



VILNIAUS UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
BIOCHEMIJOS IR MOLEKULINĖS BIOLOGIJOS KATEDRA

Biochemijos studijų programos IV kurso studentas

Gediminas SKVARNAVIČIUS

POLIAMINO RŪGŠČIŲ IR ANIJONINIŲ
DETERGENTŲ SAŲVEIKOS TERMODINAMIKA

BAKALAURO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo recenzentas:

Dr. Andžėjus VOITECHOVIČIUS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas PETRAUSKAS

Darbo konsultantas:

Prof. Daumantas MATULIS

VILNIUS, 2014

BAKALAURO BAIGIAMASIS DARBAS

POLIAMINO RŪGŠČIŲ IR ANIJONINIŲ
DETERGENTŲ SAŲVEIKOS TERMODINAMIKA

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentas:

Gediminas SKVARNAVIČIUS

Darbo vadovas:

Dr. Vytautas PETRAUSKAS

Darbo konsultantas:

Prof. Daumantas MATULIS

VILNIUS, 2014

Turinys

Įvadas	2
1. Literatūros apžvalga	3
1.1. Detergentai	3
1.2. Sąveika tarp polimerų ir detergentų	4
1.3. Sąveika tarp baltymo ir detergentų	5
1.3.1. Baltymų stabilizavimas mažomis detergento koncentracijomis	6
1.3.2. Denatūracija joniniais detergentais	6
1.4. Sulfatai ir sulfonatai gamtoje	7
1.4.1. Mažamolekulinės medžiagos	7
1.4.2. Heparano sulfatas	8
1.4.3. Chondroitino sulfatas	9
1.4.4. Sulfoninti baltymai	9
2. Medžiagos ir metodai	10
2.1. Medžiagos	10
2.1.1. Poliamino rūgštys	10
2.1.2. Detergentai	10
2.2. Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITC)	11
2.3. ITC eksperimentas	12
2.4. Duomenų analizė	12
3. Rezultatai	15
3.1. Jungimosi konstantos nustatymas	17
3.2. Temperatūros įtaka sąveikai	19
3.3. Tirpalo joninės jėgos įtaka sąveikai	19
3.4. Alifatinės grandinės ilgio įtaka sąveikai	20
4. Rezultatų aptarimas	22
5. Išvados	25
Literatūros sąrašas	30

Įvadas

Net septynios iš dvidešimties pagrindinių baltymus sudarančių amino rūgščių gali būti jonizuojamos, tai yra priklausomai nuo terpės pH turėti teigiamą arba neigiamą krūvį. Krūvį turinčios amino rūgštys turi svarbią reikšmę baltymo tretinei struktūrai (sudaro druskos tiltelius), būdamos baltymo išorėje didina baltymo tirpumą, dalyvauja baltymo išsivyniojime veikiant joniniams detergentams, yra svarbios ligando prisijungime prie baltymo bei baltymų tarpusavio sąveikoje (Keshwani et al., 2013; Rocklin et al., 2013). Nepaisant šių sąveikų svarbos, teigiamai ir neigiamai įkrautų grupių indėlis į visos sistemos termodinamiką vis dar nėra iki galo išaiškintas. Baltymai yra termodinamiškai sudėtingos sistemos, todėl išmatuoti pavienių aminorūgščių šoninių grandinių krūvių sąveikas realiuose baltymuose yra per sudėtinga užduotis. Todėl tyrimams dažnai naudojamos supaprastintos, modelinės sistemos. Viena iš tokių modelinių sistemų gali būti poliamino rūgščių, turinčių teigiamai ir neigiamai įkrautas šonines grupes ir joninių detergentų, turinčių įvairaus ilgio alifatines grandines, sistema.

Sąveika tarp joninių detergentų ir polimerų pradėta tirti dar praėjusio amžiaus šeštajame, septintajame dešimtmėčiuose. Pirmuosiuose tyrimuose buvo stebima šios sąveikos įtaka tirpalo paviršiaus įtempčiai, buvo nagrinėjama polimerų ir surfaktantų asociacija bei agregacija, putodara ir judėjimas elektroforezės metu (Goddard and Hannan, 1976). Jau tada pastebėta, kad joniniai detergentai prie priešingai įkrauto polimero jungiasi keliais etapais ir formuoja skirtingomis savybėmis pasižyminčius kompleksus. Šioje sąveikoje svarbios tiek elektrostatinės jėgos, tiek hidrofobinė sąveika (Goddard and Hannan, 1976). Tačiau iki šiol nėra nustatyti standartiniai tirpaluose esančių teigiamai ir neigiamai įkrautų polimerų ir joninių detergentų sąveikos termodinaminiai parametrai (tokie kaip laisvosios Gibso energijos, entalpijos ar entropijos pokyčiai, jungimosi pusiausvyros konstanta, šiluminės talpos pokytis).

Šiame darbe naudojantis izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu buvo tirta viena iš minėtų modelinių sistemų: teigiamai įkrautų homopolimerų (poliarginino, polilizino ir poliornitino) sąveika su neigiamą krūvį turinčiais detergentais (alkilsulfatais ir alkilsulfonatais). Buvo nustatinėjamos šios sistemos pagrindinės termodinaminės charakteristikos: sąveikos entalpija, laisvoji Gibso energija, entropija, šiluminė talpa. Šių termodinaminų parametrų nustatymas padėtų geriau suprasti biologinius procesus baltymų ir kitų makromolekulių sistemose, kuriuose yra svarbi elektrostatinė ir hidrofobinė sąveikos.

1. Literatūros apžvalga

Šiame skyriuje bus apžvelgtos pagrindinės detergentų, kurie yra šiame darbe tiriamos sistemos dalis, savybės. Taip pat bus apžvelgiami moksliniai darbai, kuriuose kitais metodais buvo tirta detergentų ir poliamino rūgščių sistema. Kadangi tai yra viena iš baltymų modeliųjų sistemų, šiame skyriuje taip pat aprašyta detergentų ir baltymų sąveika. Galiausiai, siekiant parodyti, jog sulfo grupė, kurią turi darbe naudoti detergentai, yra reikšminga ir gamtoje, bus apžvelgtos kelios biologinės sistemos, kuriose sulfo grupė atlieka svarbų vaidmenį.

1.1. Detergentai

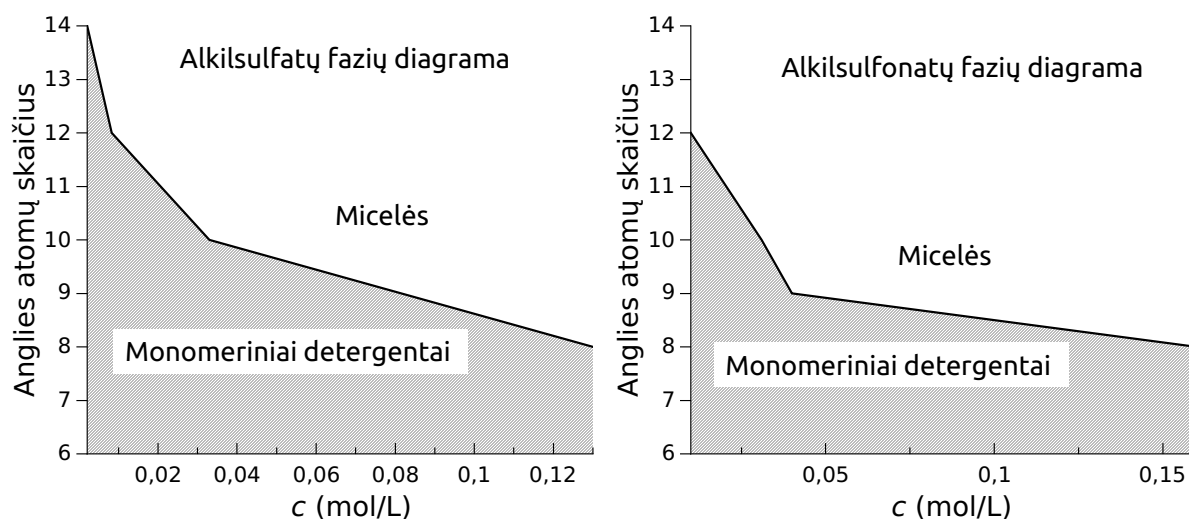
Detergentai yra paviršiaus aktyviosios medžiagos sumažinančios skysčio paviršiaus įtempį. Šia savybe detergentai pasižymi dėl savo struktūrinių ypatumų. Visos paviršiaus aktyviosios medžiagos turi polinę ir nepolinę dalis. Dėl polinės dalies, dar vadinamos „galva“, detergentai yra tirpūs vandenyje ir kituose poliniuose tirpikliuose. Nepolinė – hidrofobinė dalis – vadinama „uodega“. Dėl hidrofobinės uodegos detergentai sąveikauja su nepoliniais paviršiais, taip pat tarpusavyje. Ši struktūrinė ypatybė leidžia detergentams formuoti agregatus, vadinamus micelėmis (iš lotynų kalbos *micella* – maža dalis). Micelėse esančių detergentų hidrofilinė dalis yra atsisukusi į išorę ir kontaktuoja su vandeniu, tuo tarpu hidrofobinės dalys stengiasi pasislėpti nuo vandens micelės viduje.

1 lentelė. Kai kurių detergentų kritinės micelių koncentracijos vandenyje esant 25 °C temperatūrai. m – anglies atomų skaičius alifatinėje grandinėje. Vertės paimtos iš (JPS, 1972).

Detergentas	m	KMK (M)
Natrio tetradecilsulfatas	14	$2,1 \times 10^{-3}$
Natrio dodecilsulfatas	12	$8,3 \times 10^{-3}$
Natrio decilsulfatas	10	$3,3 \times 10^{-2}$
Natrio oktilsulfatas	8	$1,3 \times 10^{-1}$
Dekansulfoninės rūgšties natrio druska	10	$3,1 \times 10^{-2}$
Nonansulfoninės rūgšties natrio druska	9	$4,0 \times 10^{-2}$
Oktansulfoninės rūgšties natrio druska	8	$1,6 \times 10^{-1}$

Pastebėta, kad esant tam tikrai detergento koncentracijai, keičiasi detergento tirpalo fizikocheminės savybės, tokios kaip drumstumas, paviršiaus įtempis, laidumas. Buvo nustatyta, kad pasiekus ir viršijus tokią ribinę koncentraciją, detergentai buvę monomerinėje būsenoje pradeda formuoti micelas. Koncentracija reikalinga formuoti micelėms

vadinama kritine micelių koncentracija (KMK). KMK priklauso nuo detergento struktūros: kuo ilgesnė detergento hidrofobinė dalis tuo ji yra mažesnė. KMK taip pat mažėja jei hidrofobinė dalis yra šakota ar turi nesočiųjų ryšių. Polinės dalies krūvis didina detergento KMK (Lindman and Wennerström, 1980). Kai kurių detergentų KMK yra pateiktos 1-oje lentelėje. Detergentų egzistavimas skirtingose struktūrinėse fazėse priklauso nuo jų koncentracijos ir alifatinės grandinės ilgio gali būti vaizduojamas fazių diagramomis. Šiame darbe naudotų detergentų fazių diagramos yra pateiktos 1-ajame paveiksle.



1 pav. Darbe naudotų alkilsulfatų (kairėje) ir alkilsulfonatų (dešinėje) fazių diagramos priklauso nuo detergento koncentracijos ir jo alifatinės grandinės ilgio 25 °C temperatūroje. Fazių diagramos nubrėžtos pagal (JPS, 1972) duomenis.

1.2. Sąveika tarp polimerų ir detergentų

Vykdamas pirmuosius eksperimentus, skirtus tirti sąveiką tarp teigiamą krūvį turinčių detergentų ir neigiamai įkrautų polimerų, buvo stebimas nuosėdų susidarymas (Goddard and Hannan, 1976; Putnam and Neurath, 1944). Šių eksperimentų metu nustatyta, kad anijoninio detergento pridėjimas į fiksuotos koncentracijos katijoninio polimero tirpalą iš pradžių sukelia nuosėdų susidarymą, tačiau toliau keliant detergento koncentraciją nuosėdos vėl ištirpsta. Pirmasis etapas kurio metu susidaro nuosėdos priskirtas krūvių sąveikai kurio metu detergento „galva“ prisijungia prie teigiamai įkrautos polimero srities, dėl ko polimeras aplimpa detergentais su hidrofobinėmis „uodegomis“ atsuktomis į išorę, kas sukelia šio komplekso tolimesnę agregaciją. Toliau sekantis agregatų ištirpimas aiškinamas antro detergentų sluoksnio prisijungimu prie komplekso. Nauji detergentai prisijungia prie polimero-detergentų komplekso „uodegomis“ į vidų, o komplekso išorėje lieka krūvį turinčios detergento „galvos“, dėl kurių kompleksas vėl tampa tirpiu.

