



VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS

CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

Aistė Kasiliauskaitė

**BAKTERINIO MOLEKULINIO ŠAPERONO HTPG GRYNINIMAS BEI
JUNGIMOSI SU SLOPIKLIAIS MATAVIMAS**

**PURIFICATION OF BACTERIAL MOLECULAR CHAPERONE HTPG
AND MEASUREMENT OF ITS BINDING WITH INHIBITORS**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vilnius, 2011

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Katedros vedėjas

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

Aistė Kasiliauskaitė

**BAKTERINIO MOLEKULINIO ŠAPERONO HTPG GRYNINIMAS BEI
JUNGIMOSI SU SLOPIKLIAIS MATAVIMAS**

**PURIFICATION OF BACTERIAL MOLECULAR CHAPERONE HTPG
AND MEASUREMENT OF ITS BINDING WITH INHIBITORS**

Baigiamasis bakalauro darbas (projektas)

Bioinžinerijos studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

Bioinžinerijos studijų kryptis

Vadovas Vilma Michailovienė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Konsultantas dr. Alma Gedvilaitė

(Moksl. laipsnis, vardas, pavardė)

(Parašas)

(Data)

Vilnius, 2011

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS
FUNDAMENTINIŲ MOKSLŲ FAKULTETAS
CHEMIJOS IR BIOINŽINERIJOS KATEDRA

TVIRTINU

Bioinžinerija studijų kryptis

Katedros vedėjas

Bioinžinerija studijų programa, valstybinis kodas 61205T201

(Parašas)

Juozas Kulys

(Vardas, pavardė)

(Data)

**BAIGIAMOJO BAKALAURO DARBO (PROJEKTO)
UŽDUOTIS**

.....Nr.

Vilnius

Studentei

Aistei Kasiliauskaitei

Baigiamojo darbo (projekto) tema:

Bakterinio molekulinio šaperono HtpG gryninimas bei jungimosi su slopikliais matavimas

patvirtinta 2010m. lapkričio 5d. dekanų potvarkiu Nr. 339 fm

Baigiamojo darbo (projekto) užbaigimo terminas 2011m. birželio 1 d.

BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO) UŽDUOTIS:

Bakterinio karščio šoko baltymo (HtpG) gryninimas, jungimosi su eukariotinio homologų ligandais įvertinimas izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais.

Baigiamojo bakalauro darbo (projekto) konsultantai:

dr. Alma Gedvilaitė

Vadovas

.....

(Parašas)

Vilma Michailovienė

Užduotį gavau

.....

(Parašas)

Aistė Kasiliauskaitė

.....

(Data)

Vilniaus Gedimino technikos universiteto egzaminų
sesijų ir baigiamųjų darbų rengimo bei gynimo
organizavimo tvarkos aprašo 2010–2011 m. m.
6 priedas

(Baigiamojo darbo sąžiningumo deklaracijos forma)

VILNIAUS GEDIMINO TECHNIKOS UNIVERSITETAS

Aistė Kasiliauskaitė

(Studento vardas ir pavardė, studento pažymėjimo Nr.)

Fundamentinių mokslų fakultetas

(Fakultetas)

Bioinžinerija, BI 07

(Studijų programa, akademinė grupė)

**BAIGIAMOJO DARBO (PROJEKTO)
SĄŽININGUMO DEKLARACIJA**

2011 m. _____ d.
(Data)

Patvirtinu, kad mano baigiamasis darbas (projektas) tema „Bakterinio molekulinio šaperono
HtpG gryninimas bei jungimosi su slopikliais matavimas“

patvirtintas 20 10 m. _____ lapkričio 5 _____ d. dekanų potvarkiu Nr. 339 fm, yra
savarankiškai parašytas. Šiame darbe (projekte) pateikta medžiaga nėra plagijuota. Tiesiogiai ar
netiesiogiai panaudotos kitų šaltinių citatos pažymėtos literatūros nuorodose.

Prenkant ir įvertinant medžiagą bei rengiant baigiamąjį darbą (projektą), mane konsultavo
mokslininkai ir specialistai: dr. Daumantas Matulis, dr. Asta Zubrienė

Mano darbo (projekto) vadovas Vilma Michailovienė

Kitų asmenų indėlio į parengtą baigiamąjį darbą (projektą) nėra. Jokių įstatymų
nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs(-usi).

(Parašas)

(Vardas ir pavardė)

Vilniaus Gedimino technikos universitetas ISBN ISSN
Fundamentinių mokslų fakultetas Egz. sk.
Chemijos ir bioinžinerijos katedra Data-.....-.....

Pirmosios pakopos studijų **Bioinžinerijos** programos baigiamasis darbas

Pavadinimas **Bakterinio molekulinio šaperono HtpG gryninimas bei jungimosi su slopikliais matavimas**
Autorius **Aistė Kasiliauskaitė**
Vadovas **dr. Alma Gedvilaitė**

Kalba: lietuvių

Anotacija

Molekuliniai šaperonai – tai baltymai, kurie paplitę visuose organizmuose nuo bakterijų iki žinduolių. Jie naudojami kuriant naujus vaistus prieš vėžį ir infekcijas, nes yra ligų sukėlėjų sudedamoji dalis. Šaperonų sintezę ląstelėse dažniausiai lemia stresinės sąlygos (terminis šokas, poveikis sunkiaisiais metalais ar antibiotikais). Jų atsiradimui gali turėti įtakos ir ląstelės senėjimas bei patofiziologiniai veiksniai, kurie susiję su subtiliais membranos pokyčiais ar defektais. Šiuo metu yra gerai ištirta karščio šoko baltymų, gautų iš melsvabakterių, sąveika su membranomis. Manoma, jog jau žinomą prokariotinių ląstelių modelį būtų galima pritaikyti žinduolių ląstelėms. Dėl šios priežasties labai svarbu nustatyti ar bakterinis Hsp baltymas funkcionuoja taip pat, kaip ir jo eukariotinis homologas.

Darbo metu išgrynintas prokariotinis karščio šoko baltymas HtpG. Izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais ištirta šio baltymo jungimosi su radisikoliu ir ICPD47 termodinamika. Įvertinta su kuriuo slopikliu ir kokiomis sąlygomis bakterinis molekulinis šaperonas sąveikauja geriausiai. Palygintos žmogaus ir bakterijų molekulinų šaperonų jungimosi konstantos.

Darbą sudaro šešios dalys: įvadas, literatūros apžvalga, medžiagos ir metodai, rezultatai ir jų aptarimas, išvados ir literatūros sąrašas.

Darbo apimtis 43 p. teksto be priedų, 22 paveikslai, 2 lentelės, 28 bibliografiniai šaltiniai.

Prasminiai žodžiai

HtpG, Hsp90, izoterminio titravimo kalorimetrija, terminio poslinkio metodas, radisikolis, ICPD47, termodinamika, jungimosi konstanta.

Vilnius Gediminas Technical University ISBN ISSN
Faculty of Fundamental Sciences Copies No.
Department of Chemistry and Bioengineering Date-.....-.....

Bachelor Degree Studies **Bioengineering** study programme Final Thesis

Title **Purification of bacterial molecular chaperone HtpG and measurement of its binding with inhibitors**
Author **Aistė Kasiliauskaitė**
Academic supervisor **Dr Alma Gedvilaitė**

Thesis language: Lithuanian

Annotation

Molecular chaperones - proteins found in all organisms from bacteria to mammals. These proteins are implicated in human cancers and they are the components of pathogens. Therefore, they can be useful in developing new medications. Chaperone synthesis in cells most of the times are induced by stressful conditions as heat shock, heavy metals and antibiotics. Cell aging and pathophysiological factors that are associated with small changes in the membrane or defects can also lead to their origin. Heat shock protein (which are derived from cyanobacterium) interactions with membranes have been well studied in detail. And it is believed that well-known prokaryotic cell model can be used to mammalian cells. For this reason, it is important to determine whether bacterial protein HtpG functions in the same manner as its eukaryotic homolog called Hsp90.

During this thesis practical work prokaryotic heat shock protein HtpG has been purified. Thermodynamics of enzyme's binding with radicicol and ICPD47 was determined by isothermal titration calorimetry and thermal shift assay. This thesis also described under what conditions and with which inhibitor bacterial molecular chaperone interacts the strongest. Furthermore, comparison has been made between binding constants of human and bacterial molecular chaperones.

Structure: introduction, literature part, materials and methods, results and discussion, conclusions, and references.

Thesis consists of: 43 p. of text without appendixes, 22 pictures, 2 tables, and 28 bibliographical entries.

Keywords

HtpG, Hsp90, isothermal titration calorimetry, thermal shift assay, radicicol, ICPD47, thermodynamics, binding constant.

TURINYS

ĮVADAS	11
1. LITERATŪROS APŽVALGA	12
1.1 Hsp90 struktūra	12
1.2 Hsp90 sąveika su ligandais ir jų svarba.....	13
1.3 Bakterinio Hsp90 apžvalga.....	15
1.4 HtpG sąveika su ligandais	16
1.5 Baltymų ir ligandų sąveikos tyrimo metodai.....	17
1.6 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas	17
1.7 Terminio poslinkio metodas	19
2. MEDŽIAGOS, METODAI, APARATŪRA.....	21
2.1 Aparatūra, medžiagos, rinkiniai, terpės, buferiniai tirpalai	21
2.2 Metodai.....	23
3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS.....	28
3.1 HtpG N ir HtpG F baltymų sekos nustatymas.....	28
3.2 Baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas	29
3.3 HtpG N ir HtpG F baltymų gryninimas.....	30
3.4 HtpG N ir HtpG F jungimosi su slopikliais matavimas taikant izoterminio titravimo kalorimetriją.....	33
3.5 HtpG N ir HtpG F jungimosi su slopikliais matavimas taikant terminio poslinkio metodą	36
3.6 HtpG ir Hsp90 jungimosi konstantų palyginimas	40
4. IŠVADOS	41
LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	42

PAVEIKSLŲ IR LENTELIŲ SĄRAŠAS

Paveikslų sąrašas:

- 1 pav.** Hsp90 poklasiai (skalė sudaryta remiantis genotipiniu nuotuočiu) (Taipale et al., 2010) (12 psl.).
- 2 pav.** Hsp90 domenų struktūra: a) Karščio šoko baltymo 90 struktūra, susidedanti iš N – galinio (NTD), vidurinio (MD) ir C – galinio (CTD) domenų. b) Pilno ilgio Hsp90 struktūra gauta iš *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ir *Canis familiaris*. Domenų spalvos atitinka a dalies spalvas (Taipale et al., 2010) (13 psl.).
- 3 pav.** Hsp90 ATP hidrolizės ciklas (Hahn, 2009) (14 psl.).
- 4 pav.** Natūralių Hsp90 ligandų struktūrinės formulės: 1 – radisikolis, 2 – geldanamicinas (Guarnieri et al., 2008) (15 psl.).
- 5 pav.** Dažo reporterio fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros, tirpale esant baltymo (○) ir baltymo su ligandu (●) (Matulis et al., 2005) (20 psl.).
- 6 pav.** Hsp90α ir HtpG F sekų palyginimas (28 psl.).
- 7 pav.** HtpG N ir HtpG F baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas NDS-PAAG, auginant *E. coli* BL21 (DE3) kamienoje (30 psl.).
- 8 pav.** Chromatogramos gautos gryninant HtpG N ir HtpG F Ni⁺² jonų chromatografine kolonėle (31 psl.).
- 9 pav.** HtpG F ir HtpG N gryninimo 6BCL-sefarozės metalochelatinės chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG (31 psl.).
- 10 pav.** Chromatogramos gautos gryninant HtpG N ir HtpG F Q-Sepharose jonų - mainų kolonėle (32 psl.).
- 11 pav.** HtpG ir HtpG F gryninimo Q-Sepharose jonų - mainų chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG (32 psl.).
- 12 pav.** ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su ICPD47 fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (33 psl.).
- 13 pav.** ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su ICPD47 Tris buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (33 psl.).
- 14 pav.** ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (34 psl.).
- 15 pav.** ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (34 psl.).

