



VILNIAUS UNIVERSITETAS
CHEMIJOS FAKULTETAS
FIZIKINĖS CHEMIJOS KATEDRA

Chemijos studijų programos II kurso studentas

Gediminas SKVARNAVIČIUS

BALTYMŲ DENATŪRACIJOS IR JŲ SAŲVEIKOS SU
LIGANDAIS TYRIMAI AUKŠTO SLĖGIO METODAIS

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

Darbo vadovai:

Dr. Vytautas PETRAUSKAS

Prof. habil. dr. Arūnas

RAMANAVIČIUS

Darbo konsultantas:

Prof. Daumantas MATULIS

VILNIUS, 2016

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

BALTYMŲ DENATŪRACIJOS IR JŲ SAŲEIKOS SU
LIGANDAIS TYRIMAI AUKŠTO SLĖGIO METODAIS

Darbas paruoštas:

Vilniaus universiteto Biotechnologijos instituto
Biotermodinamikos ir vaistų tyrimo skyriuje

Studentas:

Gediminas SKVARNAVIČIUS _____

Darbo vadovai:

Dr. Vytautas PETRAUSKAS _____

Prof. habil. dr. Arūnas RAMANAČIUS _____

Darbo konsultantas:

Prof. Daumantas MATULIS _____

VILNIUS, 2016

Turinys

| | |
|--|-----------|
| Santrauka | 4 |
| Įvadas | 5 |
| Tikslai | 6 |
| 1. Literatūros apžvalga | 7 |
| 1.1. Slėgio įtaka baltymams | 7 |
| 1.1.1. Baltymų tūris | 7 |
| 1.1.2. Baltymų išvyniojimas slėgiu | 9 |
| 1.2. Baltymų cheminė denatūracija | 10 |
| 1.3. Fluorescenciniai baltymų išsivyniojimo tyrimo metodai | 12 |
| 1.3.1. Vidinė fluorescencija | 12 |
| 1.3.2. Išoriniai fluoroforai | 13 |
| 1.4. Branduolių magnetinio rezonanso tyrimai | 13 |
| 1.4.1. BMR veikimo principas | 14 |
| 1.4.2. Cheminis poslinkis | 16 |
| 1.4.3. Sukinio-sukinio sąveika | 16 |
| 1.4.4. Vienmačiai BMR spektrai | 17 |
| 1.4.5. Dvimačiai BMR spektrai | 18 |
| 1.4.6. BMR panaudojimas baltymų tyrimams | 19 |
| 1.5. Karboanhidrazės | 22 |
| 1.5.1. Karboanhidrazių izoformos | 22 |
| 1.5.2. Karboanhidrazių ir vėžio sąryšis | 23 |
| 1.6. HSP90 | 23 |
| 2. Medžiagos ir metodai | 24 |
| 2.1. Fluorescencinė spektroskopija aukštame slėgyje | 24 |
| 2.1.1. Baltymų denatūracijos tūrio nustatymas | 24 |
| 2.1.2. Slėginio poslinkio metodas | 26 |
| 2.2. BMR eksperimentai | 27 |
| 3. Rezultatai ir jų aptarimas | 30 |
| 3.1. Karboanhidrazių ir jų sąveikos su slopikliais tyrimas fluorescencijos aukštame slėgyje metodu | 30 |
| 3.1.1. Eksperimento eiga | 30 |
| 3.1.2. Duomenų analizė | 30 |
| 3.1.3. Skirtingų karboanhidrazės izoformų išsivyniojimas aukštame slėgyje | 34 |
| 3.1.4. Eksperimentinių sąlygų nustatymas | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.5. Karboanhidrazių sąveika su slopikliais | 36 |
| 3.2. HSP90 BMR tyrimai | 39 |
| 3.2.1. Slėgio įtaka HSP90 BMR spektrui | 40 |
| 3.2.2. Hsp90 jungimasis su ligandais | 41 |
| 4. Išvados | 48 |
| Literatūros sąrašas | 55 |

Santrumpų žodynas

| | | |
|------------------|---|---|
| ATP | – | Adenozintrifosfatas. |
| AZM | – | Acetazolamidas. |
| BMR | – | Branduolių magnetinis rezonansas. |
| CA | – | Karboanhidrazė. Romėniškais skaitmenimis žymimos skirtingos karboanhidrazės izoformos pvz. CAI, CAII, CAXIII. |
| CARBS | – | p-karboksibenzensulfonamidas |
| COSY | – | j-koreliacijos spektroskopija. |
| HECTOR | – | Hetero branduolių koreliacijos spektroskopija. |
| HSP90 | – | Žmogaus šaperono baltymas 90. |
| HSP90 α N | – | Žmogaus šaperono baltymo 90 α N-terminalinis subvienetas. |
| HSQC | – | Heterobranduolių vienetinio kvanto koherencijos spektroskopija. Prieš šį pavadinimą žymimi stebimi izotopai pvz. ^{15}N -HSQC. |
| NOE | – | Branduolinio Overhauzerio efektas. |
| NOESY | – | Branduolinio Overhauzerio efekto spektroskopija. |
| TOCSY | – | Visiškos koreliacijos spektroskopija. |

Santrauka

Šiame darbe siekiama vystyti metodus leidžiančius nustatyti baltymų-ligandų jungimosi tūrį – svarbią, bet mažai ištirtą termodinaminę charakteristiką. Jungimosi tūrio nustatymas prisidėtų prie priešvėžinių vaistinių junginių vystymo, kurių taikiniai gali būti šiame tyrime naudoti žmogaus šaperono baltymas 90 (HSP90) ir karboanhidrazių šeimos baltymai. Šiame darbe buvo tiriama baltymų-ligandų sąveika naudojant aukšto slėgio fluorimetrijos metodą, ir nagrinėjami karboanhidrazių fluorescencijos spektro pokyčiai, kurie stebimi vykstant slėgio įtakotiems baltymo konformacijos virsmams. Buvo nustatyti I-os, II-os ir XIII-os karboanhidrazių izoformų lydymosi slėgiai ir jų priklausomybė nuo denatūrantų koncentracijos. Varijuojant slopiklio koncentracija nustatytas II-osios karboanhidrazės izoformos jungimosi tūris su acetazolamidu (AZM). Taip pat aukšto slėgio branduolių magnetinio rezonanso metodu buvo tirti HSP90 α N-terminalinio subvieneto konformaciniai pokyčiai ir jo sąveika su slopikliais. Šiuo metodu nustatytos jo išsivyniojimo tarpinės būsenos susidarymui svarbios aminorūgštys. Taip pat nustatytos aminorūgštys svarbios slopiklio prisijungimui. Atliekant eksperimentus skirtinguose slėgiuose bei esant skirtingoms slopiklio koncentracijoms, nustatytas slopiklio ICPD9 jungimosi tūris.

Įvadas

Dar 1914–aisiais metais pirmą kartą buvo aprašytas aukšto slėgio poveikis baltymams. Pastebėta, jog kiaušinio baltymą veikiant aukštu slėgiu (7000 atm.) jis koagulioja ir tampa panašus į kietai virto kiaušinio baltymą (Bridgman, 1914). Vėliau daugelio bandymų metu nustatyta, jog veikiant aukštu slėgiu baltymai denatūruoja (Brandts et al., 1970). Iki šiol manoma, jog šio proceso metu vandens molekulės yra „įspaudžiamos“ į hidrofobinį baltymo globulės vidų (Day and García, 2008). Taip pat buvo pastebėta, jog skirtingai nei baltymų denatūracija temperatūra, slėginė denatūracija dažniausiai yra grįžtamas procesas (Zipp and Kauzmann, 1973). Baltymų išsivyniojimą paprastai lydi ir jų tūrio pokyčiai (Royer, 2002). Baltymų išsivyniojimo metu susidariusį tūrio pokytį išmatuoti tiesiogiai yra labai sudėtinga, tačiau vienas iš metodų leidžiančių nustatyti šį tūrio pokytį yra jų denatūracija aukštame slėgyje. Tokie eksperimentai leidžia ne tik nustatyti išsivyniojimo sąlygotą baltymų tūrio pokytį, bet ir tūrio pokytį susidarantį baltymui jungiantis su įvairiais ligandais (Toleikis et al., 2011). Ligandų jungimosi tūrio pokytis yra mažai ištirta tačiau svarbi termodinaminė savybė, tiek taikomuojami požiūriu (pvz. vaistų kūrimas), tiek fundamentalaus mokslo požiūriu (Kauzmann, 1987).

Šiame darbe pateikiamas aukšto slėgio fluorimetrijos metodo taikymas baltymų konformacijos pokyčių ir baltymų-ligandų sąveikos tyrimams. Siekiant išstobulinti metodiką, buvo analizuoti fluorescencijos spektro pokyčiai leidžiantys stebėti baltymų konformacijos kitimą. Pasirinkus konformacinių pokyčių stebėjimo metodiką nustatyti baltymams išsivynioti reikalingi slėgiai, ištirta kaip jie priklauso nuo denaturanto koncentracijos tirpale. Šiuo metodu tirta ir karboanhidrazių sąveika su sloplikiais. Pasinaudojant ligandų savybe stabilizuoti karboanhidrazes prieš slėginę denatūraciją, buvo nustatyti baltymo-ligando sąveikos termodinaminiai parametrai: jungimosi konstanta ir sąveikos sąlygotas tūris. Be fluorescencinių metodų šiame darbe taip pat aprašomi branduolių magnetinio rezonanso (BMR) eksperimentai aukštame slėgyje. Šiais eksperimentais tirti vėžinėms ląstelėms svarbaus žmogaus šaperono baltymo 90 (HSP90) konformaciniai pokyčiai aukštame slėgyje. Kadangi BMR metodas leidžia nustatyti konkrečių aminorūgščių aplinkos pokytį, nustatyta kurios aminorūgštys keičia padėtis baltymą veikiant aukštu slėgiu. Taip pat šiuo metodu tirta HSP90 sąveika su mažamolekuliniais ligandais. Išnaudojant anksčiau paminėtas BMR metodo galimybes, nustatyta, kurios aminorūgštys svarbiausios baltymo-ligando sąveikoje. Eksperimentai, kurie buvo atliekami aukštame slėgyje, taip pat leido įvertinti ir dėl baltymo-ligando sąveikos atsiradusį tūrio pokytį.

Tikslai

Šio darbo tikslai yra:

- Pasinaudojant fluorimetrija aukštame slėgyje nustatyti skirtingų karboanhidrazės izoformų išsivyniojimo tūrius.
- Slėginio poslinkio metodu nustatyti tūrį sąlygotą karboanhidrazės ir jos slopiklio sąveikos.
- Branduolių magnetinio rezonanso metodu ištirti struktūrinius baltymo HSP90 α N subvieneto struktūrinius pokyčius aukštame slėgyje.
- BMR metodu nustatyti HSP90 α N ir ligandų sąveikos sąlygotą baltymo tūrį.

1. Literatūros apžvalga

1.1. Slėgio įtaka baltymams

Slėgio įtaka medžiagoms paklūsta Le Chatelier principui – pusiausvyroje esanti sistema, paveikta išorinių veiksnių, persitvarko maksimaliai sumažindama tų veiksnių poveikį. Elementariai, dviejų būsenų, pusiausvirajai sistemai galioja lygtis (1),

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta E + p\Delta V - T\Delta S \quad (1)$$

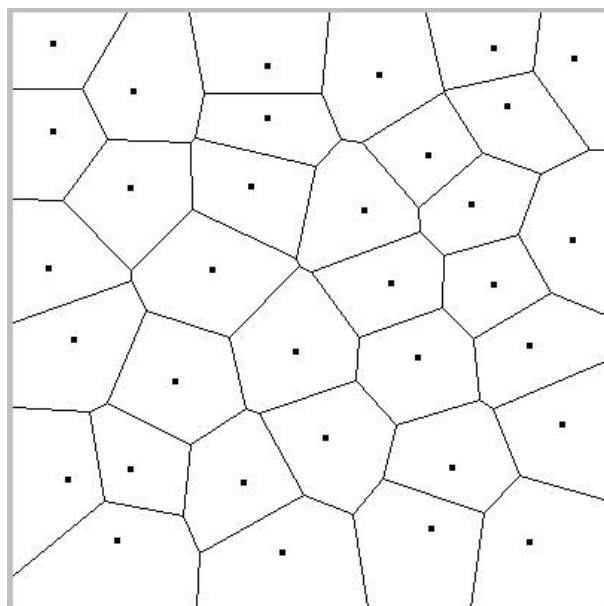
kur ΔG yra laisvosios Gibso energijos, ΔE – vidinės energijos, ΔV – tūrio, ΔS – entropijos pokyčiai, K – pusiausvyros konstanta, p – slėgis, T temperatūra, o R – universalioji dujų konstanta. Taigi pakėlus sistemos slėgį, sistema bandys sumažinti savo tūrį. Skirtingai nei temperatūra, kuri keičia tiek sistemos vidinę energiją, tiek ir tūrį (kas neleidžia šių efektų atskirti), slėgis keičia tik sistemos tūrį. Todėl slėgis itin patrauklus kintamasis tiriant baltymų struktūrinius pokyčius (Weber and Drickamer, 1983). Taigi keičiant sistemos slėgį galima įvertinti proceso tūrio pokytį ΔV . Tipinės ΔV vertės biocheminiams procesams svyruoja tarp $-50 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ir $50 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ (Mozhaev et al., 1996). Šiame skyriuje bus aptariamos šių pokyčių molekulinės interpretacijos.

1.1.1. Baltymų tūris

Dalinis tirpinio tūris, gali būti išreiškiamas lygtimi (2):

$$V^0 = V_m + V_i + V_T + \beta_{T_0} RT, \quad (2)$$

kur V_m yra tirpinio savitasis tūris, V_i – sąveikos tūris, kuris reiškia tirpiklio tūrio sumažėjimą dėl tirpinio polinių grupių hidratacijos, V_T – terminis tūris atsirandantis dėl termiškai aktyvuojamos bendros tirpinio ir tirpiklio vibracijos, β_{T_0} – tirpiklio izoterminio suspaudžiamumo koeficientas. $\beta_{T_0} RT$ dėmuo yra labai mažas, todėl dažnai neįtraukiamas į makromolekulių tyrimus (Chalikian, 2003). Baltymo V_m dažniausiai apibrėžiamas kaip Voronojaus tūris. Tai tūris apskaičiuotas naudojantis Richards sukurtu algoritmu, kuris remiasi Voronojaus išvesta geometrijos teorema (Richards, 1974). Naudojantis šiuo algoritmu, kiekvieno atomo centras laikomas pradžios tašku. Iš šio taško brėžiami vektoriai į gretimiems atomams priklausančius taškus. Tuomet konstruojamos plokštumos, kurios yra statmenos nubrėžtiems vektoriams ir dalina juos pusiau. Šios plokštumos ir jų susikirtimo briaunos sudaro briaunainius kurių viduje yra pradžios taškai. Yra apskaičiuojamas mažiausias briaunainis, jo tūris priskiriamas pradžios taškui t.y. konkrečiam atomui. Šis procesas kartojamas visiems taškams. Minimalūs briaunainiai, dar vadinami Voronojaus briaunainiais arba Voronojaus ląstelėmis (pavaizduota 1–ajame paveiksle), užima visą įmanomą tūrį, nepaisant jų išsidėstymo. Šių briaunainių tūrių suma ir vadi-



1 pav. Dvimatis voronojaus ląstelių brėžinys.

nama baltymo Voronojaus tūriu. Šis metodas tinkamas tik vidiniams baltymo atomams, nesąveikaujantiems su tirpikliu. Paviršinių atomų tūriams apskaičiuoti reikia papildomų prielaidų ar molekulinų simuliacijų vandens molekulėms išdėlioti. Kitas V_m apibrėžimas yra baltymo molekulinis tūris. Tai tirpikliui nepasiekiamas tūris. Jis apskaičiuojamas naudojant teorinį sferinį zondą, kuris atitinka tirpiklio molekulę. Šis zondas dėliojamas tūkstančius kartų aplink baltymo molekulę pozicijose kuriose jis nepatiria van der Waalso persiklojimų, jo paviršiaus taškai atsukti į baltymą tampa tirpikliui nepasiekiamu baltymo paviršiumi (Connolly, 1983). Baltymo molekulinis tūris yra dažniausiai apie 15 % mažesnis nei jo Voronojaus tūris (Chalikian, 2003).

Klasikinis globulinis baltymas aktyvioje formoje turi būti vandeninėje terpėje ir turėti savitą tretinę struktūrą, turinčią šerdį kurios amino rūgščių liekanos yra nepasiekiamos aplinkoje esančiam vandeniui (Chothia, 1984). Globulės viduje išsidėsčiusios, tirpikliui nepasiekiamos amino rūgštys yra tankiai susipakavusios, pakavimosi tankis gali būti apibrėžiamas kaip santykis tarp molekulės van der Waalso voko ir jos užimamos erdvės tūrio. (Richards, 1974), Tačiau jos taip pat sudaro įvairias ertmes. Šių ertmių buvimas leidžia vyksti įvairiems baltymų struktūriniais pokyčiams, kurie vyksta ertmėm keičiant savo dydį, išnykstant ir atsirandant (Hubbard and Argos, 1994; Richards, 1979). Šie baltymo dinaminiai virsmai keičia ir baltymo užimamą tūrį. Šie pokyčiai pagrinde keičia savitąjį baltymo tūrį V_m kuris yra sudarytas iš individualių atomų užimamo tūrio ir globulės viduje susidariusių, tirpikliui nepasiekiamų ertmių tūrio (Mozhaev et al., 1996).

1.1.2. Baltymų išvyniojimas slėgiu

Baltymų denatūracija apibrėžiama kaip baltymo ketvirtinės, tretinės ir antrinės struktūrų praradimas. Dar 1914 metais pirmą kartą pastebėta, jog baltymai paveikti aukštu slėgiu pakinta (Bridgman, 1914). Vėliau įrodyta, kad dauguma baltymų veikiant aukštu slėgiu iš tikrųjų praranda savo natyvią struktūrą (Brandts et al., 1970). Skirtingai nei terminė denatūracija, kuri yra negrįžtamas procesas slėginė denatūracija dažnai yra grįžtama, sumažinus aplinkos slėgį daugeliu atveju baltymai susigrąžina savo struktūrą, bei aktyvumą (Zipp and Kauzmann, 1973).

Denatūraciją galima aprašyti kaip dviejų stadijų procesą :



kur N – Natyvi, o U – išvyniota baltymo formos. Tačiau pastaruoju metu manoma, jog egzistuoja ir tarpinės tranzicijos formos (Kuwajima, 1989). Kol kas, literatūroje labiausiai paplitęs natyvios formos praradimo mechanizmo aiškinimas yra paremtas vandens „įspaudimu“ į baltymo ertmes. Lyginant BMR nustatytas baltymo struktūras skirtinguose, tačiau žemesniuose nei išvyniojimo, slėgiuose ši išvada patvirtinta. Aukštesniame slėgyje yra daugiau į baltymo ertmes įsiterpusių molekulių (Kundrot and Richards, 1987). Vandens įsiskverbimo procesą galima išreikšti trimis parametrais: vandens dydžio ertmės atsidarymo tikimybe atitinkamoje aplinkoje – μ_0 , vidutine vandens prisijungimo energija toje aplinkoje – $\langle u \rangle$ ir prisijungimo energijos pasiskirstymo išplitimu – σ . Keliant slėgį mažėja tikimybė susidaryti vandens dydžio ertmei tiek tirpiklyje, tiek baltymo molekulėje. Tačiau šis tikimybės mažėjimas tirpiklyje pasireiškia labiau, t.y. keliant slėgį didėja tikimybių skirtumas. Likę du faktoriai mažai kinta keliant slėgį. Manoma, kad ertmės atsidarymo tikimybių skirtumas tarp dviejų aplinkų ir yra pagrindinis vandens įsiskverbimą lemiantis faktorius (Day and García, 2008).

Slėgis vienaip ar kitaip įtakoja visas pagrindines baltymus stabilizuojančių sąveikų rūšis. Aukštesnis slėgis yra palankus joninių ryšių (druskos tiltelių), susidarančių tarp baltymo aminorūgščių šoninių grupių, disociacijai. Jonų hidratacija pasižymi neigiamu reakcijos tūrio pokyčiu, kadangi vandens molekulės yra pritraukiamos arčiau jono. Vienvalenčio jono hidratacijos tūrio pokytis ΔV yra apie $10 \text{ ml} \cdot \text{mol}^{-1}$ daugiavalenčiams jonams jis gerokai didesnis (Van Eldik et al., 1989). Taigi nuo tirpiklio izoliuotų druskos tiltelių disociacija ir hidratacija yra palanki aukštame slėgyje. BMR eksperimentų metu parodyta, jog baltymų sudaromi vandeniliniai ryšiai trumpėja kylant slėgiui (Li et al., 1998). Tai reikštų, kad vandeniliniai ryšiai yra stabilizuojami aukštu slėgiu. Tačiau šis efektas stipresnis aminorūgštims sąveikaujančioms su tirpikliu, todėl tai taip pat gali prisidėti prie baltymų išsivyniojimo. Aukštame slėgyje hidrofobinių grupių pernešimas į vandenį pasižymi teigiamu tūrio pokyčiu (Sawamura et al., 1989). Dėl šių tyrimų ilgai buvo manoma, kad aukštas slėgis stabilizuoja hidrofobinę sąveiką. Kadangi hidrofobinė sąveika yra

viena pagrindinių stabilizuojančių baltymo erdvinę struktūrą, ilgai buvo nesuprantama kaip slėgis gali denatūruoti baltymus (Kauzmann, 1987). Tačiau ši problema pasidarė aiškesnė pradėjus nagrinėti hidrofobinių grupių pernešimą atvirksčiai. Naudojant kompiuterines simuliacijas, kuriose buvo nagrinėjamas ne hidrofobinių grupių pernešimas į vandenį, bet vandens pernešimas į hidrofobinę aplinką nustatyta, jog slėgis destabilizuoja hidrofobinius kontaktus. Tai dar kartą parodo, jog skirtingai nei denatūracija karščiu, kuri skatina nepolinių grupių pernešimą į vandenį, slėginė denatūracija įspaudžia vandens molekules į hidrofobinę baltymo šerdį (Hummer et al., 1998)

Daugelio tyrimų metu pastebėta, jog denatūracija slėgiu dažnai yra grįžtamas procesas (Hawley, 1971; Zipp and Kauzmann, 1973). Šiuose tyrimuose spektroskopiniais metodais parodyta, jog skirtingai nei po denatūracijos karščiu, aukštu slėgiu denatūruotas baltymas atgauna didžiąją dalį savo prarastų struktūrų, sugražinus jį į atmosferinį slėgį. Taip pat nustatyta, jog kai kuriais atvejais aukštesnis slėgis netgi stabilizuoja baltymą prieš denatūraciją karščiu, kas rodo jog slėginė ir temperatūrinė denatūracija vyksta skirtingais mechanizmais. Rentgeno spindulių difrakcijos, bei Furje infraraudonųjų spindulių spektroskopijos metodais parodyta, kad slėginės denatūracijos metu baltymui agreguojant susidaro žymiai mažiau tarpmolekulinių β -klosčių, nei temperatūrinės denatūracijos atveju Panick et al. (1999). Dimerinių baltymų disociacija aukštame slėgyje taip pat yra grįžtamas procesas. Dimerai aukštame slėgyje disocijuoja, nes jų sąveikos vietoje atsiranda tuščių ertmių, todėl dimero tūris dažniausiai didesnis nei atskirų monomerų (Paladini and Weber, 1981).

