Šios sąlygos parodo, kad  $\Delta \beta$  ir  $\Delta C_p$  turi būti priešingų ženklų. Iš 24 lygties galima nustatyti suspaudžiamumo, šiluminio plėtimosi ir šiluminės talpos pokyčius tarp natyvaus ir išsisukusio baltymo (Meersman, Dobson et al. 2006).

Kai  $\Delta G=0$ , kreivė  $P$ - $T$  plokštumoje yra elipsė, išreiškianti baltymo išsisukimo reakcijos pusiausvyrą. Ši kreivė vadinama fazių arba stabilumo diagrama (5 pav.).

Vandenyje tirpių polimerų ir baltymų slėgio-temperatūros fazių diagramos yra panašios. Atlikti bandymai parodė, jog krakmolo ir baltymų elgesys paveikus slėgiu ir temperatūra yra labai panašus (Heremans and Smeller 1998).

#### 1.4.8 Baltymo – ligando komplekso lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio

Ligandai stabilizuojantys baltymus, esant atmosferos slėgiui, padidina baltymo lydymosi temperatūrą. Tačiau įdomu, kaip vyktų tų pačių ligandų jungimasis ir baltymų stabilizavimas, esant aukštam slėgiui? 5 pav. pateikta ribonukleazės A ir jos komplekso su ligandais, lydymosi temperatūros priklausomybė nuo slėgio. Esant atmosferos slėgiui ribonukleazė A lydymosi temperatūra ( $T_m = 60,5 \pm 0,2$  °C) yra žemesnė negu 2'-CMP-Ribonukleazės A ( $T_m = 62,9 \pm 0,3$  °C), ar 3'-CMP- ribonukleazės A ( $T_m = 61,5 \pm 0,4$  °C) kompleksų. Veikiant Ribonukleazę A ir jos kompleksus su ligandais aukštu slėgiu iki 1000 bar, buvo pastebėtas stabilizuojantis slėgio poveikis, o prie slėgio didesnio už 1000 bar lydymosi temperatūra mažėja (Dubins et al, 2000).



**Pav. 6.** Lydymosi temperatūros,  $T_M$ , priklausomybė nuo slėgio: ribonukleazės A (■), 2'-CMP-ribonukleazės A komplekso (●), ir 3'-CMP- ribonukleazės A komplekso (○) (Dubins et al., 2000).

### 1.4.9 Baltymų – slopiklių jungimosi slėginis modelis

D. Matulis ir P. Cimperman išvedė matematinį modelį, kuriuo termodinaminiais parametrais galima apibūdinti baltymų jungimąsi su ligandais prie aukšto slėgio. Slopikliui prisijungus prie natyvaus baltymo, jo struktūra yra stabilizuojama. Natyvaus baltymo stabilumas, veikiant jį aukštu slėgiu gali būti apibūdinamas slėginės baltymo išsivyniojimo tranzicijos vidurio tašku ( $P_m$ ). Kai jungimosi stoichiometrija yra 1:1, tai slopiklio koncentracijos baltymo tirpale ( $L_t$ ) ryšį su  $P_m$  galima išreikšti iš lygties D. Matulis 2005, kur vietoj slėgio naudojama temperatūra:

$$L_t = (K_{U-P_m} - 1) \left( \frac{P_t}{2K_{U-P_m}} + \frac{1}{K_{b-P_m}} \right) \quad (34)$$

kur  $P_t$  yra baltymo koncentracija,  $K_{U-P_m}$  ir  $K_{b-P_m}$  – atitinkamai, baltymo išsivyniojimo ir jungimosi prie natyvaus baltymo pusiausvyros konstantos, esant slėgiui  $P_m$ . Norint nustatyti ryšį tarp  $L_t$  ir  $P_m$ , reikia išsireikšti  $K_{U-P_m}$  ir  $K_{b-P_m}$ , o tai padaryti pirmiausia reikia išsireikšti Gibso energijos pokytį ( $K = e^{-\Delta G/RT}$ ).

Baltymo išsivyniojimo Gibso laisvosios energijos pokyčio  $\Delta_U G = G_U - G_N$  ( $G_U$  ir  $G_N$  yra atitinkamai išsivyniojusio ir natyvaus baltymo laisvosios Gibso energijos) pilnasis diferencialas turi tokią išraišką:

$$d\Delta_U G = -\Delta_U S dT + \Delta_U V dP \quad (35)$$

čia  $T$  – temperatūra,  $P$  – slėgis, baltymo išsivyniojimo entropija  $\Delta_U S = S_U - S_N$  ir tūrio pokytis  $\Delta_U V = V_U - V_N$  ( $V_U$  ir  $V_N$  yra atitinkamai išsivyniojusio ir natyvaus baltymo tūriai).

Kai proceso metu temperatūra nekinta ( $T = const$ ) 35 lygtis įgauna tokį pavidalą:

$$d\Delta_U G = \Delta_U V dP. \quad (36)$$

Rasime tūrio pokyčio išraišką kaip funkciją nuo slėgio. Pilnasis tūrio pokyčio diferencialas yra

$$d\Delta_U V = \left( \frac{\partial \Delta_U V}{\partial T} \right)_P dT + \left( \frac{\partial \Delta_U V}{\partial P} \right)_T dP. \quad (37)$$

Jei temperatūra yra pastovi 37 lygtis tampa paprastesnė:

$$d\Delta_U V = \Delta_U b dP; \quad (38)$$

čia  $\Delta_U \mathbf{b} = \left( \frac{\partial \Delta_U V}{\partial P} \right)_T$  yra suspaudžiamumo faktorius, kuris nepriklauso nuo slėgio.

Integruodami 38 lygtį gauname tūrio pokyčio priklausomybę nuo slėgio:

$$\Delta_U V_P - \Delta_U V_{P_0} = \int_{P_0}^P \Delta_U \mathbf{b} dP = \Delta_U \mathbf{b} (P - P_0) \quad (39)$$

Perrašius 39 lygtį, gaunama išraiška:

$$\Delta_U V_P = \Delta_U V_{P_0} + \Delta_U \mathbf{b} (P - P_0) \quad (40)$$

Irašius (40) išraišką į (36) lygtį, gaunama išsivyniojimo laisvosios energijos pokyčio kitimo priklausomybė nuo slėgio:

$$d\Delta_U G = (\Delta_U V_{P_0} + \Delta_U \mathbf{b} (P - P_0)) dP \quad (41)$$

Integruojant šią lygtį, gaunama:

$$\Delta_U G_P - \Delta_U G_{P_0} = \Delta_U V_{P_0} (P - P_0) + \frac{\Delta_U \mathbf{b}}{2} (P - P_0)^2 \quad (42)$$

Perrašius 42 lygtį, gaunama laisvosios išsivyniojimo energijos pokyčio priklausomybė nuo slėgio:

$$\Delta_U G_P = \Delta_U G_{P_0} + \Delta_U V_{P_0} (P - P_0) + \frac{\Delta_U \mathbf{b}}{2} (P - P_0)^2 \quad (43)$$

Čia  $\Delta_U G_{P_0}$ ,  $\Delta_U V_{P_0}$ ,  $\Delta_U \mathbf{b}$  – tiriamos sistemos išsivyniojimo laisvosios energijos, tūrio pokyčiai prie  $T_0$  ir  $P_0$  ir suspaudžiamumo pokytis.

Pagal analogiją galima parašyti jungimosi laisvosios energijos pokyčio ( $\Delta_b G_P$ ) priklausomybę nuo slėgio:

$$\Delta_b G_P = \Delta_b G_{P_0} + \Delta_b V_{P_0} (P - P_0) + \frac{\Delta_b \mathbf{b}}{2} (P - P_0)^2 \quad (44)$$

kur  $\Delta_b G_{P_0}$ ,  $\Delta_b V_{P_0}$ ,  $\Delta_b \mathbf{b}$  – baltymo - ligando jungimosi laisvosios energijos, tūrio prie  $T_0$ ,  $P_0$  ir suspaudžiamumo pokytis.

Baltymo arba jo komplekso su prisijungusiu ligandu išsivyniojimą, didinant slėgį, galima apibūdinti slėgiu  $P_m$ , prie kurio baltymo išsivyniojimo reakcija yra pusiausvyroje.  $P_m$  gali būti išreiškiamas naudojant reakcijos pusiausvyros apibrėžimą:

$$\Delta_U G_{P_m} = 0 \quad (45)$$

Tuomet, iš 43 ir 45 lygčių seka:



$$\Delta_U G_{P_0} = -\Delta_U V_{P_0} (P_m - P_0) - \frac{\Delta_U b}{2} (P_m - P_0)^2 \quad (46)$$

Pažymėjus  $\Delta P_{m0} = (P_m - P_0)$  ir perrašius (46), gauname:

$$\frac{\Delta_U b}{2} (\Delta P_{m0})^2 + \Delta_U V_{P_0} \Delta P_{m0} + \Delta_U G_{P_0} = 0 \quad (47)$$

47 lygtis yra kvadratinė  $\Delta P_{m0}$  atžvilgiu. Ši lygtis turi du sprendinius:

$$\Delta P_{m0} = \frac{-\Delta_U V_{P_0} \pm \sqrt{(\Delta_U V_{P_0})^2 - 2\Delta_U b \Delta_U G_{P_0}}}{\Delta_U b} \quad (48)$$

Baltymo arba baltymo – ligando komplekso išsivyniojimo ir jungimosi pusiausvyros konstantos turi atitinkamą formą:

$$K_U = e^{-\Delta_U G_P / RT} = e^{-\left(\Delta_U G_{T-P_0} + \Delta_U V_{P_0} (P-P_0) + \frac{\Delta_U b}{2} (P-P_0)^2\right) / RT} \quad (49)$$

$$K_b = e^{-\Delta_b G_P / RT} = e^{-\left(\Delta_b G_{T-P_0} + \Delta_b V_{P_0} (P-P_0) + \frac{\Delta_b b}{2} (P-P_0)^2\right) / RT} \quad (50)$$

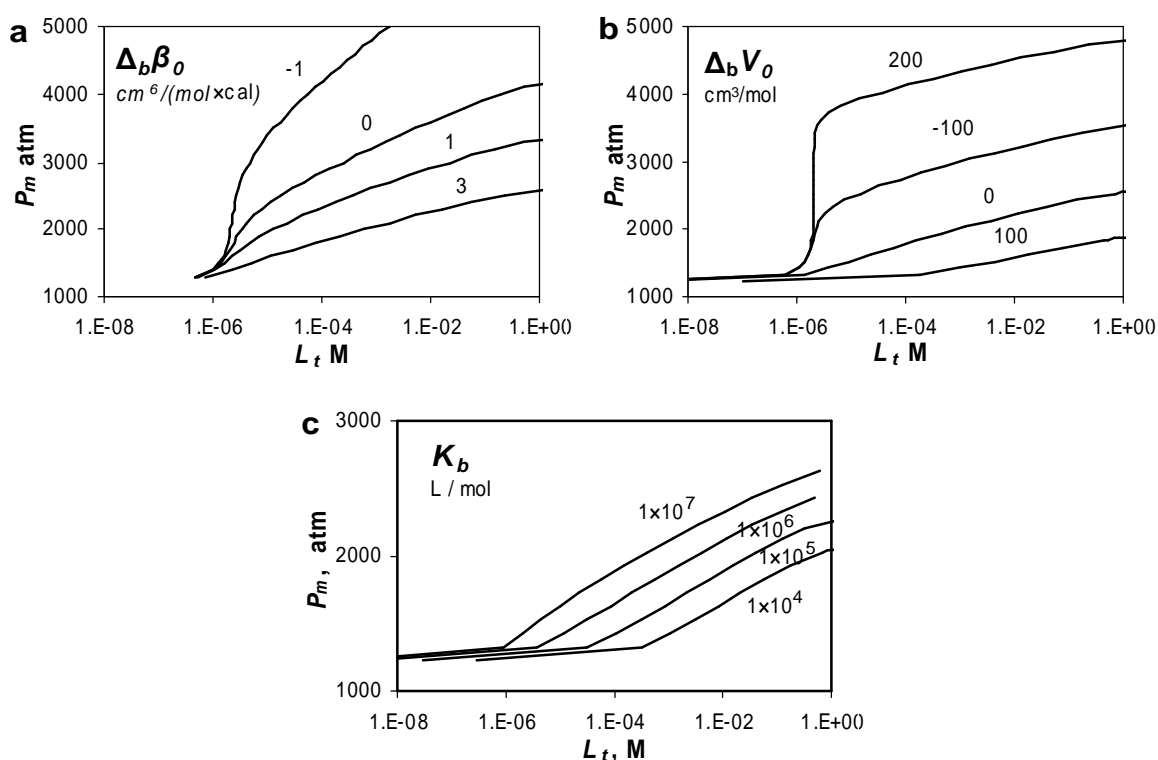
Pusiausvyros konstantas įrašius į (34) gaunama išraiška:

$$L_t = \left( e^{-\left(\Delta_U G_{T-P_0} + \Delta_U V_{P_0} (P_m - P_0) + \frac{\Delta_U b}{2} (P_m - P_0)^2\right) / RT} - 1 \right) \times \left[ \frac{P_t}{2e^{-\left(\Delta_U G_{T-P_0} + \Delta_U V_{P_0} (P_m - P_0) + \frac{\Delta_U b}{2} (P_m - P_0)^2\right) / RT}} + \frac{1}{e^{-\left(\Delta_b G_{T-P_0} + \Delta_b V_{P_0} (P_m - P_0) + \frac{\Delta_b b}{2} (P_m - P_0)^2\right) / RT}} \right] \quad (51)$$

Ši lygtis naudojama jungimosi konstantos ir kitų nuo slėgio priklausomų jungimosi parametru nustatymui.