16 pav. ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu fosfatiname buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms (35 psl.).

17 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai HtpG N – galinio domeno koncentracija pastovi, o fosfatinio buferinio tirpalo pH 7 (36 psl.).

18 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms ICPD47 koncentracijoms, kai HtpG F koncentracija pastovi, o fosfatinio buferinio tirpalo pH 7 (37 psl.).

19 pav. HtpG N ir HtpG F *T_m* priklausomybė nuo ICPD47 koncentracijos, 25°C temperatūroje (37 psl.).

20 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms radisikolio koncentracijoms, kai HtpG N – galinio domeno koncentracija pastovi, o fosfatinio buferinio tirpalo pH 7 (38 psl.).

21 pav. Tipinis fluorescencijos priklausomybės nuo temperatūros grafikas esant skirtingoms radisikolio koncentracijoms, kai HtpG F koncentracija pastovi, o fosfatinio buferinio tirpalo pH 7 (38 psl.).

22 pav. HtpG N ir HtpG F *T_m* priklausomybė nuo radisikolio koncentracijos, 25°C temperatūroje (39 psl.).

Lentelių sąrašas:

1 lentelė. HtpG N jungimosi su ICPD47 ir radisikoliu gauti parametrai, esant skirtingoms pH reikšmėms, 25°C laipsnių temperatūroje (36 psl.).

2 lentelė. Hsp90α N – galinio domeno ir HtpG N jungimosi su radisikoliu gauti parametrai (40 psl.).

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

ANS – 8-anilino-1- naftaleno sulfonatas
APS – amonio persulfatas
aps. – apsisukimai
BL21 (DE3) – išvestinis *E. coli* kamienas
CSS – kolistino sulfatinė druska
DMSO – dimetilsulfoksidas
DTT – ditionitrietolis
Hsp – karščio šoko baltymai
Hsp90 – karščio šoko baltymas 90
Hsp90 α N – karščio šoko baltymo 90 α izoformos N – galinis domenas
HtpG – aukštos temperatūros baltymas G
HtpG N – aukštos temperatūros baltymo G N – galinis domenas
HtpG F – pilno ilgio aukštos temperatūros baltymas G
IPTG – izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidas
ITK – izoterminio titravimo kalorimetrija
NDS – natrio dodecilsulfatas
NDS-PAAG – natrio dodecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
PMSF – fenilmetilsulfonilchloridas
TEMED – N,N,N',N'-tetrametiletilendiaminas
TPM – terminio poslinkio metodas
TRIS – 2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiolis
XL1 blue – išvestinis *E. coli* kamienas
 β -ME – β -merkaptio etanolis

IVADAS

Molekuliniai šaperonai – tai baltymai, kurių sintezę ląstelėse lemia terminis šokas, poveikis sunkiaisiais metalais ar antibiotikais, tačiau daugelis jų sintetinami ir palankiomis augimui sąlygomis. Šie baltymai randami visuose organizmuose nuo bakterijų iki žinduolių. Šaperonai atlieka keletą funkcijų: padeda polipeptidiniai grandinei susisukti *in vivo*, dalyvauja baltymų monomerams jungiantis į oligomerus, padeda baltymams išsivynioti pernešant juos per membraną ir susivynioti, jau pernešus pro ją, apsaugo baltymus nuo denatūracijos bei dalyvauja juos skaidant. Tai svarbu todėl, kad baltymų neteisingas susivyniojimas ar agregacija gali žmonėms sukelti vėžinius susirgimus, o molekuliniai šaperonai yra tie organizmo baltymai, kurie sumažina pavojingų veiksnių tikimybę. Anomalių struktūrų baltymai, jų sankaupos (atsiradusios dėl ląstelės apsaugos sistemos sukurtų mechanizmų neveiklumo) vaidina pagrindinį vaidmenį Alzheimerio, Parkinsono, Jakobo – Kreutzfeldo, Huntigtono, cistinės fibrozės ligų patogenezėje. Molekuliniai šaperonai gali būti naudingi kuriant naujus vaistus ir vakcinas, nes yra žmonių imuninio atsako bei ligų sukėlėjų sudedamoji dalis (Horvath et al., 2008).

Karščio šoko baltymai dalyvauja ne tik baltymų struktūros susidaryme, bet ir palaikant membranos vientisumą. Senėjimas ar patofiziologinės sąlygos taip pat gali būti susijusios su subtiliais membranos pokyčiais ar defektais, kurie lemia vėžinių ligų atsiradimą. Šiuo metu yra gerai ištirta karščio šoko baltymų, gautų iš melsvabakterių, sąveika su membranomis (Vigh et al., 2007). Manoma, jog jau žinomą prokariotinių ląstelių modelį būtų galima pritaikyti žinduolių ląstelėms (sprendžiant membranų takumo problemą). Dėl šios priežasties labai svarbu nustatyti ar bakterinis Hsp baltymas funkcionuoja taip pat, kaip ir jo eukariotinis homologas.

Darbo tikslas – bakterinio karščio šoko baltymo (HtpG) gryninimas, jungimosi su eukariotinio homologo ligandais įvertinimas izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais.

Darbo uždaviniai:

- 1) Pilno ilgio bakterinio baltymo HtpG F ir jo N – galinio domeno gryninimas;
- 2) HtpG N – galinio domeno sąveikos su sintetiniu ligandu ICPD47 matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos bei terminio poslinkio metodais;
- 3) HtpG baltymų sąveikos su radisikoliu matavimas izoterminio titravimo kalorimetrijos ir terminio poslinkio metodais;
- 4) HtpG ir Hsp90 jungimosi konstantų palyginimas.

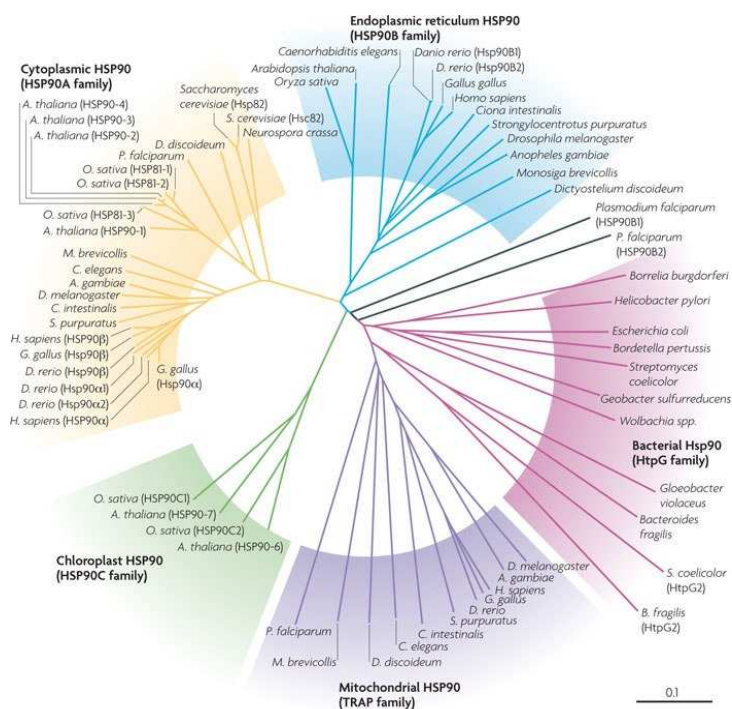
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Hsp90 struktūra

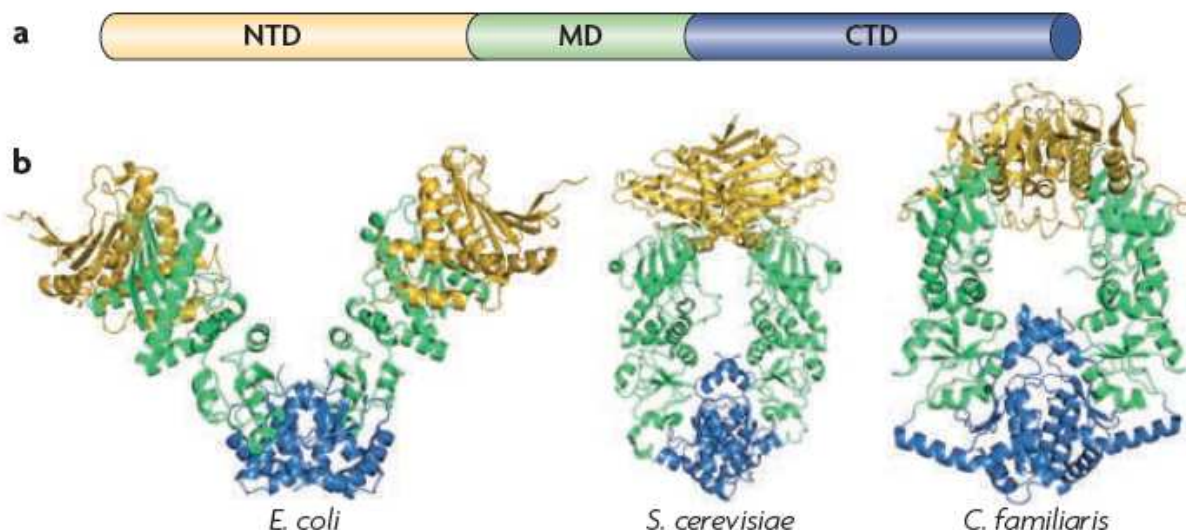
Karščio šoko baltymas 90 (Hsp90 ang. k., heat shock protein) – tai molekulinis šaperonas, priklausantis Hsp baltymų klasei. Jo pagrindinės funkcijos, kaip ir kitų molekulinio šaperono, saugoti ląstelėje ekspresuojamus baltymus nuo netaisyklingo susisukimo, sąveikos su kitais baltymais ar agregacijos po terminio šoko (Buchner, 1999). Virš 100 kinazių ir transkripcijos faktorių, kurie yra svarbūs ląstelių augimui ir išlikimui, veikla taip pat priklauso nuo šio baltymo funkcijų. Po karščio šoko Hsp90 baltymai sudaro 4 – 6 % visų ląstelėje ekspresuojamų baltymų, nors yra sintetinami ir normaliomis augimo sąlygomis. Hsp90 dimerai randami beveik kiekvienoje gyvoje ląstelėje ir yra paplitę visuose organizmuose (Horvath et al., 2008). Karščio šoko baltymo 90 klasę sudaro 5 poklasiai (1 pav.):

- Citoplazminis Hsp90A
- Endoplazminio tinklo Hsp90B
- Chloroplastinis Hsp90C
- Mitochondrinis Hsp90 (TRAP)
- Bakterinis Hsp90 (HtpG)

Hsp90 sudarytas iš trijų domenų: C – galinio, vidurinio ir N – galinio (2 pav.). N – galinis domenas sudarytas iš α – spiralių ir β – klostės, sudarytos iš 7 antilygiagrečių β – grandinių. Žmogaus genome yra du genai, koduojantys homologines indukuotąją bei konstitutyvinę Hsp90 izoformas, α ir β (hHsp90 α , hHsp90 β), funkciniai šių izoformų skirtumai dar mažai žinomi (Taipale et al., 2010). Tačiau nustatyta, jog šaperonų genetiniai pokyčiai dažniausiai yra letaliūs eukariotiniams organizmams.



1 pav. Hsp90 poklasiai (skalė sudaryta remiantis genotipiniu nuotuočiu) (Taipale et al., 2010).