1.2. Baltymų cheminė denatūracija

Baltymų denatūracija cheminiais reagentais nekeičiant kitų parametrų yra vadinama chemine denatūracija. Šiam procesui naudojami reagentai vadinami chaotropais arba tiesiog denatūrantais. Karbamidą ir guanidino hidrokloridą (GndHCl) (2 pav.) yra gerai žinomi denatūrantai. Jų savybė denatūruoti baltymus pastebėta dar 1938-aisiais metais (Greenstein, 1938). Baltymų cheminei denatūracijai reikalingos didelės šių denatūrantų koncentracijos (3-8 M). Denatūracija guanidino hidrokloridu kaip ir deantūracija slėgiu yra grįžtamas procesas (Greene and Pace, 1974). Nustatyta, jog daugelio baltymų denatūracijos laipsnis kinta tiesiškai priklausomai nuo GndHCl koncentracijos, taip pat tiesiškai kinta ir stebimoji išsivyniojimo Gibso energija – ΔG_U . Šiuo metu guanidino hidrokloridas yra vienas populiariausių denatūrantų naudojamų baltymų stabilumo tyrimams. Yra kelios viena kitai prieštaraujančios teorijos aiškinančios jo veikimą. Šios teorijos toliau aprašomos šiame skyrelyje.

Klasikinis globulinių baltymų susivyniojimo aiškinimas teigia, jog viena pagrindinių priežasčių, kodėl baltymai natyviomis sąlygomis įgauna susipakavusią, žemos entropijos konformaciją, yra hidrofobinis efektas. Vienas iš jo atsiradimo aiškinimų remiasi vandens



2 pav. Populiarūs baltymų denatūrantai.

molekulių polinkiu sudaryti vandenilinių ryšių tinklą tarpusavyje. Jeigu cheminė grupė nėra pakankamai hidrofiliška, kad išstumtų vandens molekulę sudarydama vandenilinį ryšį, ši grupė paslepia vandeniui nepasiekiamoje baltymo šerdyje.

Kol kas vienas pagrindinių klausimų siekiant nustatyti denatūrantų veikimo mechanizmą yra ar denatūrantai tiesiogiai sąveikauja su baltymo molekule, ar dalyvauja bendroje tirpiklio reorganizacijoje kurios pasekoje baltymas destabilizuojamas. Viena vyraujančių nuomonių teigia, jog denatūrantų veikimo mechanizmas remiasi poline, elektrostatine sąveika tarp polipeptido grandinės ir denatūrantų. Tiriant šią sąveiką kalorimetriniais metodais parodyta, jog šis procesas gali būti aprašomas paprastu jungimosi modeliu, su daugeliu energetiškai ekvivalenčių denatūrantų prisijungimo vietų ([Makhatadze and Privalov, 1992](#)). Tačiau termodinaminių parametrų gautų šiais tyrimais vertės nesutampa su itin didelėmis denatūrantų koncentracijomis reikalingoms išvynioti baltymus. Iš kitos pusės yra parodyta, kad denatūrantai pakeičia vandens struktūrą. Pavyzdžiui skaičiavimai naudojant Monte Carlo metodą rodo jog tiek karbamidas, tiek guanidino chloridas nepaisant to, kad yra polinės tirpumo vandenyje atžvilgiu, keičia vandens vandenilinių ryšių ilgį ir kampus taip kaip nepolinės molekulės ([Vanzi et al., 1998](#)). Tai gali turėti įtakos hidrofobinio efekto stiprumui, taigi ir globulinių baltymų natyvios struktūros stabilumui. Taip pat laiko skyros spektroskopijos metodais parodyta, jog karbamidas gali surišti vandens molekules taip sulėtindamas jų dinamiką. Tačiau šio efekto mastas net ir esant didelėms karbamido koncentracijoms (8 M) yra labai mažas, daugelis vandens molekulių išlieka nepaveiktos, taigi nėra ir įtakos vandenilinių ryšių stiprumui ([Rezus and Bakker, 2006](#)). Grįžtant prie tiesioginės denatūrantų sąveikos klausimo, taip pat nėra visiškai aišku ar denatūrantai sąveikauja su polipeptidinės grandinės „stuburu“ ar su šoninėmis grupėmis ([Stumpe and Grubmüller, 2007](#)).

Nagrinėjant denatūrantų veikimo mechanizmą yra vis dar daug neišspręstų klausimų. Tačiau gan vieningai sutinkama dėl jų įtakos baltymų išsivyniojimo termodinaminiam parametrams. Denatūrantai tiesiškai mažina išsivyniojimo laisvąją Gibbso energiją, taip sumažindami energetinį barjerą tarp natyvios ir išsivyniojusios baltymo konformacijų.

1.3. Fluorescenciniai baltymų išsivyniojimo tyrimo metodai

Fluorescenciniai metodai yra vieni populiariausių tiriant baltymų išsivyniojimą. Tai lemia keletas esminių šių metodų savybių. Kadangi fluoroforo fluorescencija labai priklauso nuo jo aplinkos (pvz. hidrofobinė ar hidrofilinė), tai pastaroji savybė išnaudojama stebint baltymo išsivyniojimą. Fluorescencinio signalo atsakas yra labai greitas, kas leidžia stebėti ir proceso kinetiką. Baltymų tyrimuose naudojami fluoroforai skirstomi į dvi grupes: 1) vidiniai kurie egzistuoja natūraliai baltymo sudėtyje (triptofanas, fenilalaninas, tirozinas) ir 2) išoriniai kurių į mėginį įdedama papildomai. Šiame skyrelyje bus aptarti darbe naudojami vidiniai ir išoriniai fluoroforai bei darbo su jais specifika.

1.3.1. Vidinė fluorescencija

Iš baltymus sudarančių amino rūgščių, trys yra vidiniai fluoroforai: triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas. Kadangi tirozinas ir fenilalaninas pasižymi mažais ekstinkcijos koeficientais, prastomis kvantinėmis išieigomis ir prastu fluorescencijos jautrumu aplinkos pokyčiams, baltymų tyrimuose dažniausiai stebima triptofano fluorescencija.

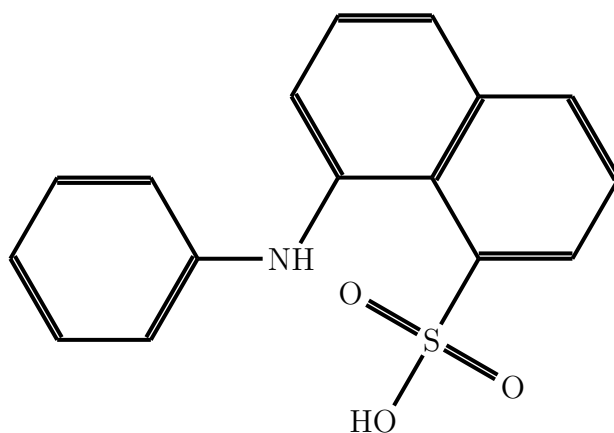
Triptofano sugerties maksimumas yra apie 280 nm tačiau siekiant atskirti triptofano fluorescenciją nuo tirozino ir fenilalanino dažniausiai sužadinimui naudojama 295 nm ar net ilgesnių bangos ilgių šviesa. Triptofano fluorescencijos maksimumas gali būti tarp 308 nm ir 353 nm. Triptofanas fluorescuoja trumpesnių bangų ruože kuomet jis yra visiškai paslėptas nuo vandens ar kitų polinių grupių, tačiau didėjant aplinkos poliškumui stebimas raudonasis poslinkis – triptofanas fluorescuoja ilgesnių bangų ruože (Burstein et al., 1973). Tai ypač naudinga baltymų konformacijos tyrimuose, kuomet triptofano šoninė grupė natyvios konformacijos baltyme yra paslėpta hidrofobinėje šerdyje, o baltymui išsivyniojant triptofanas vis labiau atveriamas į polinį tirpiklį. Paslėpto triptofano fluorescencijos maksimumas priklausomai nuo baltymo sukurtos aplinkos gali svyruoti tarp 308 nm ir 332 nm, tuo tarpu atvertas į vandenį triptofanas intensyviausiai fluorescuoja 353 - 355 nm bangos ilgio ruože (Reshetnyak and Burstein, 2001). Toks skirtumas leidžia identifikuoti atverto ir paslėpto triptofano fluorescencijos spektrus.

Be fluorescencijos spektro maksimumo kita svarbi triptofano fluorescencijos charakteristika yra kvantinė išieiga arba emisijos intensyvumas. Tačiau skirtingai nei fluorescencijos spektro maksimumo atveju, triptofano fluorescencijos intensyvumo pokyčiai keičiantis baltymo konformacijai yra sunkiai nuspėjami. Pagrindinė to priežastis, jog kai kurie baltymo struktūros elementai – tam tikros amino rūgščių šoninės grupės ir net pats peptidinis ryšys efektyviai gesina triptofano fluorescenciją (Chen and Barkley, 1998) (Yuan et al., 1998). Jeigu natyvioje baltymo konformacijoje fluorescencija nėra efektyviai gesinama, baltymui išsivyniojus gali būti stebimas fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas dėl tirpiklio gesinimo. Tačiau esant situacijai kuomet fluorescencija stipriai gesinama natyvioje struktūroje, tirpiklio gesinimas gali būti silpnesnis ir baltymui išsivyniojant fluorescencijos

intensyvumas padidės.

1.3.2. Išoriniai fluoroforai

Baltymų išsivyniojimo tyrimams be vidinės fluorescencijos taip pat gali būti naudojami ir fluorescentiniai dažai arba zondai. Vienas iš jų yra 8-anilinaftalen-1-sulfoninė rūgštis (ANS) pavaizduota 3-ajame paveiksle. Dar 1954 pastebėta, jog į vandeninį šio junginio tirpalą pridėjus baltymo – jaučio serumo albumino, ANS fluorescensija smarkiai padidėja (Weber and Laurence, 1954). Nuo to laiko ANS plačiai naudotas baltymų bei membranų tyrimams kaip fluorescentinis zondas (Kane and Bernlohr, 1996; Povarova et al., 2010; Slavik et al., 1982)



3 pav. 8-anilinaftalen-1-sulfoninė rūgštis.

ANS fluorescencijos kvantinė išeiga priklauso nuo aplinkos poliškumo. ANS fluorescencija yra gerai gesinama vandens molekulių, o fluorescencijos intensyvumas didžiausias, kuomet ANS molekulė paslėpta nuo vandens baltymo hidrofobinėje kišenėje (Slavik, 1982). ANS molekulė prie baltymo prisijungia specifinėse vietose su atitinkama stochiometrija. Panašu jog ANS prisijungimą pirmiausia įtakoja joninė sąveika su baltymo amino rūgščių katijoninėmis grupėmis. Tačiau ANS molekulės didžioji dalis yra hidrofobinė, todėl ideali ANS prisijungimo vieta turi turėti katijoninę grupę esančią baltymo viduje su kuria ANS molekulės sulfonato grupė sudaro joninį ryšį, o likusi dalis paslepiama baltymo hidrofobinėje kišenėje (Matulis and Lovrien, 1998). Taip prisijungusi ANS molekulė baltymui esant natyvioje konformacijoje dažniausiai yra paslėpta nuo vandens, o baltymui išsivyniojant yra atveriamas. Tai leidžia ANS fluorescencijos pokyčius susieti su baltymo konformacijos pokyčiais.

1.4. Branduolių magnetinio rezonanso tyrimai

Baltymai yra dinaminės struktūros, jiems būdingi įvairūs konformaciniai persitvarkymai atliekant savo funkciją, prisijungiant ligandus, katalizuojant cheminę reakciją ir

t.t. Dėl šios priežasties yra svarbu stebėti baltymus jų dinaminėje būsenoje t.y. tirpale. Labiausiai paplitęs baltymų struktūros nustatymo metodas yra rentgenostruktūrinė kristalografija. Tačiau šis metodas leidžia nustatyti tik kristalines baltymo struktūras, taip neįmanoma matyti baltymo dinaminėje būsenoje. Tačiau baltymo dinaminę būseną galima stebėti branduolių magnetinio rezonanso (BMR) metodu. Šiame skyriuje bus nagrinėjamas šio metodo veikimo principas, variantai ir pritaikymas baltymų tyrimams.

1.4.1. BMR veikimo principas

BMR veikimas paremtas magnetiškai aktyvių branduolių energijos sugertimi magnetiniame lauke. Skirtingoje aplinkoje esantys branduoliai pasižymės skirtinga sugertimi, šių signalų visuma ir sudaro vienmatį BMR spektrą.

Protonai ir branduoliai pasižymi vidiniu kampiniu momentu vadinamu sukiniu \vec{S} iš jų kyla magnetinio sukinio dipolio momentas - supaprastintai magnetinis momentas $\vec{\mu}$. Šių vektorių sumos yra branduolio kampinis momentas ir magnetinio sukinio dipolio momentas. Branduolio kampinis momentas yra kvantuotas dydis ir aprašomas lygtimi (4)

$$\vec{S} = \hbar(\sqrt{I(I+1)}), \quad (4)$$

kur \hbar yra redukuotoji Planko konstanta, I – branduolio sukinio kvantinis skaičius, kartais supaprastintai vadinamas tiesiog branduolio sukiniu. Branduolio sukinio reikšmės gali būti tik $\frac{n}{2}$. Branduolio magnetinio dipolio sukinio momentą su branduolio sukiniu tiesiogiai sieja branduolio gyromagnetinis santykis γ :

$$\vec{\mu} = \gamma\vec{S} \quad (5)$$

Kuo didesnis branduolio gyromagnetinis santykis tuo jautresnis to branduolio BMR eksperimentas. Visi branduoliai kurių sukinyš nėra lygus nuliui yra magnetiškai aktyvūs ir gali būti stebimi BMR pagalba. Sukinyš lygus nuliui jei branduolys turi lyginį protonų ir neutronų skaičių. Magnetinis momentas $\vec{\mu}$ supaprastintai gali būti laikomas mažu magnetu, kuris reaguos į sukurtą išorinį magnetinį lauką B_0 . Branduolio sukinio \vec{S} ir magnetinio momento projekcijos išoriniame magnetiniame lauke B_0 kuris atitinka Z ašį (4 pav.), jo atžvilgiu gali būti aprašoma dydžiais S_z ir μ_z išreiškiamais lygtimis (6), (7):

$$S_z = \hbar m_I \quad (6)$$

$$\mu_z = \gamma \hbar m_I, \quad (7)$$

kur m_I yra magnetinis kvantinis skaičius. m_I gali įgauti reikšmes nuo $-I$ iki I , pavyzdžiui protonas H kurio I lygus $\frac{1}{2}$ gali turėti dvi m_I reikšmes $-\frac{1}{2}$ ir $-\frac{1}{2}$. Tokiu atveju projekcija S_z gali turėti tik dvi orientacijas: lygiagrečią ir priešingą Z ašiai. Nesant išoriniam

magnetiniam laukui šios padėtys yra energetiškai ekvivalenčios, tačiau esant išoriniam magnetiniam laukui jos atsiskiria į du energetinius lygmenis kurie skiriasi energijos kvantu ΔE . ΔE gali būti apskaičiuojama naudojantis Hamiltono operatoriumi (8):

$$\hat{H} = -\gamma \hbar \hat{I} B_0 \quad (8)$$

Gaunama, jog ΔE priklauso nuo magnetinio lauko stiprumo ir magnetinio momento projekcijos vertės:

$$\Delta E = 2\mu_z B_0 = -\gamma \hbar B_0 \quad (9)$$

Kadangi energija gali būti išreikšta kaip vienas kvantas:

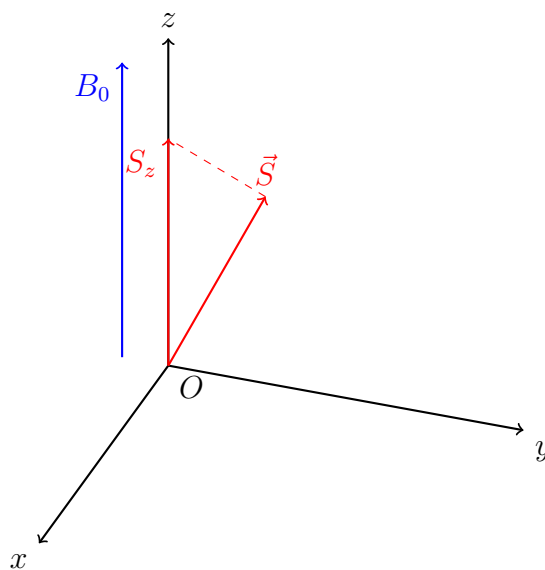
$$\Delta E = h\nu, \quad (10)$$

iš lygčių (10) ir (9) galime išreikšti bangos dažnį reikalingą sužaditimui:

$$h\nu_0 = -\gamma \hbar B_0 \quad (11)$$

$$\nu_0 = \frac{-\gamma}{2\pi} B_0. \quad (12)$$

Ši išraiška yra fundamentali rezonanso sąlyga. Branduolys kurio sukiny yra $\frac{1}{2}$, patirs vieną kvantuotą tranziciją iš žemesnio energetinio lygmens į aukštesnį, kad šis procesas vyktų branduolį reikia paveikti $h\nu_0$ dažnio elektromagnetine banga. Šis dažnis vadinamas Larmoro dažniu. Jo vertė priklausys nuo išorinio magnetinio lauko ir branduolio prigimties.



4 pav. Sukinio ir išorinio magnetinio lauko sąryšis erdvėje.

1.4.2. Cheminis poslinkis

Branduolių sukiniai magnetiniame lauke nėra izoliuoti. Jie sąveikauja su aplinkoje esančiais kitais branduoliais ir elektronais. Ši sąveika gali vykti tiek per cheminius ryšius, tiek per erdvę. Ši sąveika lemia cheminio poslinkio reiškinių. Tai vienas pagrindinių faktorių įtakojančių BMR spektro formą, todėl visuose BMR tyrimuose cheminis poslinkis yra vienas pagrindinių dėmesio objektų.

Cheminis poslinkis δ gali būti apibrėžiamas rezonansinių linijų poslinkiu BMR spektre. Šio poslinkio pagrindas yra vietinis magnetinis laukas veikiantis stebimą branduolį. Elektronai cirkuliuojantys išoriniame magnetiniame lauke B_0 sudaro mažą vietinį magnetinį lauką B_{viet} , kuris ekranuoja išorinį magnetinį lauką. Vietinis magnetinis laukas veikdamas stebimą branduolį keičia jo Larmoro dažnį. Šis ekranavimas išreiškiamas ekranavimo konstanta σ :

$$B_{viet} = (1 - \sigma)B_0, \quad (13)$$

Ekranavimo konstanta su cheminiu poslinkiu susieta lygtimi (14):

$$\delta = -\sigma. \quad (14)$$

Tam, kad panaikinti priklausomybę nuo išorinio magnetinio lauko, cheminis poslinkis dažniausiai išreiškiamas milijoninėmis dalimis standarto atžvilgiu. Išreiškiamą lygtimi (15):

$$\delta = \frac{(\nu_x - \nu_{standartas}) \times 10^6}{\nu_{standartas}}. \quad (15)$$

Standartais gali būti įvairūs junginiai. ^{13}C ir ^1H spektroskopijoje dažniausiai naudojamas tetrametilsilanas (TMS), H_3PO_4 ir CF_3COOH naudojami atitinkamai ^{31}P ir ^{19}F spektrams gauti. BMR spektroskopijoje vietoje protoninių tirpiklių dažniausiai naudojami deuterinti tirpikliai, priešingu atveju tirpiklio spektras nustelbtų mėginio spektrą.

1.4.3. Sukinio-sukinio sąveika

Kitas faktorius įtakojantis BMR spektrą yra sukinio-sukinio sąveika. Sukinio-sukinio sąveika pasireiškia per cheminius ryšius ir per erdvę, tačiau per erdvę pasireiškianti sąveika tirpaluose išnyksta. Kadangi branduoliai taip pat sukuria mažą elektromagnetinį lauką sąveikaujantys branduoliai įtakoja išorinį magnetinį lauką B_0 vienas kitam. Kaip pavyzdys paimamas mėginys kuriame egzistuoja du sąveikaujantys protonai A ir B pasižymintis skirtingais cheminiais poslinkiais. Protono magnetinis momentas išorinio lauko atžvilgiu gali turėti dvi padėtis lygiagrečią ir priešingą jam. Lygiagrečios padėties atveju protonas A stiprina išorinį magnetinį lauką B_0 protonui B, priešingos padėties atveju protonas A silpnina B_0 protonui B. Lygiai taip pat protonas B veikia protoną A. Taip priklausomai nuo padėties protonų cheminis poslinkis pasikeičia į vieną ar kitą pusę. Šis

efektas yra mažas palyginus su elektronų ekranavimu, tačiau spektre vis tiek stebimas. Šiuo atveju vietoje dviejų atskirų protonų smailių BMR spektre matomos dvi sudvigubėjusios smailės vadinamos dupletais. Ši sąveika charakterizuojama sukinio-sukinio sąveikos konstanta j_{AB} . Tai yra intervalas tarp dviejų branduolio smailių. j_{AB} vertės priklauso nuo branduolių magnetinių momentų, ryšių skaičiaus, ilgio, hibridizacijos tipo, pakaitų, elektrinio neigiamumo. Ši sąveika dar vadinama j -sąveika.