### 1.4.10 Slėginio modelio jungimosi parametrai

Baltymų – ligandų jungimosi nustatymui aukšto slėgio metodu, buvo naudojamas prieš tai aprašytas fizikinis modelis, kuriame daugybė baltymo išsivyniojimo ir jungimosi su ligandais parametrų. Norint suprasti, kaip šie parametrai keičia teorinę greivę ( $L_t$ ), buvo keičiamas pasirinktas vienas parametras ir stebimas kreivės kitimas (Pav. 7). Jungimosi suspaudžiamumo pokytis ( $\Delta_b\beta$ ) keičia modelio kreivės pokrypio kampą.



**Pav. 7.** Slėginio baltymų – ligandų modelio kreivės, keičiant modelyje esančius jungimosi parametrus: jungimosi a) suspaudžiamumo ( $\Delta_b\beta$ ), b) tūrio ( $\Delta_bV_0$ ) pokyčius ir c) jungimosi konstantą ( $K_b$ ).

Jungimosi suspaudžiamumo pokytis ( $\Delta_b\beta$ ) keičia modelio kreivės pokrypio kampą. Kuo  $\Delta_b\beta$  mažesnis, tuo kreivė statesnė (Pav. 7 a). Mažesnis jungimosi tūrio pokytis ( $\Delta_bV_0$ ), keičia fizikinio modelio kreivę į mažesnės ligando koncentracijos ( $L_t$ ) ir aukštesnio lydymosi slėgio ( $P_m$ ) sritį (Pav. 7 b). Baltymo – ligando jungimosi konstanta ( $K_b$ ) keičia sumodeliuotos kreivės poslinkį  $L_t$  ašyje.

#### 1.4.11 Baltymų išsivyniojimo slėginis modelis

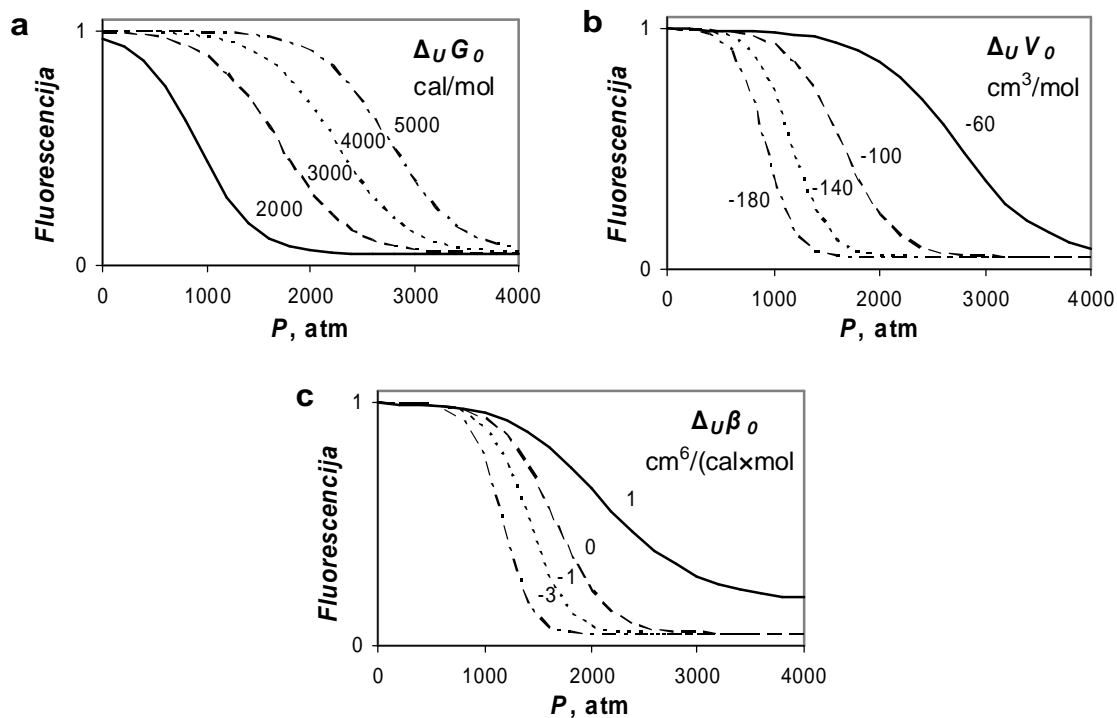
Baltymo išsivyniojimo fluorescencinius duomenis galima aprašyti D. Matulio pateiktu modeliu (Matulis, Kranz et al. 2005), tik vietoj  $\Delta_U G(T)$ , naudojama  $\Delta_U G(P)$ :

$$y_{(P)} = y_F + \frac{y_U - y_F}{1 + e^{-\Delta_U G_{(P)}/RT}} = y_U + \frac{y_F - y_U}{1 + e^{-\Delta_U G_{(P)}/RT}} \quad (52)$$

Iš 43 lygties laisvosios energijos išraišką įstačius į 52 išraišką gauname fluorescencijos priklausomybę nuo slėgio su tiriamos sistemos išsivyniojimo konstantomis: sistemos išsivyniojimo laisvosios energijos pokytis prie  $(\Delta_U G_0)$ , tūrio pokytis baltymui išsivyniojus  $(\Delta_U V_0)$ , prie  $P_0 = 1 \text{ atm}$ ,  $T_0$  ir išsivyniojimo suspaudžiamumo pokytis  $(\Delta_U \beta)$ .

$$y_{(P)} = y_U + \frac{y_F - y_U}{1 + e^{-\left(\Delta_U G_{T_0 - P_0} + \Delta_U V_{P_0} (P - P_0) + \frac{\Delta_U \beta}{2} (P - P_0)^2\right) / RT}} \quad (53)$$

Sumodeliuotose baltymo išsivyniojimo tranzicijos fluorescencijos kreivėse (funkcija  $y_{(P)}$ ) galima stebėti, ką lemia 53 lygtyje esantys parametrai (pav. 8). Baltymo išsivyniojimo laisvosios energijos pokytis  $(\Delta_U G_0)$  lemia tranzicijos poslinkį slėgio ašyje. Tūrio pokytis  $(\Delta_U V_0)$  ir suspaudžiamumo pokytis  $(\Delta_U \beta)$  lemia tranzicijos poslinkį slėgio ašyje ir pokrypio kampą.



**Pav. 8.** Sumodeliuotos baltymo išsivyniojimo fluorescencijos kreivės, keičiant išsivyniojimo a) laisvosios energijos ( $\Delta U G_0$ ) b) tūrio ( $\Delta U V_0$ ) ir c) suspaudžiamumo ( $\Delta U \beta$ ) pokyčius.

Priartinus 53 funkciją prie eksperimentinių duomenų ir pasinaudojus 48 lygtimi, iš fluorescencinių išsivyniojimo kreivių galima sužinoti baltymų lydymosi slėgį,  $P_m$  (baltymo išsivyniojimo tranzicijos vidurio taškas).

## 2. MEDŽIAGOS IR TYRIMO METODAI

### 2.1 Naudotos medžiagos

Darbe naudotos medžiagos nurodytos lentelėje 3.

Lentelė 3. Darbe naudoti reagentai.

Gamintojas	Produktas
Sigma	Žmogaus serumo albuminas (HSA), dekanoinė rūgštis, metazolamidas, Bis – Tris buferis
Roth	Dimetilsulfoksidas (DMSO)
Aldrich Chem.Co	8-anilino-1-naftaleno sulfonato amonio druskos hidratas (ANS), dodekanoinė rūgštis
Fisher Scientific	NaCl
EM Science	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O
Serva Feinbiochemica	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O
Biotechnologijos institutas, Biotermodynamikos ir vaistų tyrimo laboratorija	Rekombinantiniai žmogaus (rh) baltymai: karboanhidrazė (rhCAI), karščio šoko baltymas 90 N-galinis domenas (rhHsp90N)
Fluka	Guanidino HCl
AG – Scientific. Inc.	Radisikolis

### 2.2 Tirpalų ruošimas

#### Baltymų tirpalo ruošimas

Žmogaus serumo albuminas buvo sveriamas analizinėmis svarstyklėmis ir tirpinamas buferyje. Užšaldyti (-80 °C) rekombinantinių baltymų (rhCAI ir rhHsp90N) tirpalai atšildomi kambario temperatūroje ir skiedžiami pasirinktu buferio tirpalu. Spektrofotometru (Agilent 8453) pamatavus paruoštų tirpalų sugertį prie 280 nm šviesos, apskaičiuojama baltymo koncentracija.

#### Buferių ruošimas

Eksperimentuose buvo naudojami 10 mM Bis –Tris buferis ir 50 mM fosfatinis buferis. Bis-Tris buvo sveriamas analizinėmis svarstyklėmis, tirpinamas vandenyje (MiliQ) ir norimas pH

privedamas su HCl arba NaOH. Ruošiant fosfatinį buferį, atitinkamais santykiais pasveriami  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  ir  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , ištirpinama vandenyje (MilliQ) ir norimas pH privedamas su HCl ir NaOH.

### **Ligandų tirpalų ruošimas**

Dekanoinė, dodekanoinė riebalų rūgštys ir metazolamidas buvo sveriami analizinėmis svarstyklėmis ir tirpinami DMSO. Radisikolio tirpalas skiedžiamas DMSO.

### **2.3 Baltymų denatūracijos temperatūrinio poslinkio fluorescencijos metodas**

Tiriant baltymo temperatūrinį stabilumą fluorescencijos metodu buvo naudojamas R-Corbet fluorimetras, kuriuo vienu metu galima matuoti iki 36 arba 72 mėginių fluorescenciją. Kaitinant, 36 mėginius po 100  $\mu\text{L}$  su paruoštu baltymo tirpalu, iki 95  $^{\circ}\text{C}$  (0,5  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  greičiu) matuojama 480 nm ANS fluorescencija. Duomenys analizuojami „TF Analyst“ programa, nustatant HSA lydymosi temperatūras esant skirtingai ligando koncentracijai.

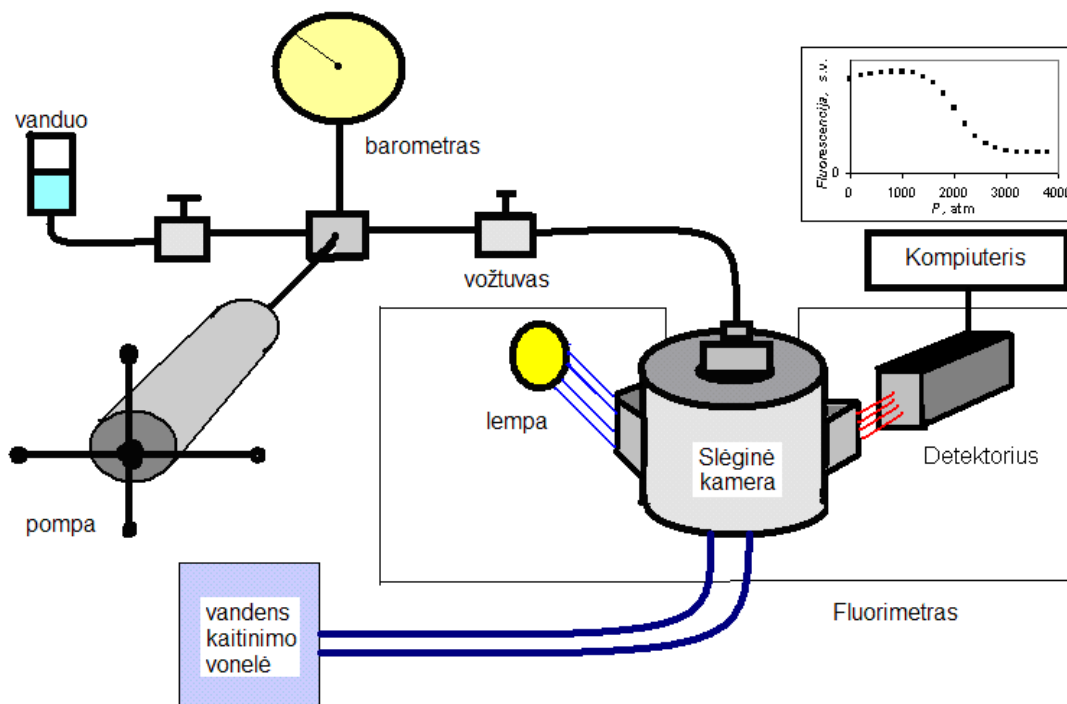
Temperatūrinis baltymų stabilumas prie pasirinkto slėgio buvo matuojamas ISS PC1 (USA) slėginiu fluorimetru, keliant temperatūrą nuo 25  $^{\circ}\text{C}$  iki 80 $^{\circ}\text{C}$ , vidutiniu 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  greičiu. Duomenys apdorojami Microsoft Excel programa. Prie nustatytų fluorescencinių kreivių Levenberg-Marquardt algoritmu, kvadratų sumai minimizuoti, buvo artinamas teorinis modelis ir nustatomi baltymo išsivyniojimo parametrai ir  $T_m$ .