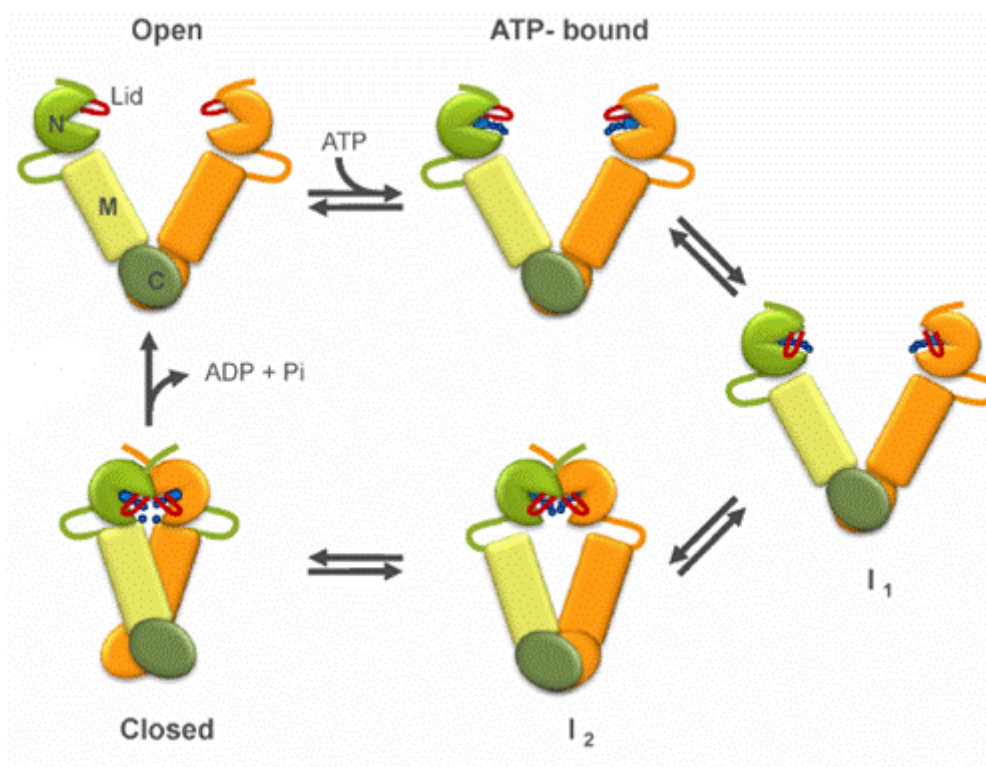


2 pav. Hsp90 domenų struktūra: a) Karščio šoko baltymo 90 struktūra susidedanti iš N – galinio (NTD), vidurinio (MD) ir C – galinio (CTD) domenų. b) Pilno ilgio Hsp90 struktūra gauto iš *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ir *Canis familiaris*. Domenų spalvos atitinka a dalies spalvas (Taipale et al., 2010).

Šaperono struktūros ir savybių tyrinėjimą paskatino tai, jog jis turėjo svarbią įtaką evoliucijos procese, nors tai seniau ir nebuvo pripažinta, manoma, kad būtent karščio šoko baltymas 90 lėmė didelę organizmų populiacijos genetinę įvairovę. Hsp90 funkcijų suvokimas aktualus dar ir dėl to, jog šie šaperonai gausiai ekspresuojami vėžinėse ląstelėse, o jų aktyvumas susijęs su onkogeninių baltymų, skatinančių vėžinių ląstelių dauginimąsi ir išlikimą, brendimu organizme.

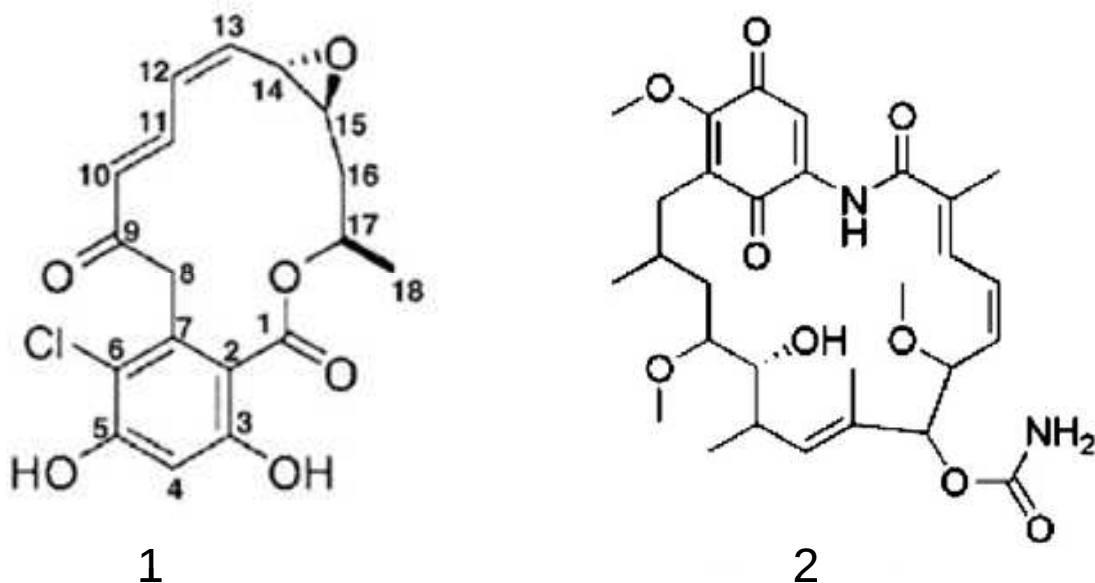
1.2 Hsp90 sąveika su ligandais ir jų svarba

Šiuo metu yra tyrinėjama apie 200 fizinių ir apie 500 genetinių ar cheminių – genetinių sąveikų tarp Hsp90 ir kitų baltymų. Kalbant apie vėžinių susirgimų gydymą, Hsp90 svarbus dėl to, jog, slopinant vienintelį baltymą, atsiranda galimybė sustabdyti onkogeninių ląstelių dauginimąsi. Manoma, jog išanalizavus šio molekulinio šaperono sąveikas su slopikliais būtų galima jį panaudoti transgeninio vėžio ir kseno transplantavimo modeliuose. Hsp90 ekspresuojami sergant krūties, kasos vėžiu, leukemija, sisteminė raudonąja vilklige ir kitais navikiniais susirgimais (Workman et al., 2007). Tarp Hsp90 „klientų“ yra tokie onkogenai: Bcr-Abl, Raf1, ErbB2, AKT, ir p53 mutantas. Šaperono N – galinis domenas pasižymi ATP-aziniu aktyvumu ir košaperoninų jungimusi (Whitesell, Lindquist, 2005). Dvi ATP molekulės jungiasi prie N – domenuose esančių jungimosi kišenių. Prisijungus ATP "dangtį" sudaranti kilpa pasisuka maždaug 120 laipsnių ir uždaro ATP jungimosi kišenę. Tai paskatina N galinių domenų asociaciją ir tolesnius konformacinius pokyčius, po kurių Hsp90 pereina į uždarytą konformaciją. Tuomet įvyksta ATP hidrolizė ir Hsp90 grįžta į atidarytą konformaciją, jog ciklą būtų galima kartoti iš naujo (3 pav.).



3 pav. Hsp90 ATP hidrolizės ciklas (Hahn, 2009).

Prie specifinio ATP jungimosi centro gali jungtis struktūriškai nepanašūs natūralūs ligandai: geldanamicinas ir radisikolis (4 pav.), pusiau sintetiniai ar sintetiniai junginiai (Solit, Chiosis, 2008). Tarp natūralių slopiklių minėti dar ir šie: herbimicinas, novobiocinas, klorobiozinas ir kt. Šios medžiagos, sąveikaudamos stipriau nei natūralūs nukleotidai, sustabdo ATP jungimąsi ir tokiu būdu keičia natūralias baltymo funkcijas navikinėse ląstelėse. Būtent geldanamicino atradimas pakeitė iki tol vyravusią nuomonę, jog Hsp90 inhibitorių nebus galima panaudoti terapeutiniais tikslais. Iš pradžių buvo manoma, jog geldanamicinas slopina v-SRC ir tik vėliau nustatyta, jog iš tikrųjų jis yra Hsp90 slopiklis.



4 pav. Natūralių Hsp90 ligandų struktūrinės formulės: 1 – radisikolis, 2 – geldanamicinas (Guarnieri et al., 2008).

Reikia pažymėti ir tai, kad radisikolis bei geldanamicinas turi ir farmakologinių apribojimų: tokių kaip mažas tirpumas, ribotas stabilumas *in vivo*, o tai stabdo jų panaudojimą antivėžinių vaistų formulavime. Radisikolis yra stipriausiai sąveikaujantis su Hsp90 ligandas, bet klinikiniais tikslais nenaudojamas dėl metabolinio nestabilumo (Moulin et al., 2004). Kaip Hsp90 slopiklis 17 – alilamino – 17 – demetoksigeldanamicinas (17 – AAG) klinikiniuose tyrimuose pradėtas naudoti nuo 1999 metų (Hostein et al., 2001). Jo dėka sustabdomas receptorių, kinazių ir transkripcijos faktorių, dalyvaujančių ontogenezeje, aktyvumas. Tai geldanamicino analogas, kuris už savo pirmtaką yra mažiau toksiškas ir stabilesnis, tačiau su Hsp90 sąveikauja silpniau (Clevenger, Blagg, 2004). Nustatyta, jog tik citotoksiniai Hsp90 inhibitoriai šiuo metu yra vieninteliai chemoterapiniai preparatai, kurie turi įtakos visiems šešiams vėžiniams požymiams. Hsp90 inhibitorių paieška svarbi tuo, jog suteikia naujų galimybių terapinei intervencijai bei padeda atsakyti į fundamentalius biologinius klausimus.

1.3 Bakterinio Hsp90 apžvalga

HtpG (aukštos temperatūros baltymas G) – tai prokariotinis Hsp90 homologas. Jis egzistuoja visose bakterijų rūšyse išskyrus *Lactobacillales* ir *Mollicutes*, taip pat nerastas arhėjose. HtpG koduojantis genas, kaip ir daugelis bakterinių genų turi tik vieną egzoną. Teigiama, kad šio baltymo seka visuose bakteriniuose organizmuose yra labai skirtinga. Šaperonai yra 588–681 a.r. ilgio ir neturi signalinių peptidų (Boshoff et al., 2004). Vis dėlto nustatyta, jog bakterinio baltymo fizicheminės, struktūrinės savybės yra panašios į jo eukariotinio atitikmens Hsp90. Kaip ir Hsp90 HtpG sudaro trys domenai (C – galinis, vidurinis ir N – galinis). Tačiau bakterinis

šaperonas priešingai nei jo eukariotinis atitikmuo nėra sintetinamas normaliomis augimo sąlygomis ir net po terminio šoko heterotrofinėse bakterijose nėra randamas. Šiuo metu vienintelis žinomas pavyzdys, kai HtpG atlieka svarbų vaidmenį fotosintetinančiuose ir prokariotiniuose mikroorganizmuose yra melsvabakterės (cianobakterijos). Šis baltymas jų ląstelėse atsakingas už terminę toleranciją, aklimatizaciją šaltomis sąlygomis ir saugo nuo oksidacinio streso (Hossain, Nakamoto, 2002). Melsvabakterės paplitusios vandenyje ir dirvožemyje, tai aerobinės, fotosintetinančios bakterijos, kurios filogenetiškai ir fiziologiškai susijusios su chloroplastais fotosintetinančiuose eukariotuose. Dar vienas skirtumas tarp Hsp90 ir HtpG, jog pastarajam nėra nustatyti jokie kofaktoriai priešingai nei jo homologui (Tanaka, Nakamoto, 1999). Tačiau tiek Hsp90 tiek HtpG oligomerizaciją bei degradaciją įtakoja Mn^{+2} ir Mg^{+2} jonai. HtpG geno mutacijos (delecija ar insercija), jei baltymas išskirtas iš *E. Coli* kamieno, nėra letalios stresinėmis ar nestresinėmis augimo sąlygomis. Šiuo metu yra ieškomi slopikliai HtpG gautam iš melsvabakterių *Synechococcus elongatus* PCC 7942 (Buchner, 2010).