Natūraliai padaryta išvada, jog šio proceso metu keičiasi bendras komplekso krūvis. Tai buvo patvirtinta elektroforezės metodu, kuomet didinant detergento koncentraciją

polimero-detergentų komplekso mobilumas elektroforezės metu mažėjo, pasiekė nulį ir toliau vėl didėjo, kai bendras komplekso krūvis tapo neigiamas (Goddard and Hannan, 1976).

Didelė dalis tyrimų nagrinėjančių sąveiką tarp detergentų ir polimerų buvo atlikti stebint šių medžiagų poveikį paviršiaus įtempčiams. Viena pagrindinių detergentų savybių yra tirpalo paviršiaus įtempties mažinimas. Vieni surfaktantai didinant jų koncentraciją palaipsniui mažina tirpalo paviršiaus įtempį iki kol pasiekama KMK. Tačiau tirpale esant priešingai įkrautų polimerų, paviršiaus įtempis yra mažinama žymiai labiau, esant gerokai mažesnėms detergentų koncentracijoms (Barck and Stenius, 1994; Merta and Stenius, 1999). Krūvį turintys polimerai labai mažai įtakoja tirpalo paviršiaus įtempį. Tai rodo, kad polimerai ir detergentai formuoja paviršiuje aktyvų kompleksą esant mažesnei nei KMK detergento koncentracijai (Goddard, 2002).

1.3. Sąveika tarp baltymo ir detergentų

Natrio dodecil sulfatas (NDS) yra joninis detergentas su neigiamą krūvį turinčia sulfato grupe ir alifatine dvylikos anglies atomų uodega. NDS sąveika su baltymais yra išnaudojama daugelyje laboratorijose naudojamų metodų. Vienas plačiausiai taikomų metodų baltymų analizėje yra NDS-PAGE metodas, kuris paremtas baltymo-NDS komplekso judėjimu elektroforezės gelyje (Laemmli, 1970; Weber and Osborn, 1969). Nepaisant to, kad NDS sąveika su baltymais tyrinėjama jau ilgą laiką (Liu et al., 2012; Putnam and Neurath, 1944), ši sąveika vis dar nėra gerai suprantama. Viena šios sąveikos ypatybių darančių ją sudėtingą, yra skirtingi efektai esant skirtingoms detergento koncentracijoms.

Gerai žinoma, jog baltymai gali būti denatūruojami naudojant NDS žymiai mažesnėmis koncentracijomis nei naudojant kitus denatūrantus, tokius kaip guanidinę ar karbamidą (Naidu and Prabhu, 2011). Nustatyta, jog NDS denatūruoja baltymus koncentracijose, kurios yra žemesnės nei KMK, o didesnėse koncentracijose įtakos denatūracijai neturi, kadangi tuomet kinta tik NDS esančio micelėse koncentracija, o ne laisvo NDS (Schneider et al., 2008). Tačiau yra duomenų jog denatūracija greitėja esant gerokai didesnėms NDS koncentracijoms nei KMK. Manoma, jog esant tokioms NDS koncentracijoms, formuojasi stripo pavidalo micelės, kurios turi didesnę įtaką denatūracijai (Lee et al., 2011).

Taip pat yra nustatyta ir priešinga joninių detergentų įtaka baltymų struktūrai. Esant itin mažoms NDS ar kitų alkilsulfatų koncentracijoms buvo pastebėtas jų apsauginis poveikis baltymų struktūrai denatūruojant baltymus karščiu ar kitais denatūrantais. Tiriant joninių detergentų apsauginį efektą apskirtiminio dichroizmo metodu buvo taip pat pastebėta, jog alkilsulfatų buvimas leidžia jaučio serumo albuminui susigrąžinti dalį terminės denatūracijos metu prarastos α -spiralinės struktūros (Moriyama et al., 2003).

1.3.1. Baltymų stabilizavimas mažomis detergento koncentracijomis

Jau praėjusio amžiaus viduryje buvo pastebėtas mažos anijoninių detergentų koncentracijos apsauginis efektas baltymams. 1948 metais publikuotame tyrime Duggan ir Luck nustatė, jog mažos anijoninių detergentų koncentracijos stabilizuoja serumo albuminą. Matuojant serumo albumino tirpalo klampos padidėjimą, įprastą denatūruojant karbamidu, nustatyta, jog anijoniniai detergentai mažina sistemos klampą po poveikimo karbamidu. Didžiausias stabilizuojantis efektas buvo stebimas naudojant NDS, šis efektas pasiekė didžiausią vertę detergento koncentracijai neviršijant KMK (Duggan and Luck, 1948). Vėliau šis efektas buvo patvirtintas optinio aktyvumo matavimais. Nustatyta, jog mažos NDS koncentracijos mažina poliarizacijos plokštumos sukimo kampą žmogaus serumo albuminą (HSA) veikiant karbamidu. Buvo nustatyta, jog stabilizacijai reikalingas keturiolikos NDS molekulių prisijungimas prie vienos HSA molekulės. Taip pat pastebėta, kad stabilizacijai reikalingos teigiamai įkrautos lizino šoninės grupės, kurias acetilinus stabilizacija nėra stebima (Markus et al., 1964). Kiek vėliau apskritiminio dichrozmo metodu parodyta, jog NDS ne tik saugo albuminą nuo denatūracijos karbamidu, bet ir padeda susigražinti dalį denatūracijos karbamidu metu prarastos spiralinės struktūros. Moriyama ir Takeda savo darbe parodė, kad NDS stabilizuojantis efektas denatūracijos karbamidu metu nepriklauso nuo NDS pridėjimo tvarkos. Iki 1,5 mM NDS buvimas tirpale padėjo išlaikyti HSA spirališkumą veikiant karbamidu, taip pat panašus NDS kiekis padėjo susigražinti didžiąją dalį HSA spirališkumo prarasto po denatūracijos (Moriyama and Takeda, 1999).

Kai kurie kiti baltymai taip pat stabilesni terminės denatūracijos metu esant mažoms NDS koncentracijoms (Moriyama et al., 2008; Nielsen et al., 2007a). Baltymų stabilizacija esant mažoms NDS koncentracijoms galėtų reikšti, jog tokiomis sąlygomis NDS jungiasi specifinėse baltymo vietose, greičiausiai elektrostatinės sąveikos dėka prie teigiamą krūvį turinčių amino rūgščių liekanų.

1.3.2. Denatūracija joniniais detergentais

Gera žinoma, jog NDS tam tikrais atvejais paspartina baltymo išsivyniojimą. Tačiau šio proceso mechanizmas nėra galutinai nustatytas. Baltymo išsivyniojimas veikiant NDS prasideda esant koncentracijoms kurios yra mažesnės nei KMK, tačiau didesnės nei tos kurioms esant baltymai stabilizuojami. Manoma, jog tokiu atveju dodecilsulfato jonai (DS^-) formuoja micles aplink baltymą, kas yra vaizduojama vėrinio (necklace and bead) modeliu (Turro et al., 1995). Manoma, jog NDS veikiami baltymai išsivynioja formuojantis bendroms micelėms, tai yra kuomet du baltymai dimerizuojasi dalindamiesi vieną detergentų micelę (Andersen et al., 2009). Tačiau ne visi baltymai denatūruojami NDS, esant žemesnėms nei KMK detergento koncentracijoms. Pavyzdžiui tiriant dviejų β -klosčių struktūrą turinčių baltymų TNfn3 ir TII27 denatūraciją NDS buvo nustatyta, kad tik

vienas jų – TII27 – denatūruoja esant mažesnėms nei KMK detergento koncentracijoms. Abu šie baltymai turi panašią struktūrą, bet skiriasi paviršiaus elektriniu potencialu. Galutiniame rezultate abiejų baltymų išsivyniojimui reikalingas, toks pats prisijungusio detergento molekulių skaičius, tačiau TII27 baltymas, turintis teigiamą krūvį paviršiuje denatūruoja esant gerokai mažesnėms NDS koncentracijoms (Nielsen et al., 2007b). Tai leidžia manyti, jog efektyviam detergentų prisijungimui prie baltymo inicijuoti reikalinga elektrostatinė sąveika.

1.4. Sulfatai ir sulfonatai gamtoje

Gamtoje tiek mažamolekulinės medžiagos tiek ir makromolekulės gali būti modifikuojamos prijungiant sulfo grupę. Ir nors modifikacijai sulfo grupėje yra skiriama gerokai mažiau dėmesio nei panašiai modifikacijai – fosforilinimui, sulfoninimas turi ne mažiau svarbų vaidmenį biologijoje. Gamtoje universalus sulfo grupės donoras yra 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfatas (PAPS) sintetinamas iš neorganinio sulfato. Sulfoninimo reakcijas organizmuose katalizuoja fermentai – sulfotransferazės. Sulfotransferazės yra skirstomos į dvi klases: citozolines ir su membranomis asociuotas. Citozolinės sulfotransferazės modifikuoja įvairias mažamolekulines medžiagas – hormonus, vaistus, ksenobiotikus (Nagata and Yamazoe, 2000). Su membranomis asocijuotos sulfotransferazės egzistuoja trans-Goldžio komplekse, kur modifikuoja makromolekules, tokias kaip baltymai ar glikoproteinai (Hooper et al., 1996). Modifikacija sulfo grupėje keičia modifikuotos molekulės fizikines savybes – didina tirpumą, gali sukelti konformacijos pokyčius tiek makromolekulėse, tiek mažamolekulinėse medžiagose. Šie pokyčiai iš esmės keičia tai, kaip šios molekulės sąveikauja su kitomis biomolekulėmis (Strott, 2002), todėl svarbu gerai suprasti sulfo grupės įtaką sąveikų termodinamikai.

1.4.1. Mažamolekulinės medžiagos

Organizmuose sulfo grupėje gali būti modifikuojamos mažamolekulinės medžiagos, steroidai ir katecholaminai. Tokia jų modifikacija keičia jų fizikochemines savybes, ir tai kaip jos sąveikauja su atitinkamais receptoriais (Strott, 2002).

Steroidiniai hormonai ir jų metabolitai gali būti modifikuojami prijungiant sulfo grupę, tačiau šios modifikacijos reikšmė nėra galutinai nustatyta. Tipiniu atveju steroidinių hormonų sulfatai neprisijungia prie atitinkamų receptorių, kas leidžia manyti, kad ši modifikacija yra išnaudojama hormonų aktyvumo reguliavimui (Hobkirk, 1993). Nustatytas ryšys tarp steroidų sulfotransferazių aktyvumo ir nuo hormonų priklausomo vėžio. Steroidinių hormonų testosterono (prostato vėžio atveju) ar estrogenų (kruties vėžio atveju) modifikacija sulfo grupėje gali reguliuoti jų aktyvumą prisijungiant prie branduolio receptorių, kadangi tik nemonifikuoti steroidiniai hormonai gali stimuliuoti augimą, todėl

sulfotransferazių aktyvumo pokyčiai, gali lemti šių vėžio formų vystymąsi (Billich et al., 2000; Chan et al., 1998).

Be steroidinių hormonų, sulfoninti gali būti ir kiti mažamolekuliniai – skydliaukės – hormonai. Pagrindinis skydliaukės sintetinas hormonas yra T4, kuris vėliau verčiamas į aktyviają formą – T3. Tiek T4, tiek T3 fenolinė hidroksi grupė gali būti sulfoninama. Sulfo grupe modifikuotas T3 nebegali jungtis prie atitinkamų receptorių, tačiau ši modifikacija svarbi jo šalinime. Sulfoninimas palengvina, toliau sekantį jodo pašalinimą iš skydliaukės hormonų, pašalintas jodas toliau gali būti naudojamas hormonų sintezei (Visser et al., 1990).

Katecholaminai tai junginiai turintys katecholio žiedą ir šoninę amino grupę. Žmogaus organizme gausiausi katecholaminai yra epinefrinas, norepinefrinas ir dopaminas. Organizmuose jie dažniausiai cirkuliuoja konjuguotoje formoje, žmogaus atveju tai daugiausiai sulfokonjugacija. Manoma, jog katecholamino sulfatai sintetinami trombocituose ir periferiniuose audiniuose, tačiau tai galutinai nėra patvirtinta (Eisenhofer et al., 2004). Sulfoninti katecholaminai nesaveikauja su receptoriais, todėl manoma, jog sulfo grupe modifikuoti katecholaminai gali tarnauti kaip atsarga nemodifikuotiems katecholaminams, kurie reikalui esant galėtų būti išlaisvinti atskeliant sulfo grupę fermento arilsulfatazės pagalba (Onasch et al., 2000).