### **2.4 Slėginės baltymų denatūracijos nustatymas**

Slėginiai eksperimentai buvo atlikti su ISS PC1 fotonus skaičiuojančiu spektrofluorimetru (ISS PC1 Photon Counting Spectrofluorimeter, USA) su prijungta slėgine sistema (Pav. 9), kuria galima pasiekti iki 4000 atm slėgį. Slėginė sistema sudaryta iš slėgiui atsparios plieninės kameros su safyriniais stiklais, kuri plieniniais vamzdeliais sujungta su barometru ir slėgine rankine pompa (Pav.9). Slėgis kameroje gali būti didinamas maksimaliu 400 atm žingsniu, po kurio reikia 5 min leisti safyriniams stiklams prisitaikyt prie pakitusio slėgio.

Slėginiai eksperimentai pradami paruošiant baltymo tirpalą į apvalią, 0,5 ml, stiklinę kiuvetę, kuri sandariai uždaroma slėgiui atsparia plėvele (Dura Seal, USA) ir įstatoma į slėginę kamerą, pripildytą vandeniu (MilliQ). Uždarius kamerą, slėgine pompa pašalinami oro burbulai susidarę slėginėje sistemoje. Vykdamas baltymo denatūraciją, slėgis didinamas nuo 1 atm iki 3800 atm, diskrečiais žingsniais po 200 atm kas 2 min. Viso slėgimo metu tirpale žadinamas baltymo

struktūroje esantis triptofanas (285 nm) arba fluorescencinis dažas ANS (380 nm) ir fiksuojama fluorescencija (triptofano prie 340 nm, ANS prie 480 nm). Pastovi temperatūra palaikoma vandens kaitinimo vonele. Prie gautų eksperimentinių duomenų artinamas fizikinis modelis ir nustatomi baltymo, baltymo – ligando išsivyniojimo parametrai, kurie naudojami baltymo – ligando jungimuisi nustatyti.



**Pav. 9.** Slėginis fluorimetras, kuriuo buvo atlikti aukšto slėgio eksperimentai. Pompa didinamas hidrostatinis slėgis nuo 1 atm iki 3800 atm, diskrečiais intervalais po 200 atm kas 2min. Kameroje patalpinta kiuvetė su baltymo tirpalu, viso slėgimo metu žadinama pasirinkto bangos ilgio šviesa ir detektuojama fluorescencija.

## 2.5 Jungimosi konstantos nustatymas

Nustatytų baltymo ir baltymo – ligando kompleksų  $T_m$  arba  $P_m$  verčių priklausomybė nuo pilnos tirpale esančios ligando koncentracijos ( $L_t$ ), apksimuojamoms temperatūriniai arba slėginiai teoriniais modeliais (14, 60), ir nustatomi baltymo – ligando jungimosi parametrai. Fizikinis modelis buvo artinimas prie eksperimentinių duomenų keičiant teorinio modelio parametrus (parametrų simuliacija) arba naudojant P. Cimperman sukurtą modulį „Origin 6“ programoje, kuris skaitmeniškai sprendamas lygtį ( $L_t$ ) mažiausių kvadratų metodu suranda artimiausią sprendinį teorinio modelio ir eksperimentinių duomenų atitikimui.

### 3. EKSPERIMENTŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

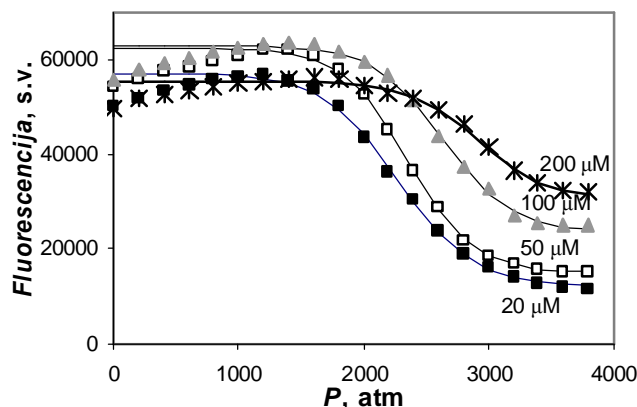
#### 3.1 Slėginės denatūracijos eksperimentai

Fluorescencijos metodu nustatant baltymo arba baltymo komplekso su ligandu denatūracijos tranziciją ir taikant fizikinį modelį, galima nustatyti nuo slėgio priklausomus baltymo išsivyniojimo ir jungimosi parametrus. Šie eksperimentai buvo atliekami prie pasirinktos temperatūros didinant slėgį iki 3800 atm ir fiksuojant baltymo struktūroje esančio triptofano arba fluorescuojančio dažo ANS fluorescenciją, kaip aprašyta metoduose (2.4 skyrelis). Fizikinį modelį artinant prie fluorescencinių eksperimentinių duomenų, nustatomi baltymo išsivyniojimo parametrai ir slėginės baltymų tranzicijos vidurio taškas ( $P_m$ ). Iš  $P_m$  priklausomybės nuo ligando koncentracijos ( $L_t$ ) nustatomi baltymo – ligando jungimosi parametrai.

##### 3.1.1 ANS įtaka HSA stabilumui ir jungimasis

Norint fluorescenciniu metodu stebėti HSA išsivyniojimo tranziciją buvo naudojamas fluorescuojantis dažas ANS. Literatūroje aprašyta, kad ANS stabilizuoja BSA (angl. bovine serum albumin) struktūrą (Matulis, Baumann et al. 1999). Šiame eksperimente buvo stebėta, kokia ANS įtaka HSA stabilumui, kai sistema veikiama aukštu slėgiu iki 3800 atm. Nustatytose fluorescencijos kreivėse pastebėta, kad kuo tirpale daugiau ANS, tuo daugiau baltymo išsivyniojimo tranzicija slenkasi į aukštesnio slėgio sritį (Pav. 10). Tai rodo, kad ANS padidina HSA stabilumą. Artinant fizikinį slėginės denatūracijos modelį (53 lygtis) prie eksperimentinių duomenų, nustatyti HSA išsivyniojimo parametrai: išsivyniojimo tūrio pokytis ( $\Delta_U V_0 = -90 \pm 10 \text{ cm}^3/\text{mol}$ ), suspaudžiamumo pokytis ( $\Delta_U \beta$ ) apytiksliai lygus 0 ir lydymosi temperatūra ( $P_m$ ), kai tirpale skirtinga ANS koncentracija (lentelė 4). Iš  $P_m$  verčių, esant skirtingai ANS koncentracijai buvo nustatyti HSA – ANS jungimosi parametrai: jungimosi konstanta,  $K_d = 1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , tūrio pokytis,  $\Delta_b V_0 = -10 \text{ cm}^3/\text{mol}$ , suspaudžiamumo pokytis, ( $\Delta_b \beta_0$ ) apytiksliai lygus 0 (pav. 11).

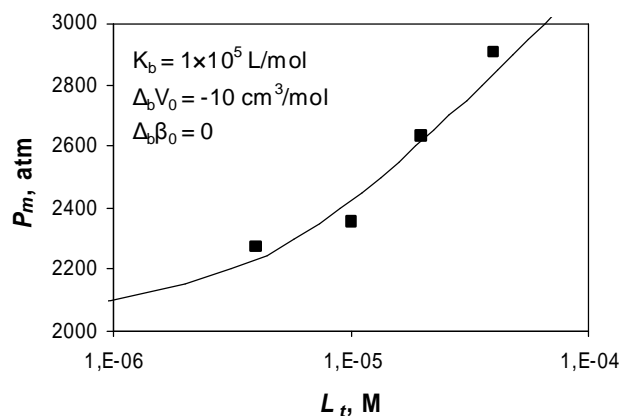




**Pav. 10.** HSA slėginės išsivyniojimo tranzicijos, esant 20 – 200  $\mu\text{M}$  ANS. Kreivės einančios per eksperimentinius taškus – matematinis modelis. Tiriamas tirpalas buvo sudarytas iš: 3  $\mu\text{M}$  HSA, 0 – 100  $\mu\text{M}$  ANS (tirpintas vandenyje), 0,5 M guanidino (Gnd), 10 mM Bis-Tris ir fosfatinio buferių mišinys, pH = 7. Eksperimentas vyko esant 25  $^{\circ}\text{C}$  temperatūrai. Tirpalas žadintas 380 nm šviesa ir fiksuota 480 nm fluorescencija.

**Lentelė 4.** HSA slėginės denatūracijos parametrai, esant skirtingai ANS koncentracijai. Nuokrypis nustatytas keičiant modelyje pasirinktą parametą ir įvertinant kiek parametras gali nukrypti kuomet modelis vizualiai nebeatitinka eksperimentinių duomenų.

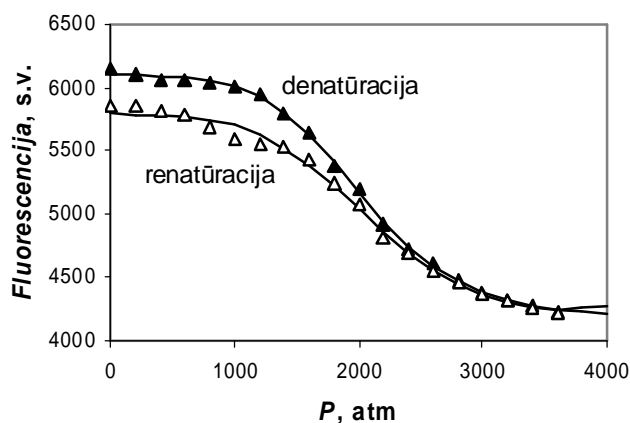
ANS, $\mu\text{M}$	$\Delta V_0$ , $\text{cm}^3/\text{mol}$	$P_m$ , atm
20	-80	2270
50	-94	2357
100	-90	2632
200	-90	2904
Nuokrypis	$\pm 5$	$\pm 50$



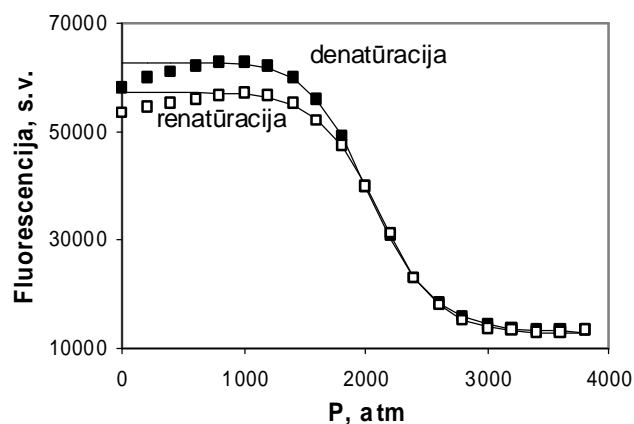
**Pav. 11.** HSA  $P_m$  priklausomybė nuo ANS koncentracijos. Fizikinį modelį (51 lygtis) priartinus prie eksperimentinių duomenų (■) nustatyti HSA – ANS jungimosi parametrai.

### 3.1.2 HSA slėginė denatūracija ir renatūracija

Fluorescenciniu metodu HSA denatūracija ir renatūracija aukštame slėgyje buvo nustatyta dviem būdais: žadinant HSA struktūroje esantį triptofaną ir naudojant fluorescuojantį dažą - ANS. Abiem atvejais denatūracija buvo grįžtama (Pav. 12, 13). Triptofanas buvo žadintas 285 nm šviesa ir fiksuojant 340 nm fluorescencija, o ANS žadintas 380 nm ir fiksuota 480 nm fluorescencija. Triptofano fluorescencijos eksperimentas buvo atliekamas, esant pastoviai 10 °C temperatūrai, kai tiriamą tirpalą sudarė: 10 μM HSA, 150 mM NaCl, 10 mM Bis – tris, 50 mM fosfatinis buferiai, pH=7. Eksperimentas su ANS buvo atliekamas, esant 25 °C temperatūrai ir tirpalą sudarė: 3 μM HSA, 50 μM ANS, 0,5 M guanidino, 10 mM Bis – Tris buferis, pH = 7. ANS atbilizuoja HSA struktūrą, todėl norint slėgiu iki 3800 atm stebėti baltymo slėginę išsivyniojimo tranziciją, buvo naudojamas guanidinas. Artinant teorinį modelį prie eksperimentinių duomenų buvo nustatyti laisvosios išsivyniojimo energijos pokyčiai:  $\Delta_U G = 2,8$  kcal/mol (be ANS) ir  $\Delta_U G = 5$  kcal/mol (su ANS), išsivyniojimo suspaudžiamumo pokytis,  $\Delta_U \beta_0 = 0$ , išsivyniojimo tūrių pokyčiai  $-58 \pm 5$  cm<sup>3</sup>/mol (be ANS),  $-98 \pm 5$  cm<sup>3</sup>/mol (su ANS) ir lydymosi slėgiai ( $P_m$ , slėgis prie kurio natyvaus ir denatūruoto baltymo kiekiai lygūs) atitinkamai  $1994 \pm 50$  atm (be ANS),  $2043 \pm 50$ atm (su ANS) (lentelė 5).