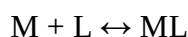
1.4 HtpG sąveika su ligandais

Dabar yra žinoma tik keletas junginių, kurie sąveikauja su bakteriniu Hsp90. Nakamoto su bendradarbiais naudodami fotoafiniškumo – kryžminio jungimo ir paviršiaus plazmoninio rezonanso metodus nustatė, jog HtpG fiziškai sąveikauja su kolistinu, kolistinu A ir polimiksinu B (cikliniais lipopetidiniais antibiotikais). Slopikliai su baltymu jungiasi jo N – galiniame ir viduriniame domenuose. Tačiau su HtpG N – galiniu domenu inhibitoriai jungiasi ne ATP jungimosi centre. Be jau minėtų slopiklių literatūroje minima ir kolistino sulfatinė druska (CSS), sudaryta iš kolistino A ir kolistino B mišinio (santykis 3:7), kuri naudojama klinikiniais tikslais. CSS su HtpG jungiasi per hidrofobines jungtis. Ji slopina baltymo šaperoninį aktyvumą, taip pat lemia paviršiaus hidrofobiškumą ir indukuoja HtpG oligomerizaciją. Paviršiaus hidrofobiškumas buvo įvertintas matuojant bis – ANS fluorescencijos intensyvumą. Taip pat, nustatyta, kad kolistino sulfatinė druska daug labiau slopina HtpG N – domeną, negu pilno ilgio HtpG, o su viduriniu baltymo domenu nesąveikauja. Tarp HtpG slopiklių minimi ir gramicidas S bei ciklodekapeptidas. Manoma, jog prokariotuose, kaip ir eukariotuose yra tas pats ATP mechanizmas, tačiau skirtingą slopiklių prisijungimą gali lemti N – galo domeno nevienodas stabilumas, kuris gali priklausyti nuo aplinkos veiksnių, tokių kaip pH. Tiriant ar kolistinas, kolistinas A ir polimiksinas B jungiasi prie ATP aktyviojo centro, atliktas eksperimentas ir su radisikoliu. Pastarasis vienintelis visiškai inhibavo HtpG aktyvumą, tačiau detalesni tyrimai su juo neatlikti (Minagawa et al., 2011).

Be jau minėtų slopiklių paieškos Nakamoto taip pat nustatė, jog HtpG dalyvauja atliekant tetrapirolo biosintezę. Literatūroje, teigiama, kad bakterinis Hsp90 sąveikauja su fikobilisomų polipeptidinėmis grandinėmis bei malato dehidrogenazės monomeru, juos stabilizuodamas ir slopindamas agregaciją, kai reakcijos molinis santykis yra 1:1. Fikobilisomų polipeptidinės grandinės ir malato dehidrogenazės monomeras yra vieni iš HtpG substratų *in vivo* (Sato et al., 2010).

1.5 Baltymų ir ligandų sąveikos tyrimo metodai

Svarbu yra suprasti molekulinis baltymų ir ligandų specifiškumo ir atpažinimo reiškinius. Baltymai gali specifiškai atpažinti ir grįžtamai prisijungti bet kurias kitas molekules – mažamolekulinius ligandus (jonus, lipidus, angliavandenius ir t.t.), makromolekules (baltymus, DNR) ar net makromolekulių kompleksus. Tipišką ligando jungimosi reakciją su baltymu galima užrašyti taip:



Baltymų natyvios struktūros stabilumą užtikrina labai didelis skaičius silpnų, nekovalentinių ryšių, kurių ryšio energija yra mažesnė, negu kovalentinio ryšio, tačiau didelis skaičius ryšių lemia molekulės stabilumą. Termodinaminių parametrų matavimas įvertinant baltymo ir ligando sąveiką yra svarbus, nes biomolekulių grįžtamoji nekovalentinė sąveika apima nekovalentinių jungčių persikirstymą (Ladbury et al., 2004).

Baltymo jungimosi su ligandu termodinamikai tirti taikomi fluorescenciniai, liuminescenciniai, spektroskopiniai, masių spektrometrijos, magnetinio rezonanso, cirkuliarinio dichroizmo, paviršiaus plazmonų rezonanso, kapiliarinės elektrofozės, įvairūs kalorimetrijos ir kt. metodai.

1.6 Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas

Iš visų termodinaminių parametrų lengviausia eksperimentiškai pamatuoti ligando jungimosi entalpiją, t.y. entalpijos pokytį, kuris nustatomas baltymui pereinant iš laisvos (neprijungtos) į su ligandu susijungusią būseną. Šiuo metu populiariausias ir lengviausiai atliekamas yra izoterminio titravimo kalorimetrijos metodas, kuriuo tiesiogiai ir pakankamai tiksliai matuojama beveik bet kurio bimolekulinio proceso sąveikos entalpija. Priklausomai nuo eksperimento sąlygų gali būti nustatoma ir jungimosi konstanta bei reakcijos stochiometrija (Baranauskiene 2009, Jelesarov 1999, Matulis 2008, Perozzo 2004).

ITK eksperimento metu ligandas titruojamas į kiuvetėje esantį baltymo tirpalą (arba atvirkščiai). Po kiekvienos ligando (arba baltymo) injekcijos matuojamas išsiskyrusios arba sugertos šilumos pokytis, kuris kiekvienos injekcijos metu yra tiesiogiai proporcingas bendram susidariusio komplekso kiekiui. Tai išreiškiama:

$$q = V_0 \Delta H \Delta[ML];$$

kur q yra šilumos kiekis, priklausantis nuo susidariusio komplekso koncentracijos $\Delta[ML]$, ΔH – jungimosi molinė entalpija, o V_0 – mėginio kiuvetės tūris.

ITK eksperimentuose kiekvienos pridėtos ligando injekcijos sukeltas šilumos pokytis priklauso nuo reakcijos tūrio, koncentracijų, jungimosi entalpijos pokyčio, jungimosi konstantos, skiedimosi šilumos, stochiometrijos ir nuo prieš tai pridėto ligando kiekio. Po kiekvienos injekcijos sumažėja neužimtų ligando prisijungimo centrų ir todėl mažėja šilumos pokytis. Visas šilumos kiekis po i -tosios injekcijos:

$$Q = V_0 \Delta H \sum \Delta[ML]_i = V_0 \Delta H [ML]_i ;$$

kur $[ML]_i$ yra visa komplekso koncentracija po i -tosios injekcijos.

Fundamentalus supratimas apie ligando ir makromolekulės sąveiką reikalauja supratimo apie jungimosi proceso pusiausvyros konstantą (K_b) bei jungimosi stoichiometriją n , kiek ligandų yra prisijungę prie molekulės, kai pasiekiamas išotininimas. Jungimosi konstanta lygi:

$$K_b = \frac{[ML]}{[M][L]} ;$$

kur $[M]$ – makromolekulės, $[L]$ – ligando, $[ML]$ – komplekso pusiausvyrinės koncentracijos. Jungimosi konstanta yra atvirkščiai proporcinga slopiklio disociacijos pusiausvyros konstantai:

$$K_d = \frac{1}{K_b}$$

Atliekant ITK eksperimentą, baltymas (arba ligandas) titruojamas 20-50 ligando (arba baltymo) injekcijų ir suplanuojamas taip, kad jungimosi reakcijos vyktų tik pusės injekcijų metu. To galima pasiekti, jei eksperimentą planuosime taip, jog jo pabaigoje ligando koncentracija bus dvigubai didesnė negu pradinė baltymo koncentracija. Integruodami gautų pikų plotus gauname išsiskyrusios arba sugertos šilumos pokytį (Matulis, 2008).

1.7 Terminio poslinkio metodas

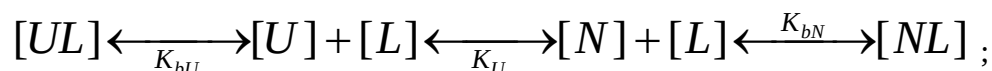
Terminio poslinkio metodas yra universalus, biofizikinis metodas, nepriklausantis nuo konkrečios baltyminės sistemos, todėl jį galima naudoti nežinomam baltymui tirti. Nors ITK metodas vienintelis, kuris pateikia tikslius ΔH duomenis, tačiau atliekant eksperimentus reikia pakankamai didelių baltymo (dažniausiai daugiau nei 0,1 mg) ir ligando kiekių, taip pat labai svarbu, jog baltymas būtų gerai išgrynintas. Visas šias problemas galima išspęsti taikant TP metodą. Jis patogus dar ir tuo, jog vienu metu galima tirti 72 ar net 384 mėginius, o procesas trunka ne ilgiau nei 2 valandas. Jo esmė – fluorescencinis baltymo temperatūrinis stabilumo tyrimas, esant skirtingoms baltymo ir ligando koncentracijoms. Į tiriamąjį baltymo tirpalą reikia pridėti dažo, dažniausiai tai ANS (8-anilino-1-naftaleno sulfonatas), kurio fluorescencija kinta, baltymui išsivyniojant. ANS anijonai prie baltymų gali jungtis aplinkoje, kurioje nėra arba beveik nėra vandens (intensyvi ANS fluorescencija) ir tokioje aplinkoje, kur prisijungusius ANS anijonus supa vanduo, kuris gesina fluorescenciją, todėl ANS fluorescuoja labai silpnai. Aplinkos dielektrinė skvarba, įtakoja ANS fluorescenciją, todėl hidrofobinėje terpėje ANS fluorescuoja stipriau, nei vandenyje. Gryname vandenyje fluorescencija yra šimtus kartų mažesnė negu gryname DMSO. Nors pastarasis nėra hidrofobinis tirpiklis, tačiau jis dažniausiai negesina fluorescencijos ir jame fluoroforai elgiasi kaip organinėje aplinkoje (Matulis, Lovrien 1998).

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

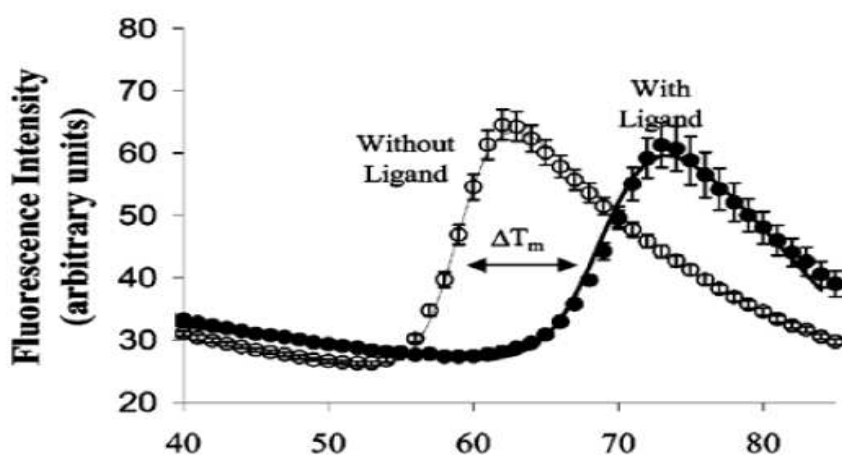
Baltymo molekulė, stengdamasi neutralizuoti sutrikdytą krūvių pusiausvyrą, iš hidrolizuoto vandens prisijungia protonų, bet nepaisant to, baltymas lieka įkrautas neigiamai, nes vandenilio jonų prisijungia dvigubai mažiau nei ANS anijonų. Sumažėjus elektrostatiniai stūmos jėgai tarp teigiamų krūvių, molekulė susitraukia (Matulis, Baumann et al. 1999).

Tiriant baltymų temperatūrinį stabilumą, kai temperatūra keliama nuolatiniu per 1 minutę greičiu, galima įvertinti ligando giminingumą bei poveikį baltymo stabilumui. Didinant temperatūrą baltymas denatūruoja, tačiau baltymą gali stabilizuoti prie jo natyvios būsenos

besijungiantis ligandas. Jei ligandas stipriau jungiasi prie išsivyniojusio baltymo, tuomet baltymas destabilizuojamas. Šias jungimosi reakcijas galima pavaizduoti taip:



kur $[UL]$ – išsivyniojusio baltymo-ligando komplekso koncentracija, $[U]$ – laisvo išsivyniojusio baltymo koncentracija, $[L]$ – laisvo ligando koncentracija, $[N]$ – laisvo natyvaus baltymo koncentracija ir $[NL]$ – natyvaus baltymo-ligando komplekso koncentracija.