1.4.4. Vienmačiai BMR spektrai

Kaip minėta ankščiau BMR signalui gauti reikalinga spinduliuotė, kurios dažnis artimas Larmoro dažniui. Tai gali būti pasiekta pastovios bangos spinduliuote arba radijo dažnio (RD) pulsu. BMR signalo gavimas susideda iš energijos sugerties ir po to sekančio jos išspinduliavimo. RD pulsas iš pradžių sužadina aukšto dažnio juostą, dėl kurios atsiranda osciliuojantis ir nuo laiko priklausomas RD laukas, kuris prisideda prie išorinio magnetinio lauko, visas išorinis magnetinis laukas gali būti išreikštas taip:

$$B_{bendras} = iB_1 + \cos(\omega_{rd}t) + kB_0, \quad (16)$$

kur ω_{rd} yra pulso dažnis, i vienetinis Ox ašies vektorius, o k yra Oz ašies vienetinis vektorius. Sužadinimą pulsu galima įsivaizduoti koordinačių sistemoje kur magnetizacijos vektorius M yra orientuotas Oz ašyje. RD pulsai pakeičia šio vektoriaus orientaciją. RD pulsas turi būti pakankamas, kad paverstų magnetizacijos vektorių reikiamu kampu α . Šis kampas priklauso nuo gyromagnetinio santykio, pulso stiprumo ir trukmės, aprašomas Ernsto taisykle:

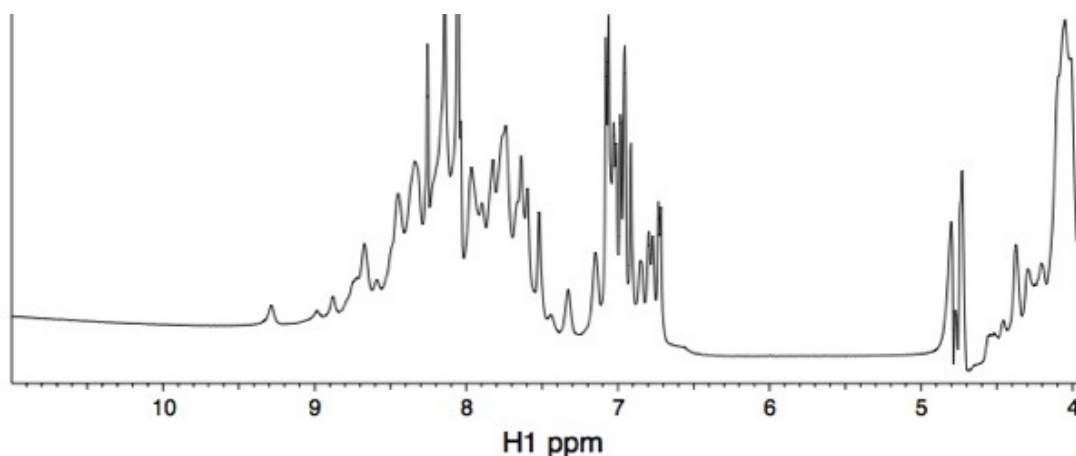
$$\alpha = \gamma B_1 t_p. \quad (17)$$

Kai magnetinis vektorius orientuotas ne Oz ašyje sukuriama elektros srovė. Paveikus 90° pulsu vektorius M bus orientuotas Ox ašyje. Tokiu atveju bus registruojamas maksimalus BMR signalas. Paveikus 180° pulsu vektorius bus orientuotas neigiamoje Oz ašies dalyje, tokiu atveju signalas neregistruojamas. Signalas netrunka amžinai. Jis osciliuoja nykdamas, šis relaksacijos procesas charakterizuojamas relaksacijos laikais: išilginiu – T_1 ir skersiniu – T_2 . T_1 aprašo M_z sugrįžimą į savo pusiausvyrinę vertę. T_2 charakterizuoja M_x ir M_y verčių nykimą. Tai gali būti išreikšta lygtimi (18):

$$M_{(XY)}(t) = M_{(xy)}(0)e^{-\frac{t}{T_2}} \quad (18)$$

Tokiu būdu vyksta vadinamasis laisvas indukcijos gesinimas (Free Induction Decay – FID). Duomenys gauti iš FID išreiškiami kaip funkcija nuo laiko, todėl dažniausiai prieš juos nagrinėjant vykdoma Furje transformacija. Furje transformacija laiko funkciją verčia dažnio funkcija:

$$F(\nu) = \int f(t)e^{-i2\pi\nu t} dt. \quad (19)$$



5 pav. Vienmatis ^1H BMR spektras.

Spektrui gauti mėginys sužadinas daugeliu pulsų, o FID kreivės susumuojamos. Furje transformacija leidžia išreikšti BMR duomenis grafiku vaizduojančiu intensyvumo priklausomybę nuo dažnio. Tai yra paprasčiausias vienmatis (1D) BMR spektras, vienmatis BMR spektras atvaizduotas 5–ajame paveiksle.

1.4.5. Dvimačiai BMR spektrai

Kaip nagrinėta anksčiau vienmatis BMR spektras vaizduojamas kaip intensyvumo priklausomybė nuo dažnio. Dvimačiame (2D) spektre pridedama papildoma dažnio ašis. Šiame skyrelyje bus nagrinėjami 2D BMR spektrų variantai.

Koreliacijos spektroskopija. Paprasčiausias dvimatės spektroskopijos būdas yra j-koreliacijos spektroskopija (COSY). Ja nustatomi vienas su kitu sąveikaujantys sukinių. Eksperimento metu veikiama 90° RD pulsu, tada seka evoliucijos laikas ir veikiama antru 90° RD pulsu, po kurio registruojama osciljuojanti banga. Evoliucijos laikas gali būti keičiamas taip gaunamos dvi dažnio ašys. COSY eksperimento metu smailės išsidėlioja įstrižainėje, t.y. abiejuose dažnių ašyse turi tokią pačią vertę. Už įstrižainės ribų esančios signalų smailės vadinami kryžminiais signalais, jie atitinka sąveikaujančius branduolius. COSY spektras parodo j-sąveiką. Visiškos koreliacijos spektroskopija (TOCSY) yra COSY atmaina. Jos metu stebimi ne tik tiesiogiai sąveikaujantys protonai, bet ir toliau esantys, tačiau vis dar priklausantys tai pačiai sąveikos sistemai protonai. Hetero branduolių koreliacijos spektroskopija (HETCOR) yra koreliacinės spektroskopijos atmaina, kurioje stebima skirtingų branduolių koreliacija.

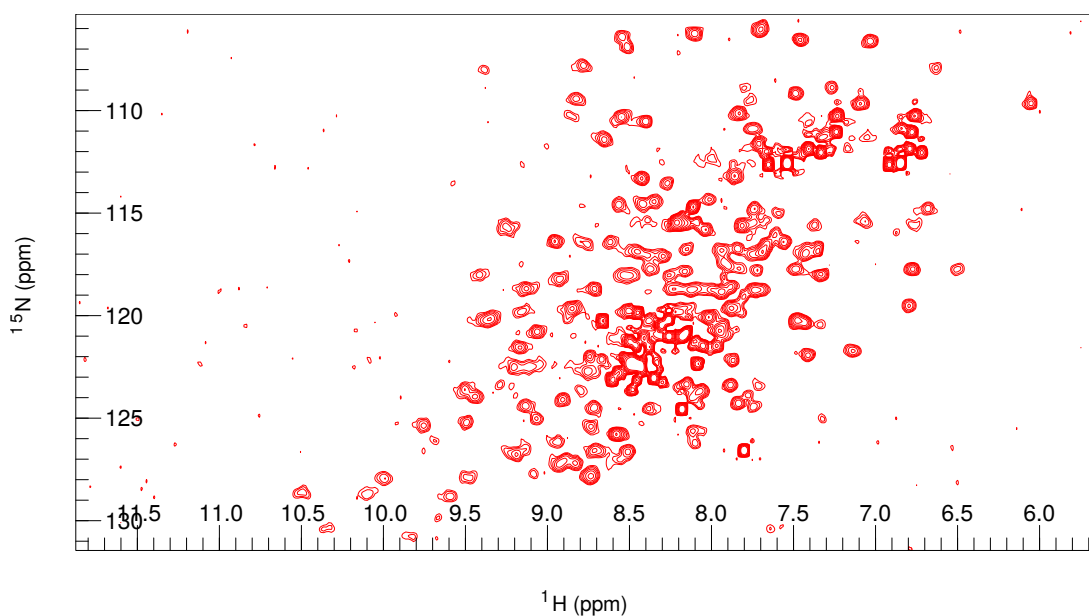
Branduolinis Overhauzerio efektas. Be j-koreliacijos yra ir kitų efektų galinčių perduoti magnetizmą tarp branduolių. Vieno branduolio sužadimas gali sukelti magnetizmą šalia esančiuose branduoliuose per dipolinę sąveiką. Tai vadinama branduoliniu Overhauzerio efektu (NOE). Šis efektas išnaudojamas branduolinio Overhauzerio efekto

spektroskopijoje (NOESY). Šio metodo metu sužadinamas vienas branduolys ir stebima kaip tai keičia su juo sąveikaujančio branduolio signalą. Kaip ir COSY eksperimento metu gaunamas grafikas kurio įstrižainėje išsidėsto branduolių pikai, o pikai už jos ribų atitinka sąveikaujančius branduolius. NOE priklauso nuo atstumo tarp branduolių todėl šiuo metodu galima išmatuoti atstumus tarp sąveikaujančių branduolių. NOESY eksperimentas ypač naudingas makromolekulių konformacijos tyrimuose.

Koherencijos spektroskopija. Kai kurie branduoliai pavyzdžiui ^{15}N dėl savo mažo gyromagnetinio santykio pasižymi mažu jautrumu BMR eksperimentuose. Todėl ieškota būdų kaip padidinti jų jautrumą. Vienas geriausių metodų tam yra heterobranduolių vietinio kvanto koherencijos spektroskopija (HSQC). Šis metodas pagrįstas magnetizmo pernešimu iš protono į mažiau jautrų heterobranduolį (Bodenhausen and Ruben, 1980). HSQC metodu gaunamas grafikas kuriame viena smailė atitinka vieną vandenilio ir heterobranduolio sąveiką. Šis metodas gerai pritaikomas baltymų tyrimams. Šiems tyrimams naudojami baltymai su žymėtais azoto atomais, t.y. jų sudėtyje vietoj ^{14}N azoto atomų yra ^{15}N azoto izotopai. Kiekviena baltymo aminorūgštis išskyrus proliną turi vieną amidinį protoną sujungtą su amidiniu azotu. HSQC spektre stebima koreliacija tarp amidinių azoto ir vandenilio branduolių, taip kiekviena amino rūgštis turi savo smailę.

1.4.6. BMR panaudojimas baltymų tyrimams

Baltymų struktūros BMR metodu. Ilgą laiką Rentgeno spindulių kristalografija buvo vienintelis metodas leidžiantis nustatyti baltymo struktūrą. Iki tol kol 1984 metais mokslininkų grupė Ciūriche, Šveicarijoje išsprendė jaučio sėklos proteazės slopiklio struktūrą (Williamson et al., 1985). Tai buvo pirmoji baltymo struktūra, kuri buvo išspręsta panaudojus BMR metodą. Nuo to laiko šis metodas išpopuliarėjo ir tapo gera alternatyva Rentgeno spindulių kristalografijai, kadangi baltymo struktūra nustatoma ne kristalinėje, o dinaminėje būsenoje. Iki dabar baltymų struktūros nustatymui dažniausiai naudojamas dar 1986 metais publikuotas standartinis protokolas. Turi būti paruošiamas itin didelės koncentracijos tirpalas, rekomenduojama koncentracija yra 1 mM, šis reikalavimas yra vienas pagrindinių BMR metodo apribojimų daugeliui mažiau tirpių baltymų. Toliau struktūros nustatymui svarbiausias yra NOESY eksperimentas. Jis leidžia išmatuoti atstumus tarp protonų. Kuo didesnis baltymas tuo tampa sunkiau priskirti atskirus rezonansus priklausančius konkrečioms aminorūgštims. Šiai problemai išspręsti baltymai dažnai žymimi ^{13}C , ^{15}N ir kartais net ^2H izotopais. Tai padaroma auginant baltymą *E.coli* bakterijose minimalioje terpėje naudojant izotopais žymėtus reagentus. Žymėjimas leidžia naudoti heterobranduolinius metodus. Gaunami 3D ar net 4D spektrais kuriuose signalo smailės atidedamos į ^{13}C ir ^{15}N ašis. Gavus reikiamus BMR spektrus reikia priskirti rezonansus atitinkamoms amino rūgštims (baltymo 2D BMR spektras pavaizduotas 6–ajame



6 pav. Dvimatis ^{15}N atomais žymėto baltymo spektras. Kiekviena spektre matoma smailė atitinka vienos aminorūgšties rezonansą.

paveiksle). Tai atliekama nuoseklaus priskyrimo metodu (Wagner and Wüthrich, 1982). Unikalus dviejų ar kelių amino rūgščių segmentai identifikuojami BMR eksperimentu ir priskiriami konkrečioms amino rūgštims lyginant duomenis su cheminiu būdu nustatyta baltymo amino rūgščių seka. Sąveikos tarp šalia esančių amino rūgščių protonų gali nustatomos pagal branduolinius Overhauzerio efektus (NOE). Mažiems baltymams šios sąveikos gali būti įvertintos vien iš ^1H spektro, tačiau didesniems reikia pasitelkti 3D spektrus. Baltymo struktūros nustatyme svarbiausi yra NOE viršutinio atstumo suvaržymai. Norint gauti aukštos rezoliucijos struktūrą reikia gauti kuo daugiau NOE konformacinių suvaržymų. Tai atliekama keletu ciklų. Gautame 2D NOESY spektre su priskyrimais, ieškoma signalų už įstrižainės kurioje sužymėti visi protonai ribų. Šie signalai atitinka dviejų protonų konformacinę sąveiką. Brėžiami statmenys palei ašis į įstrižainę, du signalai kuriuos kerta statmenys priklauso sąveikaujantiems protonams. Gavus maksimalų skaičių konformacinių suvaržymų gali būti skaičiuojama baltymo struktūra.

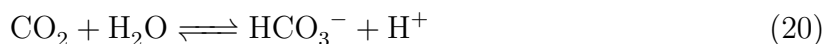
BMR panaudojimas vaistų paieškoje. BMR metodas yra puikiai pritaikomas vaistų paieškoje. Didelis šio metodo privalumas yra galimybė nustatyti tiek didelio tiek mažo giminingumo ligandus (Pellecchia et al., 2002). Didelio našumo vaistų paieška dažniausiai atliekama stebint ligando BMR signalą. Šiuo metodu reikia santykinai mažiau makromolekulės, taip pat šis metodas leidžia iš karto patikrinti junginių mišinį. Mažamolekulinės medžiagos – ligandai turi gerokai ilgesnį išilginį relaksacijos laiką T_2 . Sąveikaujančių ligandų relaksacijos laikai tampa panašūs į makromolekulės. Tai gali būti išnaudojama registruojant ir lyginant ligandų mišinio ir ligando mišinio su taikiniu ^1H spektrus (Hajduk et al., 1997). Registruojamas tik ilgesnis T_2 . Tokiu atveju pridėjus tai-

kinio besijungiančių ligandų signalai išnyksta iš spektro, taip atrenkami ir identifikuojami besijungiantys ligandai. Susijungimas su makromolekule taip pat keičia ir ligando išilginės relaksacijos laiką – T_1 . Tokiu būdu atsiranda neigiami NOE ligando spektruose esant taikinio. Taigi ligando jungimasis gali būti fiksuojamas registruojant jo $[^1\text{H}, ^1\text{H}]$ NOESY spektrą. Jeigu ligandas nesijungia, fiksuojami maži teigiami NOE. Jeigu ligandas jungiasi gali būti stebimi neigiami NOE.

BMR metodas vaistų kūrime. BMR metodas taip pat puikiai panaudojamas struktūros – aktyvumo sąryšio (Structure-Activity Relationship[SAR]) tyrimuose. Pirmoje tokių tyrimų stadijoje atrenkami prie taikinio besijungiantys mažamolekuliniai ligandai. Tai atliekama stebint taikinio-baltymo ^{15}N -HSQC spektro pokyčius pridėjus ligando. Toks tyrimas leidžia ne tik nustatyti besijungiančius ligandus, bet ir nustatyti kurioje baltymo vietoje jis jungiasi. Sekančiame žingsnyje tiriami besijungiančio ligando analogai, atrenkamas optimaliausiai besijungiantis junginys. Toliau ieškoma ligando besijungiančio kitoje baltymo vietoje atliekant naują ^{15}N -HSQC eksperimentų seriją ar analizuojant prieš tai atliktą. Antrasis ligandas taip pat optimizuojamas. Turint du ligandus nustatoma jų lokacija ir orientacija tretinėje baltymo struktūroje. Tai padaroma BMR arba Rentgeno spindulių kristalografijos pagalba. Galiausiai atsižvelgiant į jų lokaciją ir orientaciją ligandai sujungiami siekiant sukurti vieną stipriai besijungiantį ligandą (Shuker et al., 1996). Kadangi abu ligandai optimizuojami dar prieš juos sujungiant šiam metodui reikia sintetinti gerokai mažiau junginių, nei panašiuose metoduose pavyzdžiui kombinatorinėje chemijoje. Tačiau šis metodas tinka tik pakankamai mažiems baltymams, taip pat reikalingi dideli baltymo kiekiai. Tai yra pagrindiniai šio metodo apribojimai.

1.5. Karboanhidrazės

Karboanhidrazės tai šeima izofermentų katalizuojančių grįžtamą anglies dioksido hidratacijos reakciją:



Karboanhidrazės yra metalofermentai – jų aktyviajame centre trys histidino šoninės grupės koordinuoja Zn^{2+} joną. Šis jonas koordinaciniu ryšiu yra prisijungęs vandens molekulę. Koordinuota vandens molekulė lengvai atiduoda vieną savo protoną virsdama OH^- jonu. Būtent ši karboanhidrazės forma su hidroksido jonu yra aktyvi. Šis stiprus nukleofilas atakuoja šalia esančioje hidrofobinėje kišenėje prisijungusią anglies dioksido molekulę. Susidariusi, prie cinko koordinuota, bikarbonato molekulė pakeičiama vandeniu ir išlaisvinama į tirpalą. Lieka neaktyvi fermento forma, aktyvioji fermento forma regeneruojama pašalinant protoną iš aktyviojo centro per šonines grupes ar tirpale esančias buferines molekules. Aktyviosios formos regeneravimas yra reakcijos greitį limituojanti stadija (Supuran, 2008).

1.5.1. Karboanhidrazių izoformos

Šiuo metu, žmogaus organizme identifikuota 15 karboanhidrazės izoformų. Dvylika iš jų turi katalizinį aktyvumą. Aktyviosios karboanhidrazės izoformos skiriasi viena nuo kitos tiek kataliziniu aktyvumu, tiek ir lokalizacija audiniuose. Jos gali būti citozolinės (hCA I-III, VII, XIII) su membranom susietos (hCA IV, IX, XII, XIV), būti mitochondrijose (hCA VA VB), sekretuojama (hCA VI) (Aggarwal et al., 2013). Šiame darbe tirtos trys žmogaus karboanhidrazės izoformos - CAI, CAII, CAXIII.

Pirmą kartą karboanhidrazės fermentas atrastas dar 1932 eritrocituose iš karvių kraujo (Brinkman et al., 1932). Tai buvo CAII karboanhidrazės izoforma. Apie kitas karboanhidrazės izoformas nebuvo žinoma iki pat 1961, kuomet buvo atskirta antroji, mažiau aktyvi eritrocituose esanti karboanhidrazės izoforma – CAI (NYMAN, 1961), tais laikais ji vadinta karboanhidraze B. CAII izoforma žmogaus organizme dalyvauja kvėpavimo sistemoje, inkstų veikloje, regėjime ir daugelyje kitų svarbių organizmo funkcijų (Maren, 1967). CAI izoformos funkcijos vis dar nėra iki galo aiškios (Supuran et al., 2004). CA XIII izoforma buvo identifikuota tik 2004 metais (Lehtonen et al., 2004). CA XIII yra aptinkama užkrūčio liaukoje, inkstuose, plonosiose žarnosose ir seilių liaukose (Lehtonen et al., 2004). Tačiau manoma jog svarbiausia jos lokalizacijos vieta – žmogaus reprodukciniai organai. CAXIII yra aptinkama visose spermatozoidų vystymosi stadijose taip pat moteriškuose lytiniuose organuose, manoma jog CAXIII padeda susidaryti bikarbonatui kuris palaiko spermatozoidų judrumą (Supuran et al., 2010).

1.5.2. Karboanhidrazių ir vėžio sąryšis

Vienas pagrindinių vėžinių ląstelių požymių yra pasikeitęs jų rūgštingumas. Vėžinės ląstelės pasižymi didesniu vidiniu pH ir mažesniu išoriniu pH (Gil et al., 1994). Padidėjęs išorinis rūgštingumas padeda vėžinėms ląstelėms augti ir plisti. Tokios pH pusiausvyros išlaikyme bene svarbiausias yra karboanhidrazės IX vaidmuo. Pagrindinis išorinio rūgštingumo šaltinis yra ląstelės pagamintas anglies dvideginis. Tam, kad rūgštis būtų efektyviai įkalinta ląstelės išorėje CO₂ turi būti efektyviai hidratuojamas už ląstelės ribų. Tai sėkmingai atlieka ląstelės membranos išorėje prisitvirtinusi CAIX (Swietach et al., 2007). Taip pat parodyta, kad CAIX yra adhezijos baltymas kuris gali padėti vėžinėms ląstelėms prisijungti prie neadhezinio paviršiaus taip leisdamas joms plisti (Zavada et al., 2000). Vėžinės ląstelės taip pat pasižymi padidėjusia CAXII raiška. Be to CAXII raiška gali būti padidinama sukeltiant hipoksijos sąlygas. Tai rodo, jog CAXII taip pat turi svarbų vaidmenį vėžinėse ląstelėse. Tačiau iki galo CAXII reikšmė vėžiniuose susirgimuose vis dar nėra išaiškinta (Zavada et al., 2000).

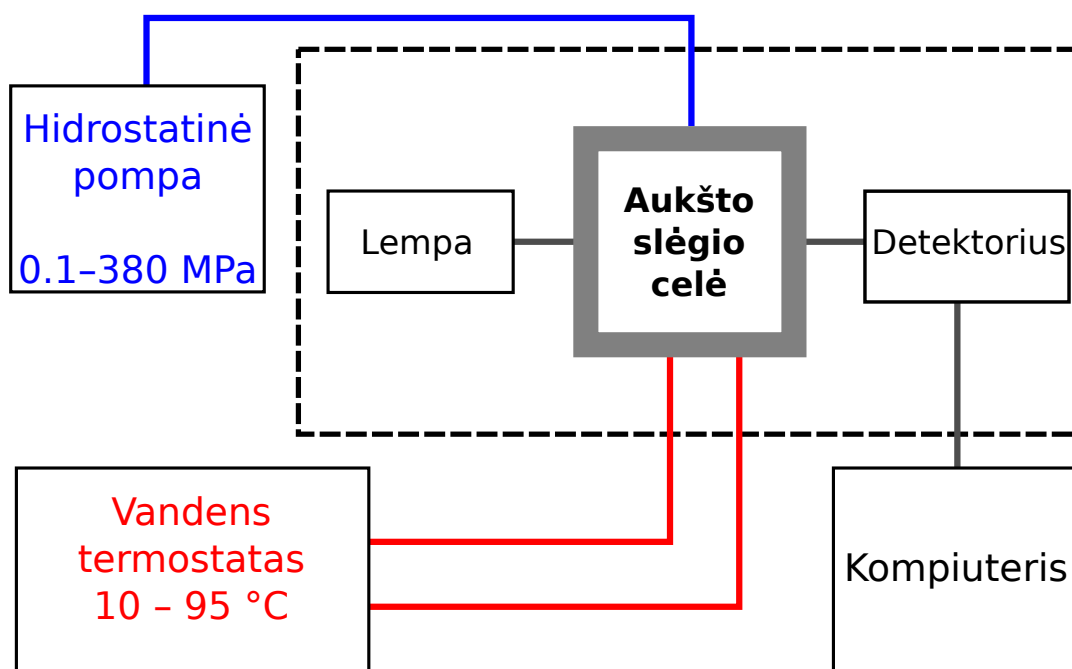
1.6. HSP90

Karščio šoko baltymas 90 (HSP90) kaip ir kiti šios šeimos baltymai pasižymi šaperono savybėmis t.y. padeda baltymams įgauti natyvią konformaciją, saugo nuo nespecifinės agregacijos (Wiech et al., 1992). HSP90 yra lankstus dimeras. Kiekvienas jo monomeras sudarytas iš trijų domenų. N-domenas sujungtas ilgu jungtuku su M-domenu, kuris susietas su dimerizacijos – C-domenu. N-domene yra gili kišenė kurioje prisijungia adenozintrifosfato (ATP) molekulė (Wandinger et al., 2008). Pastebėta jog vėžinės ląstelės pasižymi padidinta HSP90 ekspresija. Manoma, jog HSP90 padeda vėžinėms ląstelėms išgyventi keletose lygmenų. HSP90 saugo vėžinę ląstelę nuo nepalankių fiziologinių sąlygų (rūgštingumo, hipoksijos, maistinių medžiagų trūkumo). Taip pat HSP90 gali padėti vėžinei ląstelei išvengti apoptozės. Padidėjus HSP90 raiška taip pat gali leisti kai kuriems neteisingai susivyniojusiems baltymams nebūti degraduojamiems (Whitesell and Lindquist, 2005). Dėl šių priežasčių HSP90 yra potencialus priešvėžinių vaistų taikynys. HSP90 yra slopinamas natūralių slopiklių – radisikolio ir geldanamicino. Taip pat sintetiniai ir optimizuojami įvairūs sintetiniai slopikliai (Neckers and Workman, 2012).