**Pav. 12.** HSA denatūracija (▲), renatūracija (Δ), stebint Trp ir matematinis modelis. Taškai - eksperimentiniai duomenys, kreivė einanti per juos – matematinis modelis.



**Pav. 13.** HSA- ANS komplekso denatūracija (■) ir renatūracija (□). Per eksperimentinius taškus eina teorinė kreivė (51 lygtis), kurios pagalba nustatomi išsivyniojimo, susivyniojimo parametrai. Nekintantys parametrai: sistemos laisvosios energijos pokytis,  $\Delta_U G = 5$  kcal/mol, suspaudžiamumo pokytis lygus nuliui.

**Lentelė 5.** HSA denatūracijos ir renatūracijos parametrai esant ANS ir guanidino (Gnd), ir be ANS.

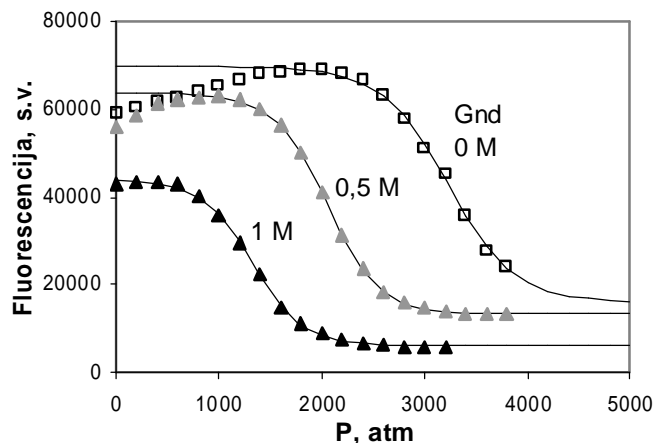
ANS, $\mu\text{M}$	Gnd, M	Parametrai	Denatūracija	Renatūracija	Parametrų nuokrypis
0	0	$\Delta_U V$ , $\text{cm}^3/\text{mol}$	-58	-56	$\pm 5$
0	0	$P_m$ , atm	1994	2038	$\pm 50$
50	0,5	$\Delta_U V$ , $\text{cm}^3/\text{mol}$	-98	-96	$\pm 5$
50	0,5	$P_m$ , atm	2057	2126	$\pm 50$

Eksperimentuose su ir be ANS, HSA išsivyniojimo parametrų skirtumo atsiradimo priežastys, gali būti ne tik dėl ANS ar 1 M guanidino. Slėginiais eksperimentais su HSA buvo parodyta, kad stebint triptofano fluorescenciją galima nustatyti antro domeno struktūrinius pokyčius, kuomet kiti du domenuose nepastebėti struktūros pokyčiai (Tanaka, Nishizawa et al. 1997). Mes manome, kad su ANS galime stebėti visų trijų HSA domenų struktūrinius pokyčius.

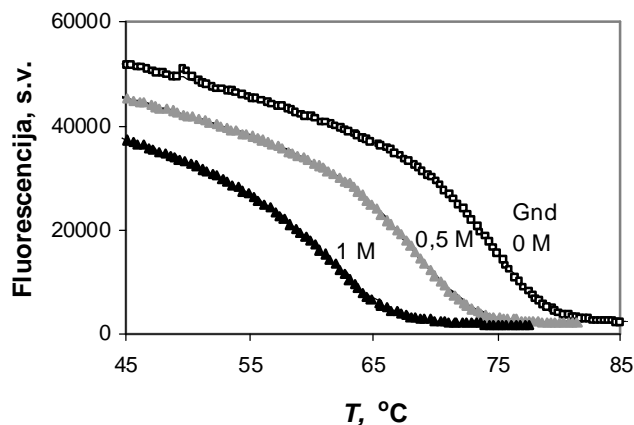
### 3.1.3 Guanidino įtaka HSA stabilumui

Guanidinas (Gnd) sumažina baltymo stabilumą, susilpnindamas vandenilinius ryšius. Norint nustatyti kokios koncentracijos guanidino reikia susilpninti HSA stabilumą, kad slėgiu iki 4000 atm būtų galima stebėti baltymo išsivyniojimo tranziciją, buvo atlikti HSA slėginės denatūracijos eksperimentai, esant skirtingai guanidino koncentracijai. Kai tirpale nėra Gnd slėgiu iki 3800 atm negalime stebėti pilną HSA išsivyniojimo tranziciją (pav. 14, □). Pridėjus 0,5 M ar 1 M Gnd galima stebėti dviejų būsenų HSA išsivyniojimo tranziciją (pav. 14, ▲, ▲). Kuo didesnė guanidino koncentracija, tuo HSA aukšto slėgio denatūracijos kreivė slenkasi į mažesnio slėgio sritį. Analogiškas poslinkis stebimas HSA veikiant aukšta temperatūra (pav. 15). Nustatant

HSA išsivyniojimo parametrus, slėginės ir temperatūrinės tranzicijos eksperimentiniai taškai aproksimuoti fizikiniais modeliais (atitinkamai 53 ir 6 lygtimis). Didėjant guanidino koncentracijai HSA lydymosi slėgis ( $P_m$ ) ir temperatūra ( $T_m$ ) mažėja, išsivyniojimo tūrio pokytis didėja (lentelė 6).



**Pav. 14.** HSA slėginės išsivyniojimo tranzicijos be Gnd ( $\square$ ) ir esant 0,5 M ( $\blacktriangle$ ), 1 M ( $\blacktriangle$ ) Gnd. Tiriamą tirpalą sudarė: 3  $\mu$ M HSA, 0 – 1 M Gnd, 50  $\mu$ M ANS 10 mM Bis-Tris ir 50 mM fosfatinio buferių mišinys, 150 mM NaCl, pH 7. Čia taškais žymimi eksperimentiniai duomenys, kreivė einanti per juos fizikinis modelis (53 lygtis).



**Pav. 15.** HSA temperatūrinės išsivyniojimo tranzicijos be Gnd ( $\square$ ) ir esant 0,5 M ( $\blacktriangle$ ), 1 M ( $\blacktriangle$ ) Gnd. Tiriamą tirpalą sudarė: 3  $\mu$ M HSA, 0 – 1 M Gnd, 50  $\mu$ M ANS 10 mM Bis-Tris ir 50 mM fosfatinio buferių mišinys, 150 mM NaCl, pH 7.

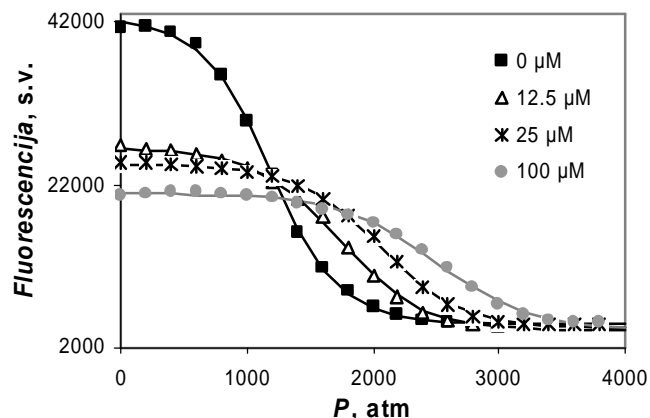
**Lentelė 6.** HSA slėginės ir temperatūrinės denatūracijos išsivyniojimo parametrai, esant skirtingai guanidino (Gnd) koncentracijai. Paklaidos nurodytos modelio artinimo prie eksperimentinių duomenų. Nuokrypis įvertintas keičiant fizikinio modelio parametrus ir vizualiai stebint kuomet keičiamo parametro vertė pakeičia teorinio modelio vertes taip, kad jos nebeatitinka eksperimentinių duomenų.

<b>Gnd, M</b>	<b><math>P_m</math>, atm</b>	<b><math>\Delta U G_{P0}</math>, cal/mol</b>	<b><math>\Delta U V_{P0}</math>, cm<sup>3</sup>/mol</b>	<b><math>T_m</math>, °C</b>
0	3225	5987	-76	75
0,5	2052	4820	-96	68,5
1	1326	3216	-99	61,5
Nuokrypis	± 30	± 50	± 2	± 0,5

Slėginės ir temperatūrinės denatūracijos kreivės parodo, kad 1 M koncentracijos guanidinas sumažina HSA stabilumą, bet nedenatūruoja baltymo. Tad šiame eksperimente nustatyta, kad 1 M guanidino galima naudoti slėginiuose eksperimentuose, tiriant HSA – ligandų sąveiką.

### **3.1.4 HSA ir HSA – dodekanoato išsivyniojimo tranzicijos**

Norint nustatyti kaip dodekanoatas keičia HSA slėginę išsivyniojimo tranziciją, buvo atlikti ANS fluorescencijos matavimo tyrimas, baltymo tirpalą veikiant aukštu slėgiu iki 4000 atm. HSA tirpalą suslėgus iki 4000 atm, nustatyta pilna HSA išsivyniojimo tranzicija (pav. 16, ■). Į tirpalą pridėjus dodekanoato HSA išsivyniojimo tranzicija pasislinko į aukštesnio slėgio sritį (pav. 16). Didinant dodekanoato koncentraciją, pastebėtas dar didesnis HSA išsivyniojimo tranzicijos poslinkis į aukštesnio slėgio sritį. Tai parodo, kad dodekanoatas stabilizuoja slėgiu denatūruojamą baltymą. Naudojant matematinį modelį, nustatyti tiriamos sistemos išsivyniojimo parametrai (lentelė 2), kur sistemos išsivyniojimo suspaudžiamumo pokytis ( $\Delta U \beta$ ) lygus nuliui. Kuo tirpale daugiau dodekanoato, tuo HSA išsivyniojimo reakcijos tūrio pokytis mažėja, o lydymosi slėgis ( $P_m$ ) didėja (lentelė 7).



**Pav. 16.** HSA slėginės išsivyniojimo tranzicijos, tirpale esant 0 – 100  $\mu\text{M}$  dodekanoato. Taškais pavaizduoti eksperimentiniai duomenys, kreivė einanti per juos – matematinis modelis. HSA tirpalą sudarė: 4  $\mu\text{M}$  HSA, 0 – 100  $\mu\text{M}$  DK arba DDK, 0,36 % DMSO, 50  $\mu\text{M}$  ANS, 150 mM NaCl, 1 M Gnd, 10 mM Bis-tris, 50 mM fosfatinis buferiai, pH 7.

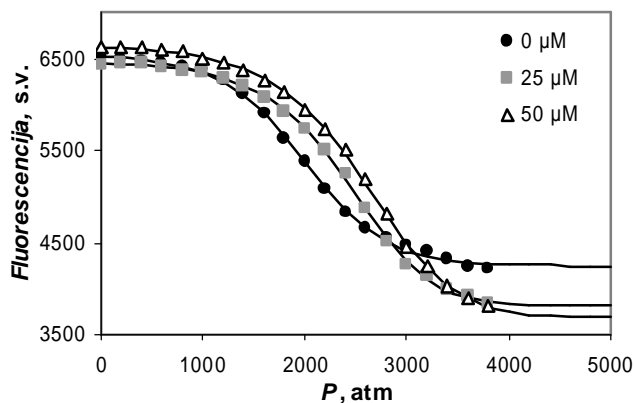
**Lentelė 7.** HSA slėginės denatūracijos išsivyniojimo parametrai, gauti artinant matematinį modelį prie eksperimentinių duomenų. Nuokrypis įvertintas nustatant kaip fizikinis modelis atitinka eksperimentinius duomenis.

DDK, $\mu\text{M}$	$\Delta U_G$ , cal/mol	$\Delta U_V$ , $\text{cm}^3/\text{mol}$	$P_m$ , atm
Nuokrypis	$\pm 50$	$\pm 5$	$\pm 30$
0	2628	-91	1190
12,5	3065	-73	1722
20	3437	-73	1921
25	3711	-74	2049
50	3936	-70	2308
100	3864	-63	2502
200	3780	-58	2655

### 3.1.5 HSA – dekanato jungimasis stebint triptofano fluorescenciją

HSA savo struktūroje turi vieną triptofano. Jis lokalizuotas antrajame HSA domene. Stebint šio triptofano fluorescenciją, galima nustatyti baltymo struktūros būseną. Šiuose eksperimentuose baltymas buvo veikiamas slėgiu iki 3800 atm ir fiksuojama triptofano fluorescencija. Tiriama tirpalą sudarė: 10  $\mu\text{M}$  HSA, 0 - 50  $\mu\text{M}$  dekanato 10 mM Bis-Tris ir 50mM fosfatinio buferių mišinys, 150 mM NaCl, pH=7. Esant 10  $^{\circ}\text{C}$  ir baltymą veikiant slėgiu iki 3800 atm, galima stebėti aiškiai išreikštą HSA išsivyniojimo tranziciją (17 pav.). Į baltymo tirpalą pridėjus dekanato, HSA išsivyniojimo tranzicija pasislinko į didesnio slėgio sritį (17 pav.). Nustačius HSA ir HSA – dekanato komplekso išsivyniojimo parametrus pastebėta, kad prie baltymo prisijungęs dekanatas smarkiai sumažina baltymo išsivyniojimo laisvosios energijos, tūrio ir suspaudžiamumo pokyčius, bei padidina lydymosi slėgį ( $P_m$ ) (lentelė 8). Padidėjas lydymosi

slėgis reškia, kad dodekanoatas stabilizuoja HSA struktūrą ir baltymą reikia veikti aukštesniu slėgiu, norint pasiekti išsivyniojimo tranzicijos lydymosi slėgį ( $P_m$ ). Smarkus neigiamo HSA išsivyniojimo tūrio pokytis, galėjo įvykti dėl teigiamo HSA – dekanato jungimosi tūrio pokyčio (lentelė 9) ir pakankamai didelio neigiamo HSA išsivyniojimo suspaudžiamumo pokyčio, tirpale esant dekanato.