5 pav. Dažo reporterio fluorescencijos priklausomybė nuo temperatūros, tirpale esant baltymo (○) ir baltymo su ligandu (●) (Matulis et al., 2005).

Iš išsivyniojimo tranzicijos galima nustatyti baltymo lydymosi temperatūrą (T_m), kuriai esant baltymo išsivyniojimo grįžtamoji reakcija yra pusiausvyros būsenoje, o natyvaus ir išsisukusio baltymo struktūrų laisvosios energijos yra lygios (5 pav.). Metodus naudojamas ne tik baltymo ir ligando jungimosi konstantų nustatymui, jo dėka galima įvertinti, kokiomis sąlygomis reikia laikyti konkretų baltymą, kokio pH reikia jį saugoti, kokių stabilizatorių reikėtų pridėti, kad baltymas išliktų stabilus norimą laiko tarpą (Matulis, 2008).

2. MEDŽIAGOS, METODAI, APARATŪRA

2.1 Aparatūra, medžiagos, rinkiniai, terpės, buferiniai tirpalai

Aparatūra

Darbe naudota aparatūra:

- o analitinės svarstyklės;
- o autoklavas;
- o elektrinė plytelė;
- o fluorimetras „R-Corbet“;
- o gryninimo sistema „AKTA explorer“;
- o kalorimetras „Microcal VP-ITC“;
- o laminarinis boksas;
- o magnetinė maišyklė „BIOSAN“;
- o maišyklė „BIOSAN“;
- o pH-metras „LaboChema“;
- o poliakrilamidinio gelio elektroforezės aparatas „BIO-RAD“ ir jo priedai;
- o purtyklė „BIOSAN Multi-vortex V-32“;
- o spektrofotometras „Jenway 6305“;
- o spektrofotometras „NanoDrop“;
- o šaldoma centrifuga „Beckmann“ (JA – 20 ir JA – 10 rotoriai);
- o šaldoma mikrocentrifuga „Eppendorf Centrifuge 5415 R“;
- o termostatas „Eppendorf ThermoStat plus“;
- o termostatuojama purtyklė „LaboChema“;
- o ultragarso šaltinis „Bandelin Sonopuls“ (MS 73 antgalis).

Medžiagos ir rinkiniai

Naudotos medžiagos ir rinkiniai pateikti pagal gamintoją:

- o AG – *Scientific. Inc.*: Radisikolis
- o BioRad: β-merkaptio etanolis, glicinas, TEMED;
- o Boehringer Mannheim: ditiotrietolis;
- o Fermentas: IPTG, molekulių masių standartai (Protein Molecular Weight Marker SM0431), GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit, GeneJETTM ;

- o *Fluka*: Coomassie Brilliant Blue R-250, N,N'-metilen-Bisakrilamidas, Na_2PO_4 , NaH_2PO_4 ;
- o *GE Healthcare*: Q-Sepharose Fast Flow, 6BCL – IDA Ni sepharose;
- o *Labochema*: urėja;
- o *Roche*: PMSF;
- o *Roth*: akrilamidas, amonio persulfatas, ampicilinas, DMSO, LB medium (Luria/Miller) terpė;
- o *Sigma*: EDTA, TRIS.

Bakterijų kamienai:

E. coli XL1-blue (Startagene) bakterijų kamienas (endA1 gyrA96 nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' [::Tn10 proAB⁺ lacI^q (lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)) naudotas plazmidės DNR išskyrimui.

Baltymų ekspresijai naudotas bakterijų kamienas *E. coli* BL21 (DE3), kuris turi tokias genetines charakteristikas: *E. coli*, B, F⁻, dcm, ompT, hsdS_B(r_B⁻, m_B⁻), galλ(DE3)

Genetiniai konstruktai:

pET – 21a/HtpG N ir pET – 21d/HtpG F plazmidės sukonstruotos Saitamos biochemijos ir molekulinės biologijos departamente, Japonija (Hitoshi Nakamoto).

Terpės ir tirpalai

Terpės:

Agarizuota LB (Miller) terpė: 10 g NaCl, 10 g triptono, 5 g mielių ekstrakto ir 15 g agaro ištirpinama viename litre dejonizuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 20 min 121°C temperatūroje.

LB medium (Luria/Miller) mitybinė terpė (sudėtis: 10 g/L triptono, 5 g/L mielių ekstrakto ir 10 g/L NaCl). 25 g terpės ištirpinami 1 litre distiliuoto vandens, pH 7. Autoklavuojama 5 min 121°C temperatūroje.

S.O.C. mitybinė terpė: 2 g triptono, 0,5 g mielių ekstrakto, 10 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM gliukozės. Triptonas, mielių ekstraktas, NaCl ir KCl tirpinami 97 ml dejonizuoto vandens. Autoklavuojama 20 min 121°C temperatūroje. Ataušinus iki kambario temperatūros, pridedama Mg druskų ir gliukozės, pH 7.

Buferiniai tirpalai ir tirpalai:

Akrilamidas/Bis-akrilamidas 30 %: 29,2 g akrilamido ir 0,8 g N,N'-metilen-bisakrilamido ištirpinama nedideliame kiekyje dejonizuoto vandens, skiedžiama iki 100 ml. Laikomas tamsiame inde 4°C temperatūroje ne ilgiau nei 30 dienų.

APS 10 %: 100 mg amonio persulfato tirpalo tirpinama 1 ml dejonizuoto vandens. Ampicilino tirpalas: 1 g ampicilino tirpinamas 10 ml dejonizuoto vandens. Tirpalo koncentracija 100 µg/µl.

Bromfenolio mëlis: 0,05 %.

Elektroforezės buferinis tirpalas (10 kartų koncentruotas): 25 mM TRIS, 1,9 M glicino ir 35 mM NDS, pH 8,3 – 8,6 (nekoreguojamas).

IPTG tirpalas: 5 g IPTG tirpinama 21 ml dejonizuoto vandens. Tirpalo koncentracija 1 M.

Kumasi R-250 dažo tirpalas: 0,62 g R-250 ištirpinama 113 ml 95 % etanolio, pridedama 23 ml ledinės acto rūgšties. Praskiedžiama dejonizuotu vandeniu iki 250 ml.

Pavyzdžio buferinis tirpalas (6 kartus koncentruotas): 350 µl 0,5 M TRIS, 50 mg NDS, 46 mg DTT, 150 µl glicerolio, pH 6,8.

1,5 M TRIS, pH 8,8: 18,15 g tris (hidroksimetil) aminometano ištirpinama 70 ml vandens. Tirpalo pH koreguojamas praskiesta (3 kartus) druskos rūgštimi iki 8,8. Praskiedžiama matavimo kolboje iki 100 ml.

0,5 M TRIS, pH 6,8: 6,0 g tris (hidroksimetil) aminometano ištirpinami 70 ml vandens. Tirpalo pH koreguojamas praskiesta (3 kartus) druskos rūgštimi iki 6,8. Praskiedžiama matavimo kolboje iki 100 ml.

2.2 Metodai

Baltymo sekos nustatymas

Transformacija į kompetentines (*E. coli* BL21 (DE3) arba XL1-blue) ląsteles:

1. Paruoštos Petri lėkštelės su agarizuota LB terpe ir ampicilinu (100 µg/ml) šildomos 37°C temperatūroje apie 1 val.
2. Į 100 µl kompetentinių ląstelių įdedama 1 µL plazmidės (1µg/µl plazmidės).
3. Transformacijos mišinys inkubuojamas 30 min. ledo vonioje.
4. Vykdomas temperatūrinis šokas 90 s 42°C temperatūroje, tuomet mišinys greitai perkeliamas į ledo vonią ir ten laikomas 2 min.
5. Į reakcijos mišinį pridedama 400 µL skystos S.O.C. terpės ir auginama 45 min 37°C temperatūroje termostatuojamoje purtyklėje 220 aps./min.

6. Reikiamas transformuotų kompetentinių ląstelių tūris steriliai užsėjamas ant pašildytos Petri lėkštelės. Lėkštelė inkubuojama termostate 37°C temperatūroje 16 val.

Plazmidinės DNR gryninimas sekoskaitai nustatyti:

Plazmidinės DNR išskyrimui iš *E. coli* XL1 blue kamieno bakterijų biomasės naudojamas „GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit“ rinkinys. Gryninama pagal standartinį protokolą. DNR koncentracija nustatoma „NanoDrop“ spektrofotometru.

Ekspresija, tirpumo patikrinimas ir gryninimas

HtpG N ir HtpG F ekspresija *E. coli* bakterijų BL21 (DE3) kamienne:

1. LB terpė su 50 g/ml ampicilinu užsėjama viena kolonija iš transformuotos Petri lėkštelės ir auginama per naktį (16 val.) 37°C temperatūroje purtant 250 aps./min.
2. Naktinė kultūra persėjama į naują terpę su ampicilinu (50 g/ml) skiedžiant santykiu 1:50.
3. Auginama termostatuojamoje purtyklėje (250 aps./min.) 37°C temperatūroje, kol optinis tankis ($\lambda = 600$ nm) pasiekia ~0,5.
4. Prieš indukciją paruošiamas kontrolinis mėginys. Paimama 300 μ l ląstelių suspensijos, nucentrifuguojama, supernatantas nupilamas, biomasė tirpinama 30 μ l pavyzdžio buferiniame tirpale, kaitinama 5 min. 100°C temperatūroje.
5. Indukuojama pridedant 1 mM IPTG. HtpG N biomasė auginama 3 val. 18°C temperatūroje, o HtpG F biomasė – 20 val., tokioje pačioje temperatūroje.
6. Paruošiamas visų ląstelių baltymų mėginys skiedžiant ląstelių suspensiją, kad jos optinis tankis būtų lygus kontrolinio ląstelių baltymų mėginio optiniam tankiui. Mėginys centrifuguojamas 1 min. 10000 aps./min. greičiu, nuosėdos tirpinamos 30 μ l pavyzdžio buferinio tirpalo ir pakaitinamas 5 min 100 °C temperatūroje.
7. Bakterijų kultūra centrifuguojama 20 min. 6000 aps./min. greičiu, supernatantas pašalinamas. Biomasė laikoma -20°C temperatūroje.
8. Mėginiai (prieš indukciją ir po indukcijos) analizuojami NDS-PAAG būdu.

Baltymų elektroforezė:

Elektroforezė 12 proc. NDS – PAAG , denatūruojant baltymo molekules atliekama Lemlio (Laemmli 1970 m.) metodu. Elektroforezei ruošiami geliai:

Apatinis frakcionuojantis 12% gelis:	Viršutinis koncentruojantis 4% gelis:
30% Akrilamidas 2 ml	30% Akrilamidas 0,335 ml
1,5 M TRIS, pH 8,8 1,25 ml	0,5 M TRIS, pH 6,8 0,625 ml
10 % SDS 0,05 ml	10 % SDS 0,025 ml
H ₂ O 1,585 ml	H ₂ O 1,5 ml
10 % APS 0,025 ml	10 % APS 0,00125 ml
TEMED 0,0025 ml	TEMED 0,0025 ml

Paruoštas frakcionuojantis gelis pilamas tarp elektroforezės plokštelių (2 stiklų) ir užsluoksniuojamas vandeniu. Poliarizacijos reakcija kambario temperatūroje vyksta apie 30 minučių. Geliui sustingus, vanduo nusauginamas filtriniu popieriumi ir užpilamas koncentruojantis gelis bei įstatomos „šukutės“. Gelis taip pat stingsta apie 30 min. Viršutiniam geliui sustingus, plokštelės su geliu statomos į elektroforezės aparatą, išimamos „šukutės“. Elektroforezės aparatas užpildomas 1x elektroforezės buferiniu tirpalu. Į susidariusius gelio takelius įvedami pavyzdžiai. Elektroforezė vykdoma 20 mA srovėje, kol dažo frontas pasiekia frakcionuojančio gelio apačią. Gelis dažomas 20 minučių Kumasi dažu.