1.4.2. Heparano sulfatas

Heparano sulfatas (HS) tai polisacharidas esantis visų gyvūnų ląstelių paviršiuje. Jie dažniausiai būna proteoglikanų sudėtyje prijungti prie syndekano ar glipikano šerdinių baltymų (Bernfield et al., 1999). HS priklauso gliukozaminglikanų šeimai, tai yra ilgi nešakoti angliavandeniai sudaryti iš pasikartojančio disacharido. Dėl didelio kiekio sulfato grupių HS yra viena labiausiai neigiamai įkraudų molekulių gyvuose organizmuose. Dėl šios savybės HS sąveikauja su daugeliu specifinių baltymų taip dalyvaudama įvairiuose organizme vykstančiuose procesuose, tokiuose kaip, koaguliacija, uždegiminiai procesai ar net vėžio metastazė (O'Connell and Weeraratna, 2011). HS biosintezė prasideda nuo tetrasacharidinio jungiamąjo regiono (-GlcA-Gal-Gal-Xyl-Ser) suformavimo. Jungiamasis regionas formuojamas prie specifinių šerdinio baltymo serino liekanų prijungiant ksilozę iš UDP-ksilozės. Specifinė transferazė prijungia vieną acetilgliukozamino molekulę prie jungiamąjo regiono taip pažymėdama šią sritį prailginimui HS grandinėmis (Esko and Zhang, 1996). Grandinė ilginama paeiliui prijungiant D-gliukurono rūgštį ir D-gliukozaminą. Prijungimui naudojami atitinkami sacharido-UDP dariniai, šį procesą vykdo viena HS polimerazė (Lind et al., 1993). HS grandinės ilgis gali skirtis iki dešimt kartų priklausomai nuo ląstelės ir šerdinio baltymo, tačiau dažniausiai susiformuoja grandinė iš 50-150 disacharidų. Grandinei susiformavus atskiri sacharidai modifikuojami. Iš pradžių grandinę modifikuoja N-deacetilazė/N-sulfotransferazė kuri pakeičia acetilgliuko-

zamno acetil grupę į sulfato grupę. Šis fermentas modifikuoja tik kai kuriuos grandinės regionus. Tuomet šalia modifikuoto gliukozamino esančios D-gliukurono rūgštys empirizuojamos į L-idurono rūgštis, šį procesą vykdo gliukuronil-C5-empirazė (Crawford et al., 2001). Modifikuoti regionai sulfatinami. Šie regionai paeiliui veikiami trijų sulfotransferazių: iduronosil 2-O sulfotransferazės, gliukozaminil 6-O sulfotransferazės ir gliukozaminil 3-O sulfotransferazės (Esko and Lindahl, 2001). Kaip sulfato grupės donoras yra naudojamas 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfatas.

1.4.3. Chondroitino sulfatas

Chondroitino sulfatas (CS) tai gliukozamino glikanas įeinantis į proteoglikanų sudėtį. CS gausu ląstelių paviršiuje ir užląsteliniam skystyje. CS svarbus fiziologiniuose reiškiniuose tokiuose kaip morfogeneze, citogeneze ar neuronų plastiškumas (Sugahara et al., 2003). CS yra sudarytas iš pasikartojančių gliukurono rūgšties (GlcA) ir N-acetilgalaktozamino (GalNAc) disacharidų. CS biosintezė prasideda lygiai taip pat kaip ir HS biosintezė, prie šerdinio baltymo suformuojamas tetrasacharidinis jungiamasis regionas. Tačiau CS atveju prie jungiamojo regiono prijungiama GalNAc molekulė GalNAc transferazės I pagalba, taip ši sritis pažymima CS grandinės sintezei (Sugahara and Kitagawa, 2000). Grandinė ilginama prijungiant GlcA ir GalNAc molekules, GlcA transferazės II ir GalNAc transferazės II pagalba. Yra identifikuotos septynios sulfotransferazės modifikuojančios chondroitino ir jo stereoizomero dermatano grandines. Chondroitino sulfatinimas prasideda nuo GalNAc, sulfato grupė prijungiama prie 4-O arba 6-O atomų. 4-O sulfatintas disacharidas gali būti toliau modifikuojamas įvedant sulfato grupę GalNAc 6-O padėtyje. 6-O sulfatintas disacharidas toliau gali būti modifikuojamas įvedant sulfato grupę GlcA 2-O padėtyje. Taip chondroitino modifikacija gali būti skirstoma į du skirtingus kelius (Mikami and Kitagawa, 2013).

1.4.4. Sulfoninti baltymai

Baltymai taip pat gali būti modifikuojami sulfo grupe. Tai potransliacinė modifikacija vykstanti trans-Goldžio komplekse, kurios metu sulfo grupė prijungiama prie tam tikrų aminorūgščių šoninių grupių. Pirmą pastebėta modifikacija sulfo grupe yra tirozino sulfoninimas. Ši modifikacija pirmą kartą aprašyta dar praėjusio amžiaus šeštame dešimtmetyje (Bettelheim, 1954). Organizme net 1% viso baltymuose esančio tirozino gali būti sulfoninta, todėl tai yra dažniausia tirozino potransliacinė modifikacija (Huttner, 1988).

Sulfonintas tirozinas dažnas adhezijos molekulėse. CD44 yra adhezijos molekulė esanti leukocituose ir turinti svarbų vaidmenį jų prisijungimui prie endotelio ląstelių imuninio atsako metu. Atrasta, jog vienas iš jį aktyvuojančių veiksnių yra modifikacija sulfo grupe, kuri yra inicijuojama vėžio nekrozės faktoriaus- α (Maiti et al., 1998). Tirozino modifikacija sulfo grupe taip pat svarbi P-selektino glikoproteino ligando-1 (PSGL-1) prisijungime

prie P-selektino. P-selektinas yra adhezijos molekulė esanti endotelio ląstelių paviršiuje, PSGL-1 yra ekspresuojamas leukocituose ir jungiasi prie P-selektino. Nustatyta, kad tirozino sulfoninimas yra svarbus specifiniam jo prisijungimui prie P-selektino uždegiminio proceso metu (Wilkins et al., 1995). Tirozino modifikacija sulfo grupe taip pat paplitusi koaguliacijos veiksmuose. Tam, kad būtų aktyvuojami koaguliacijos veiksnys V ir koaguliacijos veiksnys VIII, jie turi būti proteolitiškai veikiami trombinu. Tirozino potransliacinė modifikacija šiuose veiksmuose yra būtina jų aktyvacijai trombinu (Pittman et al., 1994). Su G-baltymais susieti receptoriai taip pat pasižymi tirozino potransliacine modifikacija. Glikoproteininių hormonų receptoriai tai su G baltymais susietų receptorių, reaguojančių į tam tikrus glikoproteinus, grupė. Manoma, kad specifiniam ligando prisijungimui prie šių receptorių yra svarbūs joniniai ryšiai, kuriuos sudaro ir sulfo grupė, prijungta prie tirozino. (Costagliola et al., 2002; Grossmann et al., 1998)

Kita baltymų modifikacija sulfo grupe yra serino ir treonino sulfoninimas. Ši potransliacinė modifikacija pirmą kartą aprašyta tik šiame amžiuje. Serino ar treonino sulfoninimas aptiktas baltymuose iš įvairių eukariotinių organizmų, nuo vienaląsčių iki žmogaus. Taip pat ši potransliacinė modifikacija aptikta įvairių rūšių nebūtinai funkciškai panašiuose baltymuose, pavyzdžiui miozino lengvojoje grandinėje iš sraigės (*Lymnaea stagnalis*) ir žmogaus tirozino kinazės receptoriuje Ror2. Tačiau šių modifikacijų reikšmė dar nėra išaiškinta (Medzihradzsky et al., 2004).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Medžiagos

2.1.1. Poliamino rūgštys

Tyrimė buvo naudoti trijų amino rūgščių polimerai: poli-L-Arginino hidrochloridas, poli-L-lizino hidrochloridas, poli-L-lizino-hidrobromidas ir poli-L-ornitino hidrochloridas. Polimerų ilgiai buvo tarp 70 ir 350 amino rūgščių. Visi eksperimentuose naudoti polimerai pirkti iš **Sigma-Aldrich** kompanijos.

2.1.2. Detergentai

Tyrimė buvo naudoti septyni anijoniniai detergentai.

1-dekansulfoninės rūgšties natrio druska, natrio dodecilsulfatas ir natrio oktilsulfatas pirktos iš **Sigma Chemical**.

Natrio decilsulfatas iš **Eastman Kodak Co.**

1-oktansulfoninės rūgšties natrio druska ir natrio undecilsulfatas iš **Aldrich Chem. Co.**

1-nonansulfoninės rūgšties natrio druska iš **Pfaltz Bauer Inc.**

2.2. Izoterminio titravimo kalorimetrija (ITC)

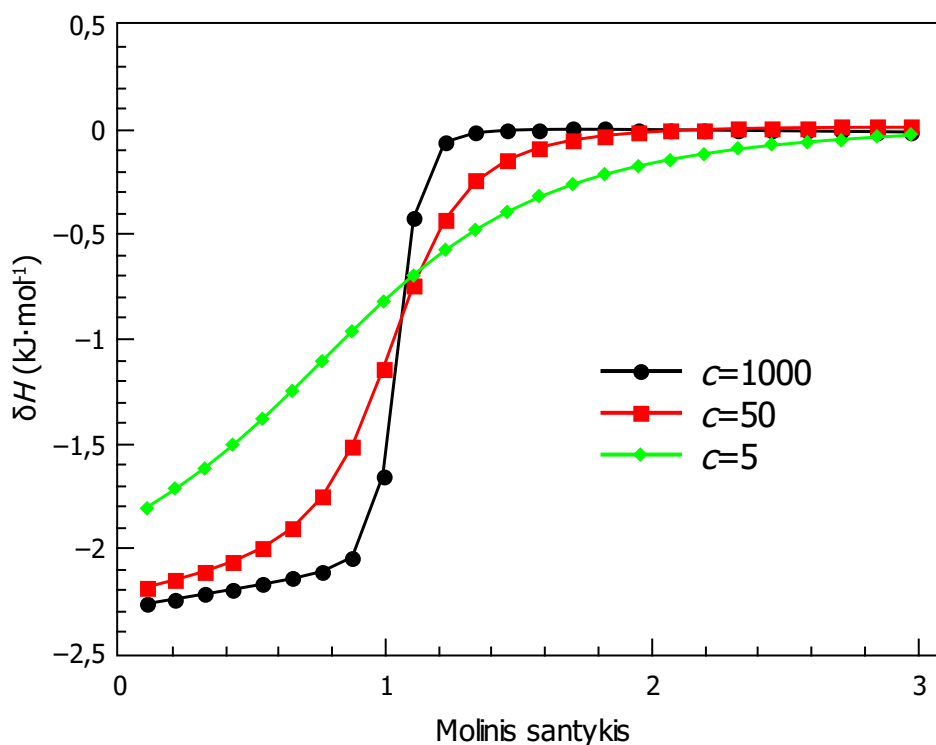
Izoterminio titravimo kalorimetrija – tai metodas kuriuo matuojama sugerta ar išsiskyrusi šiluma vykstant reakcijai titravimo pastovioje temperatūroje metu. Pirmieji ITC instrumentai atsirado devintojo dešimtmečio pabaigoje (Wiseman et al., 1989). Tobulėjant izoterminio titravimo kalorimetrams jie išpopuliarėjo biologinių molekulių sąveikos tyrimuose dėl savo universalumo ir informatyvumo (Ladbury, 2010). Visi cheminiai procesai turi entalpijos pokytį ΔH , kurį ITC metodu galima išmatuoti tiesiogiai. Eksperimento metu galima nustatyti ir jungimosi konstantą K_b . Sąveikos entalpija ITC metodu matuojama tiesiogiai, lyginant šilumos pokytį tarp tiriamosios ir kontrolinės celės, o jungimosi konstanta yra nustatoma taikant matematinius jungimosi modelius. Laisvosios Gibso energijos pokytis ΔG ir entropijos pokytis ΔS apskaičiuojamas iš standartinių termodinamikos lygčių:

$$\Delta G = -RT \ln K_b, \quad (1)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (2)$$

kur R – molinė dujų konstanta, T – absoliutinė temperatūra.

Izoterminio titravimo kalorimetra sudaro dvi kiuvetės – mėginio ir palyginamoji. Palyginamoji kiuvetė užpildoma vandeniu ar buferio tirpalu, joje palaikoma pastovi temperatūra. Mėginio kiuvetė užpildoma tiriamosios medžiagos tirpalu, kurio temperatūra palaikoma tokia pati kaip palyginamojoje kiuvetėje. Jei reakcijos metu šiluma išsiskiria mėginio kiuvetė šaldoma, jei šiluma sugerama – kiuvetė šildoma. Matuojama energija, kurios reikia palaikyti vienodą kiuvečių temperatūrą. ITC eksperimento metu į mėginio kiuvetėje esantį tirpalą, automatinio švirksčiu tam tikro tūrio injekcijomis titruojama antroji medžiaga. Integruojant plotą po kreive apskaičiuojama kiekvienos injekcijos metu išsiskyrusi šiluma (Wiseman et al., 1989). Norint atlikti sėkmingą ITC eksperimentą svarbiausia tinkamai parinkti reagentų koncentracijas, atsižvelgiant į reakcijos stochiometriją ir jungimosi konstantą. Eksperimentas turi būti suplanuotas taip, jog reakcijos stochiometrinis taškas būtų pasiekiamas eksperimento viduryje, tokiu atveju gaunama pilna jungimosi entalpijos kreivė, iš kurios galima išgauti kitus termodinaminius parametrus (Holdgate, 2001). Pasirenkant reagentų koncentracijas, labai svarbus yra koeficientas c , dar vadinamas Wiseman'o faktoriumi (Wiseman et al., 1989). Jis yra lygus jungimosi konstantos ir celėje esančio reagento koncentracijos sandaugai $c = K_b \times [M]$. Nuo jo priklauso jungimosi kreivės forma. Dažniausiai rekomenduojamas c vertės intervalas yra nuo 1 iki 1000. Šiame intervale kreivės forma jautriausia mažiems c koeficiento pokyčiams, todėl tiksliausiai gali būti apskaičiuojamos jungimosi konstantos vertės (Wiseman et al., 1989). Didėjant c koeficiento skaitinei vertei, titravimo kreivė statėja. Šio koeficiento įtaka kreivės formai pavaizduota 2-ajame paveiksle.