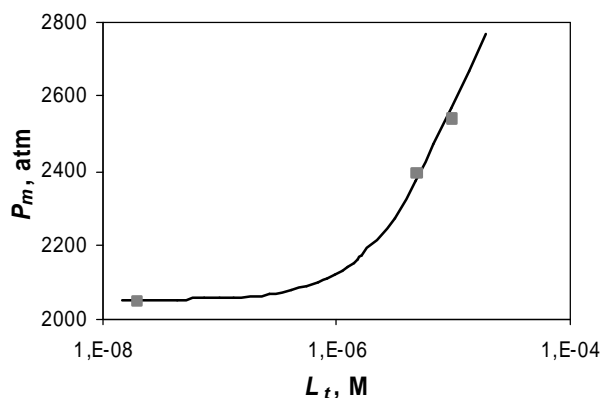


**Pav. 17.** HSA, HSA – DK komplekso slėginės išsivyniojimo tranzicijos, kai tirpale 0 (●), 25 (■) ir 50 (Δ) μM dekanato. Čia taškais vaizduojami eksperimentiniai duomenys, kreivė einanti per juos – fizikinis modelis.

**Lentelė 8.** HSA ir HSA – DK komplekso išsivyniojimo parametrai, prie skirtingos DK koncentracijos.

$DK, \mu M$	$\Delta UG, \text{cal/mol}$	$\Delta UV, \text{cm}^3/\text{mol}$	$\Delta U\beta, \text{cm}^6/(\text{cal} \times \text{mol})$	$P_m, \text{atm}$
Nuokrypis	$\pm 50$	$\pm 5$	$\pm 0,05$	$\pm 30$
0	3606	-92	0,81	2048
25	1749	-6	-0,82	2400
50	1767	-8	-0,66	2551

Iš  $P_m$  priklausomybės nuo dekanato koncentracijos ( $L_t$ ) (pav. 18) nustatyti HSA – dodekanoato jungimosi parametrai (lentelė 9).



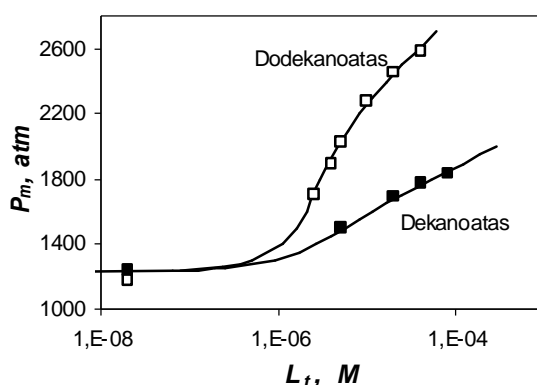
**Pav. 18.** HSA  $P_m$  priklausomybė nuo dekanato koncentracijos tirpale ( $L_t$ ). Čia taškai – eksperimentiniai duomenys, kreivė fizikinis modelis (51 lygtis).

**Lentelė 9.** HSA – dekanato jungimosi parametrai prie 10 °C temperatūros, kai išsivyniojimo parametrai:  $\Delta_U G = 3,6$  kcal/mol,  $\Delta_U V = -92$  cm<sup>3</sup>/mol,  $\Delta_U \beta = 0,81$  cm<sup>6</sup>/(cal×mol). Fizikiniame modelyje priimama, kad pateikti lentelėje parametrai nustatomi, esant  $P_0 = 1$  atm ir  $T_0 = 25$  °C (parametų ekstrapoliacija).

$\Delta_b \beta$ , cm <sup>6</sup> /(cal×mol)	$\Delta_b V$ , cm <sup>3</sup> /mol	$K_b$ , M <sup>-1</sup>	$K_d$ , M
0	35	$1,5 \times 10^7$	$6,7 \times 10^{-8}$
Nuokrypis	±5	± $5 \times 10^6$	± $2 \times 10^{-7}$

### 3.1.6 HSA – DK, DDK jungimosi palyginimas

HSA tirpalas, buvo veikiamas slėgiu iki 4000 atm ir matuojama ANS fluorescencija. Vėliau iš gautų duomenų nustatomi lydimosi slėgiai ( $P_m$ ) ir iš jų priklausomybės nuo dekanato, dodekanoato koncentracijos (19 pav.) nustatomi jungimosi parametrai (10 lentelė). Nustatant HSA – dekanato ar dodekanoato jungimosi charakteristikas, buvo naudoti HSA išsivyniojimo parametrai:  $\Delta_U G = 2000$  (cal/mol),  $\Delta_U \beta = -1,45$  (cm<sup>6</sup>×cal<sup>-1</sup>×mol<sup>-1</sup>),  $\Delta_U V = -45$  (cm<sup>3</sup>/mol). Aukšto slėgio intervale nuo 1 atm iki 5000 atm, alifatinių ir aromatinių angliavandenilių grandinių suspaudžiamumas yra didesnis nei vandens, todėl ligandui pakeitus dalį vandens molekulių, sistemą galima suspausti labiau, ir baltymas tampa atsparnesnis aukštam slėgiui.



**Pav. 19.** HSA  $P_m$  priklausomybė nuo dekanato (DK) (■) ir dodekanoato (DDK) (□) koncentracijos tirpale. Tiriama HSA tirpalą sudarė: 4 μM HSA, 0 – 800 μM DK arba DDK, 0,4 % DMSO, 50 μM ANS, 150 mM NaCl, 1 M Gnd, 10 mM Bis –tris, 50 mM fosfatinis buferiai, pH 7.

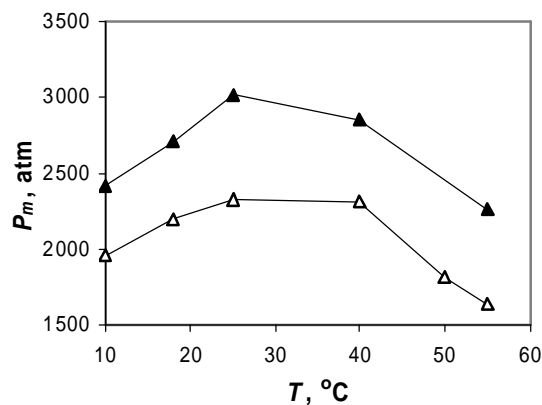
**Lentelė 10.** HSA jungimosi su dekanotu (DK) ir dodekanoatu (DDK) parametrai.

Parametrai	DK	DDK	Nuokrypis
$\Delta_b \beta$ , cm <sup>6</sup> /(cal×mol)	3	-0,2	±0,05
$\Delta_b V$ , cm <sup>3</sup> /mol	-52	-11	±2
$K_b$ , M <sup>-1</sup>	$5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$	-
$K_d$ , M	$2 \times 10^{-6}$	$4 \times 10^{-7}$	-



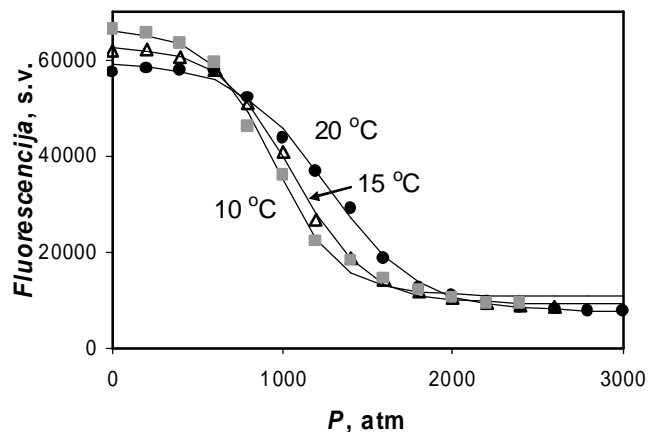
### 3.1.7 HSA, HSA – DK komplekso $P_m$ priklausomybė nuo temperatūros

Prie skirtingos temperatūros nustatos HSA slėginės denatūracijos fluorescencijos kreivės ir  $P_m$ . HSA lydymosi slėgių ( $P_m$ ) vertės nesant ir esant 25  $\mu\text{M}$  dekanato atidėjus nuo temperatūros (19 pav.), galima išvelgti elipsinės baltymų Slėgio-Temperatūros (P-T) fazių diagramos fragmentą, kaip minima daugelyje literatūrinių šaltinių. HSA – DK komplekso P–T fazių diagrama pasislinkusi į aukštesnio slėgio sritį. Tai parodo, kad DK stabilizuoja aukštu slėgiu denatūruojamą HSA, esant temperatūrai nuo 10  $^{\circ}\text{C}$  iki 55  $^{\circ}\text{C}$ .



**Pav. 20.** HSA ( $\Delta$ ), HSA, esant 25  $\mu\text{M}$  dekanato ( $\blacktriangle$ ) lydymosi slėgio ( $P_m$ ) priklausomybė nuo temperatūros. Tiriama HSA tirpalą sudarė: 10  $\mu\text{M}$  HSA, 0 arba 25  $\mu\text{M}$  dekanato, 10 mM Bis-Tris ir 50 mM Fosfatinis buferiai, 150 mM NaCl, pH 7, 0,36 % DMSO. Tirpalas žadintas 285 nm šviesa ir fiksuota 340 nm fluorescencija.

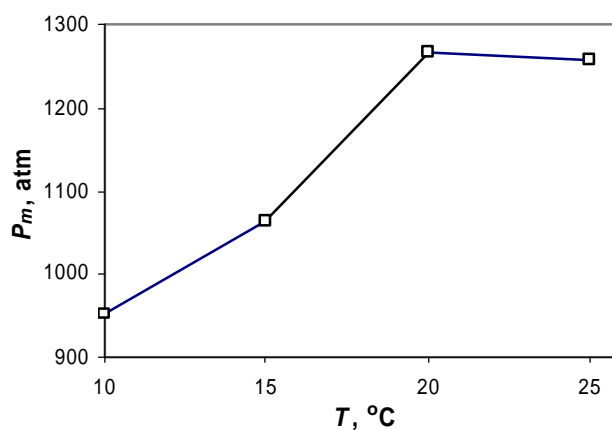
Panašus eksperimentas, tik mažesniame temperatūriniame intervale buvo atliktas, kai į tirpalą pridėta ANS ir Gnd. Tirpalas buvo sudarytas iš: 6  $\mu\text{M}$  HSA, 1M Gnd, 50 $\mu\text{M}$  ANS, 10mM Bis-Tris ir fosfatinio buferio, 150 mM NaCl, pH=7. Tirpalas žadintas 380 nm ir fiksuota 480 nm fluorescencija. Fluorescencinėse kreivėse galima pastebėti, kad žemiau 20  $^{\circ}\text{C}$  HSA slėginė išsivyniojimo tranzicija slenkasi į žemesnio slėgio sritį (Pav. 21). Tai reiškia, kad žemesnėje temperatūroje, baltymo stabilumas sumažėja. Šiuose eksperimentuose nebuvo atsižvelgta, jog prie žemesnės temperatūros HSA išsivyniojimo reakcijos pusiausvyros greitis prie pakitusio slėgio gali būti mažesnis. Matematinio modeliu nustačius nuo slėgio priklausomus HSA išsivyniojimo parametrus (Lentelė 11) pastebėta, kad prie žemesnės nei 20  $^{\circ}\text{C}$  temperatūros, HSA išsivyniojimo neigiamas tūrio pokytis didėja, o  $P_m$  – mažėja, kai kiti modelyje esantys parametrai ( $\Delta U G_0 = 2,8 \text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta U \beta_0 = 0$ ) nekinta.



**Pav. 21.** HSA prie skirtingos temperatūros: 20 °C (●), 15 °C (Δ), 10 °C (■). Čia taškai – eksperimentiniai duomenys, kreivė – matematinis modelis.

**Lentelė 11.** HSA išsivyniojimo parametrai nustatyti artinant teorinį modelį prie eksperimentinių duomenų. Išsivyniojimo laisvosios energijos pokytis ( $\Delta U G_0$ ) laikytas 2,8 kcal/mol, o suspaudžiamumo pokytis ( $\Delta U \beta_0$ ) artimas nuliui.