2. Medžiagos ir metodai

2.1. Fluorescencinė spektroskopija aukštame slėgyje

Šiame darbe naudotas „ISS PC1“ spektrofluorimetras su aukšto slėgio moduliū. Supaprastinta aparato schema pavaizduota 7-ajame paveiksle. Eksperimento metu mėginys patalpinamas į kvarcinę 0,5 ml tūrio kiuvetę, kuri patalpinama į slėginę kamerą. Mechanine pompa sukuriamas hidrostatinis slėgis iki 380 MPa. Prijungta kaitinimo vonelė palaiko pastovią temperatūrą, tarp 10 °C ir 80 °C. Mėginys sužadinamas ksenono arkine lempa reikiamo bangos ilgio šviesa, o detektoriumi registruojamas fluorescencijos spektras arba norimo bangos ilgio šviesos intensyvumas. Šiuo spektrofotometru galima sužadinti ir registruoti šviesą kurios bangos ilgis tarp 200 nm ir 900 nm.



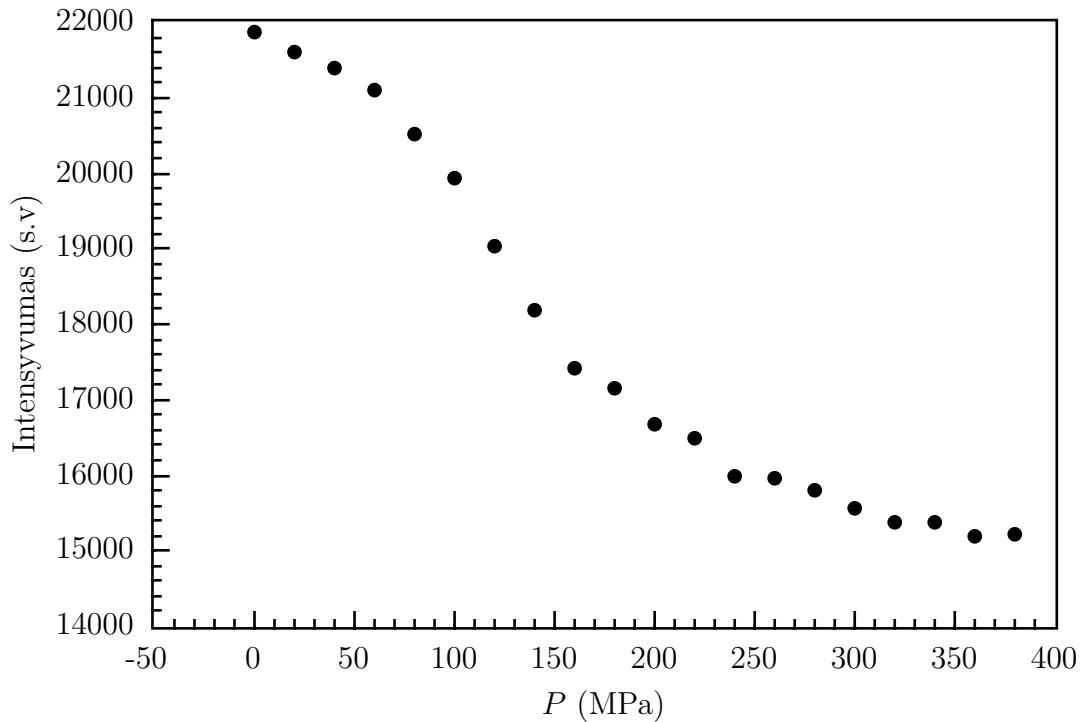
7 pav. Eksperimente naudojamos įrangos principinė schema.

2.1.1. Baltymų denatūracijos tūrio nustatymas

Šiame darbe baltymų denatūracija slėgiu buvo nustatoma stebint jų fluorescenciją. Tipinio eksperimento, kuriame registruota vidinė triptofano fluorescencija, duomenys pavaizduoti 8-ajame paveiksle .

Tariant, jog baltymo išsivyniojimo procesas turi dvi stadijas – natyvią (N) ir išvyniotą (U), stebima fluorescencija gali būti aprašoma lygtimi –

$$f = f_N + \frac{f_U - f_N}{1 + e^{\Delta U G / RT}}, \quad (21)$$



8 pav. Žmogaus serumo albumino denatūracijos eksperimentas. Stebimas 336 nm bangos ilgio fluorescencijos intensyvumas, sužadinus 295 nm bangos ilgio šviesa. Eksperimentas atliktas esant 1 M GndHCl.

kur f_N – natyvaus baltymo fluorescenciją aprašantis dydis (tai gali būti fluorescencijos intensyvumas, fluorescencijos spektro maksimumą atitinkantis bangos ilgis, spektro masių centras ir pan.) , f_I – išvynioto baltymo fluorescenciją aprašantis dydis, $\Delta_I G$ – baltymo išvyniojimo Gibso energija. Išvyniojimo Gibso energija yra:

$$\Delta_U G = G_U - G_N \quad (22)$$

Pilnas Gibso energijos diferencialas yra:

$$d(\Delta_U G) = -\Delta S dT + \Delta V dP \quad (23)$$

Jeigu temperatūra pastovi, lygtis (23) supaprastėja:

$$d(\Delta_U G) = \Delta V dP \quad (24)$$

Integruojant (24)-ąją lygtį gauname Gibso energijos priklausomybę nuo slėgio:

$$\Delta_U G = \Delta_U G_0 + \Delta V_0(P - P_0) + \frac{\Delta\beta}{2}(P - P_0)^2. \quad (25)$$

Lygtyje (25) $\Delta\beta$ yra suspaudžiamumo konstanta, kuri matematiškai yra dalinė tūrio iš-

vestinė pagal slėgį esant pastoviai temperatūrai:

$$\Delta\beta = \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (26)$$

Įstatę (25)-ą lygtį į (21)-ą gauname matematinį modelį apskaičiuoti laisvosios energijos, tūrio ir suspaudžiamumo pokyčius atsirandančius dėl baltymo išsivyniojimo:

$$f = f_N + \frac{f_U - f_N}{1 + e^{(\Delta_U G_0 + \Delta V_0(P-P_0) + \frac{\Delta\beta}{2}(P-P_0)^2)/RT}}. \quad (27)$$

2.1.2. Slėginio poslinkio metodas

Baltymų išvyniojimas aukštame slėgyje gali būti panaudotas ir nustatant tūrio pokytį, atsirandantį dėl ligando prisijungimo. Tai termodinaminė sąveikos charakteristika, savo svarba prilyginama sąveikos entalpijai (Kauzmann, 1987). Tačiau dėl eksperimentų sudėtingumo ši charakteristika žymiai mažiau naudojama ir tyrinėjama.

Slėginio poslinkio metodas išnaudoja baltymo stabiliumo kitimą jam sąveikaujant su ligandu t.y. prisijungus ligandui baltymas yra atsparesnis denatūracijai (nors yra atvejų kuomet ligandas destabilizuoja baltymą). Tai aprašoma pusiausvyros lygtimi



kur $[U]$ - išsivyniojusio baltymo koncentracija, $[L]$ - laisvo ligando koncentracija, $[N]$ - natyvaus baltymo koncentracija, $[NL]$ - baltymo-ligando komplekso koncentracija, K_U - išsivyniojimo pusiausvyros konstanta, K_b - ligando jungimosi konstanta. Daroma prielaida jog egzistuoja tik dvi baltymo konformacijos - natyvi ir išsivyniojusi, taip pat, kad ligandas jungiasi tik prie natyvios konformacijos baltymo, todėl išsivyniojimas reikalauja baltymo-ligando komplekso disociacijos. Taigi iš lygties (28), galime išreikšti ligando jungimosi ir baltymo išsivyniojimo konstantas:

$$K_b = \frac{[NL]}{[N][L]} \quad (29)$$

$$K_U = \frac{[U][L]}{[N][L]} = \frac{[U]}{[N]} \quad (30)$$

Taip pat iš masės tvermės dėsnių gali būti išreikštos ligando ir baltymo visuminės koncentracijos:

$$L_t = [L] + [NL] \quad (31)$$

$$P_t = [N] + [NL] + [U] \quad (32)$$

Iš lygties (29) išsireiškus $[L]$ ir išraišką įstačius į lygtį (31) gaunama:

$$L_t = \frac{[NL]}{K_b[N]} + [NL] = [NL] \left(\frac{1}{K_b[N]} \right) \quad (33)$$

Iš lygčių (32) ir (30), galima gauti $[NL]$ išraišką su vienu nežinomuoju $[U]$:

$$[NL] = P_t - [N] - [U] = P_t - \frac{[U]}{K_u} - [U] \quad (34)$$

Įstačius lygtį (34) į lygtį (33) gaunama:

$$L_t = \left(P_t - \frac{[U]}{K_u} - [U] \right) \left(\frac{K_u}{[U]K_b} + 1 \right) \quad (35)$$

Baltymo lydymosi slėgio P_m taške pusė viso baltymo yra išsivyniojusi t.y. $[U] = \frac{P_t}{2}$. Todėl lygtis (35) supaprastėja:

$$L_t = \left(P_t - \frac{P_t}{2K_u} - \frac{P_t}{2} \right) \left(\frac{2K_u}{P_t K_b} + 1 \right) = \left(\frac{P_t}{2} - \frac{P_t}{2K_u} \right) \left(\frac{2K_u}{P_t K_b} + 1 \right) \quad (36)$$

Iš šios lygties pirmųjų skliaustų iškelę $\frac{P_t}{2K_u}$ narį į antruosius gauname galutinę bendros lignado koncentracijos reikalingos pakelti baltymo lydymosi slėgį P_m išraišką:

$$L_t = (K_u - 1) \left(\frac{P_t}{2K_u} + \frac{1}{K_b} \right), \quad (37)$$

Baltymo išsivyniojimo pusiausvyros konstantą K_u , su slėgiu galime susieti pasinaudoję lygtimi (25)

$$K_u = e^{-\Delta_U G/RT} = e^{-(\Delta_U G_0 + \Delta_U V_0(P_m - P_0))}, \quad (38)$$

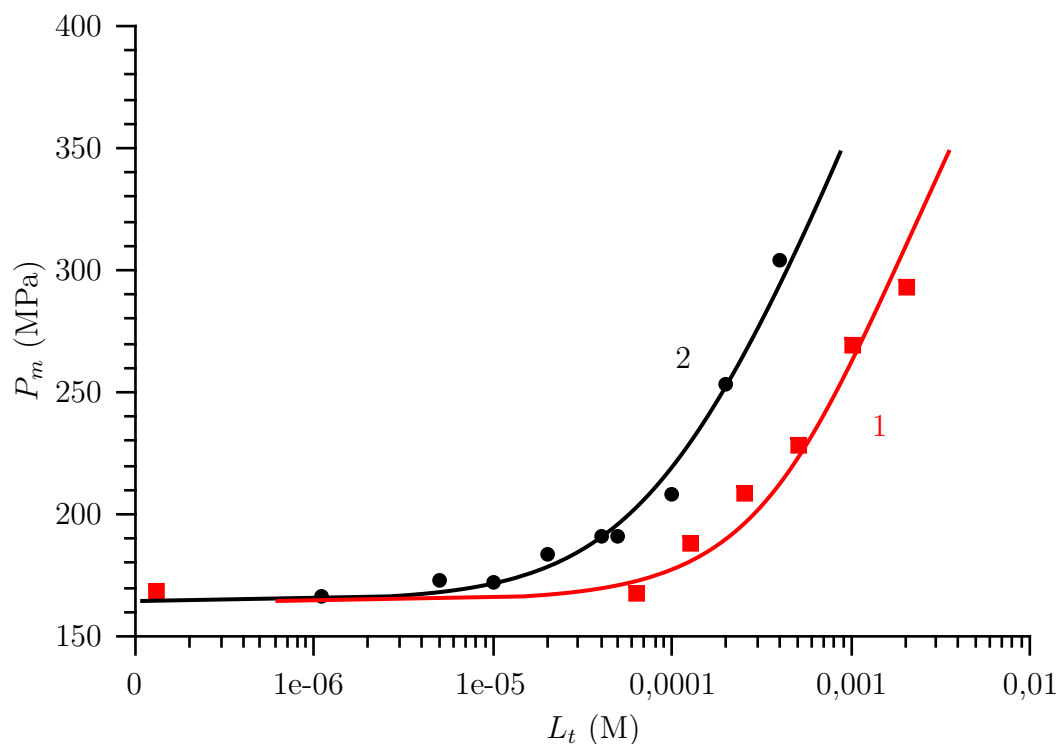
Ligando prisijungimo pusiausvyros konstanta išreiškiamą (25) lygtyje išsivyniojimo Gibso energiją, tūrį ir suspaudžiamumą pakeitus atitinkamais ligando prisijungimo parametrais.

$$K_b = e^{-\Delta_b G/RT} = e^{-(\Delta_b G_0 + \Delta V_b(P_m - P_0))} \quad (39)$$

Lygtyse (38) ir (39) paprastumo dėlei apsiribojama tiesiniu slėgio nariu Gibso energijos išraiškoje. Atlikus keletą eksperimentų naudojant skirtingas ligando ir pastovią baltymo koncentracijas, gaunama dozavimo kreivė pavaizduota 9-ajame paveiksle kuriai pritaikius modelį aprašytą lygtimis (37), (38) ir (39) galime apskaičiuoti baltymo-ligando jungimosi sąlygotą tūrio pokytį – V_b , dar vadinamą reakcijos tūriu ar tiesiog jungimosi tūriu.

2.2. BMR eksperimentai

BMR eksperimentai buvo atliekami registruojant ^{15}N izotopu žymėto baltymo ^{15}N - ^1H HSQC spektrus. Eksperimentams buvo naudojamas 600 MHz „Bruker” magnetas.



9 pav. Dozavimo kreivės sudarytos naudojant du skirtingus junginius (1) ir (2). Didinant ligando koncentraciją baltymas vis labiau stabilizuojamas prieš slėginę denatūraciją, lydimosi slėgis P_m didėja. Perimta iš (Toleikis et al., 2011).

Kaip standartas buvo naudojamas 4,4-dimetil-4-silanpentano-1-sulfoninė rūgštis. Mėginys ruoštas 10mM HEPES buferyje pH=7,0. Paruoštas mėginys buvo talpinamas specialioje keramikinėje kiuvetėje, sujungtoje su aukšto slėgio hidrostatische pompa. Spektrai registruoti 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 MPa slėgyje. Gauti dvimačiai spektrai analizuoti „CcpNMR” programa. Amidinių grupių cheminiai poslinkiai priskirti pagal (Schwalbe, 2006).

Pusiausvyra tarp dviejų būsenų pasikeitus slėgiui ar pridėjus ligando įvertinama analizuojant smailių atitinkančių aminorūgšties amidinės grupės cheminius poslinkius ^{15}N HSQC spektre. Tarkime aminorūgšties amidinė grupė kinta tarp dviejų stadijų A ir B. Šios stadijos atitinka cheminius poslinkius spektre σ_A ir σ_B . Lėtų mainų atveju pasikeitimo tarp šių dviejų būsenų laikas yra lėtesnis nei BMR signalo fiksavimo laikas. Taigi jeigu tirpale pusiausvyroje egzistuoja abi šios būsenos ^{15}N HSQC spektre stebimi dvi smailės atitinkantys abiejų būsenų cheminius poslinkius. Didinant ligando koncentraciją smailių padėtys nesikeis, keisi tik jų intensyvumai. Esant itin stipriai sąveikai ir ligando pertekliui matomas tik viena smailė, kadangi beveik visos konkrečios aminorūgšties amidinės grupės sąveikauja su ligandu. Lėtieji mainai būdingi stipresnėms sąveikoms. Priešingu atveju jei šis mainų laikas yra greitas (fast exchange) BMR spektro fiksavimo metu molekulė spėja ne kartą pasikeisti tarp šių būsenų, taigi spektre stebima smailė atitinkanti šių dviejų būsenų vidurkį. Smailės padėtis leidžia nustatyti kurios iš šių dviejų būsenų egzistuoja

daugiau. Didinant ligando kiekį pikas slenkasi arčiau susijungusią formą atitinkančio piko. Taip pat yra tarpinis variantas (intermediate exchange). Šiuo atveju stebimas signalo išplitimas tarp dviejų būsenų.

Siekiant analizuoti spektre, dėl aukšto slėgio ar ligando pridėjimo, atsiradusius pokyčius, analizuoti atskirų smalių cheminių poslinkių pokyčiai apskaičiuoti pagal lygtį (40)

$$\Delta\delta = \sqrt{(\delta_{H_x} - \delta_{H_0})^2 + \left(\frac{\gamma_N}{\gamma_H}\right)^2 (\delta_{N_x} - \delta_{N_0})^2}, \quad (40)$$

kur δ_{H_x} ir δ_{N_x} yra cheminiai poslinkiai analizuojamame spektre, δ_{H_0} ir δ_{N_0} – cheminiai poslinkiai palyginamajame spektre, o γ_N ir γ_H yra gyromagnetiniai santykiai.

Atlikus serijas eksperimentų naudojant skirtingas ligando koncentracijas, disociacijos konstanta K_d skaičiuota pritaikius modelį išreikštą lygtimi (41)

$$\Delta\delta = \delta_0 + \frac{(\delta_l - \delta_0) \times (P_t + L_t + Kd) - \sqrt{(L_t + P_t + Kd)^2 - 4L_t C_b}}{2P_t}, \quad (41)$$

kur P_t yra baltymo koncentracija, L_t – ligando koncentracija, δ_l – cheminis poslinkis su ligandu, δ_0 – cheminis poslinkis be ligando.

Apskaičiavus K_d vertes skirtinguose slėgiuose galima apskaičiuoti tūrio pokytį atsiradusį dėl ligando prisijungimo – ΔV_b , tai padaroma naudojantis tiesine lygtimi (42):

$$\Delta G_b = V_b \times P \quad (42)$$

3. Rezultatai ir jų aptarimas

3.1. Karboanhidrazių ir jų sąveikos su slopikliais tyrimas fluorescencijos aukštame slėgyje metodu.

Gausiausia karboanhidrazės slopiklių grupė yra sulfonamidiniai slopikliai. Pagrindinė šių slopiklių dalis yra sulfonamidinė grupė, kuria slopiklis prisijungia prie karboanhidrazės aktyviajame centre esančio cinko atomo. Likusios molekulės dalies struktūra gali sustiprinti ar susilpninti slopiklio prisijungimą prie kurio nors ar visų karboanhidrazės izoformų (Supuran et al., 2003). Karboanhidrazių ir jų slopiklių sąveika yra gerai iširta įvairiais termodinaminiais metodais tokiais kaip izoterminė titravimo kalorimetrija, terminio poslinkio metodas, giminingumo kapiliarinė elektroforezė, apskritiminių dichroizmo spektroskopija, masių spektrometrija ir kt. Karboanhidrazės netgi gali būti laikomos modeline sistema baltymų-lignadų sąveikos tyrimuose (Krishnamurthy et al., 2008; Matulis et al., 2005; Morkūnaitė et al., 2014). Tačiau nei vienu iš anksčiau naudotų metodų neįmanoma nustatyti dėl baltymu-ligando sąveikos atsiradusio tūrio pokyčio. Šiame darbe fluorimetrijos aukštame slėgyje metodu, siekiama išnagrinėti karboanhidrazių denatūraciją slėgiu ir nustatyti dėl sąveikos su ligandais atsiradusį tūrio pokytį.