2 pav. ITC eksperimentų simuliacijos, atliktos „CSC Nano Analyse“ programa. Visose simuliacijose naudotos tos pačios medžiagų koncentracijos, keista tik K_b vertė, tuo pačiu kito ir c koeficientas.

2.3. ITC eksperimentas

Šiame darbe ITC eksperimentai buvo atlikti naudojant **Calorimetry Sciences Corporation CSC 5300** modelio kalorimetrą. Eksperimentai buvo atlikti pastovioje temperatūroje 13 – 61 °C intervale. Prieš atliekant eksperimentą kalorimetro celė ir švirkštas buvo plaunami dejonizuotu vandeniu, po to skalaujami atitinkamais eksperimente naudojamais tirpalais. Titravimo metu kiuvetėje esantis tirpalas maišomas 250 apsisukimų per minutę greičiu. Kalorimetro celės tūris yra 1,0 mL, eksperimentuose naudoto švirkšto tūris – 250 μ L. Standartinio eksperimento metu kiuvetė būdavo užpildoma 1 mM koncentracijos poliamino rūgšties tirpalu, kurio koncentracija yra išreiškama pagal amino rūgščių (monomerų) skaičių, o švirkštas užpildomas 10 mM koncentracijos detergento tirpalu. Paruošus kalorimetrą eksperimentui sekdamo 20–30 minučių periodas pusiausvyrai pasiekti. Duomenys pradedami registruoti 4 min iki titravimo pradžios. Titravimo metu buvo atliekamos 25 injekcijos, kiekvienos jų tūris 10 μ L, laiko tarpai tarp injekcijų buvo 4 min.

2.4. Duomenų analizė

Eksperimentiniai duomenys buvo analizuoti naudojant programos „MicroCal Origin 5.0“ modulį skirtą ITC duomenų analizei. Standartiniais ITC eksperimentams, kurių

metu matuojamas ligando jungimasis prie makromolekulės, buvo naudojamas „vienos jungimosi vietos“ modelis. Ligando jungimasis yra aprašomas grįžtama reakcija:



kur $[M]$ – makromolekulės koncentracija, $[L]$ – ligando koncentracija, $[ML]$ – makromolekulės-ligando komplekso koncentracija. Jungimosi konstanta K_b lygi:

$$K_b = \frac{[ML]}{[L][M]}. \quad (4)$$

Bendra ligando koncentracija:

$$[L_t] = [ML] + [L]. \quad (5)$$

Bendra makromolekulės koncentracija:

$$[M_t] = [ML] + [M]. \quad (6)$$

Iš lygčių (4)–(6) galime išsireikšti susijungusios makromolekulės ir ligando koncentraciją $[ML]$. Diferencijuojant $[ML]$ išraišką yra gaunama lygtis:

$$\frac{d[ML]}{dX_t} = \frac{1}{2} + \frac{1 - 0,5 \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right) - \frac{y}{2}}{\sqrt{y^2 - 2y \left(1 - \frac{1}{K_b M_t}\right) + \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right)^2}}, \quad (7)$$

čia X_t ligando kiekis titravimo metu, $y = \frac{X_t}{M_t}$.

Išsiskyres šilumos kiekis priklauso nuo susidariusio ML komplekso kiekio $d[ML]$, reakcijos entalpijos ΔH ir kiuvetės tūrio V_0 :

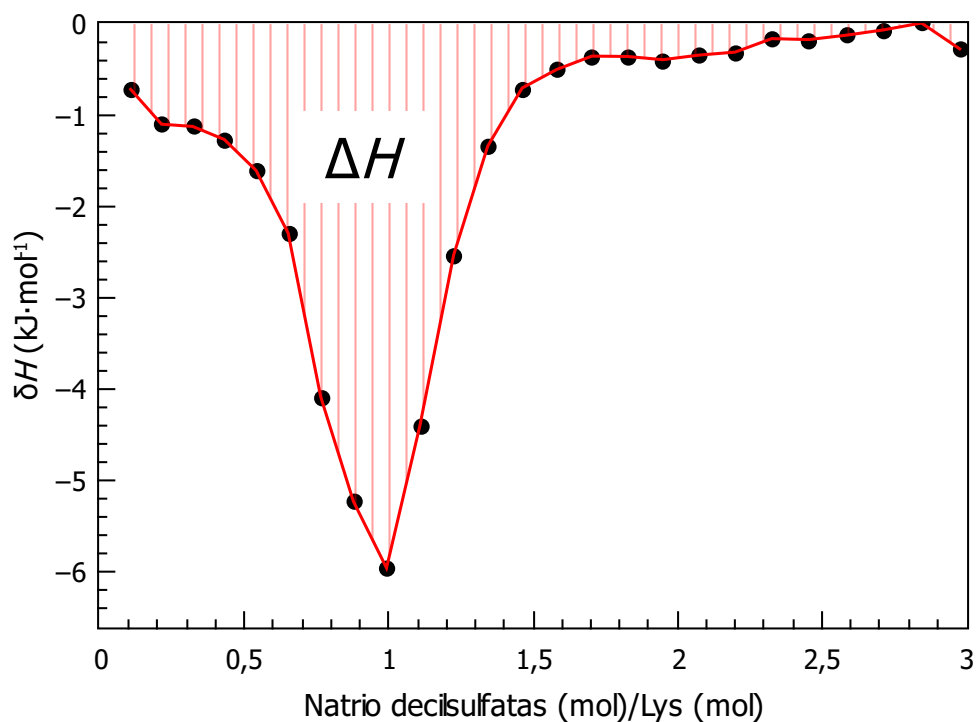
$$dQ = d[ML] \times \Delta H \times V_0 \quad (8)$$

I (8) lygtį įrašę $d[ML]$ išraišką, gauname lygtį, kuri aprašo kaip išsiskyrusios ar sugerotos šilumos kiekis priklauso nuo medžiagų kiekio ir sąveikos termodinaminių parametru (Matulis, 2008):

$$Q = \Delta H \times V_0 \times \left(\frac{1}{2} + \frac{1 - 0,5 \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right) - \frac{y}{2}}{\sqrt{y^2 - 2y \left(1 - \frac{1}{K_b M_t}\right) + \left(1 + \frac{1}{K_b M_t}\right)^2}} \right) \quad (9)$$

Tačiau tik dalis šiame darbe atliktų eksperimentų galėjo būti analizuojami taikant šį mo-

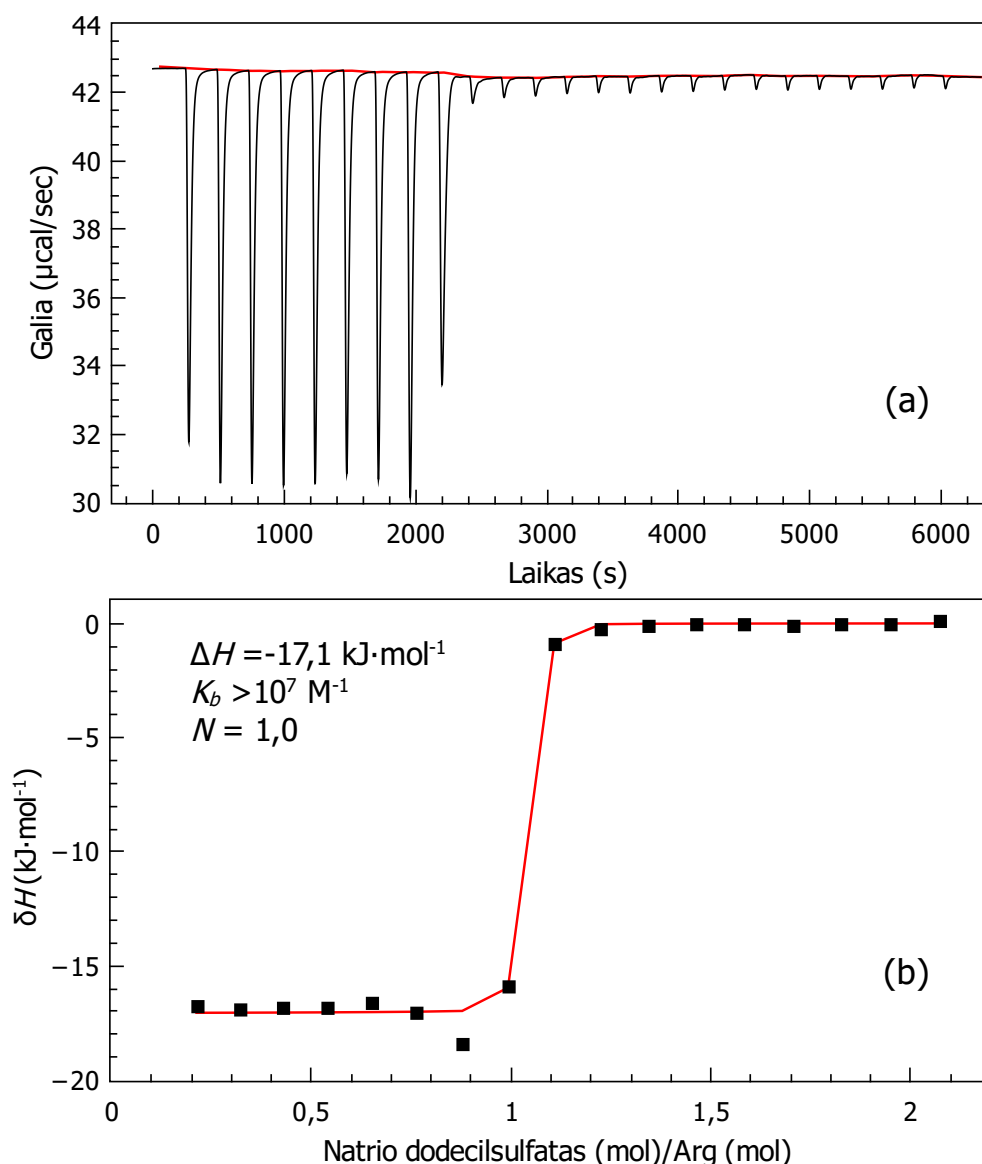
delį. Daugeliu atvejų analizę apsunkino lygiagrečiai vykstantys procesai, tokie kaip agregacijos metu išsiskirianti energija ar konformacijos pokyčiai. Analizuojant eksperimentus, kuriems „vienos jungimosi vietos“ modelis negalėjo būti taikomas (žiūrėti 3 paveikslą), reakcijos entalpija buvo apskaičiuota suradus plotą, kurį riboja titravimo kreivė.



3 pav. Sąveikos tarp polilizino ir natrio decil sulfato titravimo kreivė. Sąveikos entalpija buvo apskaičiuojama surandant plotą, kurį riboja titravimo kreivė.

3. Rezultatai

Šiame darbe izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu buvo tirti teigiamai įkrautų poliamino rūgščių ir anijoninių detergentų sąveikos termodinaminiai parametrai. Tirta kaip šie parametrai priklauso nuo temperatūros, tirpalo joninės jėgos, medžiagų koncentracijos ir jų cheminės struktūros (aminorūgšties šoninės grupės, detergento joninės grupės, hidrofobinės dalies ilgio).