$T, ^\circ\text{C}$	$\Delta U V, \text{cm}^3/\text{mol}$	$P_m, \text{atm}$
25	-91	1258
20	-91	1268
15	-108	1063
10	-121	950



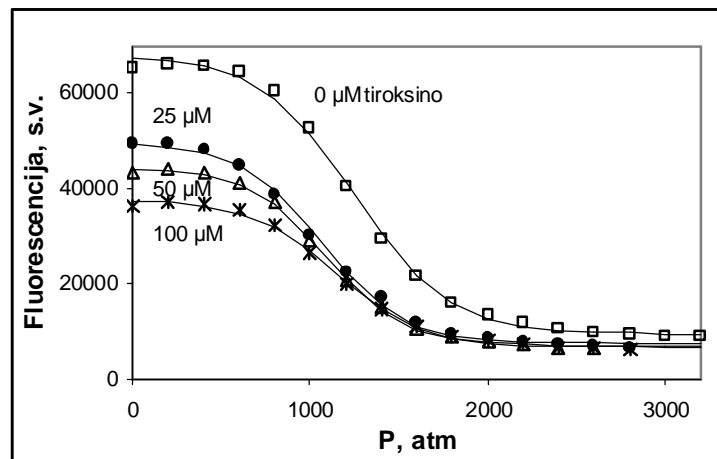
**Pav. 22.** Temperatūros įtaka slėginei HSA denatūracijai.

### 3.1.8 HSA, HSA – tiroksinas slėginė denatūracija

Šiame eksperimente buvo tirta, kaip tiroksinas veikia HSA denatūraciją slėgiu. Baltymo tirpalą suslėgus nuo 1 atm iki 3200 atm stebėta pilna HSA išsivyniojimo tranzicija (pav. 23,

duomenys pavaizduoti □) ir nustatytas lydymosi slėgis ( $P_m = 1247 \pm 50$  atm) (lentelė 12). Į HSA tirpalą pridėjus tiroksino, HSA išsivyniojimo tranzicija pasislinko į žemesnio slėgio sritį ( $P_m = 1065 \pm 50$  atm) (lentelė 12), o ANS fluorescencija sumažėjo (23 pav.). Į tirpalą pridėjus 100  $\mu$ M tiroksino, baltymo  $P_m$  pasislinko į aukštesnio slėgio sritį, lyginant su mažesne tiroksino koncentracija (lentelė 12).

Artinant matematinį modelį prie eksperimentinių duomenų buvo nustatytas HSA, HSA komplekso su tiroksinu išsivyniojimo tūrio pokyčiai ( $\Delta_U V$ ) prie 1 atm ir 25 °C, kai tiriamos sistemos išsivyniojimo laisvoji energija ( $\Delta_U G$ ) 2,8 (kcal/mol), o suspaudžiamumas,  $\Delta_U \beta = 0$ , prie 1 atm ir 25 °C. Išsivyniojimo tūrio pokytis kinta paklaidų ribose, todėl negalime teigti, kad tiroksinas keičia HSA išsivyniojimo tūrio pokytį.



**Pav. 23.** HSA slėginė denatūracija, esant skirtingai tiroksino koncentracijai. Tiriamą tirpalą sudarė: 3  $\mu$ M HSA, 1 M Gnd, 10 mM Bis-Tris, 50 mM fosfatinis buferiai, 150 mM NaCl, pH = 7, T = 25 °C, 50  $\mu$ M ANS (tirpintas vandenyje), 0 - 100  $\mu$ M tiroksino (ištirpintas 0,2 M NaOH). ANS žadintas 380 nm bangos ilgio šviesa ir fiksuota 480 nm fluorescencija.

**Lentelė 12.** Slėgio poveikį charakterizuojantys HSA išsivyniojimo parametrai, esant skirtingai tiroksino koncentracijai tirpale.

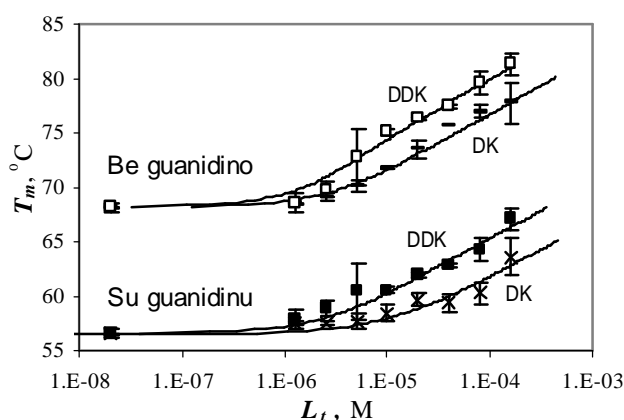
Tiroksinas, $\mu$ M	$\Delta_U V$ , $\text{cm}^3/\text{mol}$	$P_m$ , atm
0	-92	1247
25	-108	1067
50	-106	1087
100	-100	1146

Nors tiroksinas pastebimai keičia HSA slėginės denatūracijos fluorescencijos kreivę, tačiau iš gautų duomenų negalime nustatyti HSA – tiroksino jungimosi konstantos, nes nestebimi ženklūs slėginiai poslinkiai didinant tiroksino koncentraciją tirpale.

## 3.2 Temperatūros poslinkio eksperimentai

### 3.2.1 HSA - DK, DDK jungimasis temperatūros poslinkio metodu

Pagal HSA lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) priklausomybę nuo ligando koncentracijos ( $L_t$ ) (24 pav.), buvo nustatyti HSA – dekanato, dodekanoato jungimosi konstantos esant  $T_0 = 25\text{ }^\circ\text{C}$  (13 lentelė). Pastebėta, kad dodekanoatas jungiasi 4-5 kartus stipriau, nei dekanatas. Guanidinas (Gnd) nežymiai (paklaidų ribose) keičia HSA – dekanato, dodekanoato jungimosi konstantą. Artinant modelį prie eksperimentinių duomenų, baltymo išsivyniojimo entalpijos pokytis ( $\Delta_U H_{Tr}$ ) ir šiluminės talpos pokytis ( $\Delta_U C_{p\_Tm}$ ) buvo pastovūs, tiek esant, tiek nesant Gnd:  $\Delta_U H_{Tr} = 60\text{ kcal/mol}$ ,  $\Delta_U C_{p\_Tm} = 2,4\text{ kcal}/(\text{mol}\times\text{K})$ .



**Pav. 24.** HSA lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) priklausomybė nuo dekanato (DK) ( $\times$ ) ir dodekanoato (DDK) ( $\blacksquare$ ) koncentracijos ( $L_t$ ), kai tirpale 1 M Gnd ir DK (–), DDK ( $\square$ ) be Gnd. Tiriamą HSA tirpalą sudarė: 4  $\mu\text{M}$  HSA, 0 – 800  $\mu\text{M}$  DK arba DDK, 0,4 % DMSO, 50  $\mu\text{M}$  ANS, 150 mM NaCl, 10 mM Bis – tris, 50 mM fosfatinis buferiai, pH 7.

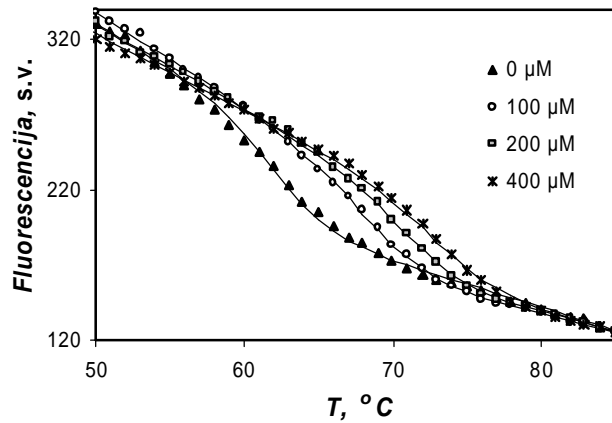
**Lentelė 13.** HSA – dekanato (DK), dodekanoato (DDK) jungimosi konstantos, tirpale esant ir nesant 1M guanidino (Gnd)

	DK	DDK
	$K_{b\_T_0}, \text{M}^{-1}$	
Be Gnd	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^7$
Su Gnd	$5 \times 10^5$	$2,5 \times 10^6$

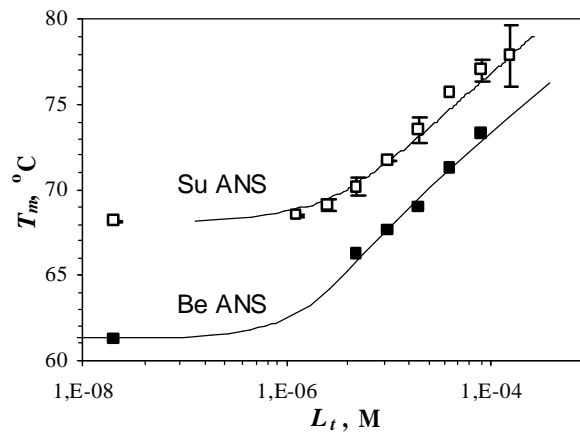
### 3.2.2 HSA – dodekanoato jungimasis su ir be ANS

Siekiant išsiaiškinti ar ANS keičia HSA - dodekanoato jungimąsi buvo atlikti eksperimentai, stebint HSA išsisukimo tranzicijas su ir be ANS. Tiriamą HSA tirpalą sudarė: 4-5

$\mu\text{M}$  HSA, 0-400  $\mu\text{M}$  dekanato (DK), 150 mM NaCl, 0  $\mu\text{M}$  ir 50  $\mu\text{M}$  ANS, 10 mM Bis-Tris 50 mM fosfatinio buferių mišinys,  $pH$  7. Artinant modelį prie eksperimentinių duomenų, baltymo išsivyniojimo ir kai kurie jungimosi parametrai buvo laikomi pastovūs, tiek esant, tiek nesant ANS:  $\Delta_U H_{Tr} = 6$  kcal/mol,  $\Delta_U C_{p\_Tm} = 2,4$  kcal/(mol $\times$ K),  $\Delta_b C_{p\_Tm} = -0,2$  kcal/(mol $\times$ K),  $\Delta_b H_{Tr} = -10$  kcal/mol.



**Pav. 25.** HSA išsivyniojimo tranzicijos esant 0 - 400  $\mu\text{M}$  dekanato. Stebima HSA struktūroje esančio triptofano fluorescencija prie 340 nm. Kuo daugiau tirpale dekanato, tuo HSA išsivyniojimo tranzicijos slenkasi į aukštesnės temperatūros sritį.



**Pav. 26.** HSA,  $T_m$  priklausomybė nuo DK koncentracijos ( $L_t$ ), esant tirpale 50  $\mu\text{M}$  ANS ( $\square$ ) ir be ANS ( $\blacksquare$ ).

**Lentelė 14** HSA – dekanato jungimosi ( $K_b$ ) ir disociacijos ( $K_d$ ) konstantos be ir su ANS.

	$K_b, M^{-1}$	$K_d, M$
<b>Be ANS</b>	$1,5 \times 10^7$	$6,7 \times 10^{-8}$
<b>Su ANS</b>	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^{-7}$

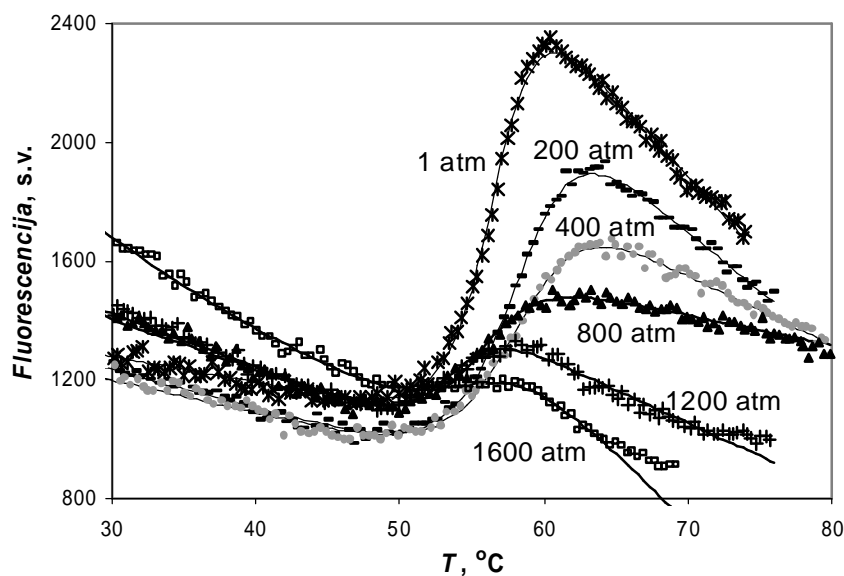
ANS beveik nekeičia (paklaidų ribose) HSA – dekanato jungimosi konstantos.

### 3.3 Terminis poslinkis prie aukšto slėgio

Šiame skyrelyje pateiksiu keleta eksperimentinių duomenų su dviem baltymais: rhCAI ir Hsp90N. Eksperimentai buvo atlikti slėginiu fluorimetru (2,5 skyrelis), prie kurio prijungta vandens kaitinimo vonelė. Visi eksperimentai buvo vykdomi pagal pasirinkta schemą, jog prie pasirinkto aukšto slėgio, tiriamas tirpalas kaitinamas 2 °C/ min greičiu nuo 25 iki 70 ar 85 °C, ir kas 10 sekundžių fiksuojama fluorescencija.

#### 3.3.1 rhHsp90N temperatūrinė denatūracija, esant aukštam slėgiui

Norint nustatyti aukšto slėgio įtaką rhHsp90N stabilumui ir lydymosi temperatūrai ( $T_m$ ), prie pasirinkto pastovaus aukšto slėgio, baltymo tirpalas buvo veikiamas temperatūra nuo 25 °C iki 75 - 80 °C. Temperatūrinės rhHsp90N denatūracijos fluorescencijos kreivėse stebima aiški aukšto slėgio įtaka baltymo išsivyniojimo tranzicijai (Pav. 27).