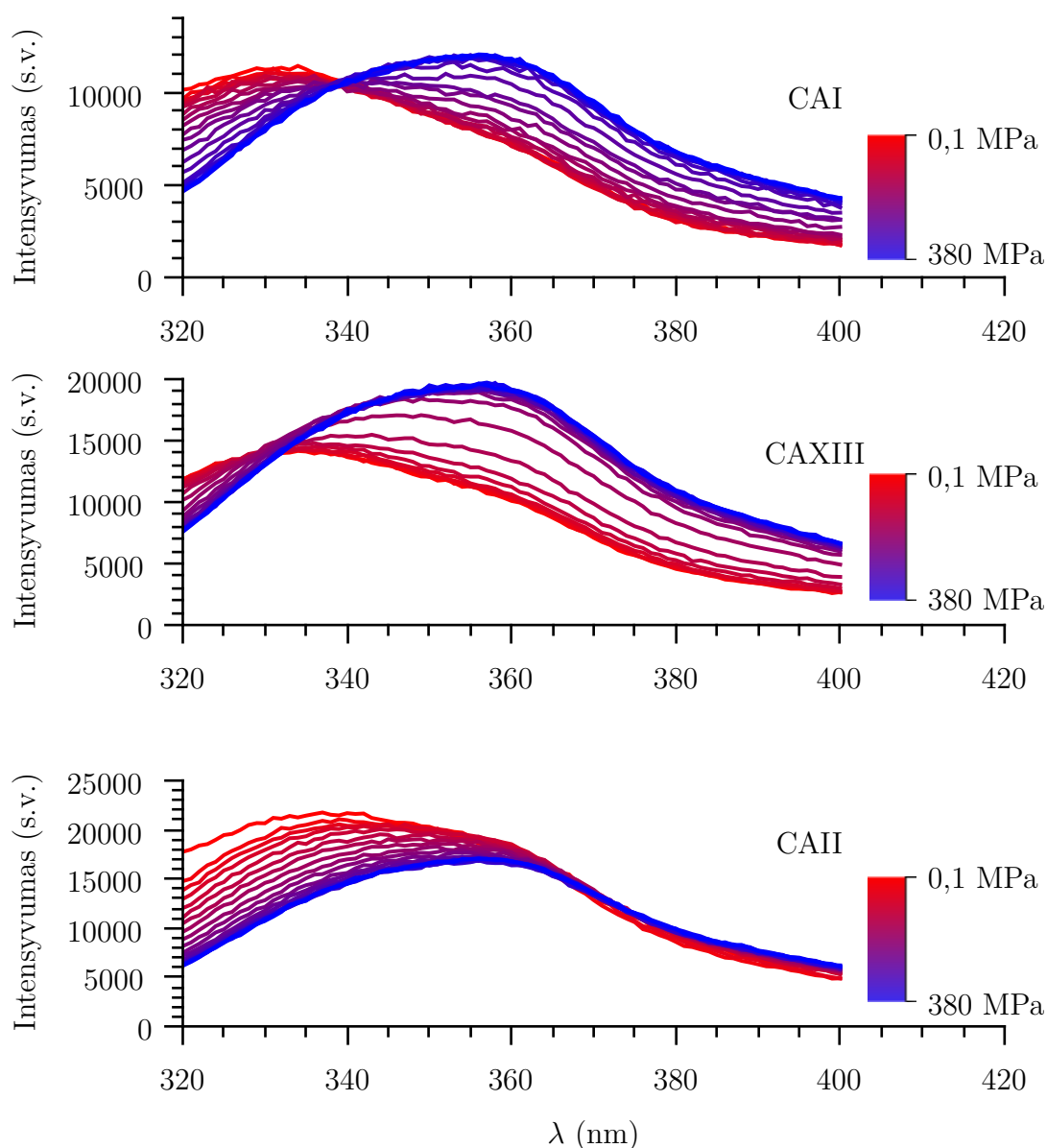
3.1.1. Eksperimento eiga

Kiuvetė užpildoma vandeniniu tirpalu, kurio sudėtyje yra: 3 μ M tiriamojo baltymo, 0-1,2 M guanidino hidroklorido, 10mM Bis-Tris ($pH=7,0$), 0-100 μ M slopiklio tirpinto dimetilsulfoksido(DMSO) tirpale, taip pat atitinkamas kiekis DMSO siekiant, kad visuose tirpaluose DMSO sudarytų 1% viso tūrio. Bis-Tris buferinis tirpalas pasirinktas dėl mažo jonizacijos reakcijos tūrio, tai reiškia jog šio buferio pH mažai kinta keičiantis slėgiui (Kitamura and Itoh, 1987). Slėgis keliamas žingsniais po 20 MPa. Pakėlus slėgį laukiama dvi minutes. Sužadanimui naudojama 295 nm bangos ilgio šviesa, kadangi toks bangos ilgis leidžia selektyviai sužadinti tik triptofanus (Moller and Denicola, 2002). Fiksuojamasis fluorescencijos spektras 320-400 nm bangų ruože, fluorescencija matuojama kas 1 nm. Gaunami spektrai pavaizduoti 10-ajame paveiksle. Kiekvienas spektro taškas gaunamas atliekant 20 pakartojimų.

3.1.2. Duomenų analizė

Šio darbo metu aukšto slėgio fluorescencijos metodu buvo tirtas, trijų karboanhidrazės izoformų (CAI, CAII, CAXIII), išsivyniojimas aukštame slėgyje. Visų trijų karboanhidrazės izoformų vidinės fluorescencijos spektrai pasižymėjo batochrominiu poslinkiu keliant celės slėgį t.y. išsivyniojant baltymui. Tačiau spektro intensyvumai kito skirtingai visoms trimis karboanhidrazės izoformoms. CAII spektro intensyvumas ties maksimumu mažėjo

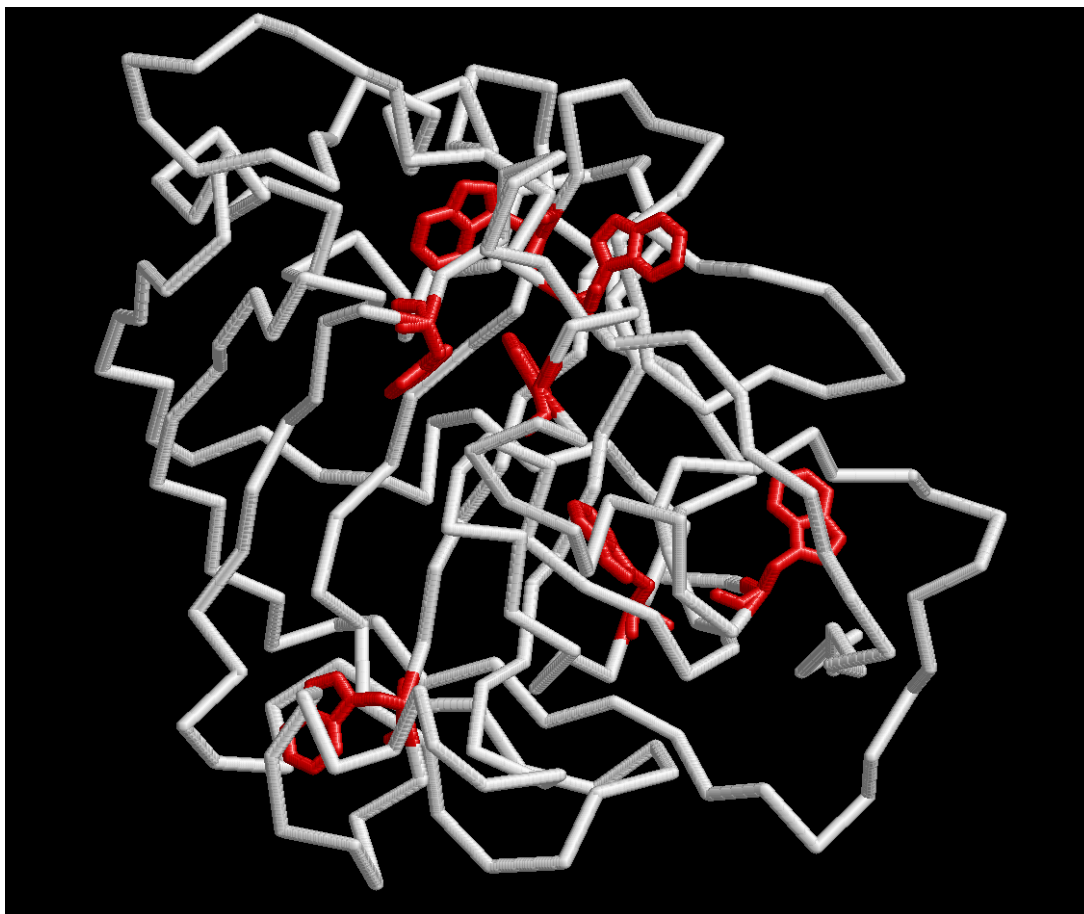
viso eksperimento metu keliant slėgį, CAXIII atvirkščiai – fluorescencijos intensyvumas didėjo keliant slėgį. CAI izoformos fluorescencijos spektro intensyvumas mažėjo keliant slėgį iki tam tikro taško, po kurio toliau keliant slėgį jis pradėjo augti. Gauti CA fluorescencijos spektrai pavaizduoti 10-ajame paveiksle.



10 pav. CAI, CAXIII ir CAII fluorescencijos spektrai skirtinguose slėgiuose. Spektrai fiksuojami, kas 20 MPa, taigi viename brėžinyje pavaizduota 20 spektrų.

Triptofano fluorescencijos spektro bathochrominis poslinkis aukštame slėgyje būdingas ir atskirai triptofano molekulei, tačiau jis siekia tik 3 nm 400 MPa slėgyje, poslinkis triptofano esančio polipeptido sudėtyje dar mažesnis (Ruan et al., 2000). Karboanhidrazių fluorescencijos spektrų poslinkiai 380 MPa slėgyje yra 7-10 nm, todėl jų atsiradimo priežastis turi būti struktūriniai baltymo pokyčiai. Kadangi triptofano fluorescencijos bathochrominis poslinkis yra būdingas perėjimui iš nepolinės aplinkos į polinę (Reshetnyak

and Burstein, 2001), galima teigti jog natyvioje būsenoje visų trijų CA izoformų triptofanai egzistuoja globulės viduje. Ši išvada sutampa su kristalografiniais duomenimis pavaizduotais 11-ajame paveiksle. Ši fluorescencijos spektro savybė gali būti naudojama kaip signalas leidžiantis nustatyti baltymo išsivyniojimą.



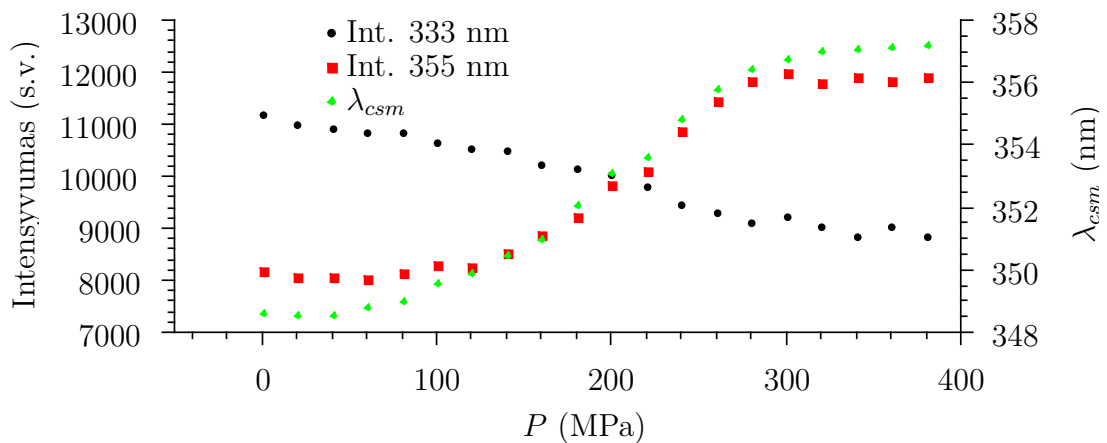
11 pav. CA II struktūra, (Eriksson et al., 1988). Raudona spalva pažymėti triptofanai

Norint nustatyti baltymo išsivyniojimo kreivę, eksperimentinius duomenis buvo bandoma analizuoti įvairiai: stebint spektro maksimumo arba masių centro poslinkį bei fluorescencijos intensyvumo kitimą. Vienas paprastesnių metodų yra stebėti fluorescencijos spektro maksimumą, pritaikius Gauso skirstinį. Tačiau šis metodas turi daug trūkumų. Pirmiausia 320 - 400 nm bangų ilgio ruožas yra tik dalis fluorescencijos spektro, o tai įneša papildomas paklaidas apskaičiuojant fluorescencijos maksimumo tašką. Antra, fluoresuoti gali ne viena triptofano šoninė grupė, todėl registruojamas suminis fluorescencijos spektras, kurio forma nebeatitinka vieno Gauso skirstinio formos. Šiai problemai spręsti gali būti naudojamas dviejų Gauso skirstinių modelis. Šiame modelyje daroma prielaida, jog egzistuoja 2 skirtingos triptofano būsenos pasižyminčios Gauso skirstinio formos fluorescencijos spektrais, tačiau turinčios skirtingą fluorescencijos maksimumo padėtį. Vienas skirstinys atitinka triptofaną atvertą į vandenį, kitas paslėptą hidrofobinėje baltymo dalyje. Kitas būdas yra apskaičiuoti fluorescencijos spektro masės centrą $\langle \lambda \rangle_{CSM}$. Masės

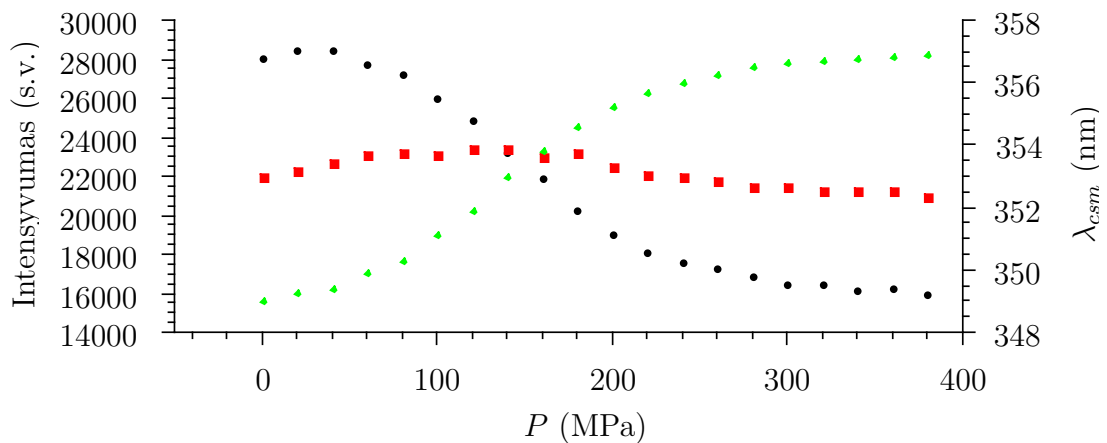
centras apskaičiuotas naudojant formulę:

$$\langle \lambda \rangle_{CSM} = \frac{\sum_{\lambda=320}^{400} F(\lambda) \times \lambda}{\sum_{\lambda=320}^{400} F(\lambda)}, \quad (43)$$

kur $F(\lambda)$ – fluorescencijos intensyvumas, λ – bangos ilgis. Tačiau šio metodo tikslumui taip pat trukdo tai, jog dažniausiai stebime tik dalį fluorescencijos spektro, kas savo ruožtu įneša paklaidas į spektro masių centro nustatymą.



(a) CAI



(b) CAII

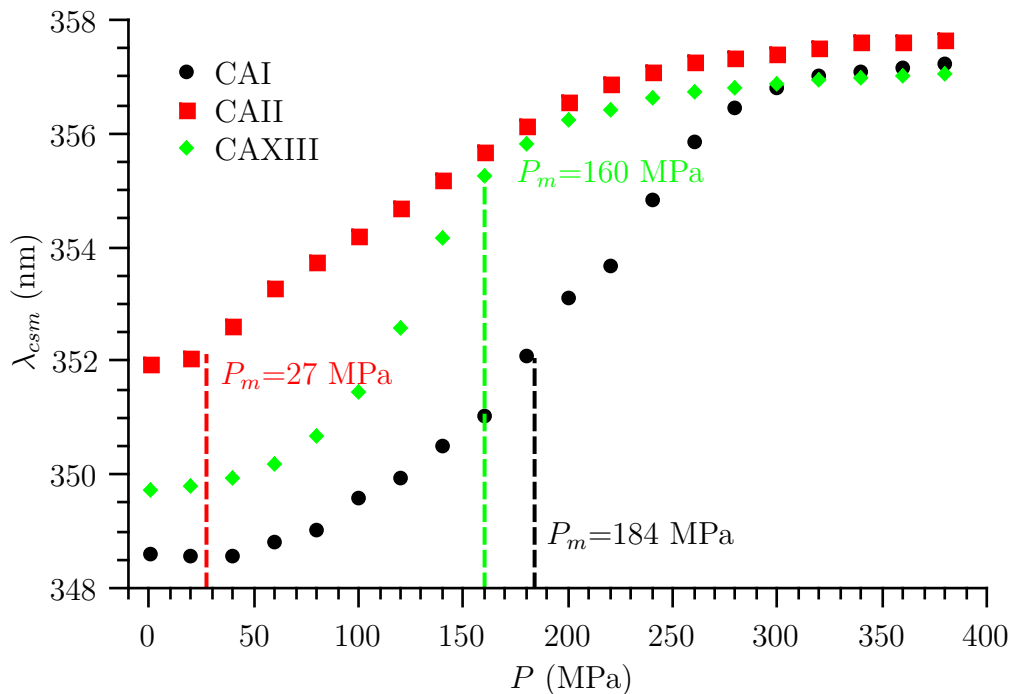
12 pav. Karboanhidrazių CAI (a) ir CAII (b) išsivyniojimo kreivės gautos trimis skirtingais būdais. Masės centro kreivės ašis pavaizduota dešinėje grafikų pusėje, intensyvumo kairėje. Fluorescencijos intensyvumas matuotas ties dviem bangos ilgiais 333 nm ir 355 nm

Dar vienas metodas yra stebėti fluorescencijos intensyvumą fiksuotame bangos ilgyje. Naudojant šį metodą galima žymiai pagreitinti eksperimentą, kadangi nereikalinga registruoti visą spektrą, be to spektro forma tampa nebesvarbi. Tačiau šį metodą reikia naudoti

atsargiai, nes rezultatų interpretavimą gali įtakoti prieš tai aptarti fluorescencijos spektro poslinkio reiškiniai. Tiek CAI, tiek CAXIII izoformai analizuojant spektrus šiuo metodu tinkamiausias bangos ilgis buvo ties spektro maksimumu eksperimento pabaigoje, tačiau CAII izoformos spektrus geriausia analizuoti buvo stebint fluorescencijos intensyvumą, ties maksimumu eksperimento pradžioje. Kreivės gautos visais šiais metodais palygintos 12-ajame paveiksle. Kadangi triptofano fluorescencija gali būti gesinama labai įvairiai priklausomai nuo aplinkos (Chen and Barkley, 1998; Yuan et al., 1998), ko pasekoje stebint fluorescencijos intensyvumą ne visada gaunamos taisyklingos formos kreivės. Šiame darbe eksperimentai buvo analizuoti pagal spektro poslinkį, o ne intensyvumo pokyčius. P_m vertės apskaičiuojamos gautoms fluorescencijos spektro poslinkio priklausomybėms nuo slėgio pritaikius matematinį modelį aprašytą (27)-ąja lygtimi. Pritaikant kreivę prie duomenų fiksuojamos f_n ir f_u vertės remiantis analizuojamo baltymo eksperimentu kuriame aiškiai matomi natyvaus ir išsivyniojusio baltymo fluorescencijos spektrai.

Šio modelio pritaikymas yra etapas kuriame atsiranda reikšmingiausios paklaidos. Pritaikant matematinį modelį kreivėms, gautomis skirtingais analizės būdais poskyrio pradžioje P_m vertės vidurkio standartinė paklaida yra 11 MPa.

3.1.3. Skirtingų karboanhidrazės izoformų išsivyniojimas aukštame slėgyje.



13 pav. Skirtingų karboanhidrazės izoformų denatūracijos aukštu slėgiu kreivės. Visuose eksperimentuose naudojama ta pati chaotropo koncentracija – 1 M GndHCl.

Kadangi turima įranga pasiekiamas hidrostatinis slėgis (380 MPa) nėra pakankamas

pilnai išvynioti daugelį baltymų, į mėginį pridedama chaotropinių reagentų. Chaotropiniai reagentai – medžiagos destabilizuojančios baltymą, jų pagalba baltymai išvyniojami žemesniuose slėgiuose ir temperatūrose. Šiame darbe pasirinktas chaotropinis reagentas buvo guanidino hidrochloridas. Atliekant eksperimentus toje pačioje GndHCl koncentracijoje šios skirtingos karboanhidrazės izoformos (CAI, CAII, CAXIII), pasižymėjo skirtingu atsparumu denatūracijai aukštu slėgiu. CAI pasirodė esanti stabiliausia, CAII – mažiausiai stabili (pavaizduota 13-ajame paveiksle).

Tačiau tai nėra absoliučios išsivyniojimo slėgių vertės. Cheminė denatūracija guanidino hidrochloridu dažniausiai pasižymi tiesine denatūracijos laipsnio priklausomybe nuo denatūrantų koncentracijos (Greene and Pace, 1974), išsivyniojimo laisvoji Gibbso energija – ΔG_U taip pat kinta tiesiškai priklausomai nuo GndHCl koncentracijos. Siekiant nustatyti baltymų išsivyniojimo slėgius nesant chaotropo, buvo atliktos eksperimentų serijos kiekvienai karboanhidrazės izoformai keičiant GndHCl koncentracijas. Nustatyta, kad jų išsivyniojimo slėgis P_m taip pat yra tiesiškai priklausomas nuo GndHCl koncentracijos. Taigi šį reiškinį galime aprašyti lygtimi (44)

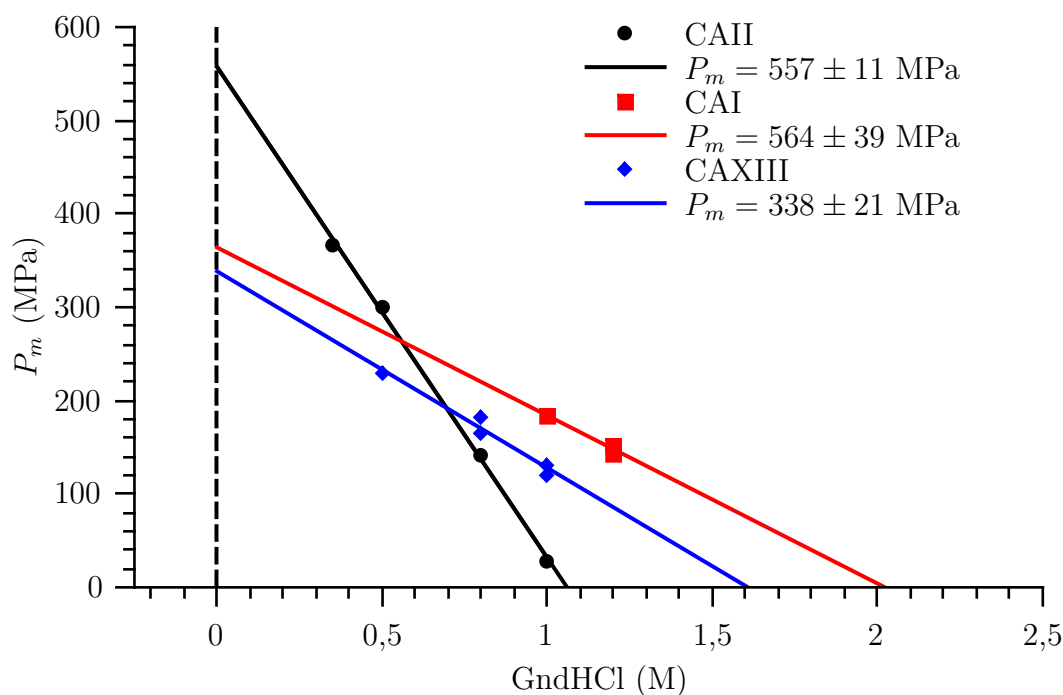
$$P_m(\text{GndHCl}) = P_m - m \times [\text{GndHCl}], \quad (44)$$

kur $P_m(\text{GndHCl})$ yra išsivyniojimo slėgis esant tam tikrai GndHCl koncentracijai, P_m – išsivyniojimo slėgis nesant chaotropo, o m – santykinė konstanta. Naudojantis šia lygtimi galima nustatyti baltymų P_m atlikus eksperimentų serijas naudojant skirtingas GndHCl koncentracijas. Turint šiuos duomenis galima ekstrapoliuoti gautą tiesę į nulinę GndHCl koncentraciją (duomenys pavaizduoti 14 -ajame paveiksle). Ekstrapoliuojant šias tieses į atmosferinį slėgį gaunamos šių baltymų cheminei denatūracijai reikalingos chaotropo koncentracijos.