Tirpių ir netirpių baltymų nustatymas:

1. 0,5 g bakterijų biomasės tirpinama 6 ml ardymo buferiniame tirpale (25 mM TRIS pH 7,0, 1 mM β-ME).
2. Įvedamas 1 mM PMSF ir maišoma 1 val. 4°C temperatūroje.
3. Ardoma ultragarsu 10min. kas 60 s darant 60 s pertrauką esant 70 % amplitudei.
4. Lizatas centrifuguojamas 20 min. 20000 aps./min. greičiu 4°C temperatūroje.
5. Matuojama supernatanto koncentracija Bradfordo metodu.
6. Nuosėdos tirpinamos 2 ml 8 M urėjos bei matuojama jų koncentracija Bradfordo metodu.
7. Ruošiami tirpios ir netirpios baltymų frakcijos mėginiai: į 30 μL baltymo tirpalo pilami 7,5 μL pavyzdžio buferio (6 kartus koncentruoto), mėginiai kaitinami 5 min. 100°C temperatūroje.
8. Tirpi ir netirpi baltymų frakcijos analizuojamos NDS-PAAG būdu.

HtpG N ir HtpG F baltymų gryninimas:

HtpG N baltymo gryninimas:

Biomassė (9,8 g) tirpinama ardymo buferiniame tirpale (25 mM Tris, turinčio 0,1 M NaCl ir 20 mM imidazolo, pH 8,0, pridėdant 1mM β-ME, 1mM PMSF) maišant 1 val., 4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu, ledo vonelėje, 10min., kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70% amplitudei. Centrifuguojama 20 min. 6000 aps./min. greičiu.

Supernatantas leidžiamas per 6B – CL IDA chromatografijos kolonėlę (10 ml), su imobilizuotais Ni^{+2} jonais, naudojant 25 mM Tris buferinį tirpalą, kuriame yra 0,1M NaCl, 20mM imidazolo ir 1 mM β -merkpto etanolio (β -ME) pH 8,5. Tekėjimo greitis – 5 ml/min. Chromatografijos frakcijos tikrinamos NDS – PAAG, remiantis elektroforegrama bei chromatograma sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas 18 val. dializuojamas 25mM Tris buferiniame tirpale pH 7,5, 1M NaCl ir 1 mM β -ME.

Norint gauti grynesnį baltymą, 34 ml baltymo tirpalo leidžiama per Q – Sepharose chromatografijos kolonėlę, kuri pakrauta 10 ml sorbento, naudojant 25 mM Tris, turintį 1 mM β -merkpto etanolio pH 7,5 buferinį tirpalą. Baltymo desorbcijai naudojamas linijinis NaCl gradientas, pradedant 0 M ir baigiant 1 M per 10 kolonėlės tūrių. Frakcijos tikrinamos NDS – PAAG(sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos). Baltymo tirpalas dializuojamas 25mM Tris buferiniame tirpale pH 7,5, 50mM NaCl ir 0,1 mM DTT. Gauta 78 mg tikslinio baltymo. Saugoma -80C temperatūroje.

HtpG F baltymo gryninimas:

18,16 g biomasės tirpinama ardymo buferiniame tirpale (25mM Tris, 0,1M NaCl, 20mM imidazolo, pH 8,0, pridedant 3mM β -ME, 1mM PMSF) maišant 1 val., 4°C temperatūroje. Ardoma ultragarsu, ledo vonelėje, 10min., kas 60 s darant 60 s pertrauką, esant 70% amplitudei. Centrifuguojama 20 min. 6000 aps./min. greičiu.

Supernatantas leidžiamas per 6B – CL IDA chromatografijos kolonėlę (15 ml) , su imobilizuotais Ni^{+2} jonais naudojant 25 mM Tris buferinį tirpalą, kuriame yra 0,1M NaCl, 20 mM imidazolo ir 1 mM β -merkpto etanolio pH 8,5, Tekėjimo greitis – 5 ml/min. Baltymas desorbuojamas didinant konkurentinio ligando (imidazolo) koncentraciją: nuo 0,02 M iki 0,5 M. Chromatografijos frakcijos tikrinamos NDS-PAAG ir sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas 18 val. dializuojamas 25 mM Tris buferiniame tirpale pH 8,0, 1 M NaCl ir 1 mM β -ME.

23 ml baltymo tirpalo leidžiama per Q-Sepharose chromatografijos kolonėlę (15 ml), naudojant 25 mM Tris, turintį 1 mM β -merkpto etanolio pH 7,5 buferinį tirpalą. Baltymo desorbcijai naudojamas linijinis NaCl gradientas per 10 kolonėlės tūrių. Frakcijos tikrinamos NDS –PAAG ir sujungiamos tikslinį baltymą turinčios frakcijos. Baltymo tirpalas dializuojamas 25mM Tris buferiniame tirpale pH 7,0, 50mM NaCl, 5mM DTT ir 3mM β -ME. Saugoma -80C temperatūroje. Tikslinio baltymo gauta 138 mg.

HtpG N ir HtpG F jungimosi su slopikliais matavimas

ITK matavimai:

Eksperimentas atliekamas Microcal VP-ITC kalorimetru. Kiuvetės tūris 1,4ml, švirkšto tūris - 250µl. Ruošiami du mėginiai po 2 ml: baltymo tirpalas, kuris pilamas į kiuvetę, ir slopiklio tirpalas, kuriuo užpildomas švirkštas.

Naudojamas baltymo ir ligando koncentracijų santykis 1:10 ir 3 µM bei 6 µM koncentracijos baltymo tirpalas. Toks koncentracijų santykis rekomenduojamas tam, kad būtų galima išmatuoti ir jungimosi ir skiedimosi šilumas, t.y. visi baltymo aktyvieji centrai turi būti įsotinami ligandu maždaug eksperimento viduryje. Baltymo ir ligando tirpalus sudaro vienodos pagalbinių medžiagų koncentracijos: 50 mM fosfatinio arba 50 mM TRIS buferinio tirpalo, 100 mM NaCl ir 2% DMSO.

Paruoštais mėginiais užpildoma kiuvetė ir švirkštas. Švirkštas įmerkiamas į kiuvetę. Prieš pradedant eksperimentą palaukiama, kol nusistovės tiesi bazinė linija. Eksperimentuose taikytas maišymo greitis 260 aps./min., iš viso – 25-30 injekcijos, vienos injekcijos tūris 10 µl , o tarpas tarp injekcijų – 200 s. Eksperimentai atlikti 25°C temperatūroje.

TPM matavimai:

Ligandas pirmiausia ištirpinamas DMSO, tuomet skiedžiamas iki norimos koncentracijos, tačiau DMSO galutiniame tirpale (galutinėje plokštelėje, išpilsčius su baltymu) neturi būti didesnė nei 2%. Baltymo ir ligando tirpalai ruošiami atskirai. Ruošiamas du kartus koncentruotas baltymo tirpalas (20 µM) fosfatiname buferiniame tirpale, turinčiame 100 µM ANS ir 100 µM NaCl. Ruošiamas du kartus koncentruoti 400 µM, 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM ir 0 µM koncentracijų ligandų tirpalai, turintys 4 % DMSO. Į mėgintuvėlius išpilstoma po 10 µL du kartus koncentruotų baltymo ir tam tikros koncentracijos ligando tirpalų. Gauti 10 µM baltymo tirpalai skirtingose pH, turintys 200 µM, 100 µM, 50 µM, 25 µM, 12,5 µM, 6,25 µM, 3,13 µM ir 0 µM ligando. Matavimai atliekami R-Corbert fluorimetru, keliant temperatūrą 1°C per minutę intervale nuo 25°C iki 100°C.

Duomenų apdorojimas:

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu gauti rezultatai apdoroti Microcal™Origin™v5,0 programa. Terminio poslinkio metodu gauti rezultatai apdoroti ThermoFluor++ 1.4.2 programa.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1 HtpG N ir HtpG F baltymų sekos nustatymas

HtpG N ir HtpG F plazmidžių DNR išskirta iš *E. coli* XL1 blue/pET-21a /HtpG N ir *E. coli* XL1 blue/pET-21d/HtpG F kolonijų panaudojant UAB „Fermentas“ „GeneJETTM Plasmid Miniprep Kit“ rinkinį. Tikslinio geno seka nustatyta „BTI Sekvenavimo Centre“ naudojant T7-Prom ir T7-Term pradmenis. HtpG F baltymo seka buvo palyginta su Hsp90α seka (6 pav.). Tai buvo padaryta, norint nustatyti, kiek šios sekos yra homolginės ir ar bus galima HtpG N bei HtpG F baltymus naudoti tyrimams su Hsp90 slopikliais, kurie prie baltymo jungiasi speciafiniame ATP jungimosi centre.

HtpG-Q5MZP9	1	MAIL	E	QGNIT	IHTDNIF	PIIKKSL	YSEHE	IFLREL	ISNAVD	AIQKLK	47																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Hspa-P09700	1	MPEETQTQDQPMEEEEV	E	TFAFQAE	IAQLMSL	IINTF	YSNKE	IFLREL	ISNSSD	ALDKIR	60																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
HtpG-Q5MZP9	48	MVSYAGELEGEIG	-DPQIT	LSIDRDRKQL	LKIADNG	IGMTADE	IKRYINQV	AFSSAEDF	IE	106																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
Hspa-P09700	61	YESLTDPSKLD	SGKELHIN	LIPNKQDRTL	ITVDTG	IGMTKADL	INNLTGT	AKSGTKAF	ME	120																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
HtpG-Q5MZP9	107	KYKGGADQPI	IGHFGLGFYS	AFIVADRV	EIETLSY	QKGATPV	HWTC	DGSSPSFEL	SEG	SRT	166																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Hspa-P09700	121	ALQAGADIS	MIQGQFGV	GFYSAYL	VAEKVT	ITKHND	DEQYAW	ESSAGGS	SFTV	TRDTG	EPM	180																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
HtpG-Q5MZP9	167	ERGTTI	ILNLSEEE	EYLEPARI	RQLVKTY	CDFMPVPI	ALEG				208																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
Hspa-P09700	181	GRGTV	ILHLKED	QTEYLE	ERRIKEI	VKKHSQ	FIGYPIT	L	FVEKERD	KEVSD	DEAE	EKKED	240																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
HtpG-Q5MZP9	209																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																												

6 pav. Hsp90α ir HtpG F sekų palyginimas. Mėlynai pažymėtos aminorūgštys identiškai sutampa abejose sekose.

Nustatyta, jog HtpG F ir Hsp90α baltymų sekos yra tik 24,82% identiškos, tačiau ATP jungimosi centre yra tik keletas aminorūgščių, kurios skiriasi:

Hsp90 α	Ser52	Asn106	Lys112	Val136	His154	Ser164
HtpG F	Ala39	Tyr92	Phe98	Leu122	Ser140	Trp150

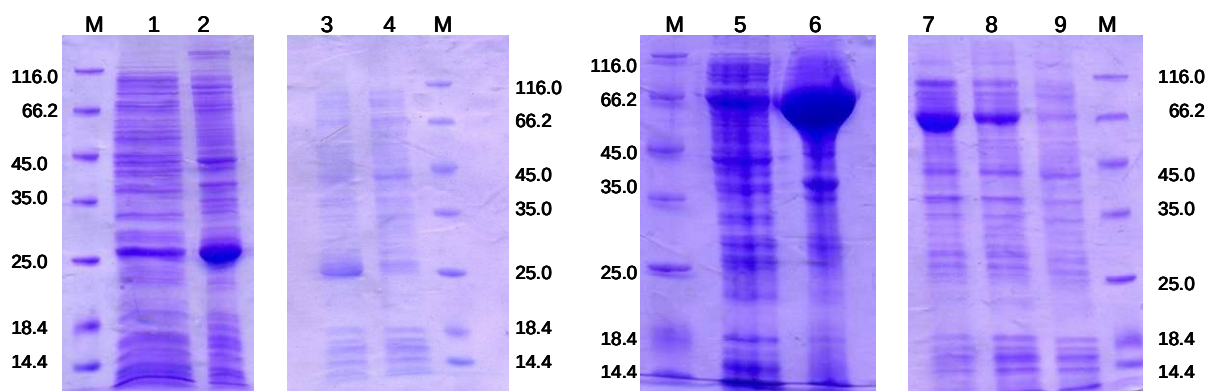
Visos kitos aminorūgštys, esančios ATP jungimosi centre, tokios pačios. Manoma, jog keleto aminorūgščių skirtumas gali šiek tiek daryti įtaką jungimosi termodinamikai, tačiau natūralus (radisikolis) bei sintetinis (ICPD47) Hsp90 slopikliai su HtpG baltymu turėtų sąveikauti ATP jungimosi centre.