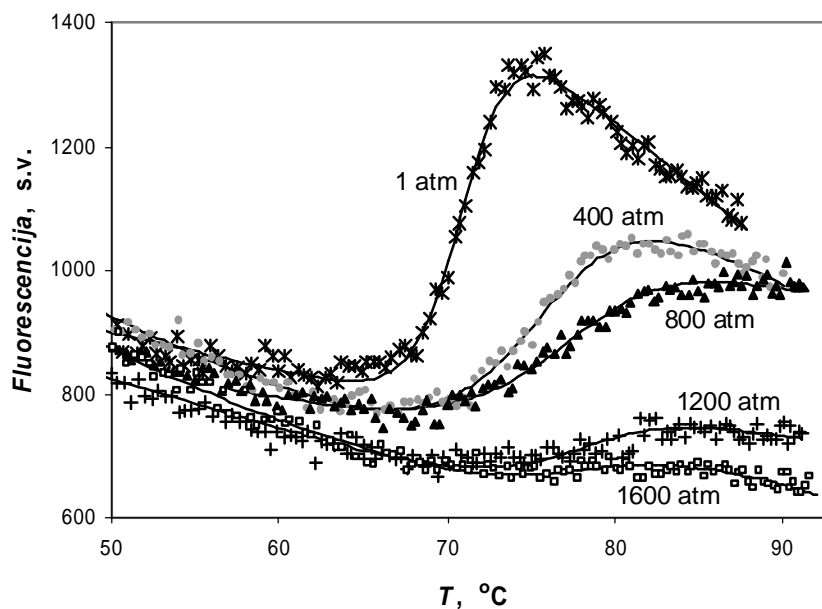


**Pav. 27.** Hsp90N temperatūrinė denatūracija prie skirtingo slėgio. Tiriamas tirpalas buvo sudarytas iš: 8  $\mu$ M rhHsp90N, 50  $\mu$ M ANS (ištirpintas vandenyje), 10 mM bis-tris buferio, pH 7. ANS žadintas 380 nm bangos ilgio šviesa ir fiksuota 480 nm fluorescencija.

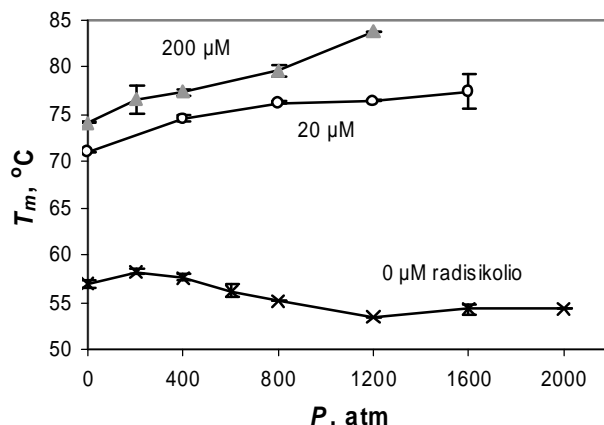
Aukštas slėgis sumažina tranzicijos fluorescenciją ir įtakoja baltymo išsivyniojimo entalpijos pokytį, kuris nusako tranzicijos pokrypio kampą (27 pav.). Pastebėtas baltymo  $T_m$  padidėjimas iki 400 atm ir  $T_m$  sumažėjimas aukštesniame slėgyje (Pav. 29, Lentelė 15).

### 3.3.2 rhHsp90N temperatūrinė denatūracija, aukštame slėgyje esant radisikolio

Suslėgus Hsp90N – radisikolio tirpalą iki 400 atm, 800 atm, 1200 atm ir 1600 atm ir jį kaitinant nuo 25 °C iki 95 °C temperatūros, buvo matuojama 480 nm ANS fluorescencija ir stebima baltymo išsivyniojimo tranzicija, kai tirpale 20 μM radisikolio. Fluorescencijos greivėse aiškiai pastebima, kad aukštas slėgis mažina fluorescenciją baltymo išsivyniojimo tranzicijos dalyje (28 pav.). Esant 1200 atm ir 1600 atm slėgiui baltymo – radisikolio komplekso fluorescencinės kreivės labai stipriai keičia savo formą ir tai gali parodyti apie baltymo su radisikoliu vykstančius struktūrinius pokyčius. Iš fluorescencijos kreivių nustačius rhHsp90N  $T_m$ , pastebėta, kad aukštas slėgis iki 1600 atm stabilizuoja temperatūra veikiamą baltymą, padidindamas  $T_m$  nuo 71 °C iki 77,4 °C (lentelė 15).



**Pav. 28.** Hsp90N-radisikolis komplekso temperatūrinė denatūracija, esant 1 atm, 400 atm, 800 atm, 1200 atm, 1600 atm slėgiui. Baltymo tirpalą sudarė: 8 μM Hsp90N, 20 μM radisikolis, 50 μM ANS, 10mM bis-tris buferis, pH 7. Čia taškai – eksperimentų duomenys, kreivė fizikinis modelis (14).



**Pav. 29.** Hsp90N  $T_m$  priklausomybė nuo slėgio, esant 0  $\mu M$  (x); 20  $\mu M$  (o) ir 200  $\mu M$  (▲) radisikolio koncentracijai baltymo tirpale. Bandymai kartoti tris kartus, prie taškų atidėti standartiniai nuokrypiai. Dauguma taškų nuokrypis mažesnis už simbolio dydį

**Lentelė 15.** Hsp90N lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) kitimas baltymą vaikiant slėgiu, nesant radisikolio ( $T_{m1}$ ) ir esant 20  $\mu M$  radisikolio ( $T_{m2}$ ).  $\Delta T_{m21} = T_{m2} - T_{m1}$ .

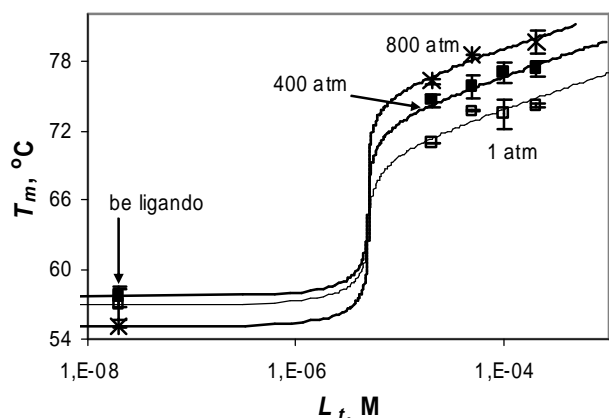
$P$ , atm	$T_{m1}$ , °C	$T_{m2}$ , °C	$\Delta T_{m21}$ , °C
1	57,0	71,0	14,0
200	58,3	-	-
400	57,7	74,6	16,8
600	56,2	-	-
800	55,1	76,3	21,1
1200	53,4	76,4	23,0
1600	54,3	77,4	23,1
2000	54,4	-	-

Lyginant kaip aukštas slėgis lemia rhHsp90N temperatūrinę denatūraciją esant ir nesant radisikolio (pav. 29), galima teigti, kad prie baltymo prisijungęs radisikolis stipriai pakeičia rhHsp90N stabilumą ir atsaką į aukšto slėgio poveikį.

### 3.3.3 Hsp90N – radisikolio jungimasis prie aukšto slėgio

Temperatūrinio poslinkio metodu, prie 1 atm, 400 atm, 800 atm slėgio buvo nustytos rhHsp90N lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) tirpale esant skirtingai radisikolio koncentracijai. Iš  $T_m$  priklausomybės nuo ligando koncentracijos ( $L_t$ ) (30 pav.) buvo nustatytos rhHsp90N - radisikolio jungimosi konstantos ( $K_b$ ) esant 1 atm, 400 atm, 800 atm slėgiui. Pastebėta, kad aukštame slėgyje rhHsp90N – radisikolio jungimosi konstanta padidėja 200 kartų (lentelė 16).





**Pav. 30.** Hsp90N – radisikolio jungimasis prie 1 atm (□), 400 atm (■), 800 atm (\*). Tiriamą tirpalą sudarė: 10 μM rhHsp90N, 50 μM ANS (ištirpintas vandeny), 0 – 200 μM radisikolio (ištirpintas DMSO), 1,8 % DMSO, 10 mM bis-tris, 50mM fosfatinis buferiai, pH 7.

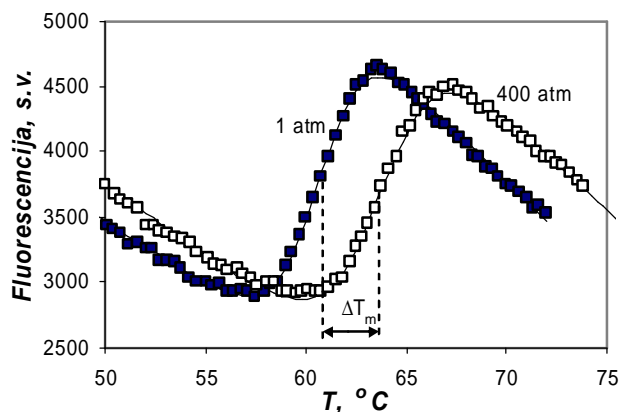
**Lentelė 16.** rhHsp90N – radisikolio jungimosi ( $K_b$ ) ir disociacijos ( $K_d$ ) konstantos prie skirtingo slėgio. Čia  $T_r$  - baltymo lydymosi temperatūra, nesant ligando. Modelyje esantys pastovūs parametrai: baltymo išsivyniojimo entalpijos pokytis, nesant ligandui ( $\Delta_u H_{Tr} = 140$  kcal/mol), išsivyniojimo šiluminės talpos pokytis ( $\Delta_u C_{Tr} = 1,5$  kcal/(mol×K)), baltymo – ligando jungimosi entalpijos pokytis ( $\Delta_b H_{T0} = -5$  kcal/mol), jungimosi šiluminės talpos pokytis ( $\Delta_b C_{T0} = -0,2$  kcal/(mol×K)), kai  $T_0 = 37$  °C.

$P$ , atm	$T_r$ , °C	$K_b$ , $M^{-1}$	$K_d$ , M
1	57	$3,5 \times 10^9$	$2,9 \times 10^{-10}$
400	57,7	$1,7 \times 10^{10}$	$5,9 \times 10^{-11}$
800	55	$8 \times 10^{11}$	$1,3 \times 10^{-12}$

### 3.3.4 rhCAI $T_m$ kitimo priklausomybė nuo slėgio ir metazolamido

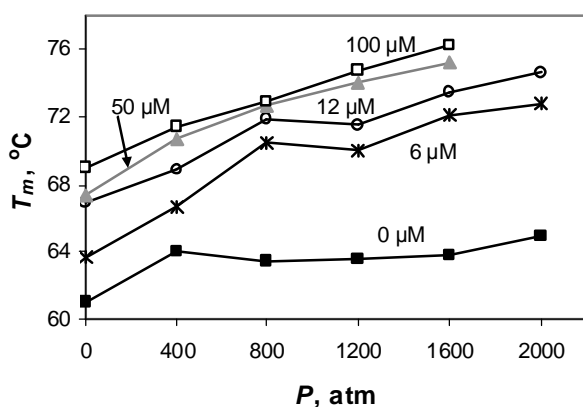
Norint išsiaiškinti ar aukštas slėgis keičia rhCAI lydymosi temperatūrą ( $T_m$ ), kuomet tirpale yra ir nėra baltymą stabilizuojančio ligando – metazolamido, reikėjo atlikti rhCAI temperatūrinės denatūracijos eksperimentus, ties pasirinktu pastoviu aukštu slėgiu. Tiriamas rhCAI tirpalas suspaustas iki norimo pastovaus slėgio, ir kaitinamas nuo 25 °C iki 85 °C temperatūros, 2 °C/min greičiu. Viso kaitinimo metu, žadinant tirpalą 380 nm šviesa, matuojama 480 nm fluorescencija. Gauti fluorescencijos duomenys aproksimuojami teoriniu modeliu (6), nustatant  $T_m$ .

Nustačius rhCAI temperatūrinės denatūracijos fluorescencijos kreives prie normalaus atmosferos ir aukšto slėgių, pastebėta, kad nesant tirpale metazolamido, 400 atm slėgyje baltymo temperatūrinės denatūracijos fluorescencijos kreivė slenka į aukštesnės temperatūros sritį (pav. 31). Šis poslinkis parodo, kad aukštas slėgis stabilizuoja temperatūra veikiamą rhCAI.



**Pav. 31.** rhCAI denatūracija aukšta temperatūra prie 1 atm (■) ir 400 atm (□). Tiriamas tirpalas: 3 μM rhCAI, 50 μM ANS, 50 mM fosfatinis, buferis (pH 7), 1,8% DMSO.

Esant slėgiui nuo 400 atm iki 2000 atm  $T_m$  daugiau ar mažiau išlieka pastovi (Pav. 32, taškai pažymėti ■). Esant baltymo tirpale 6 – 100 μM metazolamido, slėgis iki 2000 atm lemia rhCAI lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) padidėjimą. Kuo aukštesnis slėgis, tuo rhCAI  $T_m$  didesnis (Pav. 32).