Atlikus eksperimentines serijas naudojant skirtingas GndHCl koncentracijas, apskaičiuotos P_m vertės nesant chaotropo karboanhidrazėms CAI, CAII, CAXIII yra atitinkamai 364 ± 39 MPa, 557 ± 11 MPa, 338 ± 21 MPa. Santykinės konstantos m vertės atitinkamai $526 \pm 15 \frac{\text{MPa}}{\text{M}}$, $180 \pm 4 \frac{\text{MPa}}{\text{M}}$, $211 \pm 21 \frac{\text{MPa}}{\text{M}}$. Didesnis atsparumas denatūracijai slėgiu nebūtinai reiškia atitinkamai didesnio atsparumo termininei denatūracijai. Denatūracijai karščiu atspariausia CAXIII izoforma, mažiausiai atspari CAII izoforma (Kišonaitė et al., 2014; Morkūnaitė et al., 2014). Šį apsikeitimą galima analizuoti lyginant šių izoformų struktūras. Viena iš priežasčių kodėl CAXIII santykinai mažiau stabili ją veikiant aukštu slėgiu galėtų būti tai, jog CAXIII sudaro dimera, kuris gali būti labiau suspaudžiamas nei monomerinis baltymas.

3.1.4. Eksperimentinių sąlygų nustatymas

Norint atlikti slėginio poslinkio eksperimentus naudojant slopiklius buvo reikalinga nustatyti optimalias GndHCl koncentracijas kiekvienai iš karboanhidrazės izoformų. Tai



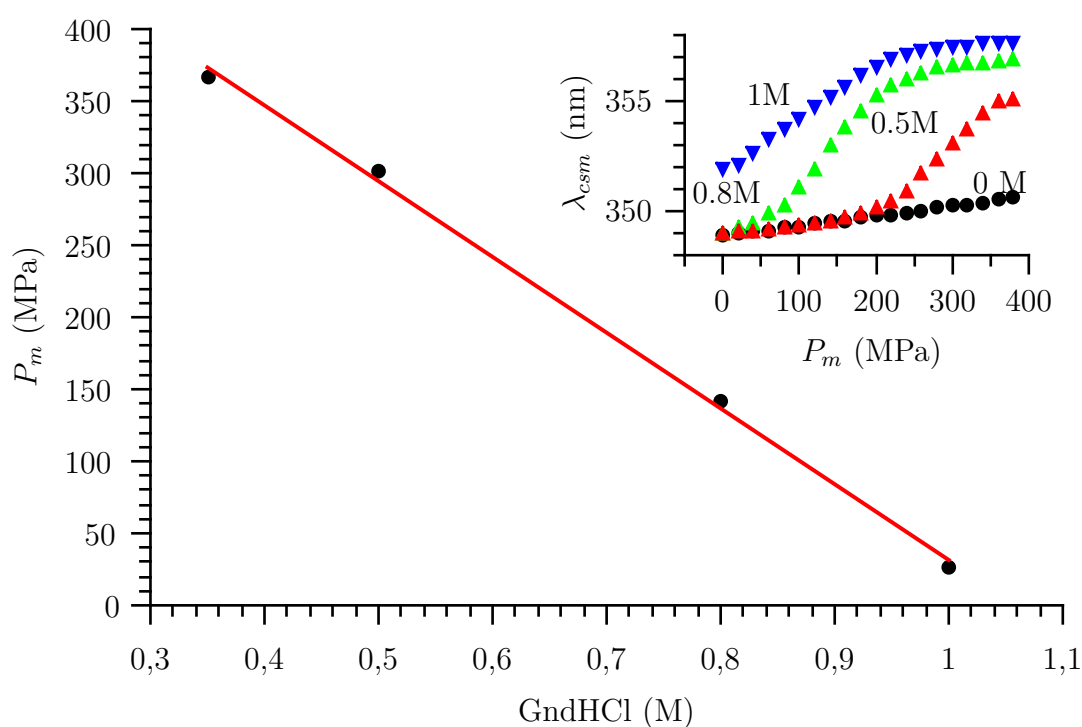
14 pav. Skirtingų karboanhidrazės izoformų išsivyniojimo slėgių P_m priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos.

padaryta naudojantis jau ankščiau aprašytais eksperimentų serijomis keičiant GndHCl koncentraciją. Šių eksperimentinių serijų pagalba buvo nustatytos optimalios GndHCl koncentracijos kiekvienai izoformai: CAI – 1,2 M; CAII – 0,8 M; CAXIII, 1 M. Atliekant eksperimentus su šiomis guanidino hidrochlorido koncentracijomis, eksperimento pradžioje visos baltymo molekulės yra natyvioje būsenoje, pabaigoje – baltymo molekulės išsivyniojusios, gaunama pilna proceso kreivė (kreivės esant skirtingoms GndHCl koncentracijoms pavaizduotos 15-ajame paveiksle).

3.1.5. Karboanhidrazių sąveika su slopikliais

Šio darbo metu buvo tirta dviejų karboanhidrazės izoformų (CAI ir CAII) sąveika su dviem slopikliais, sulfonamidais – acetazolamidu (AZM) ir p-karboksibenzensulfonamidu (CARBS). Slopiklių struktūros pavaizduotos 16-ajame paveiksle.

Šiame darbe pasitelktas slėginio poslinkio metodas. Atliktos eksperimentų serijos naudojant skirtingas slopiklių koncentracijas. Visi eksperimentai atlikti 10 mM Bis-Tris buferiniame tirpale kurio pH=7,0. Visuose atliktuose eksperimentuose baltymo koncentracija pastovi – 3 μ M. Slopiklių koncentracija kinta nuo 1 μ M iki 100 μ M. Visuose keturiuose sistemose (CAI-AZM, CAI-CARBS, CAII-AZM, CAII-CARBS), ligandai stabilizavo baltymą prieš denatūraciją aukštu slėgiu. Šis efektas stiprėjo didinant slopiklių koncentracijas. 16-ajame paveiksle palyginti šių dviejų slopiklių stabilizavimo efektai baltymui CAI. Slopiklis

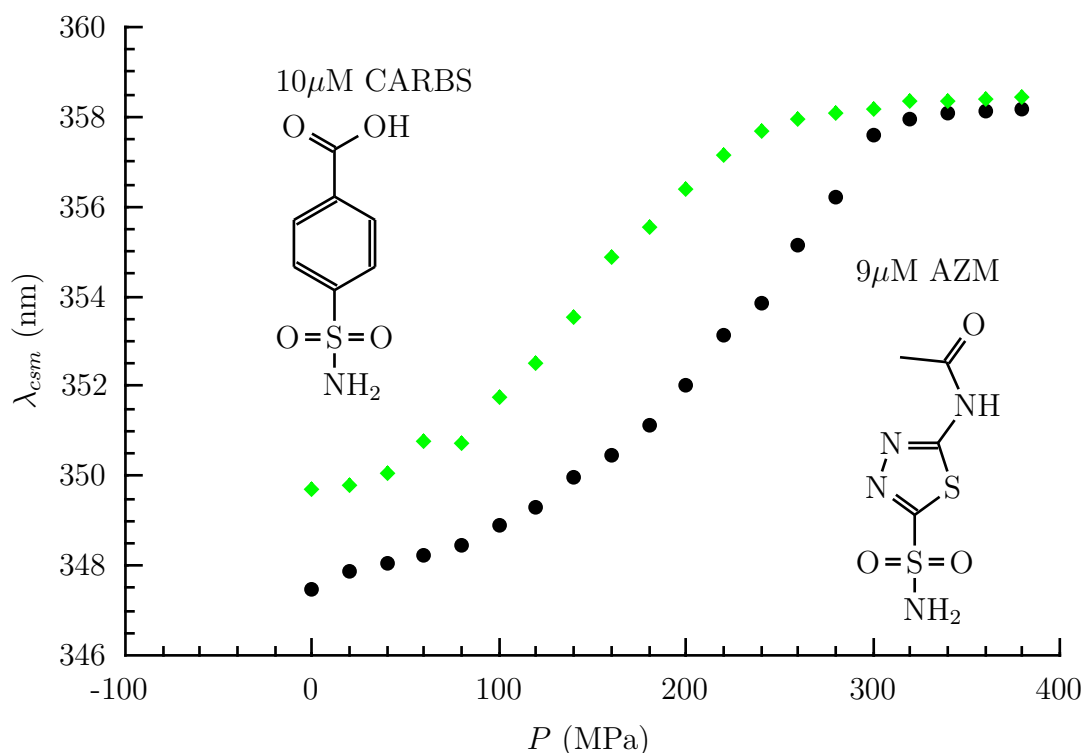


15 pav. Karboanhidrazės II išsivyniojimo slėgio P_m priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos. Viršutiniame kampe atvaizduotos išsivyniojimo kreivės. Kreivė gauta naudojant 0,8 M GndHCl yra tinkamiausia analizei.

AZM stabilizavo baltymą žymiai stipriau nei CARBS. Tai atitinka literatūroje žinomas jungimosi stiprumo vertes nustatytas slėginio poslinkio bei izoterminio titravimo kalorimetrijos metodais (Matulis and Todd, 2004). Šis stabilizuojantis efektas leidžia analizuoti duomenis anksčiau aprašytu slėginio poslinkio metodu.

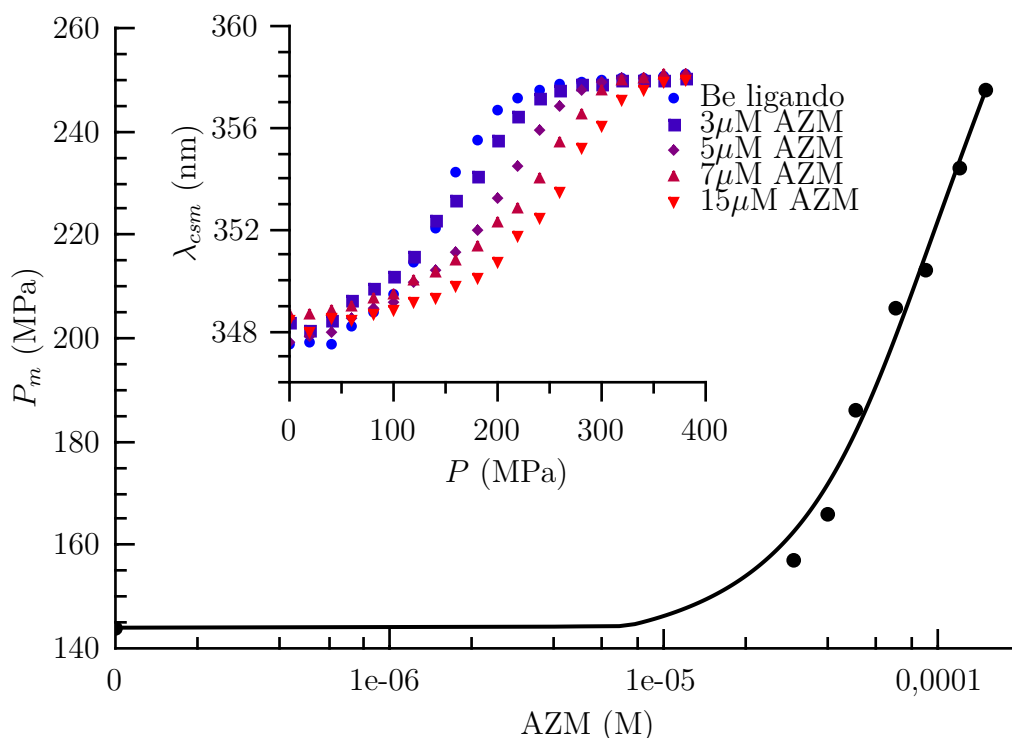
Naudojant nustatytas optimalias GndHCl koncentracijas pavyko gauti serijas eksperimentų trims iš keturių sistemų. Visose sistemose didinant slopiklio koncentraciją baltymo lydimosi slėgis P_m didėjo. Tai reiškia jog sąveikos tūris yra neigiamas, t.y. baltymo-ligando kompleksas užima mažesnę tūrį nei šie komponentai atskirai. Sulfonamidiniai slopikliai jungdamiesi su CA įsitvirtina tam tikroje erdmėje fermento aktyviajame centre (Matulis and Todd, 2004). Nustatyta jog AZM prisijungimo prie CAI tūris lygus $-59 \pm 6 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$. Šis rezultatas palyginamas su kitomis literatūroje nustatytomis baltymo – mažamolekulinio ligando sąveikos tūrių vertėmis (Toleikis et al., 2011). Nustatyta jungimosi konstanta K_b lygi $1,3 \times 10^7 \pm 6 \times 10^6$, dozavimo kreivė pateikta 17–ajame paveiksle. Literatūroje kitais metodais nustatyta šios baltymo-ligando poros jungimosi konstanta esant 7,0 pH yra lygi $1,19 \times 10^6$. Toks nesutapimas baltymų-ligandų jungimosi konstantos nustatyme nėra didelis.

Tiriant CAII-AZM sistemą nepavyko gauti eksperimentinių kreivių esant tai pačiai chaotropo koncentracijai. Pridėjus slopiklio baltymas stabilizuojamas per stipriai, kad būtų įmanoma jį denatūruoti tomis pačiomis sąlygomis. Todėl, siekiant gauti CAII-AZM



16 pav. Baltymo CAI išsivyniojimo kreivės su skirtingais slopikliais. Grafike atidėta spektro masių centro priklausomybė nuo slėgio.

dozavimo kreives, buvo atliktos serijos eksperimentų leidžiančios nustatyti P_m priklausomybę nuo guanidino hidroklorido koncentracijos, esant tam tikroms AZM koncentracijoms. Šio eksperimentų rinkinio fluorescencijos spektrai analizuojami pritaikius dviejų Gauso skirstinių modelį. Turint šiuos duomenis buvo galima ekstrapoliuoti P_m vertes į nulinę GndHCl koncentraciją. Taip sudaryta dozavimo kreivė naudojant ekstrapoliavimo būdu gautas P_m vertes skirtingose AZM koncentracijose (duomenys pateikti 18–ajame paveiksle). Naudojantis šia dozavimo kreive apskaičiuota K_b lygi $7,4 \times 10^7$. Šis rezultatas atitinka literatūroje žinomas šios konstantos vertes (Morkūnaitė et al., 2014). Nustatytas jungimosi tūris ΔV_b buvo $-15 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$. Pritaikant matematinį modelį buvo naudojamos fiksuotos, baltymo išsivyniojimo be ligando, parametrų ΔV_U ir ΔG_U vertės, šios vertės pasirinktos analizuojant eksperimentų seriją be ligando, bet keičiant GndHCl koncentraciją. Kadangi, kaip jau aprašyta anksčiau, P_m ir ΔG_U kinta tiesiškai priklausomai nuo GndHCl koncentracijos, padaryta prielaida, kad keičiantis GndHCl koncentracijai ΔV_U išlieka pastovi, kinta tik ΔG_U . Šis tyrimas taip pat parodė jog P_m priklausomybės nuo GndHCl koncentracijos – m vertės, keičiasi priklausomai nuo slopiklio koncentracijos. Didinant slopiklio koncentraciją didėja ir koeficientas m (į neigiamų verčių pusę). Tai reiškia, kad esant didesnėms slopiklio koncentracijoms baltymo P_m mažėja staigiau didinant GndHCl koncentraciją. Taigi darant eksperimentus esant vienodai denatūrančio koncentracijai, dozavimo kreivės taškai išsidėlios skirtingai, priklausomai nuo to kokia



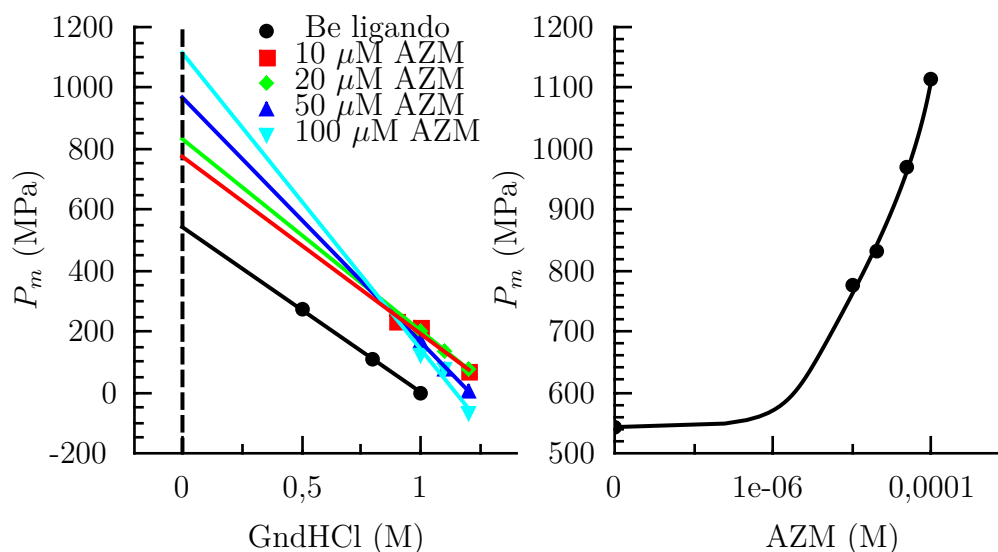
17 pav. CAI išsivyniojimo slėgio P_m priklausomybė nuo slopiklio AZM koncentracijos. P_m vertės apskaičiuotos naudojant CAI fluorescencijos spektro masių centro vertes skirtinguose slėgiuose, šios kreivės pavaizduotos viršutiniame kairiajame kampe. Iš šios dozavimo kreivės apskaičiuotos sąveikos ΔV_b ir K_b vertės, jos lygios atitinkamai $-59 \pm 6 \text{ cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$ ir $1,3 \times 10^7 \pm 6 \times 10^6$

pasirinktoji denatūrantų koncentracija. Tai reikštų, kad toks dozavimo kreivės sudarymo būdas nėra teisingas, norint patikimai ištirti sistemą reikia atlikti eksperimentų serijas keičiant ir slopiklio ir GndHCl koncentracijas.

Parametro m pokyčiai dažnai siejami su tirpikliui prieinamo paviršiaus pokyčiais išsivyniojimo metu (Myers et al., 1995). Tačiau yra ir kita versija, kuri teigia jog šie pokyčiai susiję su tarpinės būsenos, tarp natyvaus ir išsivyniojusio baltymo, kiekiu. Pagal šią teoriją, didesnis tarpinės būsenos kiekis mažina m vertes (Whitten et al., 2001). Remiantis šia teorija galima teigti, kad ligando buvimas stabilizuoja natyvią būseną t.y. mažina tarpinės būsenos kiekio, dėl ko yra stebimas m vertės didėjimas didinant slopiklio koncentraciją.

3.2. HSP90 BMR tyrimai

Siekiant nustatyti kaip kinta baltymo konformacija aukštame slėgyje buvo atlikti ^1H - ^{15}N HSQC eksperimentai varijuojant slėgį nuo 5 iki 150 MPa. Taip pat siekiant nustatyti su kuriomis aminorūgštimis ir kaip stipriai sąveikauja šio baltymo slopikliai bei koks šios sąveikos tūris, buvo atliktos eksperimentų serijos naudojant AZ3 bei ICPD9 slopiklius, kurių struktūros pavaizduotos 21-ajame paveiksle. Šių eksperimentų metu varijuota slo-



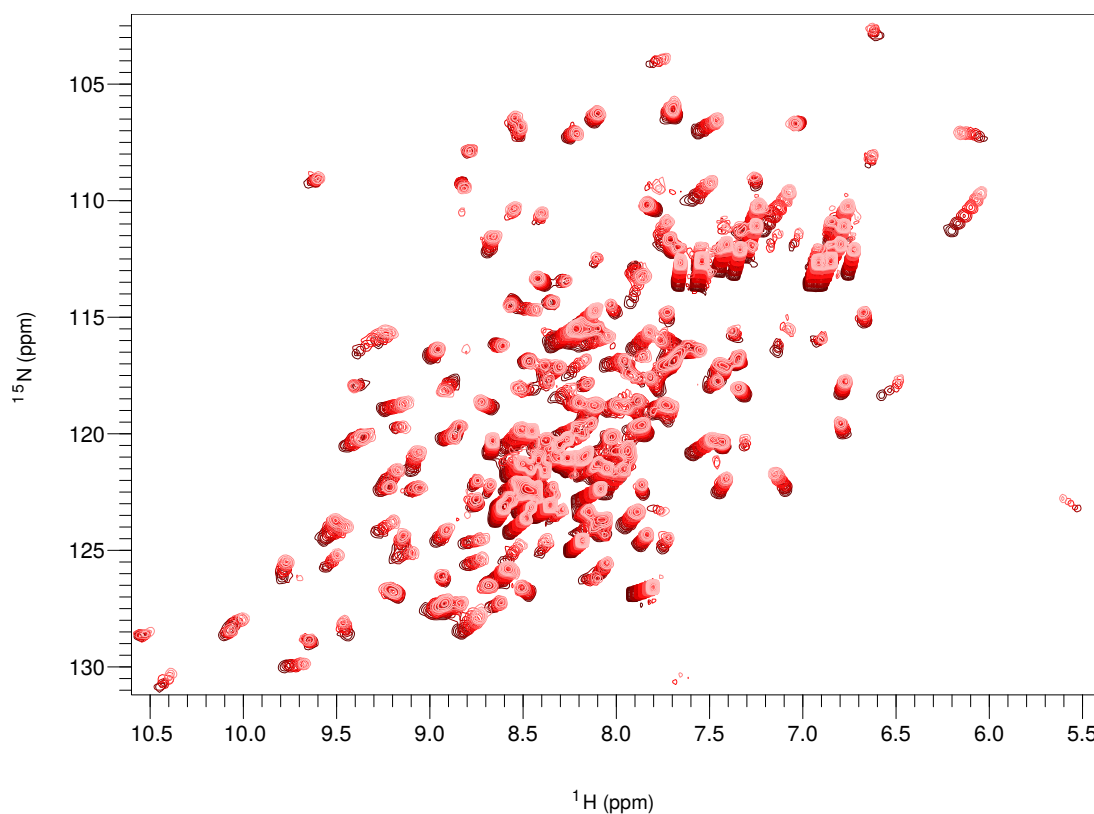
18 pav. Kairėje pavaizduotos CAII P_m verčių priklausomybė nuo GndHCl koncentracijos esant įvairioms AZM koncentracijoms. Eksperimentinius taškus atitinkančios tiesės ekstrapoliuotos į nulinę GndHCl koncentraciją, taip apskaičiuojamos P_m vertės nesant chaotropo. Dešinėje pavaizduota iš šių verčių sudaryta dozavimo kreivė. Jai pritaikytas matematinis modelis, kurio pagalba apskaičiuoti prisijungimo termodinaminiai parametrai.

piklių koncentracija ir slėgis. Šiame skyrelyje aptariami BMR eksperimentų rezultatai.

3.2.1. Slėgio įtaka HSP90 BMR spektrui

Eksperimentu metu buvo registruojami HSP90 α N ^{15}N HSQC spektrai 5, 10, 30, 60, 90, 120, 150 MPa slėgyje. Spektrai atvaizduoti 19-ajame paveiksle. Kambario temperatūroje HSP90 α N išsivyniojimo slėgis P_m yra apie 510 MPa (Toleikis et al., 2011). Šio eksperimento metu pasiektas slėgis yra gerokai mažesnis nei išsivyniojimo, todėl šio eksperimento metu galima stebėti pirmąsias, išsivyniojimo metu vykstančias, tranzicijas.