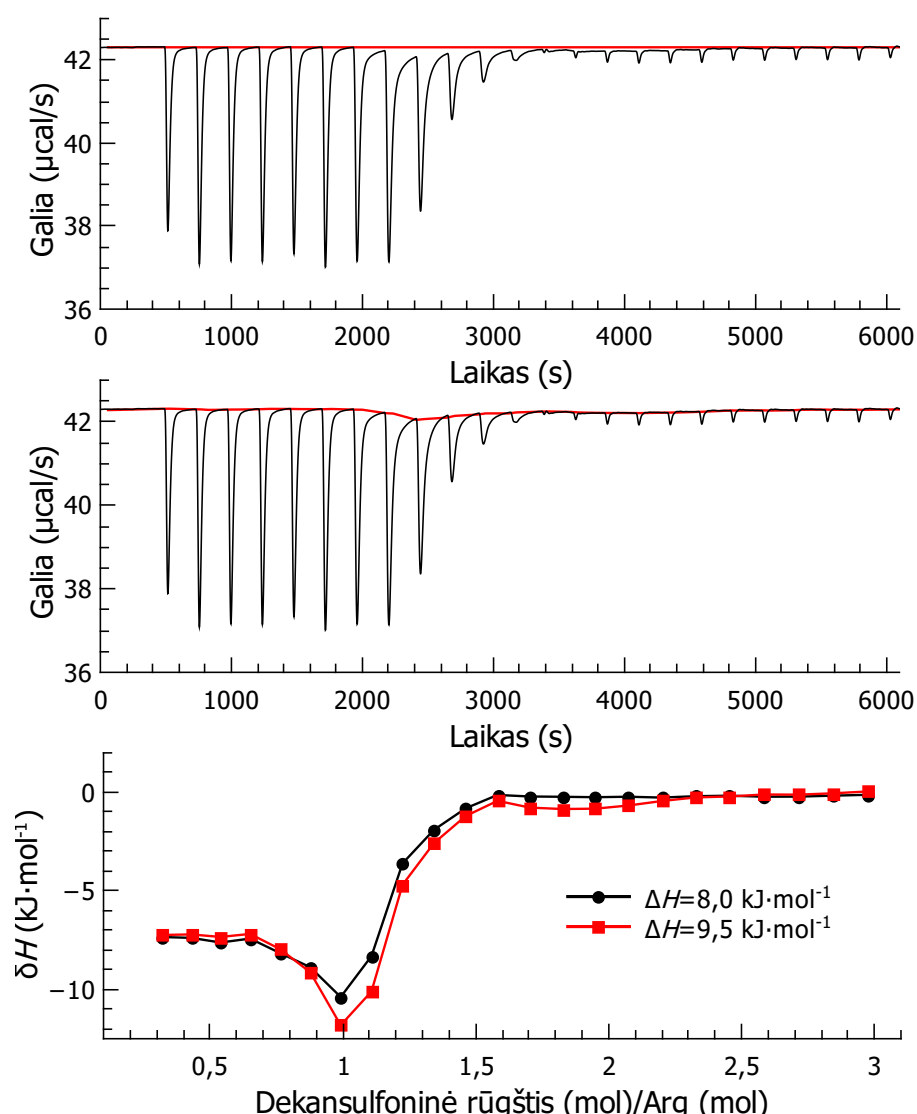


4 pav. Dodecil sulfato jungimasis prie arginino homopolimerų: (a) dalyje pavaizduota neapdorota eksperimento kreivė, (b) dalyje – entalpijos kreivė, gauta integruojant išsiskyrusį šilumos kiekį kiekvienos injekcijos metu. Reakcijos pradžioje celėje esančių poliarginino šoninių grupių koncentracija buvo 1 mM, NDS koncentracija švirkšte – 10 mM. Sąveikos šiluma išsiskiria iki stochiometrinio taško, kuriame medžiagų santykis celėje 1:1.

Tipinio ITC eksperimento rezultatai yra pavaizduoti 4-ajame paveikslėlyje. Šiame eksperimente buvo tirta sąveika tarp dodecilsulfato ir poliarginino. Paveikslėlio (a) dalyje

yra neapdorota eksperimento kreivė, kurioje bėgant laikui yra fiksuojama galia, kurios reikia tiriamąją kiuvetę palaikyti pastovios temperatūros. Iš neapdorotos kreivės gaunama kreivė pavaizduota (b) dalyje. Jos taškai yra gaunami integruojant plotą, kurį riboja neapdorota kreivė kiekvienos injekcijos metu. Iš integruotos kreivės yra apskaičiuojami pagrindiniai termodinaminiai parametrai.

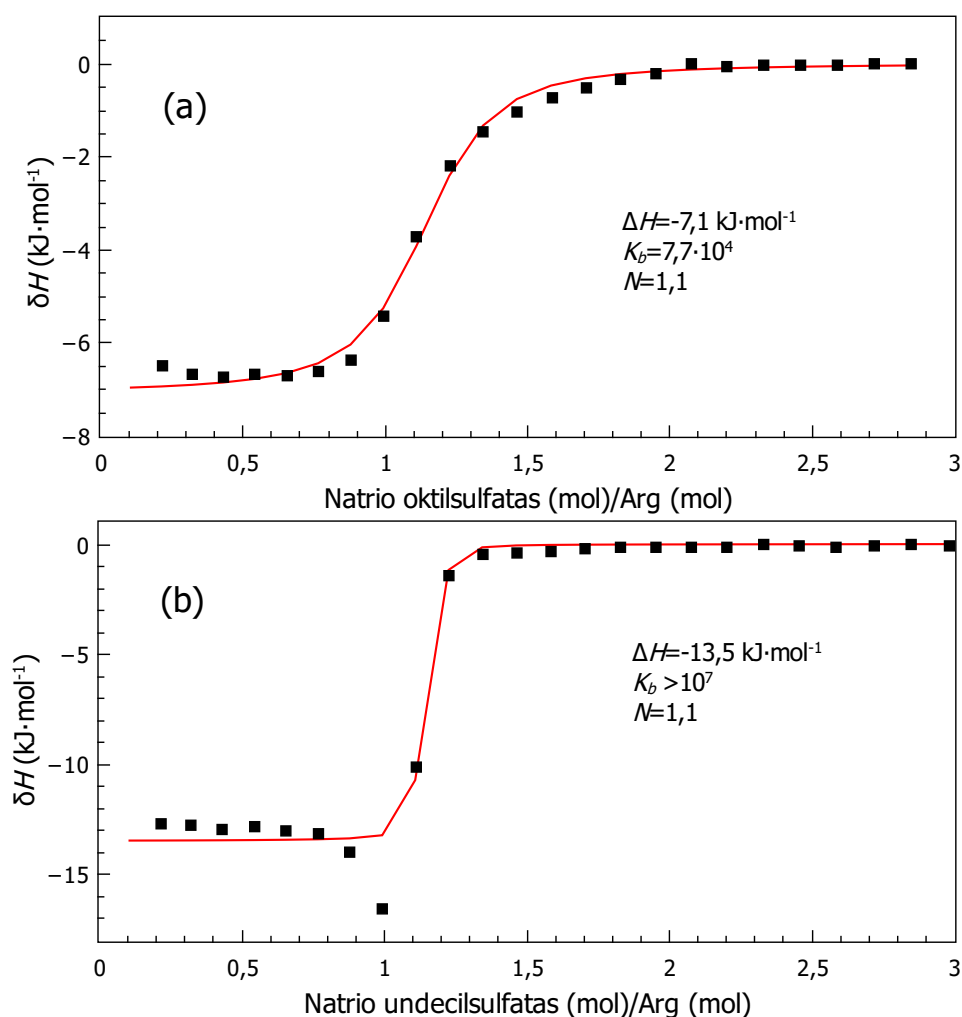
Eksperimentai buvo suplanuoti taip, jog titravimo viduryje detergento ir poliamino rūgščių šoninių grupių santykis būtų lygus 1:1. Tipinė titravimo pradžioje celėje esančių amino rūgščių šoninių grupių koncentracija buvo lygi 1 mM, švirksšte esančių detergentų koncentracija lygi 10 mM. Prie krūvį turinčių amino rūgščių homopolimerų prisijungiančių detergentų skaičius atitiko krūvį turinčių šoninių grupių skaičių (žr. 4-ą pav.). Šis santykis nekito keičiant detergentus ar poliamino rūgštis.



5 pav. Dekansulfoninės rūgšties jungimosi su poliargininu ITC duomenys. Eksperimento viduryje buvo stebimas bazinės linijos linkis. Palyginti eksperimentų rezultatai, gauti iš kreivės su ištiesinta ir neištiesinta bazinėmis linijomis.

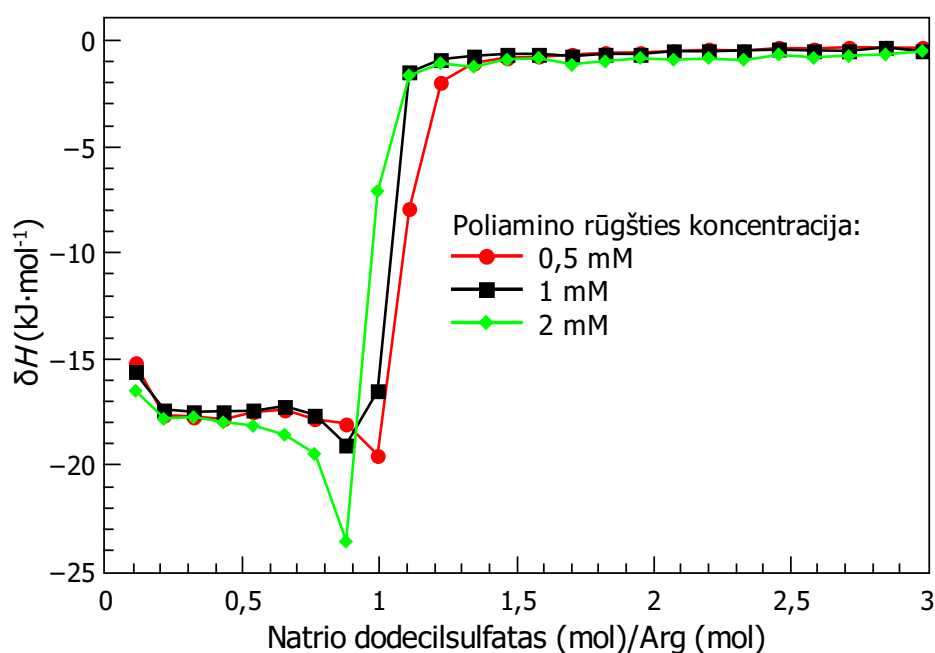
Kai kurių eksperimentų metu buvo stebimas bazinės linijos linkis eksperimento viduryje (žr. 5-ą pav.). Šis linkis indikuoja apie papildomus procesus vykstančius eksperimento metu, pavyzdžiui, polimero konformacijos pokytį. Buvo įvertinta, kokią įtaką šie procesai turi eksperimento rezultatams. Tą galima padaryti palyginus apskaičiuotas reakcijos entalpijas, kai bazinė linija yra pastovi (viršutinis brėžinys 5-ame pav.) ir išvesta per injekcijos pikų apačias (vidurinis brėžinys 5-ame pav.). Bazinės linijos nestabilumas keitė sąveikos entalpijos vertę iki 16%.

3.1. Jungimosi konstantos nustatymas



6 pav. ITC eksperimentai atlikti 25 °C, naudojant (a) 10 mM natrio oktilsulfato ir 1 mM poliarginino tirpalus bei (b) 5 mM natrio undecilsulfato ir 0,5 mM poliarginino tirpalus. Eksperimente (a) buvo apskaičiuoti visi pagrindiniai termodinaminiai sąveikos parametrai, o (b) atveju nustatyta tik mažiausia galima K_b vertė.

Detergentų ir poliamino rūgščių jungimosi konstanta K_b buvo nustatinėjama taikant „vienos jungimosi vietos modelį“, kuris paprastai naudojamas analizuojant mažamolekulinio ligando sąveiką su baltymu. Šiuo metodu pavyko nustatyti kai kurių silpnesnių

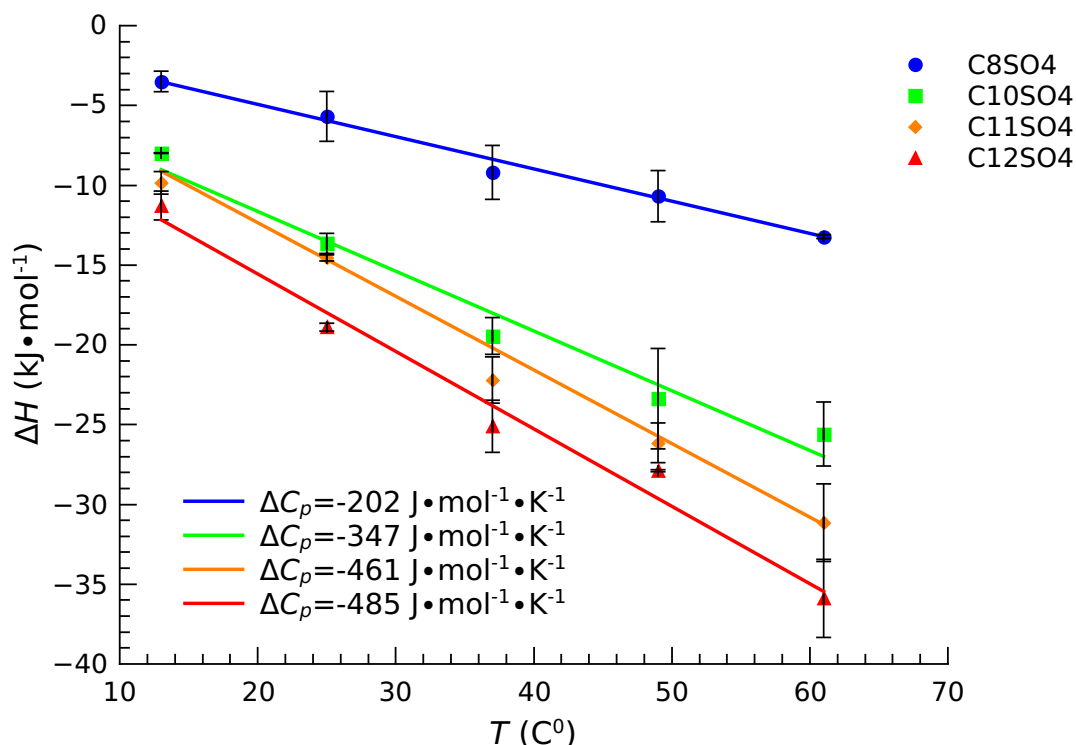


7 pav. Natrio dodecilsulfato sąveikos su poliargininu duomenys. Naudotos skirtingos medžiagų koncentracijos, siekiant tiksliau nustatyti K_b . Tačiau titravimo kreivių formos nepakito ir tiksliau apskaičiuoti K_b nepavyko. Šiame paveiksle linijos yra tik vaizdinė priemonė, o ne matematinis modelis.

sąveikų K_b . Pavyzdžiui natrio oktilsulfato ir poliarginino sąveikai visi termodinaminiai parametrai buvo apskaičiuoti naudojantis „vienos jungimosi vietos“ modeliu (žr. 6 pav. (a) eksperimentas). Tačiau šiuo modeliu nebuvo įmanoma apskaičiuoti didesnių K_b verčių, kadangi buvo viršytos c faktoriaus ribos. Tokiu atveju kreivės forma tampa nejautri K_b pokyčiams: pavyzdys yra 6-ajame paveiksle (b) parodytas eksperimentas naudojant natrio undecil sulfatą ir poliargininą. Ši problema dažnai sprendžiama naudojant mažesnes reagentų koncentracijas, tačiau taip priartėjama prie kalorimetro jautrumo ribos (Tellinghuisen, 2005), kas taip pat mažina eksperimento patikimumą nustatant sistemos termodinامينius parametrus.