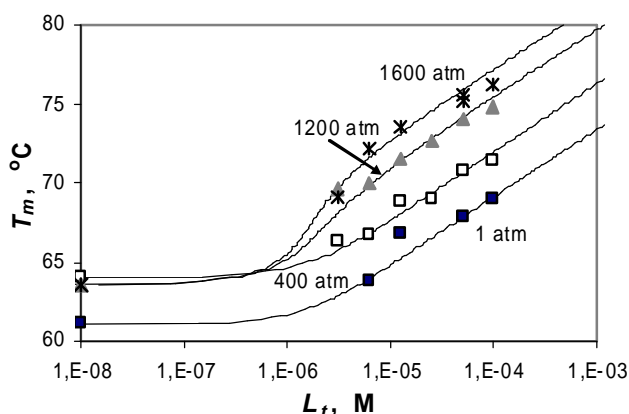


**Pav. 32.** rhCAI,  $T_m$  priklausomybė nuo slėgio, kai tirpale 0 μM (■), 6,25 μM (\*), 12,5 μM (○), 50 μM (▲), 100 μM (□) metazolamido koncentracija. Tiriamas tirpalas buvo sudarytas iš: 3 μM rhCAI, 50 μM ANS, 50 mM fosfatinis, buferis (pH 7), 1,8 % DMSO, 0 - 200 μM metazolamido.

Aukšto slėgio stabilizuojamąjį poveikį galima aiškinti taip, kad padidėjusi temperatūra padidina išsisukusio baltymo tūrį daugiau nei susisukusio (Desai, Panick et al. 1999), o slėgiu yra skatinama reakcija, kurios metu sistemos tūris sumažėtų. Eksperimentais su citochromu c, buvo parodyta, kad aukštas slėgis iki 2200 atm stabilizuoja temperatūra veikiamą baltymą, padidindamas jo lydymosi temperatūrą daugiau nei 13 °C, kai pH 4,3 (Dubins, Filfil et al. 2003).

### 3.3.5 rhCAI – metazolamido jungimasis, esant aukštam slėgiui

Iš rhCAI temperatūros denatūracijos fluorescencijos kreivių nustatyta rhCAI lydymosi temperatūros ( $T_m$ ), esant 0 – 100  $\mu\text{M}$  metazolamido koncentracijai. Nustačius  $T_m$  priklausomybę nuo pilnos ligando koncentracijos ( $L_t$ ), prie skirtingo slėgio ir artinant fizikinį modelį (51) prie eksperimentinių duomenų (pav. 33), buvo įvertintos rhCAI – metazolamido jungimosi konstantos, esant skirtingam slėgiui (lentelė 17).



**Pav. 33.** HSA  $T_m$  priklausomybė nuo metazolamido koncentracijos tirpale ( $L_t$ ), esant 1 atm (■), 400 atm (□), 1200 atm (▲), 1600 atm (\*) slėgiui. Čia taškai – eksperimentiniai duomenys, kreivė einanti per juos – fizikinis modelis (51 lygtis). Tiriamas tirpalas buvo sudarytas iš: 3  $\mu\text{M}$  rhCAI, 0 – 200  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  ANS, 1,8 % DMSO, 50mM fosfatinio buferio, pH 7. Artinant teorinį modelį prie eksperimentinių duomenų kai kurie parametrai buvo nekeičiami:  $\Delta_u H_{Tr} = 100$  kcal/mol,  $\Delta_u C_{Tr} = 1,5$  kcal/(mol $\times$ K),  $\Delta_b H_{To} = 5$  kcal/mol,  $\Delta_b C_{To} = 0,2$  kcal/(mol $\times$ K) (51 lygtis).

**Lentelė 17.** rhCAI – METZ jungimosi parametrai prie skirtingo slėgio. Čia  $T_r$  – rhCAI lydymosi temperatūra tirpale nesant metazolamido.

$P$ , atm	$T_r$ , °C	$K_b$ , $\text{M}^{-1}$	$K_d$ , M
1	61	$1,5 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{-7}$
40	64	$1,5 \times 10^6$	$6,6 \times 10^{-7}$
1200	63,6	$1,2 \times 10^7$	$8,3 \times 10^{-8}$
1600	63,6	$3,1 \times 10^7$	$3,2 \times 10^{-8}$

Aukštas slėgis iki 400 atm nekeičia jungimosi konstantos, o esant 1600 atm slėgiui jungimosi konstanta ( $K_b$ ) padidėja 20 kartų (lentelė 17).

## Išvados

1. Sumažinus HSA stabilumą 1 M guanidinu, galima aukštu slėgiu iki 4000 atm stebėti HSA išsivyniojimo tranziciją, kuomet nustatytas  $P_m = 1326 \pm 30$  atm.
2. Matuojant stacionarią fluorescenciją aukštame slėgyje, nustatyti HSA – dekanato, dodekanoato jungimosi tūrio pokyčiai ( $\Delta_b V_0$ ) atitinkamai  $-52$  cm<sup>3</sup>/mol ir  $-11$  cm<sup>3</sup>/mol, suspaudžiamumo pokyčiai ( $\Delta_b \beta$ ) atitinkamai  $3$  cm<sup>6</sup>/(cal×mol) ir  $-0,2$  cm<sup>6</sup>/(cal×mol), kai jungimosi konstantos ( $K_b$ ) atitinkamai  $5 \times 10^5$  M<sup>-1</sup> ir  $2,5 \times 10^6$  M<sup>-1</sup>.
3. Aukštas slėgis iki 400 atm lemia rhHsp90N, rhCAI lydymosi temperatūros ( $T_m$ ) padidėjimą, o toliau didinant slėgį  $T_m$  sumažėja ir pasiekia sotį.
4. Aukštas slėgis lemia rhHsp90N – radisikolio ir rhCAI – metazolamido jungimosi konstantų padidėjimą.

## Investigations of protein-ligand binding at high pressure

### SUMMARY

Fluorescence method at high pressure was used to carry out the unfolding and binding experiments with three proteins : human serum albumin (HSA), recombinant human (rh) heat shock protein 90 N – terminal domain (rhHsp90N) and carbonic anhydrase I (rhCAI). HSA with 1 M guanidinium can be unfolded by high pressure up to 4000 atm, with the melting pressure ( $P_m$ ) of  $1326 \pm 30$  atm. We also determined the HSA unfolding transition at high pressure up to 4000 atm with different concentration of decanoate and dodecanoate. The HSA – decanoate, dodecanoate binding parametres were determined at higt pressure. The binding volume change ( $\Delta_b V_0$ ) of the HSA- decanoate and dodecanoate were  $-52 \text{ cm}^3/\text{mol}$  ir  $-11 \text{ cm}^3/\text{mol}$  respectively and the binding compressibility change were ( $\Delta_b \beta$ )  $3 \text{ cm}^6/(\text{cal} \times \text{mol})$  ir  $-0,2 \text{ cm}^6/(\text{cal} \times \text{mol})$  respectively, when binding constants were  $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  ir  $2,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$  respectively. The temperature denaturation of rhCAI and rhHsp90N with ligands and without them were determined at high pressure. High pressure changed the stability of rhCAI and rhHsp90N and enhance the proteins – ligands binding constants.

## **Padėka**

Dėkoju savo darbo vadovui Daumantui Matuliui, Piotrui Cimperman už išvestą fizikinį modelį, pastabas, naudingus patarimus ir diskusijas, kurios padėjau geriau suprasti darbe atliktų eksperimentų rezultatus. Už draugišką darbo atmosferą ir naudingus patarimus noriu padėkoti visai Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijai.

Dėkoju savo šeimai už rūpinimąsi mano išsilavinimu ir tvirtą palaikymą visų studijų metu.

## NAUDOTA LITERATŪRA

- Barbosa S., Taboada P., et al. (2003). "Protein - ligand interaction: volumetric and compressibility characterization of the binding of two anionic penicillins to human serum albumin." Langmuir **19**: 1446-1448.
- Boonyaratanakornkit, B., C. Park, et al. (2002). "Pressure effect on intra- and intermolecular interactions within proteins." Biochimica et Biophysica Acta: 235-249.
- Chalikian, T. V. (2003). "Volumetric properties of proteins." Annu Rev Biophys Biomol Struct **32**: 207-35.
- Chalikian, T. V. and K. J. Breslauer (1996). "Compressibility as a means to detect and characterize globular protein states." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(3): 1012-4.
- Chapeaurouge, A., J. S. Johansson, et al. (2001). "Folding intermediates of a model three-helix bundle protein. Pressure and cold denaturation studies." J Biol Chem **276**(18): 14861-6.
- Cimpmperman, P., L. Baranauskiene, et al. (2008). "A quantitative model of thermal stabilization and destabilization of proteins by ligands." Biophys J **95**(7): 3222-31.
- Clery-Barraud, C., A. Ordentlich, et al. (2002). "Pressure and heat inactivation of recombinant human acetylcholinesterase. Importance of residue E202 for enzyme stability." Eur J Biochem **269**(17): 4297-307.
- Desai, G., G. Panick, et al. (1999). "Pressure-jump studies of the folding/unfolding of trp repressor." J Mol Biol **288**(3): 461-75.
- Dubins, D. N., R. Filfil Jr., et al. (2000). "The role of water in protein - ligand interactions: volumetric characterizations of the binding of 2'-CMP and 2'-CMP to robonuclease A." J. Phys. Chem. B **104**: 390-401.
- Dubins, D. N., R. Filfil, et al. (2003). "Volume and compressibility changes accompanying thermally-induced native-to-unfolded and molten globule-to-unfolded transitions of cytochrome c: a high pressure study." Biochemistry **42**(29): 8671-8.
- Gekko, K. and Y. Hasegawa (1986). "Compressibility-structure relationship of globular proteins." Biochemistry **25**(21): 6563-71.
- Hawley, S. A. (1971). "Reversible pressure--temperature denaturation of chymotrypsinogen." Biochemistry **10**(13): 2436-42.
- Heremans, K. (1982). "High pressure effects on proteins and other biomolecules." Annu Rev Biophys Bioeng **11**: 1-21.
- Heremans, K. and L. Smeller (1998). "Protein structure and dynamics at high pressure." Biochim Biophys Acta **1386**(2): 353-70.
- Lesch, H., H. Stadlbauer, et al. (2002). "Stability diagram and unfolding of a modified cytochrome c: what happens in the transformation regime?" Biophys J **82**(3): 1644-53.
- Mantulin, W. W. and H. J. Pownall (1985). "Reversible folding reactions of human apolipoprotein A-I: pressure and guanidinium chloride effects." Biochim Biophys Acta **836**(2): 215-21.
- Matulis, D., C. G. Baumann, et al. (1999). "1-anilino-8-naphthalene sulfonate as a protein conformational tightening agent." Biopolymers **49**(6): 451-8.
- Matulis, D., J. K. Kranz, et al. (2005). "Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor." Biochemistry **44**(13): 5258-66.
- Matulis, D. and R. Lovrien (1998). "1-Anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation." Biophys J **74**(1): 422-9.

- Meersman, F., C. M. Dobson, et al. (2006). "Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions." Chem Soc Rev **35**(10): 908-17.
- Mitra, L., N. Smolin, et al. (2006). "Pressure perturbation calorimetric studies of the solvation properties and the thermal unfolding of proteins in solution--experiments and theoretical interpretation." Phys Chem Chem Phys **8**(11): 1249-65.
- Mozhaev, V. V., K. Heremans, et al. (1996). "High pressure effects on protein structure and function." Proteins **24**(1): 81-91.
- Pastorekova, S., A. Casini, et al. (2004). "Carbonic anhydrase inhibitors: the first selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the tumor-associated isozyme IX." Bioorg Med Chem Lett **14**(4): 869-73.
- Peters, T. (1996). "All about albumin. Biochemistry, genetics and medical applications." Academic press: 1-432.
- Prehoda, K. E., E. S. Mooberry, et al. (1998). "Pressure denaturation of proteins: evaluation of compressibility effects." Biochemistry **37**(17): 5785-90.
- Saifer, A. and L. Goldman (1961). "The free fatty acids bound to human serum albumin." J. Lipid Research **2**(3): 269-270.
- Sasahara, K. and K. Nitta (1999). "Pressure-induced unfolding of lysozyme in aqueous guanidinium chloride solution." Protein Sci **8**(7): 1469-74.
- Silva, J. L. and G. Weber (1993). "Pressure stability of proteins." Annu Rev Phys Chem **44**: 89-113.
- Suzuki, K. (1972). "Measurements at high pressure." Methods Enzymol **26 PtC**: 424-52.
- Tanaka, N., H. Nishizawa, et al. (1997). "Structure of pressure-induced denatured state of human serum albumin: a comparison with the intermediate in urea-induced denaturation." Biochim Biophys Acta **1338**(1): 13-20.
- Taulier, N. and T. V. Chalikian (2002). "Compressibility of protein transitions." Biochim Biophys Acta **1595**(1-2): 48-70.
- Zhou, J. M., L. Zhu, et al. (2000). "Inactivation of creatine kinase by high pressure may precede dimer dissociation." Eur J Biochem **267**(4): 1247-53.