Didžioji dalis amidinės grupės smailių keliant slėgį slenkasi palei magnetinį lauką (downfield) t.y. pasižymi didesnėmis cheminio poslinkio vertėmis. Tai būdinga daugeliui šiuo metodu ištirtų baltymų (Arnold et al., 2002). Toks poslinkis reiškia amidinių grupių sudaromų vandenilinių ryšių trumpėjimą keliant slėgį. Toks poslinkis keliant slėgį yra stipresnis amidinėms grupėms tiesiogiai sudarančioms vandenilinius ryšius su vandeniu, todėl didelis poslinkis palei magnetinį lauką yra išsivyniojimo – perėjimo iš hidrofobinės šerdies į tirpiklį požymis (Li et al., 1998). Šis poslinkis didžiajai daliai tirtų baltymo aminorūgščių (pvz. Thr90, Ile91, Val92, Thr94, Asn155) yra tiesinis. Keliant slėgį tai įprastas reiškinys nesusijęs su konformaciniais pokyčiais, kuris yra būdingas ir tretinės struktūros neturintiems peptidiniams modeliams (Arnold et al., 2002). Pagal nustatytą kristalinę struktūrą (Li et al., 2012) šių aminorūgščių amidinės grupės jau natyvioje būsenoje yra atvertos į globulės išorę ir sąveikauja su vandeniu, todėl konformaciniai baltymo poky-

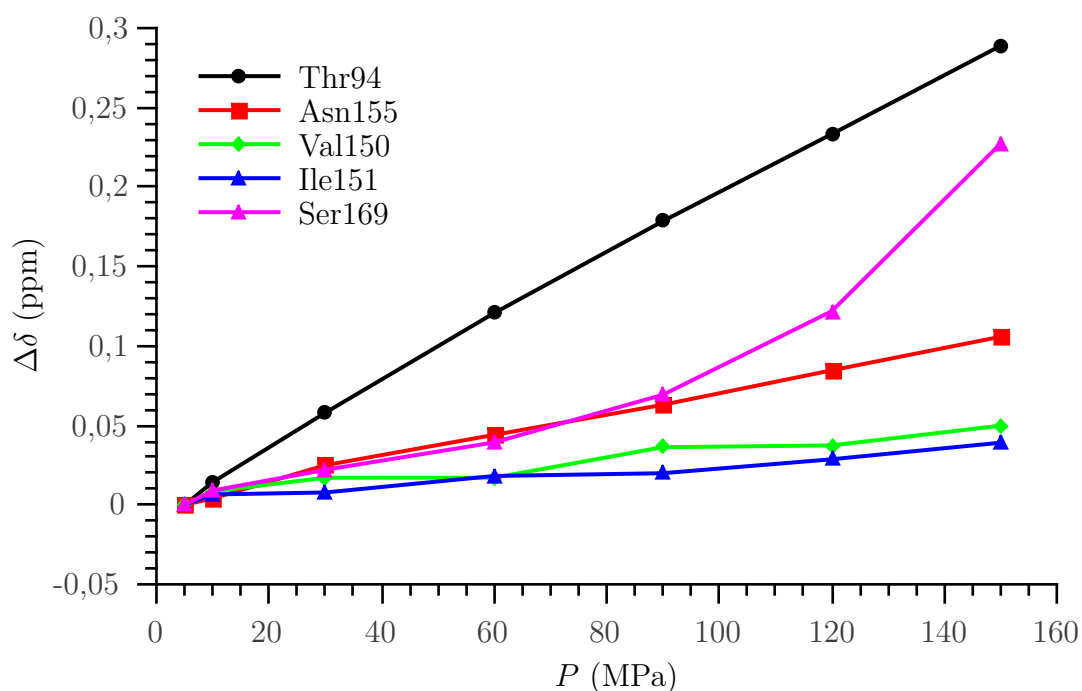


19 pav. HSP90 α N ^{15}N HSQC spektrai skirtingame slėgyje. Šviesiausia spalva žymi spektrą 5 MPa slėgyje, tamsiausia – 150 MPa slėgyje.

čiai jam denatūruojant nekeičia šių aminorūgščių būsenos. Kai kurios amidinės grupės pasižymėjo labai nežymiu cheminiu poslinkiu arba iš vis juo nepasižymėjo. Šios amidinės grupės priklauso Gly137, Val150, Ile151 amino rūgštims. Šios amino rūgštys yra giliai baltymo hidrofobinėje šerdyje, nepasiekiamos vandeniui. Kadangi pasiektas slėgis gerokai mažesnis nei denatūracijos, greičiausiai šių aminorūgščių aplinka nesikeitė keliant slėgį. Kai kurių amino rūgščių amidinių grupių smailės (tokių kaip Tyr139, Ala161, Arg182, Ser169) pasižymėjo dideliu, netiesiniu poslinkiu keliant slėgį. Netiesinis poslinkis keliant slėgį dažniausiai siejamas su konformaciniais pokyčiais (Kitahara et al., 2013). Dėl šios priežasties galima spėti, kad sritys pasižyminčios tokiu netiesiniu poslinkiu yra pirmiausiai besikeičiančios vykstant slėginei denatūracijai, tai yra jų konformacinių pokyčių energija mažiausia. Šiuo atveju dauguma šių amino rūgščių buvo β -klostės sudėtyje. Šių skirtingų signalų palyginimas pavaizduotas 20-ajame paveiksle.

3.2.2. Hsp90 jungimasis su ligandais

Šiame darbe aukšto slėgio BMR metodu tirta dviejų slopiklių AZ3 ir ICPD9 sąveika su HSP90 baltymu. Slopiklių cheminės struktūros pavaizduotos (21)-ajame pav. BMR eksperimentais siekta nustatyti su kuriomis aminorūgštėmis sąveikauja slopikliai, kaip jų jungimosi termodinaminius parametrus įtakoja aukštas slėgis ir nustatyti dėl jungimosi

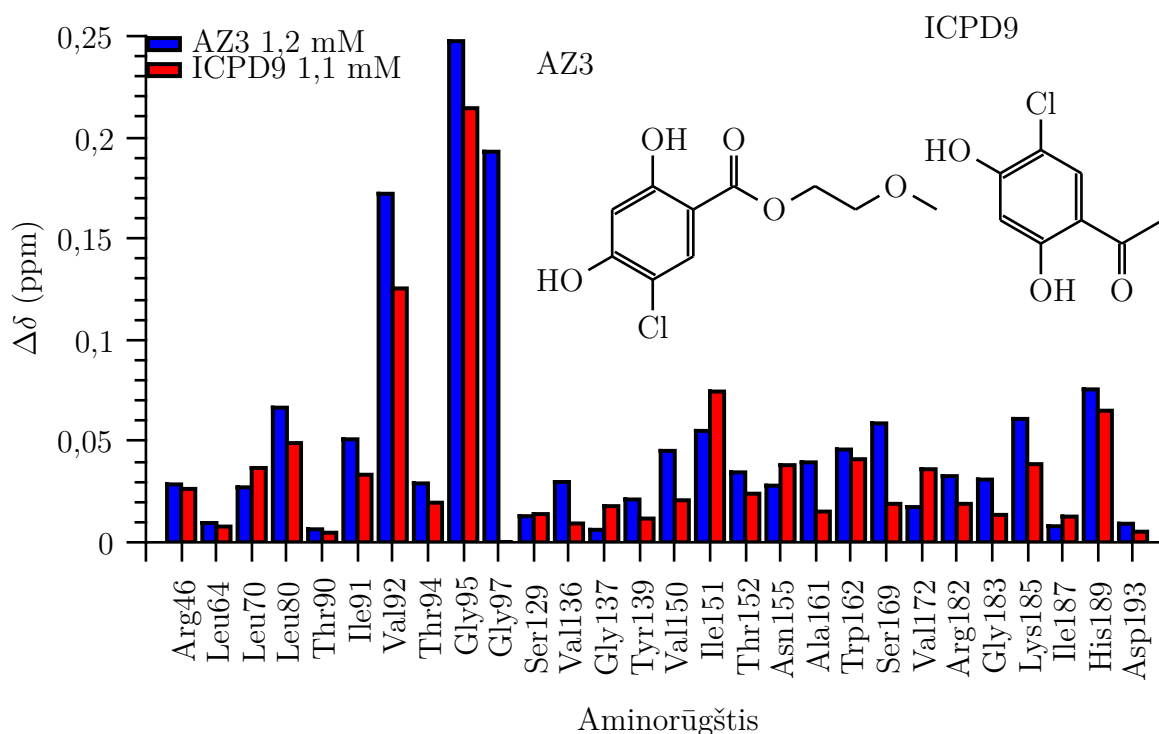


20 pav. Aminorūgščių amidinių grupių smailių poslinkio ^{15}N HSQC spektre keliant slėgį palyginimas. Thr94 ir Asn155 pasižymi ženkliai tiesiniu poslinkiu. Val150 ir Ile151 pasižymi labai menku, neženkliu poslinkiu. Ser169 poslinkis ženklus ir netiesinis. Linijos grafike yra tik vaizdinė priemonė.

atsiradusį tūrio pokytį.

Pridėjus slopiklio, baltymo BMR spektras keičiasi, amino rūgščių su kuriomis sąveikauja slopikliai smailių padėtys slenka priklausomai nuo slopiklio koncentracijos. Šio darbo metu atliktos eksperimentų serijos keičiant slopiklio koncentraciją nuo 0.15 iki 5 mM, taip pat keičiant slėgį nuo 5 iki 150 MPa. Atlikus šias eksperimentų serijas galima įvertinti atskirų aminorūgščių sąveikos su ligandais disociacijos konstantą t.y. įvertinti prisijungimo stiprumą.

21 – ajame paveiksle pavaizduota identifikuotų aminorūgščių amidinių grupių cheminiai poslinkiai pridėjus šių ligandų. Didesnis cheminis poslinkis stebimas toms pačioms aminorūgštims abiejų ligandų atveju. Nustatyta, kad slopiklis AZ3 stipriausiai jungiasi prie Val92, Gly95 ir Gly97 aminorūgščių (pav. 22). Val92, Gly95 ir Gly97 aminorūgštys natyvioje baltymo konformacijoje yra aktyviajame centre, ATP prisijungimo vietoje. Šių aminorūgščių smailės ^{15}N HSQC spektre pasižymėjo didžiausiu poslinkiu, jų dozavimo kreivės stebint cheminio poslinkio pokytį pasižymėjo stačiausia forma, todėl ligando disociacijos K_d vertės šioms amino rūgštims buvo per mažos, kad jas būtų įmanoma apskaičiuoti. Sąveika su šiomis aminorūgštims pasižymėjo lėtaisiais mainais. Beveik visų eksperimentų su ligandu metu buvo stebima tik viena, susijungusios formos, smailė. Dvi smailės stebimos tik esant 0,08 mM AZ3, spektrai pavaizduoti 23 –ajame paveiksle. Lėtieji

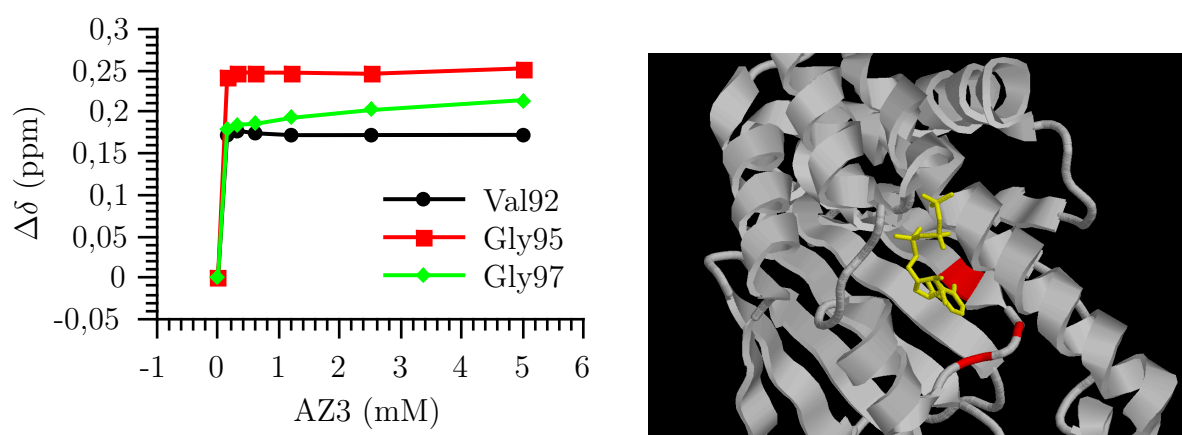


21 pav. Pavaizduoti HSP90 α N aminorūgščių amidinių grupių smailių ^{15}N HSQC spektre cheminio poslinkio pokyčiai pridėjus skirtingų ligandų. Šių aminorūgščių smailės spektre buvo identifikuotos remiantis (Schwalbe, 2006).

mainai dažniausiai yra itin stiprios sąveikos požymis, tačiau literatūroje kitais metodais nustatyta, jog ligandai AZ3 ir ICPD9 yra gan silpnai besijungiantys (Petrauskas et al., 2013).

BMR eksperimentai leidžia ne tik įvertinti ligandų prisijungimo stiprumą, bet ir identifikuoti sąveikaujančias aminorūgštis. Sąveikoje dalyvaujančių aminorūgščių cheminio poslinkio signalų pokyčiai yra kooperatyvus procesas, t.y. visos sąveikoje dalyvaujančių aminorūgščių smailės pasižymi panašia cheminio poslinkio pokyčio $\Delta\delta$ priklausomybe nuo ligando koncentracijos – apskaičiuojamos panašios K_d vertės (Meyer and Peters, 2003). Tačiau be jau minėtų stipriausiai besijungiančių aminorūgščių esančių ligando prisijungimo kišenės viduje, tiriant HSP90 α N sąveiką su AZ3 jog kai kurios amino rūgštys pasižymi greitaisiais mainais, gerokai silpnesne sąveika. Šios aminorūgštys nėra ligando prisijungimo kišenės viduje pvz. Val136 yra prie kišenės įėjimo. Gali būti, jog ligandas jungiasi ne tik pačioje kišenėje, bet ir prie aminorūgščių esančių aplink kišenę, tačiau gerokai silpniau. Slėginio bei terminio poslinkių metodais, kuriais anksčiau išanalizuotas šių slopiklių jungimasis, stebimas visų jungimosi variantų vidurkis. Todėl BMR metodu nustatytos K_b vertės aminorūgštims esančioms kišenėje yra mažesnės, nei nustatytos kitais metodais. Priešingai ne kišenėje esančioms aminorūgštims K_b vertės yra didesnės, nei nustatytos kitais metodais.

HSP90 α N aminorūgščių signalų poslinkiai didinant ICPD9 koncentraciją pasižymėjo

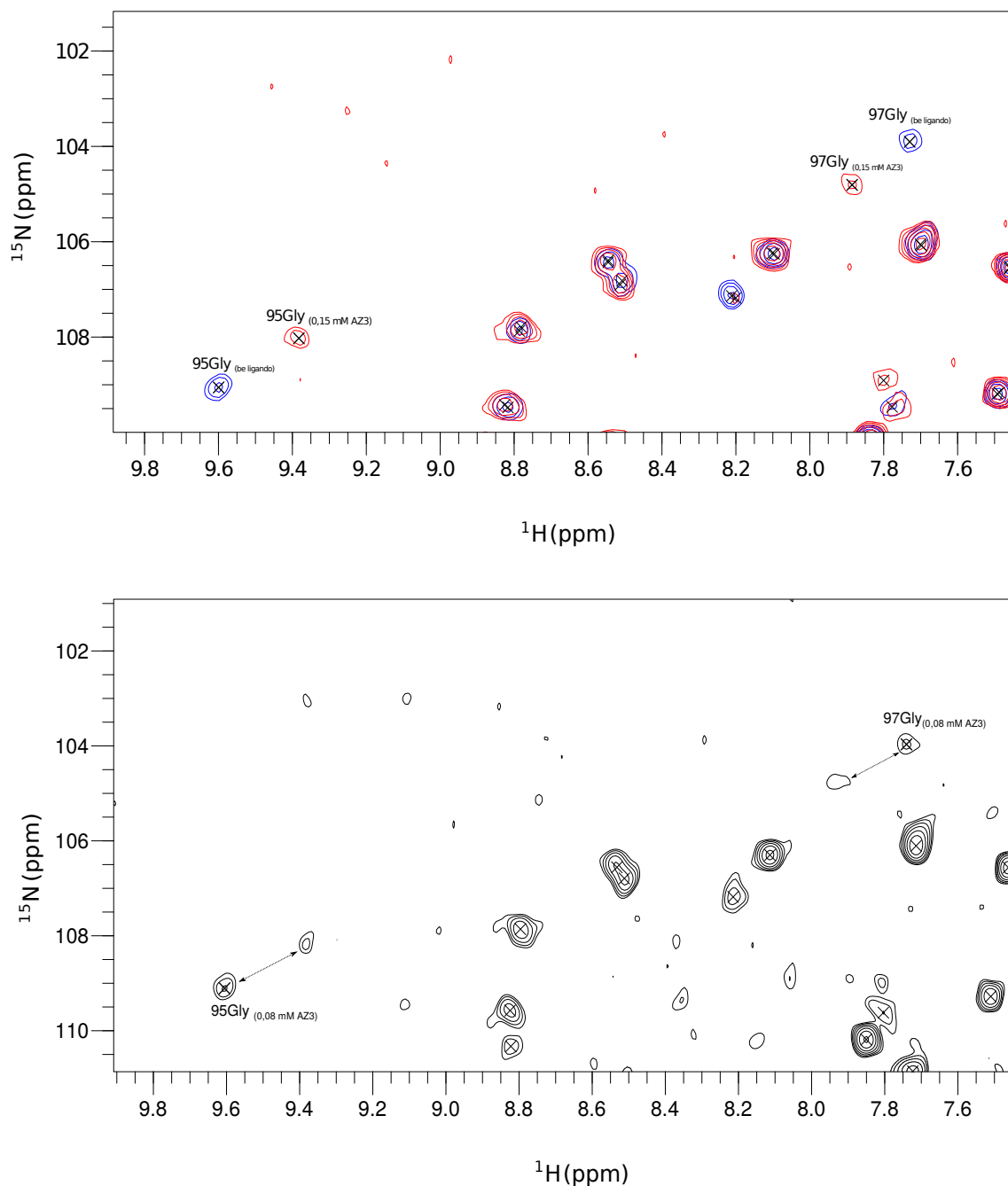


22 pav. Kairėje pavaizduota aminorūgščių amidinių grupių smailių poslinkio ^{15}N HSQC spektre priklausomybė nuo ligando AZ3 koncentracijos. Linijos grafike yra tik vaizdinė priemonė. Kreivių statusas atspindi sąveikos stiprumą. Šiuo atveju kreivės per stačios nustatyti disociacijos konstantos K_d vertę. Ši vertė gali siekti nanomolio litre eilę. Dešinėje pavaizduota HSP90 α N struktūra raudona spalva pažymėtos šios amino rūgštys. Geltona spalva pažymėta ATP molekulė.

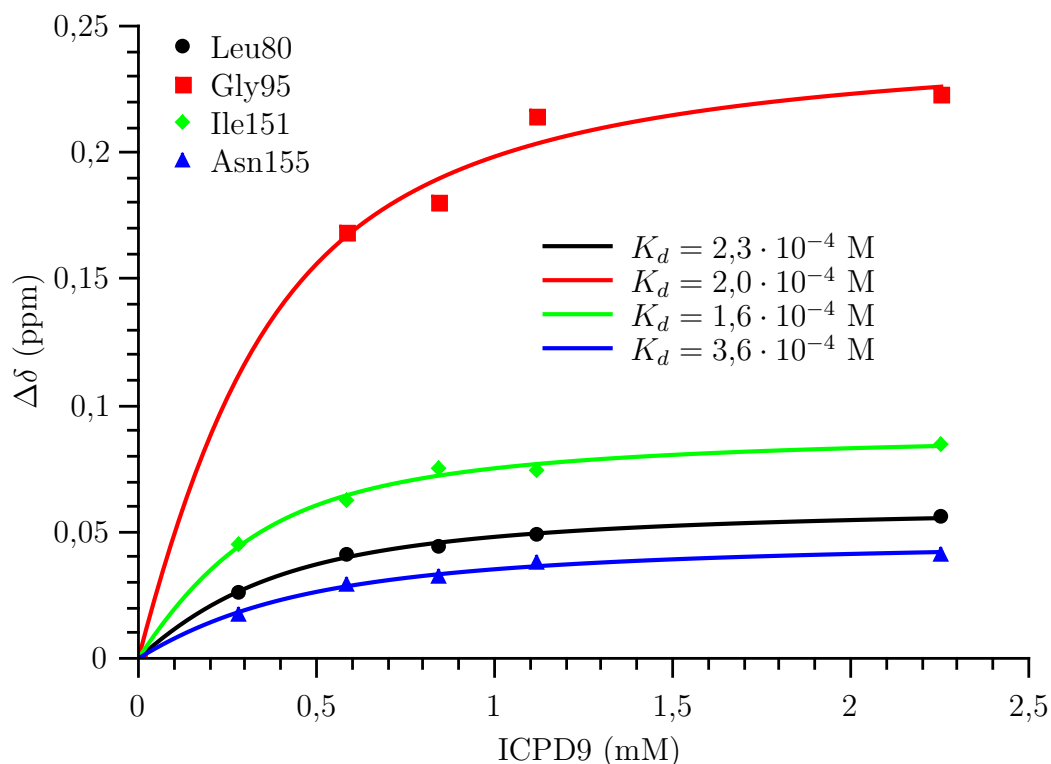
kooperatyvumu. Keliant ICPD9 koncentraciją signalai slinkosi atitinkamai vienas kito atžvilgiu. Pritaikius matematinį modelį šiems poslinkiams apskaičiuota disociacijos konstanta K_d , kurios vertė lygi $2,4 \cdot 10^{-4} \pm 9 \cdot 10^{-5}$ M (rezultatai pavaizduoti 24–ajame paveiksle.

ICPD9 pasižymėjo silpnesne sąveika nei AZ3. Tai buvo stebima netgi lyginant nespecificinę sąveiką su AZ3 pasižyminčias amino rūgštis. Palyginimas kai kurioms aminorūgštims atvaizduotas (25)-ajame paveiksle.