3.2 Baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas

Prieš patikrinant HtpG N ir HtpG F baltymų ekspresiją ir tirpumą apskaičiuotos jų molekulinės masės, teoriniai izoelektriniai taškai (pI) bei ekstinkcijos koeficientai naudojant Šveicarijos bioinformatikos instituto internetiniame puslapyje pateiktu „ProtParam“ įrankiu:

	HtpG N	HtpGF
Molekulinė masė(kDa)	24,9422	73,6682
Teorinis pI	5,10	5,08
Ekstinkcijos koeficientas	17483	64938

Atlikta DNR plazmidės transformacija į kompetentinę *E. coli* BL21 (DE3) kultūrą ir patikrinta baltymų ekspresija bei tirpumas. Auginimo sąlygos parenkamos tokios, kad baltymai būtų tirpūs, jų kiekis būtų kuo didesnis ir baltymai būtų kuo stabilesni. Todėl iki indukcijos IPTG buvo auginama 37°C temperatūroje, o pasiekus 0,5 ($\lambda = 600$ nm) optinį tankį pridedama 1 M IPTG (galutinė jo koncentracija 0,1 mM) ir auginama 3 val. 18°C temperatūroje. HtpG F baltymo biomasė po indukcijos auginama 3val. ir 20val., jog būtų galima įvertinti, kuriuo pasirinktu būdu baltymo ekspresija yra geresnė.

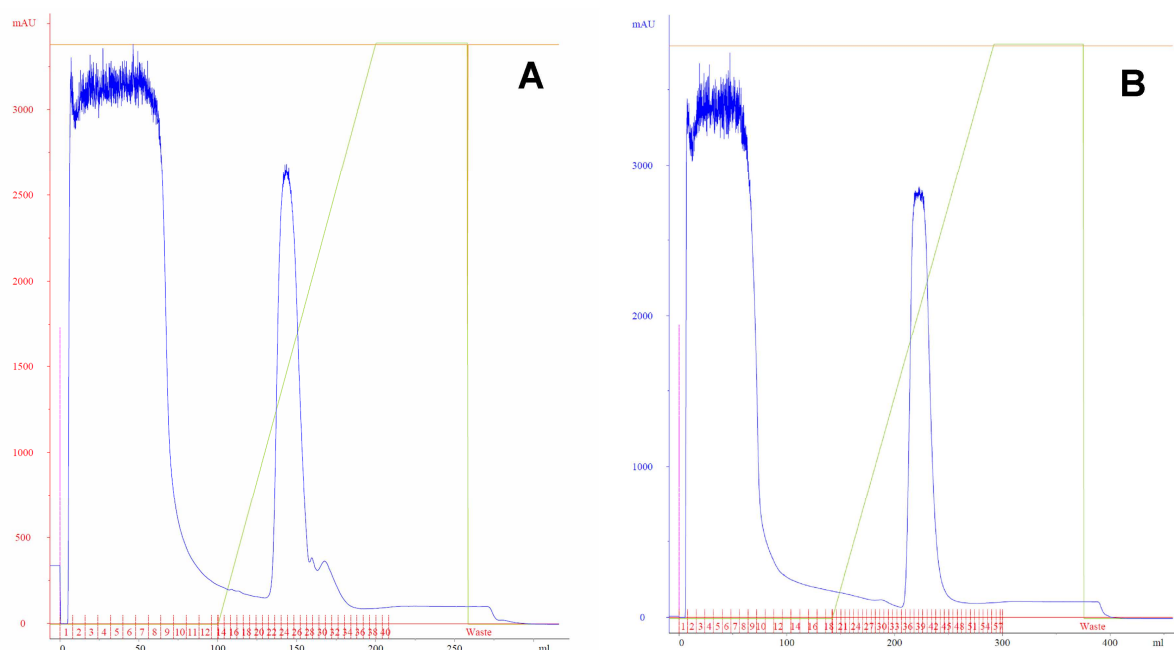


7 pav. HtpG N ir HtpG F baltymų ekspresijos ir tirpumo patikrinimas NDS-PAAG, auginant *E. coli* BL21 (DE3) kamiene. M – baltymų dydžio standartas SM0431; 1, 2 – HtpG N tirpi ir netirpi frakcijos; 3, 4 – HtpG N mėginiai po ir prieš indukciją; 5, 6 – HtpG F tirpi ir netirpi frakcijos; 7 – HtpG F mėginys po 20val. indukcijos; 8 – HtpG F mėginys po 3val. indukcijos; 9 – HtpG F mėginys prieš indukciją.

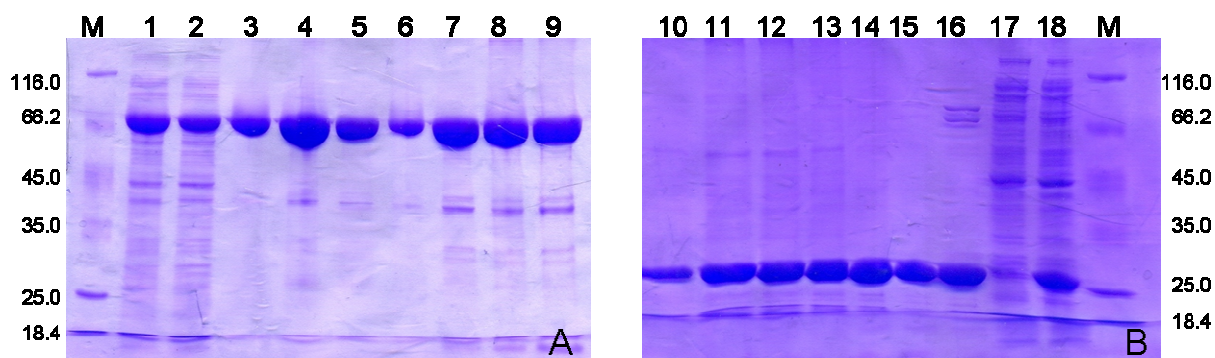
Iš 7 paveikslo galime teigti, jog auginant HtpG F baltymo biomasę indukciją geriau atlikti 20val. Taipogi, iš NSD – PAAG rezultatų matyti, jog pET-21a /HtpG ir pET-21d /HtpG F plazmidės ekspresuoja tikslinius baltymus, kurių ekspresijos lygis ir tirpumas yra pakankami, norint atlikti tolimesnius tyrimus.

3.3 HtpG N ir HtpG F baltymų gryninimas

Biomasė suardyta ultragarsu, didesnė dalis baltymo gauta netirpioje frakcijoje (7 pav.) Kadangi baltymas turėjo heksahistidino uodegėlę, grynintas naudojant Ni^{+2} jonų chromatografinę kolonėlę ir Q-Sepharose jonų – mainų kolonėlę, norint pasiekti didesnę grynumą bei sukonzentruoti baltymą. Metalochelatinėje chromatografijoje sąveika tarp baltymų ir sorbento vyksta susidarant koordinaciniams ryšiams tarp sorbento ligando su imobilizuotais Ni^{+2} jonais ir baltymų heksahistidino uodegėlių. Baltymai desorbuojami leidžiant imidazolo (konkurentinio ligando) gradientą (0,02 – 0,5M). Eliucija atliekama nekeičiant pradinio buferinio tirpalo pH. Remiantis chromatogramomis (8 pav.) bei elektroforegramomis (9 pav.) sujungiamos frakcijos, turinčios didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją (HtpG N – 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 frakcijos, o HtpG F – 37, 38, 39, 40, 41, 42 frakcijos).

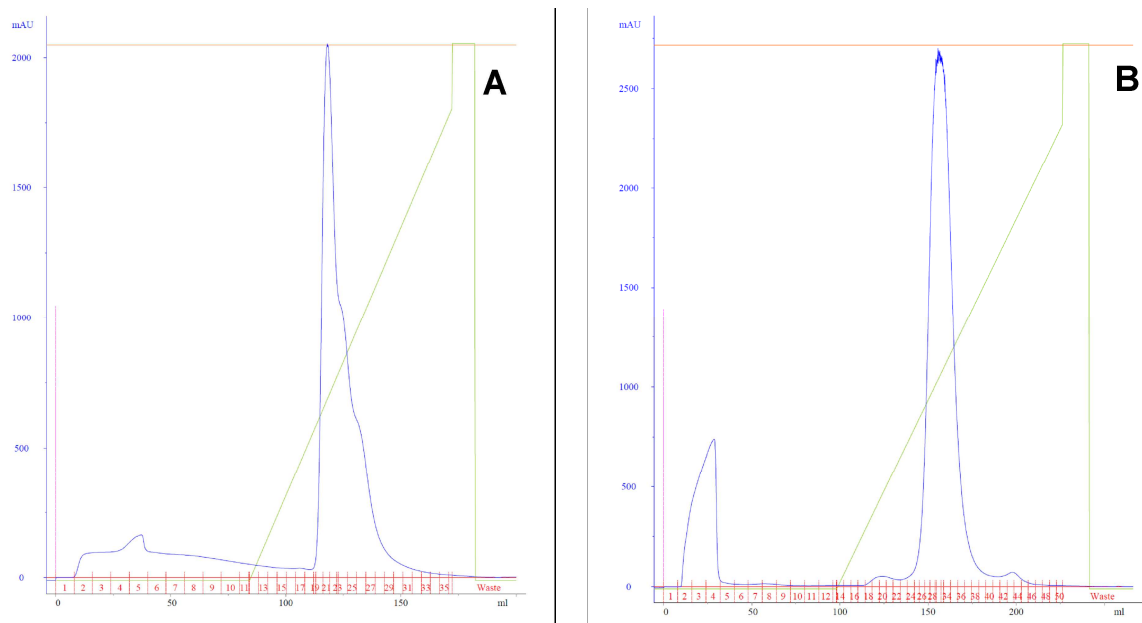


8 pav. Chromatogramos gautos gryninant HtpG N (A) ir HtpG F(B) Ni^{+2} jonų chromatografine kolonėle.

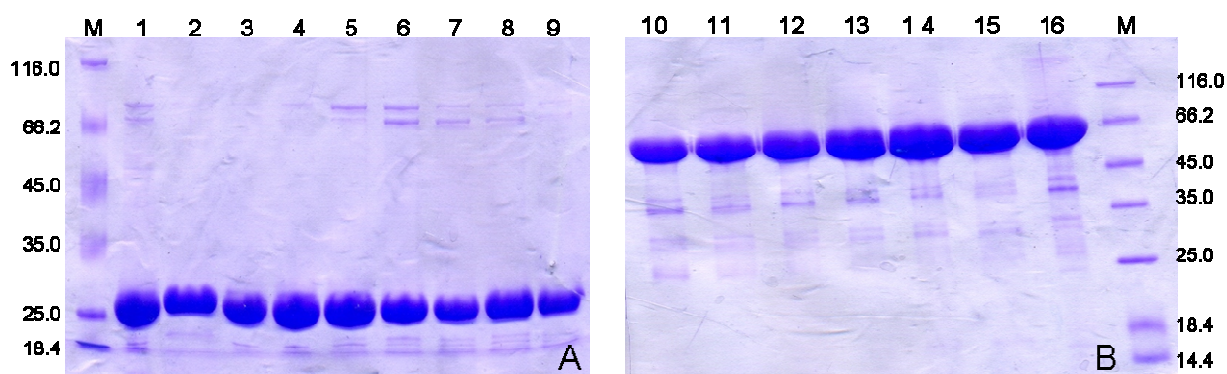


9 pav. HtpG F (A) ir HtpG N (B) gryninimo 6BCL-sefarožės metalochelatinės chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. M – baltymų dydžio standartas SM0431; 1,18 – baltymų mėginiai prieš gryninimą; 2, 17 – nesisorbavusios baltymų frakcijos; 3 – 9 ir 10 – 16 – baltymų frakcijos po gryninimo.