Šiame darbe siekiant patikrinti ar eksperimento metu naudojamų medžiagų koncentracijų pakeitimas turi įtakos apskaičiuojamiems termodinaminiais parametrams buvo atlikti eksperimentai naudojant dvigubai didesnes ir dvigubai mažesnes, nei viso likusio darbo metu, koncentracijas. Švirkšte esančio detergento koncentracija – 5 mM arba 20 mM, kiuvetėje esančios poliamino rūgšties šoninių grupių koncentracija – atitinkamai 0,5 mM ir 2 mM. Koncentracijų variavimas neturėjo didelės įtakos eksperimentiniams rezultatams. Kaip matyti iš sugretintų eksperimentų rezultatų 7-ajame paveiksle, jungimosi entalpijų kreivės kito nežymiai keičiant medžiagų koncentracijas. Visuose eksperimentuose detergentų koncentracijos buvo žemesnės nei KMK (žr. 1-ą lentelę), todėl micelių formavimosi ar jų suardymo energija įtakos rezultatams neturėjo.

3.2. Temperatūros įtaka sąveikai



8 pav. ITC eksperimentų metu nustatyta sąveikos tarp skirtingo ilgio alkilsulfatų ir poliarginino, entalpijų priklausomybė nuo temperatūros. Eksperimentai atlikti naudojant 10 mM koncentracijos detergentų ir 1 mM poliarginino tirpalus.

Temperatūros įtaka termodinaminių parametru vertėms buvo tiriama atliekant eksperimentus (13 – 61 °C) temperatūrų intervale. Eksperimentai skirtingose temperatūrose leido nustatyti sąveikų šiluminės talpos pokytį pasinaudojant pastovaus slėgio šiluminės talpos lygtimi:

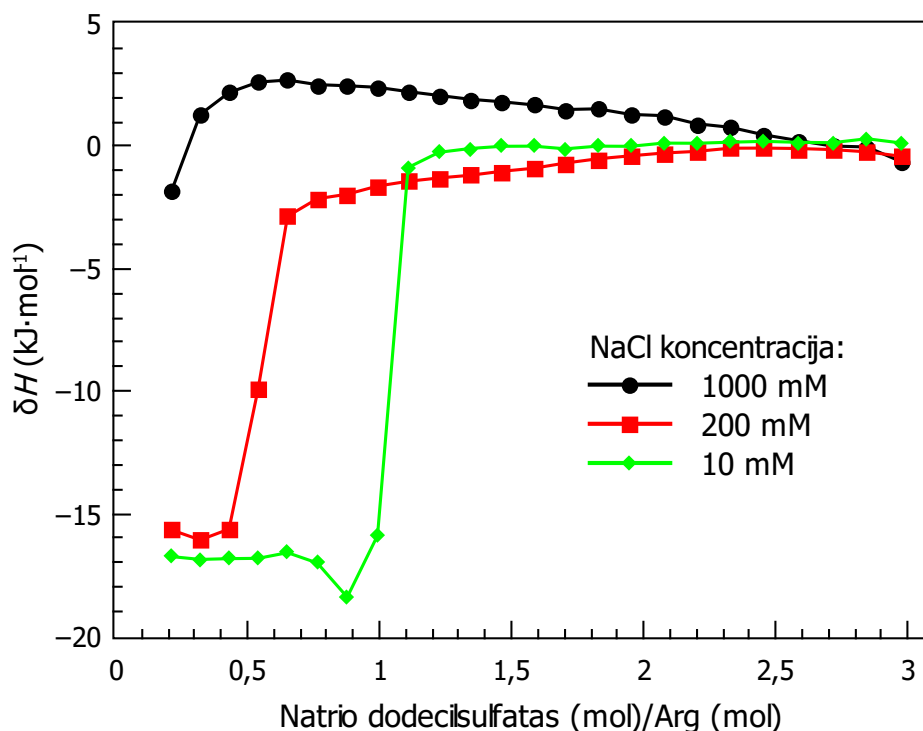
$$\Delta C_p = \left(\frac{\delta H}{\delta T} \right)_p \quad (10)$$

Visų tyrime naudotų detergento – poliainino rūgšties porų tarpusavio sąveikos pasižymėjo neigiama šilumine talpa, t.y., didesnėje temperatūroje sąveikos entalpijos vertė neigiamesnė. Šis reiškinys siejamas su hidrofobine agregacija (Matulis and Bloomfield, 2001). Iš atliktų eksperimentų buvo nustatyta, jog šiluminės talpos pokyčio neigiama vertė koreliuoja su detergento hidrofobinės dalies ilgiu, kaip tai pavaizduota 8-ajame paveiksle.

3.3. Tirpalo joninės jėgos įtaka sąveikai

Siekiant nustatyti tirpalo joninės jėgos įtaką sąveikai tarp detergentų ir poliainino rūgščių, buvo atlikti eksperimentai naudojant tirpalus su skirtinga natrio chlorido koncentracija (NaCl koncentracija kito nuo 10 mM iki 1000 mM). Didinant NaCl koncentraciją

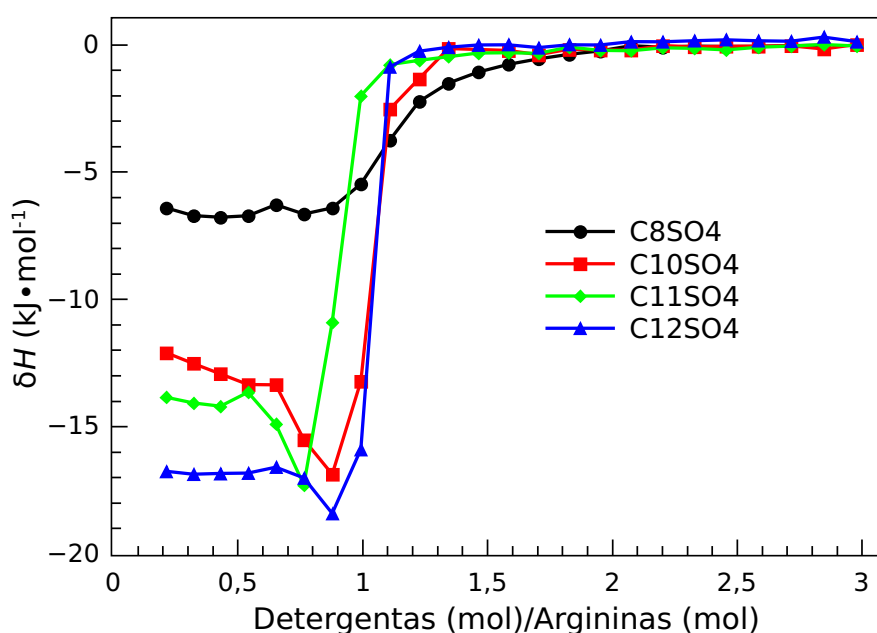
reakcijos stochiometrija mažėjo. Eksperimentuose, kuriuose naudota NaCl koncentracija buvo didesnė nei 500 mM, jungimasis nebebuvo stebimas (viršutinė kreivė 9 paveiksle). Šie rezultatai rodo, kad anijoninių detergentų prisijungimui prie katijoninių poliamino rūgščių yra būtini joniniai ryšiai.



9 pav. ITC eksperimentai su SDS ir poliargininu naudojant skirtingas NaCl koncentracijas. Didinant NaCl koncentraciją vis mažiau SDS molekulių prisijungia prie poliarginino. Šiame paveiksle linijos yra tik vaizdinė priemonė, o ne matematinis modelis.

3.4. Alifatinės grandinės ilgio įtaka sąveikai

Siekiant nustatyti alifatinės grandinės ilgio m įtaką poliamino rūgščių ir detergentų sąveikai, buvo atlikti ITC eksperimentai naudojant skirtingų ilgių detergentus. Eksperimentuose arginino, lizino ir ornitino homopolimerai buvo titruojami alkil sulfatais, bei sulfonatais, kurių alifatinės grandinės ilgis kito nuo 8 iki 13. Sąveikos su trumpesnę nei 8 anglies atomų grandinę turinčiais detergentais buvo per silpnos stebėti kalorimetriniu metodu, o eksperimentai su ilgesnę grandinę turinčiais detergentais buvo neįmanomi dėl jų mažo tirpumo vandenyje. Detergentų prisijungimo prie poliamino rūgščių termodinaminiai parametrai reikšmingai skyrėsi naudojant skirtingo ilgio anijoninius detergentus. Iš eksperimentų matyti, jog ilgesnė detergento hidrofobinė dalis lemia stipresnę sąveiką, tačiau patikimai nustatyti buvo įmanoma tik sąveikos entalpiją. Kitus parametrus (jungimosi konstantą ir entropiją) nustatyti trukdė per stiprus jungimasis dėl kurio c faktorius viršijo ribas reikalingas nustatyti K_b (žr. 10 pav.).

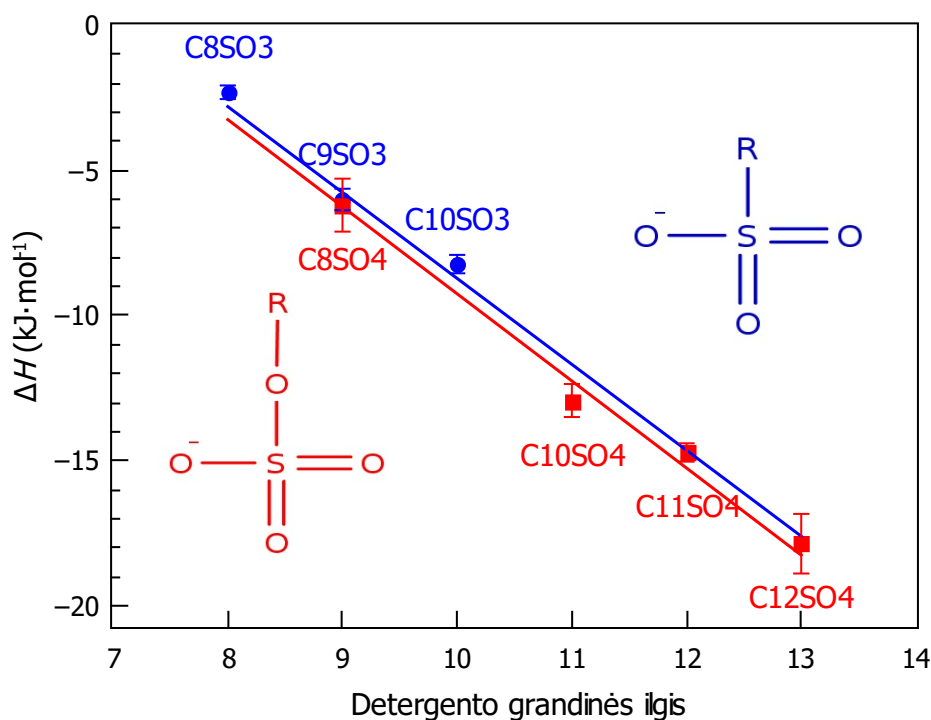


10 pav. ITC eksperimentų (25°C temperatūra) duomenys, naudojant skirtingo ilgio alkilsulfatus ir poliargininą. Šiame paveiksle linijos yra tik vaizdinė priemonė, o ne matematinis modelis.