Norint pasiekti didesnę grynumą ir sukonzentruoti baltymą, apjungus frakcijas, turinčias didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją, leidžiama antroji jonų mainų chromatografijos kolonėlė (Q-Sepharose jonų - mainų kolonėlė). Baltymas desorbuojamas didinant priešjono (NaCl) koncentraciją (0 – 1 M). Sujungiamos frakcijos, turinčios didžiausią tikslinio baltymo koncentraciją (10 ir 11 pav.). Baltymai gauti su nežymiomis priemaišomis.



10 pav. Chromatogramos gautos gryninant HtpG N (A) ir HtpG F(B) Q-Sepharose jonų - mainų kolonėle.

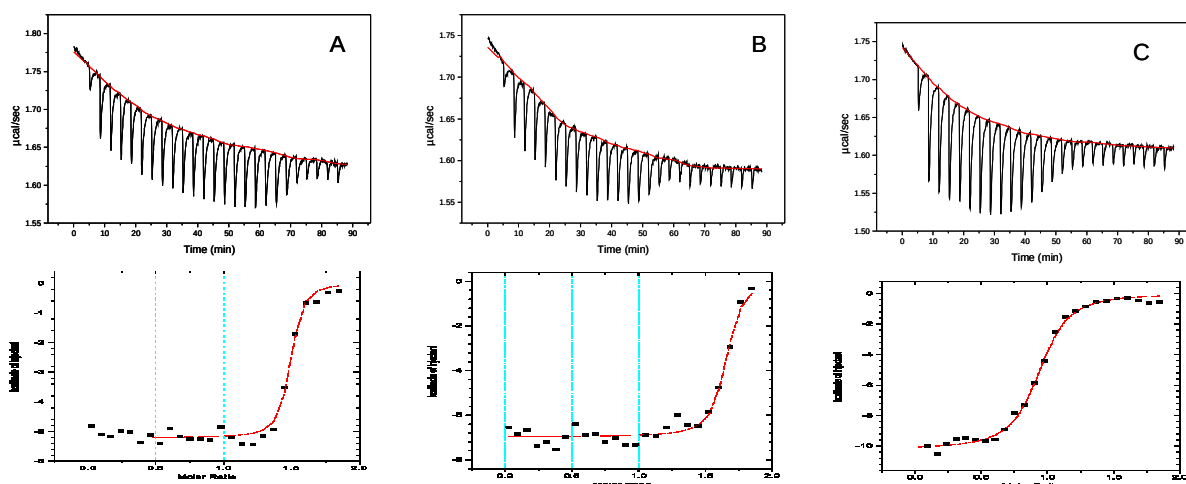


11 pav. HtpG N (A) ir HtpG F (B) gryninimo Q-Sepharose jonų - mainų chromatografijos metodu rezultatai NDS-PAAG. M – baltymų dydžio standartas SM0431; 1,16 – baltymų mėginiai po pirmojo gryninimo; 2 – 9 ir 10 – 15 – baltymų frakcijos po gryninimo.

HtpG N ir HtpG F baltymai yra nestabilūs, kadangi HtpG N paviršiuje turi 2 Cys, o HtpG F 7 Cys, kurie gali oksiduotis esant deguonies arba kitam oksidatoriui ir sudaryti disulfidinius tiltelius tarpusavyje arba su kito baltymo molekulės paviršiuje esančiais Cys. Ilgiau laikant kambario ar net 4°C temperatūroje jie gali išsėsti į nuosėdas. Todėl laikomi -80°C temperatūroje, HtpG N - 25 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl ir 0,1 mM DTT tirpale, o HtpG F 25 mM Tris buferiniame tirpale pH 7,0, 50 mM NaCl, 5 mM DTT ir 3 mM β -ME.

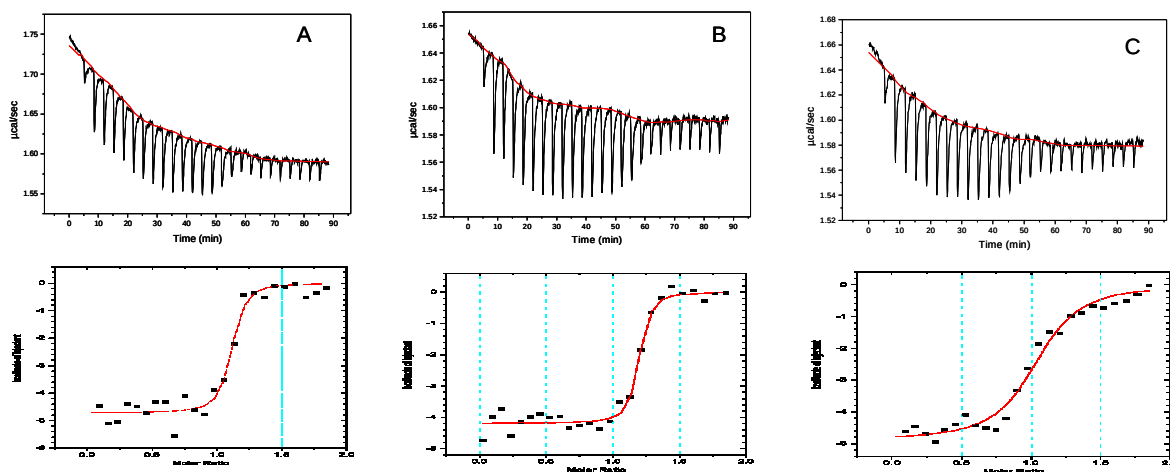
3.4 HtpG N ir HtpG F jungimosi su slopikliais matavimas taikant izoterminio titravimo kalorimetriją

Izoterminio titravimo kalorimetrijos metodu buvo išmatuota išsikirianti šiluma jungiantis HtpG N ir HtpG F baltymams su komerciniu (radisikoliu) ir sintetiniu (ICPD47) slopikliais. Jungimasis tirtas 0,05 M Tris ir 0,05 M fosfatiname buferiniuose tirpaluose, esant skirtingoms jų pH reikšmėms (6,0;7,0;8,0), 25°C laipsnių temperatūroje. 12 paveiksle pavaizduotos būdingos ITK metodu gautos kreivės, jungiantis HtpG N su ICPD47 fosfatiname buferiniame tirpale.



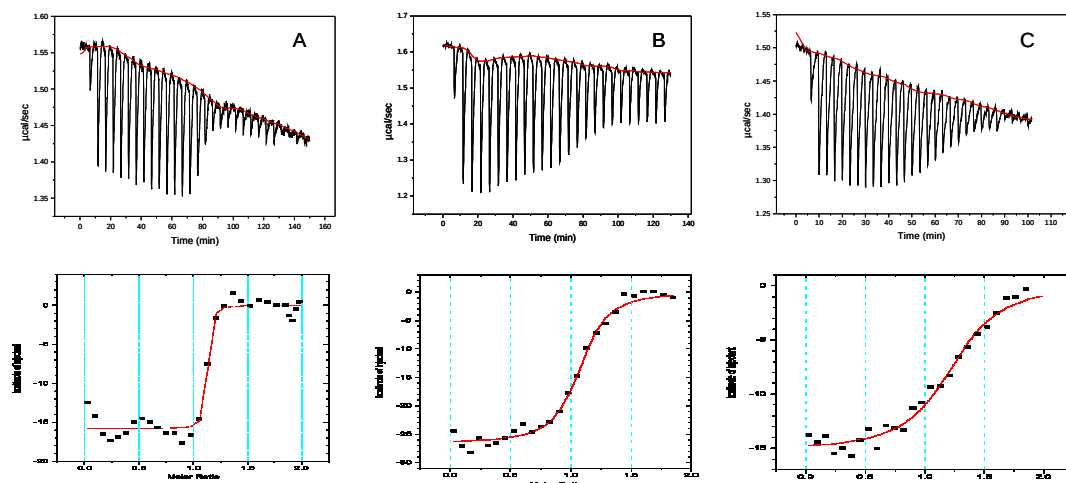
12 pav. ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su ICPD47 fosfatiname buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas – duomenys gauti, kai pH 6,0; B paveikslas – pH 7,0; C – pH 8,0. Viršuje pateikti pirminiai duomenys, o apačioje integruotos kreivės. $K(A) > K(B) > K(C)$.

Kitame paveiksle (13 pav.) pateikiamos ITK kreivės, gautos jungiantis HtpG N su ICPD47 Tris buferiniame tirpale esant skirtingoms pH reikšmėms.

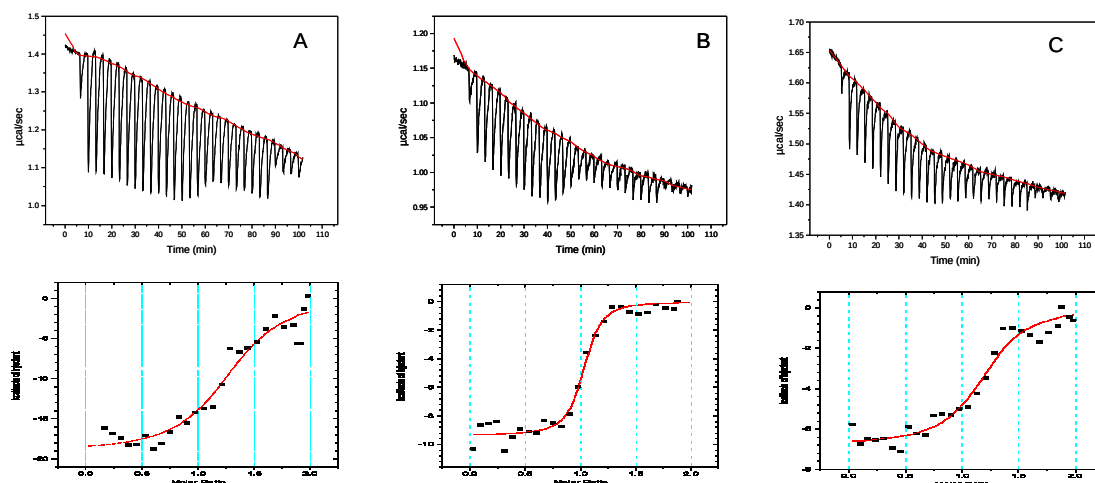


13 pav. ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su ICPD47 Tris buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas – duomenys gauti, kai pH 6,0; B paveikslas – pH 7,0; C – pH 8,0. Viršuje pateikti pirminiai duomenys, o apačioje integruotos kreivės.

Remiantis grafikais (12 ir 13 pav.) galima teigti, jog HtpG N jungimosi su ICPD47 (slopiklis susintetintas Biotechnologijos instituto Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo laboratorijoje) jungimosi konstantos skirtingos, esant tom pačiom pH reikšmėm skirtinguose buferiniuose tirpaluose. 14 paveiksle pavaizduotos ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu kreivės fosfatiniame buferiniame tirpale, o 15 paveiksle – Tris buferiniame tirpale.



14 pav. ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas – duomenys gauti, kai pH 6,0; B paveikslas – pH 7,0; C – pH 8,0. $K(A) > K(B) > K(C)$.



15 pav. ITK metodu gautos HtpG N jungimosi su radisikoliu fosfatiniame buferiniame tirpale kreivės, esant skirtingoms pH reikšmėms. A paveikslas – duomenys gauti, kai pH 6,0; B paveikslas – pH 7,0; C – pH 8,0.

Baltymo jungimosi ITK metodu su slopikliais parametrai pateikti 1 lentelėje. Remiantis jais galima teigti, jog HtpG N su ICPD47 geriausiai jungiasi, kai fosfatinio buferinio tirpalo pH 6,0, o Tris buferinio tirpalo pH 7,0. Tas pats dėsniumas pastebimas ir baltymui jungiantis su radisikoliu. Taip pat iš gautų duomenų galime teigti, jog HtpG N su sintetiniu slopikliu ICPD47