2 lentelė. Detergento CH_2 grupės įtaka prisijungimo prie poliaminorūgščių entalpijai

Poliamino rūgštis	$\Delta\Delta H_{\text{CH}_2}$ (kJ/mol)
pArg	$-3,3 \pm 0,1$
pLys	$-2,0 \pm 0,1$
pOrn	$-1,3 \pm 0,1$

Buvo nustatyta, kad sąveikos entalpijos dydis yra tiesiogiai proporcingas detergento alifatinės grandinės ilgiui. Esant ilgesnei detergento alifatinei grandinei buvo stebima vis labiau egzoterminė sąveika. Tiriant katijoninių ir anijoninių detergentų sąveikas panašioje modelinėje sistemoje buvo nustatyta, jog alkilsulfatų grandinėje esantis papildomas deguonies atomas turi tokią pačią įtaką entalpijai, kaip papildoma CH_2 grupė (Norvaišas et al., 2012). Šis dėsniumas buvo gautas ir šio darbo metu poliamino rūgščių – detergentų sistemoje. Tai matyti iš eksperimentų serijos pavaizduotos 11-ajame paveiksle, kuomet alkilsulfatą pakeitus vienu anglies atomu daugiau turinčiu alkil sulfonatu sąveikos entalpija išlieka ta pati. Tiesinė priklausomybė buvo nustatyta visoms darbe naudotoms poliamino rūgštims (žr. 12 pav.). Tačiau vienos metil grupės įtakos entalpijai skaitinė vertė nebuvo vienoda skirtingoms poliamino rūgštims. Didžiausią įtaką papildoma metil grupė turėjo detergentui jungiantis prie poliarginino (žr. 2-ą lentelę).

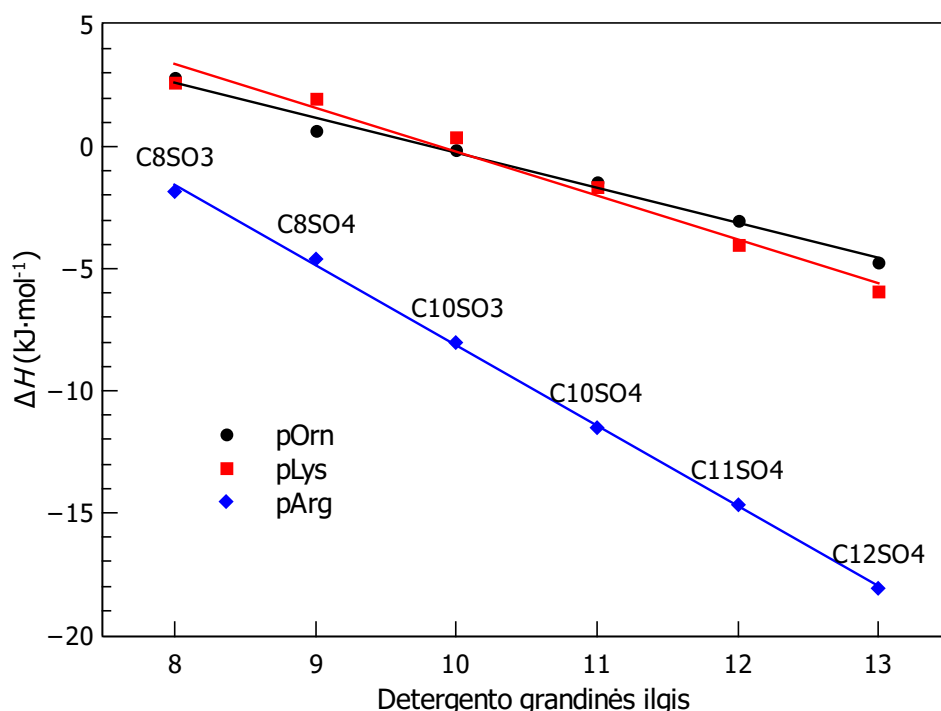


11 pav. ITC eksperimentų metu nustatytų sąveikos entalpijų palyginimas. Eksperimentai atlikti 25 °C temperatūroje, 1 mM poliarginino tirpalas titruotas 10 mM alkilsulfatų ar alkilsulfonatų tirpalais.

4. Rezultatų aptarimas

Šio darbo metu buvo tirta sistema, kurią sudaro teigiamą krūvį turinčios poliamino rūgštys ir neigiamą krūvį turintys detergentai. Keičiant eksperimentines sąlygas, bei sistemos sudedamąsias dalis, buvo apskaičiuoti šią sąveiką lemiančių jėgų termodinaminiai parametrai, taip pat nustatyti tam tikri dėsniniai leidžiantys geriau suprasti šioje sistemoje vykstančius procesus.

Šiame darbe buvo tiriamas detergentų jungimasis prie poliamino rūgščių esant vienodam kiekiui teigiamai įkrautų amino rūgščių ir neigiamai įkrautų alkilsulfatų ar alkilsulfonatų. Eksperimentų rezultatai patvirtino, jog pirminis detergentų prisijungimas prie polimerų yra lemiamas elektrosstatinės sąveikos tarp skirtingų krūvių (Markus et al., 1964). Visuose šiame darbe atliktuose izoterminio titravimo kalorimetrijos eksperimentuose detergentų prisijungimas buvo stebimas iki taško, kuriame detergentų ir aminorūgščių skaičius kiuvetėje vienodas. Joninės jėgos pakėlimas pridėdant natrio chlorido trukdė detergentų prisijungimui prie polimerų. Tai reiškia, kad prisijungimas vyksta neigiamai įkrautam detergentui išstumiant Cl^- ar kitą tirpalo neorganinį anijoną esantį prie teigiamai įkrautos amino rūgšties šoninės grupės. Šie rezultatai leidžia manyti, jog pirminis detergentų prisijungimas vyksta vienai detergento molekulei sudarant joninį ryšį su amino rūgšties šonine grupe.



12 pav. ITC eksperimentų metu nustatytų sąveikos entalpijų priklausomybė nuo detergento alifatinės grandinės ilgio. Eksperimentai atlikti 25 °C temperatūroje, naudojant 10 mM koncentracijos detergentų ir 1 mM poliamino rūgščių tirpalus.

Tačiau elektrostatinė sąveika nebuvo vienintelė jėga lemianti detergentų prisijungimą prie poliamino rūgščių. Darbo metu nustatyta tiesinė priklausomybė tarp detergento alifatinės grandinės ilgio ir sąveikos stiprumo. Ilgesnę grandinę turintys detergentai jungėsi stipriau nei turintys trumpesnę grandinę (žr. 3-ąją lentelę). Buvo apskaičiuota papildomos CH₂ grupės įtaka sąveikos entalpijai, kuri yra tarp -1,3 kJ/mol ir -3,3 kJ/mol (pateikta 2-oje lentelėje). Šis reiškinys galėtų būti aiškinamas prisijungusių detergentų alifatinių grandinių tarpusavio hidrofobine sąveika. Ilginant detergento grandinę sąveika stiprėjo dėl vis didesnės entalpijos įtakos, taip pat iš eksperimentų skirtingose temperatūrose nustatyta, jog ilginant detergento grandinę stebimas vis neigiamesnis pastovaus slėgio šiluminės talpos C_p pokytis. Būtent šios charakteristikos yra būdingos detergentų hidrofobinei agregacijai (Matulis and Bloomfield, 2001).

Dar vienas požymis, kurį galima priskirti prisijungusių detergentų molekulių alifatinių grandinių tarpusavio sąveikai yra kooperatyvumo efektas. Titravimo kreivėse buvo stebimas signalo stiprėjimas prie polimero prisijungiant vis daugiau detergentų molekulių. Manoma, kad detergentams jungiantis prie polimerų, jie palaipsniui iš netvarkingos spiralės konformacijos įgauna tvarkingą α -spiralės struktūrą (McCord et al., 1977; Satake and Yang, 1976). Įgaunant tvarkingą struktūrą vis daugiau prisijungusių detergentų alifatinių grandinių gali persidengti erdvėje ir taip sąveikauti tarpusavyje. Be to detergentų, kurių alifatinė grandinė sudaryta iš septynių ar mažiau anglies atomų, prisijungimas prie polimerų nebuvo pastebėtas. Darbo rezultatai rodo, jog vien elektrostatinės sąveikos

anijoninių detergentų prisijungimų prie katijoninių poliamino rūgščių neužtenka. Šioje sistemoje svarbi tiek elektrostatinė tiek ir hidrofobinė sąveika.

3 lentelė. Skirtingo ilgio alkilsulfatų sąveikos su poliargininu termodinaminiai parametrai 25 °C temperatūroje.

m	K_b (M^{-1})	ΔH (kJ/mol)	ΔG (kJ/mol)	$T\Delta S$ (kJ/mol)	ΔC_p ($J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}$)
8	$5,9 \cdot 10^4 \pm 2,5 \cdot 10^4$	$-5,7 \pm 1,5$	$-27 \pm 1,1$	$21 \pm 0,5$	$-202 \pm 1,3$
10	$\geq 10^7$	$-12,9 \pm 1,6$	≤ -40	$\geq 27,0 \pm 1,6$	$-347 \pm 2,5$
11	$\geq 10^7$	$-14,6 \pm 0,2$	≤ -40	$\geq 25,9 \pm 0,2$	$-461 \pm 3,5$
12	$\geq 10^7$	$-18,1 \pm 1,4$	≤ -40	$\geq 21,9 \pm 1,4$	$-485 \pm 9,4$

Dar vienas darbo metu pastebėtas dėsningumas, kurio nepavyksta paaiškinti prieš tai aptartais efektais, yra skirtingos jungimosi entalpijos tokio paties grandinės ilgio detergentams prisijungiant prie skirtingų poliamino rūgščių. Iš rezultatų pateiktų 12 paveiksle matyti, kad detergentų sąveikos entalpija su poliargininu yra labiau egzoterminė nei su polilizinu arba poliornitinu. Tai galima paaiškinti atsižvelgiant į amino rūgščių šoninių grupių struktūrą. Poliarginino šoninė grandinė turi guanidino grupę, kuri su sulfato ar sulfonato deguonies atomais gali suformuoti dvi vandenilines jungtis. Tuo tarpu tiek polilizino tiek ir poliornitino šoninėje grandinėje esanti amino grupė su sulfato ar sulfonato deguonies atomais greičiausiai formuoja tik vieną vandenilinį ryšį. Analogiški rezultatai buvo gauti tiriant panašią modelinę sistemą, sudarytą iš sąveikaujančių teigiamai ir neigiamai įkrautų poliamino rūgščių. Taigi, entalpijų skirtumas tarp poliarginino ir polilizino (bei poliornitino) sąveikos su detergentais kyla iš skirtingo vandenilinių ryšių skaičiaus.

Taip pat darbo metu pastebėtas dėsningumas – skirtinga alifatinės grandinės ilgio įtaka detergentams prisijungiant prie skirtingų poliamino rūgščių. Papildoma detergento grandinės CH_2 grupė turėjo beveik dvigubai didesnę įtaką sąveikos entalpijai detergentams jungiantis prie poliarginino, nei prie poliornitino ar polilizino. Papildomos CH_2 grupės įtaka detergento prisijungimui prie poliornitino ir polilizino paklaidų ribose yra panaši. Šis dėsningumas skiriasi poliarginino atveju. To priežastis galėtų būti, prieš tai aptarta galimybė guanidino grupei suformuoti du vandenilinius ryšius su sulfo grupe. Yra manoma, kad šalia vandenilinių ryšių susidarymo vietose esančios papildomos grupės dėl erdvinių efektų gali blokuoti vandens priėjimą prie vandenilinį ryšį sudarančių grupių, taip juos sustiprindamos (Bai and Englander, 1994). Taigi, šios sistemos atveju šis efektas galėtų paaiškinti, kodėl du vandenilinius ryšius sudarančioje poliarginino ir detergento sistemoje papildoma CH_2 grupė turi dvigubai didesnę įtaką sąveikos entalpijai, nei vieną vandenilinį ryšį sudarančiose (polilizino ir poliornitino) sistemose.

5. Išvados

Šio darbo metu naudojant izoterminio titravimo kalorimetrijos metodą ir varijuojant eksperimento sąlygas bei naudojamas medžiagas buvo nustatytos šios katijoninių poliamino rūgščių ir anijoninių detergentų sąveikos termodinaminės savybės:

- Anijoninių detergentų prisijungimas prie teigiamai įkrautų poliamino rūgščių vyksta detergento molekulei jungiantis prie krūvį turinčios amino rūgšties šoninės grupės santykiu 1:1.
- Detergentų jungimąsi prie įkrautų poliamino rūgščių lemia tiek elektrostatinė tiek ir hidrofobinė sąveikos. Kuo ilgesnė detergento alifatinė grandinė, tuo jų jungimosi su poliamino rūgštimis entalpija yra labiau egzoterminė.
- Šiluminės talpos pokytis atsirandantis dėl poliamino rūgščių sąveikos su detergentais yra neigiamas. Ši vertė tuo neigiamesnė kuo didesnis detergento alifatinės grandinės ilgis.
- Deguonies atomas alkilsulfato grandinėje turi tokį patį įnašą į jungimosi entalpiją, kaip ir papildoma CH_2 grupė alkilsulfonato grandinėje.
- Arginino šoninėje grandinėje esanti guanidino grupė su detergentų sulfo grupe gali suformuoti du vandenilinius ryšius, tuo tarpu lizino (ir ornitino) amino grupė – tik vieną, todėl detergentų sąveikos entalpija su poliargininu yra labiau egzoterminė nei su polilizinu (ir poliornitinu).

Nors izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu, pavyko išsamiai išanalizuoti katijoninių poliamino rūgščių ir anijoninių detergentų sąveiką lemiančias jėgas, tikslūs termodinaminiai parametrai buvo nustatyti ne visoms tirtosioms sistemoms. Tam sutrukdė ITC metodo apribojimai nustatant stiprias jungimosi konstantas. Sistemos energijos pokyčiai, susiję su galimais detergentų–poliamino rūgščių kompleksų struktūriniais virsmis, ateityje galėtų būti detalčiau išnagrinėti naudojant kitus, pavyzdžiui, apskritiminio dichroizmo, eksperimentinius metodus.

Literatūros sąrašas

- (1972). Critical micelle concentrations of aqueous surfactant systems. by p. mukerjee and k. j. mysels. prepared under contract for the office of standard reference data, national bureau of standards of nsrds-nbs 36, washington, dc 20234, 1971 v + 227 pp. 20.5. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 61(2):319–319.
- Andersen, K. K., Oliveira, C. L., Larsen, K. L., Poulsen, F. M., Callisen, T. H., Westh, P., Pedersen, J. S., and Otzen, D. (2009). The role of decorated sds micelles in sub-cmc protein denaturation and association. *J Mol Biol*, 391(1):207–226.
- Bai, Y. and Englander, S. W. (1994). Hydrogen bond strength and beta-sheet propensities: the role of a side chain blocking effect. *Proteins*, 18(3):262–266.
- Barck, M. and Stenius, P. (1994). Interactions between carboxymethyl cellulose and cationic surfactants 1. phase equilibria and surface tensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 89(1):59 – 69.
- Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 68:729–777.
- Bettelheim, F. R. (1954). Tyrosine-o-sulfate in a peptide from fibrinogen. *Journal of the American Chemical Society*, 76(10):2838–2839.
- Billich, A., Nussbaumer, P., and Lehr, P. (2000). Stimulation of mcf-7 breast cancer cell proliferation by estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate: inhibition by novel non-steroidal steroid sulfatase inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 73(5):225–235.
- Chan, J., Song, C. S., Matusik, R. J., Chatterjee, B., and Roy, A. K. (1998). Inhibition of androgen action by dehydroepiandrosterone sulfotransferase transfected in pc-3 prostate cancer cells. *Chem Biol Interact*, 109(1-3):267–278.
- Costagliola, S., Panneels, V., Bonomi, M., Koch, J., Many, M. C., Smits, G., and Vassart, G. (2002). Tyrosine sulfation is required for agonist recognition by glycoprotein hormone receptors. *EMBO J*, 21(4):504–513.
- Crawford, B. E., Olson, S. K., Esko, J. D., and Pinhal, M. A. (2001). Cloning, golgi localization, and enzyme activity of the full-length heparin/heparan sulfate-glucuronic acid c5-epimerase. *J Biol Chem*, 276(24):21538–21543.
- Duggan, E. L. and Luck, J. M. (1948). The combination of organic anions with serum albumin; stabilization against urea denaturation. *J Biol Chem*, 172(1):205–220.

- Eisenhofer, G., Kopin, I. J., and Goldstein, D. S. (2004). Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*, 56(3):331–349.
- Esko, J. D. and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest*, 108(2):169–173.
- Esko, J. D. and Zhang, L. (1996). Influence of core protein sequence on glycosaminoglycan assembly. *Curr Opin Struct Biol*, 6(5):663–670.
- Goddard, E. (2002). Polymer/surfactant interaction: Interfacial aspects. *Journal of Colloid and Interface Science*, 256(1):228 – 235.
- Goddard, E. and Hannan, R. (1976). Cationic polymer/anionic surfactant interactions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 55:73–79.
- Grossmann, M., Leitolf, H., Weintraub, B. D., and Sz kudlinski, M. W. (1998). A rational design strategy for protein hormone superagonists. *Nat Biotechnol*, 16(9):871–875.
- Hobkirk, R. (1993). Steroid sulfation current concepts. *Trends Endocrinol Metab*, 4(2):69–74.
- Holdgate, G. A. (2001). Making cool drugs hot: isothermal titration calorimetry as a tool to study binding energetics. *Biotechniques*, 31(1):164–6, 168, 170 passim.
- Hooper, L. V., Manzella, S. M., and Baenziger, J. U. (1996). From legumes to leukocytes: biological roles for sulfated carbohydrates. *The FASEB Journal*, 10(10):1137–46.
- Huttner, W. B. (1988). Tyrosine sulfation and the secretory pathway. *Annu Rev Physiol*, 50:363–376.
- Keshwani, N., Banerjee, S., Brodsky, B., and Makhatadze, G. I. (2013). The role of cross-chain ionic interactions for the stability of collagen model peptides. *Biophys J*, 105(7):1681–1688.
- Ladbury, J. E. (2010). Calorimetry as a tool for understanding biomolecular interactions and an aid to drug design. *Biochem Soc Trans*, 38(4):888–893.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–5.
- Lee, A., Tang, S. K. Y., Mace, C. R., and Whitesides, G. M. (2011). Denaturation of proteins by sds and tetraalkylammonium dodecyl sulfates. *Langmuir*, 27(18):11560–11574.

- Lind, T., Lindahl, U., and Lidholt, K. (1993). Biosynthesis of heparin/heparan sulfate. identification of a 70-kda protein catalyzing both the d-glucuronosyl- and the n-acetyl-d-glucosaminyltransferase reactions. *J Biol Chem*, 268(28):20705–20708.
- Lindman, B. and Wennerström, H. (1980). Miceles. amphiphile aggregation in aqueous solution. *Top Curr Chem*, 87:1–87.
- Liu, R., Bu, W., Xi, J., Mortazavi, S. R., Cheung-Lau, J. C., Dmochowski, I. J., and Loll, P. J. (2012). Beyond the detergent effect: a binding site for sodium dodecyl sulfate (sds) in mammalian apoferritin. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 68(Pt 5):497–504.
- Maiti, A., Maki, G., and Johnson, P. (1998). Tnf-alpha induction of cd44-mediated leukocyte adhesion by sulfation. *Science*, 282(5390):941–943.
- Markus, G., Love, R. L., and Wissler, F. C. (1964). Mechanism of protection by anionic detergents against denaturation of serum albumin. *J Biol Chem*, 239:3687–3693.
- Matulis, D. (2008). *Baltymų fizikinė chemija*. Technologija.
- Matulis, D. and Bloomfield, V. A. (2001). Thermodynamics of the hydrophobic effect. ii. calorimetric measurement of enthalpy, entropy, and heat capacity of aggregation of alkylamines and long aliphatic chains. *Biophysical Chemistry*, 93(1):53–65.
- McCord, R. W., Blakeney, Jr, E., and Mattice, W. L. (1977). Conformational changes induced in ionized poly(l-arginine) and poly(l-histidine) by sodium dodecyl sulfate. *Biopolymers*, 16(6):1319–1329.
- Medzihradzsky, K. F., Darula, Z., Perlson, E., Fainzilber, M., Chalkley, R. J., Ball, H., Greenbaum, D., Bogyo, M., Tyson, D. R., Bradshaw, R. A., and Burlingame, A. L. (2004). O-sulfonation of serine and threonine: mass spectrometric detection and characterization of a new posttranslational modification in diverse proteins throughout the eukaryotes. *Mol Cell Proteomics*, 3(5):429–440.
- Merta, J. and Stenius, P. (1999). Interactions between cationic starch and mixed anionic surfactants. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 149(1–3):367 – 377.
- Mikami, T. and Kitagawa, H. (2013). Biosynthesis and function of chondroitin sulfate. *Biochim Biophys Acta*, 1830(10):4719–4733.
- Moriyama, Y., Kawasaki, Y., and Takeda, K. (2003). Protective effect of small amounts of sodium dodecyl sulfate on the helical structure of bovine serum albumin in thermal denaturation. *J Colloid Interface Sci*, 257(1):41–46.

- Moriyama, Y. and Takeda, K. (1999). Re-formation of the helical structure of human serum albumin by the addition of small amounts of sodium dodecyl sulfate after the disruption of the structure by urea. a comparison with bovine serum albumin. *Langmuir*, 15(6):2003–2008.
- Moriyama, Y., Watanabe, E., Kobayashi, K., Harano, H., Inui, E., and Takeda, K. (2008). Secondary structural change of bovine serum albumin in thermal denaturation up to 130 degrees c and protective effect of sodium dodecyl sulfate on the change. *J Phys Chem B*, 112(51):16585–16589.
- Nagata, K. and Yamazoe, Y. (2000). Pharmacogenetics of sulfotransferase. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40(1):159–176. PMID: 10836131.
- Naidu, K. T. and Prabhu, N. P. (2011). Protein-surfactant interaction: sodium dodecyl sulfate-induced unfolding of ribonuclease a. *J Phys Chem B*, 115(49):14760–14767.
- Nielsen, A. D., Borch, K., and Westh, P. (2007a). Thermal stability of humicola insolens cutinase in aqueous sds. *J Phys Chem B*, 111(11):2941–2947.
- Nielsen, M. M., Andersen, K. K., Westh, P., and Otzen, D. E. (2007b). Unfolding of beta-sheet proteins in sds. *Biophys J*, 92(10):3674–3685.
- Norvaišas, P., Petrauskas, V., and Matulis, D. (2012). Thermodynamics of cationic and anionic surfactant interaction. *J Phys Chem B*, 116(7):2138–2144.
- O’Connell, M. P. and Weeraratna, A. T. (2011). A spoonful of sugar makes the melanoma go: the role of heparan sulfate proteoglycans in melanoma metastasis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24(6):1133–1147.
- Onasch, A., Tanzeem, A., Isgro, F., Böning, D., and Strobel, G. (2000). Effect of intravenous dopamine infusion on plasma concentrations of dopamine and dopamine sulfate in men, during and up to 18 h after infusion. *Eur J Clin Pharmacol*, 55(10):755–759.
- Pittman, D. D., Tomkinson, K. N., Michnick, D., Selighsohn, U., and Kaufman, R. J. (1994). Posttranslational sulfation of factor v is required for efficient thrombin cleavage and activation and for full procoagulant activity. *Biochemistry*, 33(22):6952–6959.
- Putnam, F. W. and Neurath, H. (1944). The precipitation of proteins by synthetic detergents1a. *Journal of the American Chemical Society*, 66(5):692–697.
- Rocklin, G. J., Boyce, S. E., Fischer, M., Fish, I., Mobley, D. L., Shoichet, B. K., and Dill, K. A. (2013). Blind prediction of charged ligand binding affinities in a model binding site. *J Mol Biol*, 425(22):4569–4583.

- Satake, I. and Yang, J. T. (1976). Interaction of sodium decyl sulfate with poly(l-ornithine) and poly(l-lysine) in aqueous solution. *Biopolymers*, 15(11):2263–2275.
- Schneider, G. F., Shaw, B. F., Lee, A., Carillho, E., and Whitesides, G. M. (2008). Pathway for unfolding of ubiquitin in sodium dodecyl sulfate, studied by capillary electrophoresis. *J Am Chem Soc*, 130(51):17384–17393.
- Strott, C. A. (2002). Sulfonation and molecular action. *Endocr Rev*, 23(5):703–732.
- Sugahara, K. and Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol*, 10(5):518–527.
- Sugahara, K., Mikami, T., Uyama, T., Mizuguchi, S., Nomura, K., and Kitagawa, H. (2003). Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Curr Opin Struct Biol*, 13(5):612–620.
- Tellinghuisen, J. (2005). Optimizing experimental parameters in isothermal titration calorimetry. *J Phys Chem B*, 109(42):20027–20035.
- Turro, N. J., Lei, X.-G., Ananthapadmanabhan, K. P., and Aronson, M. (1995). Spectroscopic probe analysis of protein-surfactant interactions: The bsa/sds system. *Langmuir*, 11(7):2525–2533.
- Visser, T. J., van Buuren, J. C., Rutgers, M., Eelkman Rooda, S. J., and de Herder, W. W. (1990). The role of sulfation in thyroid hormone metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, 1(4):211–218.
- Weber, K. and Osborn, M. (1969). The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J Biol Chem*, 244(16):4406–4412.
- Wilkins, P. P., Moore, K. L., McEver, R. P., and Cummings, R. D. (1995). Tyrosine sulfation of p-selectin glycoprotein ligand-1 is required for high affinity binding to p-selectin. *J Biol Chem*, 270(39):22677–22680.
- Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F., and Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem*, 179(1):131–7.