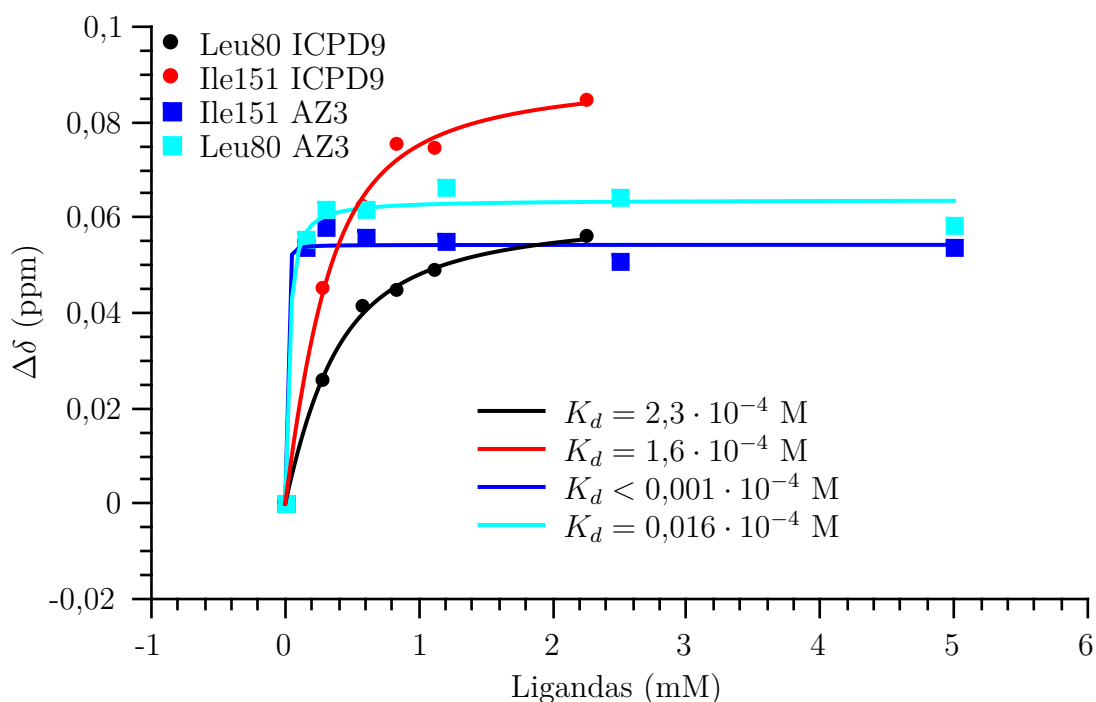
Eksperimentų serijos keičiant slopiklių koncentracijas atliktos skirtinguose slėgiuose leidžia nustatyti K_d priklausomybę nuo slėgio. Naudojantis šia priklausomybe galima nustatyti ligando prisijungimo sąlygotą tūrį. AZ3 atveju, specifinio prisijungimo vietoje esančių aminorūgštys pasižymi lėtąja sąveika, nagrinėjant smailės poslinkį spektre jų termodinaminių parametrų nepavyko nustatyti. Tačiau šiuo metodu pavyko ištirti ICPD9 sąveiką su baltymu. HSP90 α N aminorūgštims sąveikaujant su ligandu ICPD9, parametras K_d didėjo keliant slėgį. Tai reiškia, kad aukštesnis slėgis nepalankus prisijungimui Nors taškų išsibarstymas buvo didelis, buvo išanalizuotos K_d priklausomybės nuo slėgio kelioms amino rūgštims (rezultatai pavaizduoti 26–ajame paveiksle. Nagrinėjant šį reiškinį su skirtingomis amino rūgštimis, jungimosi tūrio pokytis kito gan siaurame intervale – tarp 13 ir 20 $\text{cm}^{-3}\text{mol}^{-1}$. Dėl sudėtingos, eksperimentavimo naudojant aukštą slėgį, specifikos iki šiol yra atlikta labai nedaug darbų kuriuose nustatinėjamas baltymų-ligandų sąveikos tūris. Tuose keliuose atliktuose darbuose įvairioms sistemoms mažamolekulinio ligando prisijungimo prie baltymo tūris svyruoja nuo -160 iki 31 $\text{cm}^{-3}\text{mol}^{-1}$ (Chalikian, 2003; Dubins et al., 2000; Petrauskas et al., 2013; Toleikis et al., 2012). Taigi šis re-



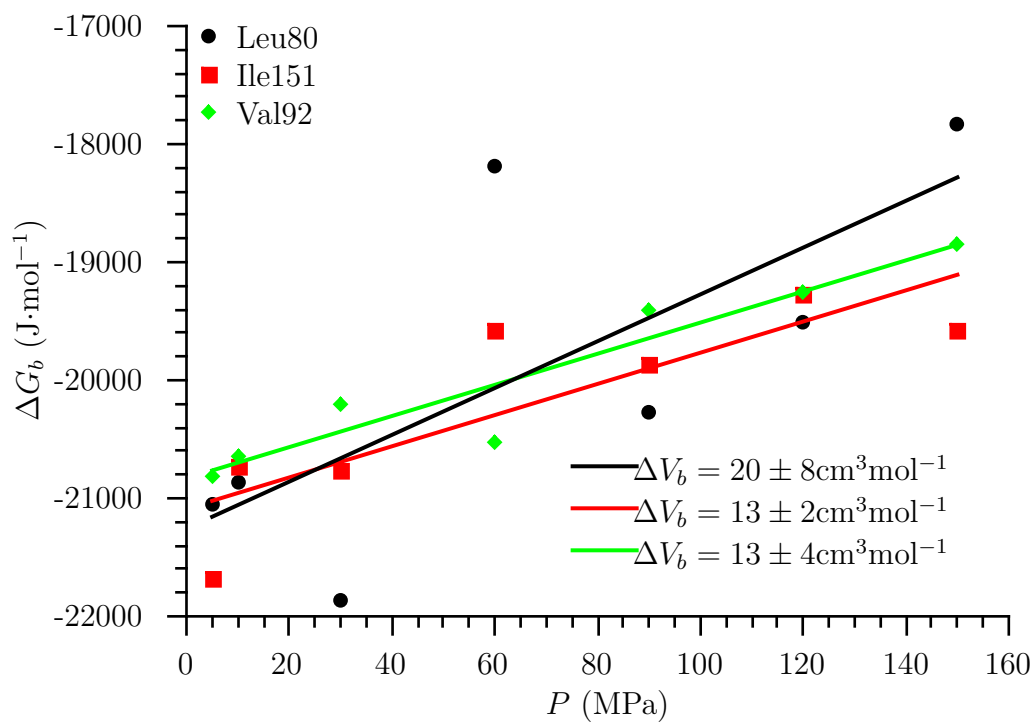
23 pav. HSP90 α N ^{15}N HSQC spektrai. Viršutiniame paveiksle atvaizduoti du spektrai. Mėlyna spalva žymi kontrolinį spektrą be ligando, raudona spalva HSP90 α N spektrą su 0,15 mM AZ3. Aminorūgštys 95Gly ir 97Gly pasižymi itin stipria sąveika su lėtu mainų laiku, todėl spektre su ligandu šioms aminorūgštims matoma tik viena smailė atitinkanti amidinių grupių cheminius poslinkius su prisijungusiu ligandu. Apačioje pavaizduotas HSP90 α N spektras esant labai mažai (0,08 mM) ligando. Šiuo atveju matomi dvigubi signalai atitinkantys susijungusią ir laisvą baltymo formas.



24 pav. Aminorūgščių amidinių grupių smailių poslinkio ^{15}N HSQC spektre priklausomybė nuo ICPD9 koncentracijos. Pritaikius eksperimentinius taškus atitinkantį modelį apskaičiuotos disociacijos konstantos K_d vertės.



25 pav. Kai kurių aminorūgščių amidinių grupių smailių poslinkio ^{15}N HSQC spektre priklausomybė nuo ligandų ICPD9 ir AZ3 koncentracijos. Pagal šias priklausomybes, apskaičiuotos disociacijos konstantos K_d vertės šioms aminorūgštims.



26 pav. ICPD9 jungimosi prie HSP90 α N Gibso energijos priklausomybė nuo slėgio. Eksperimentinius taškus atitinkančių tiesių nuokrypio koeficientai lygūs jungimosi tūriams.

zultatas yra palyginamas su rezultatais gautais panašiose sistemose. Teigiama jungimosi tūrio reikšmė reiškia, kad ligando ir baltymo kompleksas užima didesnę tūrį, nei abu šie komponentai atskirai.

4. Išvados

Šiame darbe aukšto slėgio fluorimetrijos ir aukšto slėgio branduolių magnetinio rezonanso metodais tirti baltymų struktūriniai pokyčiai aukštame slėgyje bei jų sąveika su ligandais. Šių tyrimų metu padarytos šios išvados:

- Karboanhidrazes CAI, CAII, CAXII veikiant aukštu slėgiu vyksta struktūriniai pokyčiai, kurie pasižymi triptofano fluorescencijos spektro batochrominiu pokyčiu. Universaliausias metodas anlaizuoti šiuos fluorescencijos duomenis yra seksti fluorescencijos spektro masių centro pokytį.
- Karboanhidrazėms išvynioti reikalingas slėgis pasižymi tiesine priklausomybe nuo GndHCl koncentracijos, tai leidžia ekstrapoliuojant nustatyti šio parametro vertes fiziškai nepasiekiant tokio slėgio. Iš trijų darbe naudotų karboanhidrazės izoformų, nesant chaotrolo stabiliausia yra CAII izoforma, mažiausiai stabili – CAXIII Karboanhidrazių išsivyniojimas pasižymi neigiamu tūrio pokyčiu.
- Sulfonamidiniai karboanhidrazių slopikliai stabilizuoja jas prieš slėginę denatūraciją. Stipriau besijungiantys ligandai karboanhidrazes stabilizuoja stipriau. Tirtų slopiklių prisijungimas sąlygoja neigiamą baltymo tūrio pokytį.
- CAII išsivyniojimo Gibso energija ir lydymosi slėgis yra tiesinės GndHCl koncentracijos funkcijos. Šių tiesių polinkio koeficientai priklauso nuo slopiklio koncentracijos. Didesni AZM kiekiai sąlygoja didesnes polinkio koeficientų vertes.
- Norint teisingai nustatyti ligando jungimosi tūrį slėginio poslinkio metodu reikia atlikti eksperimentus keičiant tiek slopiklio, tiek chaotrolo koncentracijas, taip sudarant dozavimo kreivę iš ekstrapoliuotų P_m verčių. Šiuo metodu nustatytas AZM prisijungimo sąlygotas CAII baltymo tūrio pokytis ΔV_b yra lygus $-15 \pm 2 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$.
- HSP90 α N veikiant aukštu slėgiu stebimi struktūriniai pokyčiai. Nustatyta, jog baltymui išsivyniojant pirmiausiai savo padėtį keičia Tyr139, Ala161, Arg182, Ser169 aminorūgštys.
- BMR metodu nustatyta, jog prie HSP90 baltymo ligandai AZ3 ir ICPD9 jungiasi prie ATP prisijungimo vietoje esančių aminorūgščių Val92, Gly95, Gly97. AZ3 prisijungimas pasižymi lėtąja sąveika, todėl disociacijos konstatntos vertės negali būti nustatytas pagal cheminį poslinkį. Nustatyta stebimoji ICPD9 disociacijos konstanta K_d lygi $2,4 \cdot 10^{-4} \pm 9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$, o šio ligando prisijungimo prie HSP90 α N sąlygotas tūris – V_b lygus $15 \pm 3 \text{ cm}^3 \text{ mol}^{-1}$

Literatūros sąrašas

- Aggarwal, M., Boone, C. D., Kondeti, B., and McKenna, R. (2013). Structural annotation of human carbonic anhydrases. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28(2):267–277.
- Arnold, M. R., Kremer, W., Lüdemann, H. D., and Kalbitzer, H. R. (2002). 1h-nmr parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides gly-gly-x-ala at pressures between 0.1 and 200 mpa. *Biophys Chem*, 96(2-3):129–140.
- Bodenhausen, G. and Ruben, D. J. (1980). Natural abundance nitrogen-15 {NMR} by enhanced heteronuclear spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 69(1):185 – 189.
- Brandts, J. F., Oliveira, R. J., and Westort, C. (1970). Thermodynamics of protein denaturation. effect of pressure on the denaturation of ribonuclease a. *Biochemistry*, 9(4):1038–1047.
- Bridgman, P. W. (1914). The coagulation of albumen by pressure. *Journal of Biological Chemistry*, 19(4):511–512.
- Brinkman, R., Margaria, R., Meldrum, N., and Roughton, F. (1932). The co2 catalyst present in blood. *J. Physiol*, 75:3–4.
- Burstein, E. A., Vedenkina, N. S., and Ivkova, M. N. (1973). Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem Photobiol*, 18(4):263–279.
- Chalikian, T. V. (2003). Volumetric properties of proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 32:207–35.
- Chen, Y. and Barkley, M. D. (1998). Toward understanding tryptophan fluorescence in proteins. *Biochemistry*, 37(28):9976–9982.
- Chothia, C. (1984). Principles that determine the structure of proteins. *Annu Rev Biochem*, 53:537–572.
- Connolly, M. L. (1983). Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic acids. *Science*, 221(4612):709–713.
- Day, R. and García, A. E. (2008). Water penetration in the low and high pressure native states of ubiquitin. *Proteins*, 70(4):1175–1184.
- Dubins, D. N., Filfil, R., Macgregor, R. B., and Chalikian, T. V. (2000). Role of water in protein-ligand interactions: Volumetric characterization of the binding of 2'-cmp and 3'-cmp to ribonuclease a. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(2):390–401.

- Eriksson, A. E., Jones, T. A., and Liljas, A. (1988). Refined structure of human carbonic anhydrase ii at 2.0 Å resolution. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 4(4):274–282.
- Gil, S., Zaderenzo, P., Cruz, F., Cerdán, S., and Ballesteros, P. (1994). Imidazol-1-ylalkanoic acids as extrinsic 1h nmr probes for the determination of intracellular ph, extracellular ph and cell volume. *Bioorg Med Chem*, 2(5):305–314.
- Greene, Jr, R. and Pace, C. N. (1974). Urea and guanidine hydrochloride denaturation of ribonuclease, lysozyme, alpha-chymotrypsin, and beta-lactoglobulin. *J Biol Chem*, 249(17):5388–5393.
- Greenstein, J. P. (1938). Sulfhydryl groups in proteins i. egg albumin in solutions of urea, guanidine, and their derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 125(2):501–513.
- Hajduk, P. J., Olejniczak, E. T., and Fesik, S. W. (1997). One-dimensional relaxation-and diffusion-edited nmr methods for screening compounds that bind to macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*, 119(50):12257–12261.
- Hawley, S. A. (1971). Reversible pressure–temperature denaturation of chymotrypsinogen. *Biochemistry*, 10(13):2436–2442.
- Hubbard, S. J. and Argos, P. (1994). Cavities and packing at protein interfaces. *Protein Sci*, 3(12):2194–2206.
- Hummer, G., Garde, S., García, A. E., Paulaitis, M. E., and Pratt, L. R. (1998). The pressure dependence of hydrophobic interactions is consistent with the observed pressure denaturation of proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(4):1552–1555.
- Kane, C. D. and Bernlohr, D. A. (1996). A simple assay for intracellular lipid-binding proteins using displacement of 1-anilinonaphthalene 8-sulfonic acid. *Anal Biochem*, 233(2):197–204.
- Kauzmann, W. (1987). Thermodynamics of unfolding. *Nature*, 325:763–764.
- Kitahara, R., Hata, K., Li, H., Williamson, M. P., and Akasaka, K. (2013). Pressure-induced chemical shifts as probes for conformational fluctuations in proteins. *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc*, 71:35–58.
- Kitamura, Y. and Itoh, T. (1987). Reaction volume of protonic ionization for buffering agents. prediction of pressure dependence of ph and poh. *Journal of Solution Chemistry*, 16(9):715–725.

- Kišonaitė, M., Zubrienė, A., Čapkauskaitė, E., Alexey, S., Joana, S., Kairys, V., Michailovienė, V., Manakova, E., Gražulis, S., and Matulis, D. (2014). Intrinsic thermodynamics and structure correlation of benzenesulfonamides with a pyrimidine moiety binding to carbonic anhydrases i, ii, vii, xii, and xiii. *PLoS one*, 9(12):e114106. PDB/4QSA, 4QSB, 4QSI, and 4QSJ.
- Krishnamurthy, V. M., Kaufman, G. K., Urbach, A. R., Gitlin, I., Gudiksen, K. L., Weibel, D. B., and Whitesides, G. M. (2008). Carbonic anhydrase as a model for biophysical and physical-organic studies of proteins and protein-ligand binding. *Chemical reviews*, 108(3):946–1051.
- Kundrot, C. E. and Richards, F. M. (1987). Crystal structure of hen egg-white lysozyme at a hydrostatic pressure of 1000 atmospheres. *J Mol Biol*, 193(1):157–170.
- Kuwajima, K. (1989). The molten globule state as a clue for understanding the folding and cooperativity of globular-protein structure. *Proteins*, 6(2):87–103.
- Lehtonen, J., Shen, B., Vihinen, M., Casini, A., Scozzafava, A., Supuran, C. T., Parkkila, A.-K., Saarnio, J., Kivelä, A. J., Waheed, A., Sly, W. S., and Parkkila, S. (2004). Characterization of ca xiii, a novel member of the carbonic anhydrase isozyme family. *J Biol Chem*, 279(4):2719–2727.
- Li, H., Yamada, H., and Akasaka, K. (1998). Effect of pressure on individual hydrogen bonds in proteins. basic pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 37(5):1167–1173.
- Li, J., Sun, L., Xu, C., Yu, F., Zhou, H., Zhao, Y., Zhang, J., Cai, J., Mao, C., Tang, L., Xu, Y., and He, J. (2012). Structure insights into mechanisms of atp hydrolysis and the activation of human heat-shock protein 90. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44(4):300–306.
- Makhatadze, G. I. and Privalov, P. L. (1992). Protein interactions with urea and guanidinium chloride. a calorimetric study. *J Mol Biol*, 226(2):491–505.
- Maren, T. H. (1967). Carbonic anhydrase: chemistry, physiology, and inhibition. *Physiol Rev*, 47(4):595–781.
- Matulis, D., Kranz, J. K., Salemme, F. R., and Todd, M. J. (2005). Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using thermofluor. *Biochemistry*, 44(13):5258–5266.
- Matulis, D. and Lovrien, R. (1998). 1-anilino-8-naphthalene sulfonate anion-protein binding depends primarily on ion pair formation. *Biophys J*, 74(1):422–9.

- Matulis, D. and Todd, M. J. (2004). *Thermodynamics - Structure Correlations of Sulfonamide Inhibitor Binding to Carbonic Anhydrase*, pages 107–132. Wiley.
- Meyer, B. and Peters, T. (2003). Nmr spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(8):864–890.
- Moller, M. and Denicola, A. (2002). Protein tryptophan accessibility studied by fluorescence quenching. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 30(3):175–178.
- Morkūnaitė, V., Gylytė, J., Zubrienė, A., Baranauskienė, L., Kišonaitė, M., Michailovienė, V., Juozapaitienė, V., Todd, M. J., and Matulis, D. (2014). Intrinsic thermodynamics of sulfonamide inhibitor binding to human carbonic anhydrases i and ii. *J Enzyme Inhib Med Chem*.
- Mozhaev, V. V., Heremans, K., Frank, J., Masson, P., and Balny, C. (1996). High pressure effects on protein structure and function. *Proteins*, 24(1):81–91.
- Myers, J. K., Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci*, 4(10):2138–2148.
- Neckers, L. and Workman, P. (2012). Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res*, 18(1):64–76.
- NYMAN, P. O. (1961). Purification and properties of carbonic anhydrase from human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*, 52:1–12.
- Paladini, Jr, A. and Weber, G. (1981). Pressure-induced reversible dissociation of enolase. *Biochemistry*, 20(9):2587–2593.
- Panick, G., Malessa, R., and Winter, R. (1999). Differences between the pressure- and temperature-induced denaturation and aggregation of beta-lactoglobulin a, b, and ab monitored by ft-ir spectroscopy and small-angle x-ray scattering. *Biochemistry*, 38(20):6512–6519.
- Pellecchia, M., Sem, D. S., and Wüthrich, K. (2002). Nmr in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*, 1(3):211–219.
- Petrauskas, V., Gylytė, J., Toleikis, Z., Cimmperman, P., and Matulis, D. (2013). Volume of hsp90 ligand binding and the unfolding phase diagram as a function of pressure and temperature. *Eur Biophys J*, 42(5):355–362.

- Povarova, O. I., Kuznetsova, I. M., and Turoverov, K. K. (2010). Differences in the pathways of proteins unfolding induced by urea and guanidine hydrochloride: molten globule state and aggregates. *PLoS One*, 5(11):e15035.
- Reshetnyak, Y. K. and Burstein, E. A. (2001). Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. ii. the statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins. *Biophys J*, 81(3):1710–1734.
- Rezus, Y. L. A. and Bakker, H. J. (2006). Effect of urea on the structural dynamics of water. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49):18417–18420.
- Richards, F. (1979). Packing defects, cavities, volume fluctuations, and access to the interior of proteins. including some general comments on surface area and protein structure. *Carlsberg Research Communications*, 44(2):47–63.
- Richards, F. M. (1974). The interpretation of protein structures: total volume, group volume distributions and packing density. *J Mol Biol*, 82(1):1–14.
- Royer, C. A. (2002). Revisiting volume changes in pressure-induced protein unfolding. *Biochim Biophys Acta*, 1595(1-2):201–209.
- Ruan, K., Tian, S., Lange, R., and Balny, C. (2000). Pressure effects on tryptophan and its derivatives. *Biochem Biophys Res Commun*, 269(3):681–686.
- Sawamura, S., Kitamura, K., and Taniguchi, Y. (1989). Effect of pressure on the solubilities of benzene and alkylbenzenes in water. *The Journal of Physical Chemistry*, 93(12):4931–4935.
- Schwalbe, Harald; Jacobs, D. E. B. S. K. F. K. V. M. L. T. (2006). Nmr backbone assignment of the n-terminal domain of human hsp90. *J. Biomol. NMR* 36, 52-52.
- Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). Discovering high-affinity ligands for proteins: Sar by nmr. *Science*, 274(5292):1531–1534.
- Slavik, J. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochim Biophys Acta*, 694(1):1–25.
- Slavik, J., Horak, J., Rihova, L., and Kotyk, A. (1982). Anilinonaphthalene sulfonate fluorescence and amino acid transport in yeast. *J Membr Biol*, 64(3):175–9.
- Stumpe, M. C. and Grubmüller, H. (2007). Interaction of urea with amino acids: implications for urea-induced protein denaturation. *J Am Chem Soc*, 129(51):16126–16131.
- Supuran, C. T. (2008). Carbonic anhydrases—an overview. *Curr Pharm Des*, 14(7):603–14.

- Supuran, C. T., Fiore, A. D., Alterio, V., Monti, S. M., and Simone, G. D. (2010). Recent advances in structural studies of the carbonic anhydrase family: The crystal structure of human ca ix and ca xiii. *Curr Pharm Des*, 16:3346–3254.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Casini, A. (2003). Carbonic anhydrase inhibitors. *Med Res Rev*, 23(2):146–189.
- Supuran, C. T., Scozzafava, A., and Conway, J. (2004). *Carbonic anhydrase - its inhibitors and activators*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA.
- Swietach, P., Vaughan-Jones, R. D., and Harris, A. L. (2007). Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev*, 26(2):299–310.
- Toleikis, Z., Cimmerman, P., Petrauskas, V., and Matulis, D. (2011). Determination of the volume changes induced by ligand binding to heat shock protein 90 using high-pressure denaturation. *Anal Biochem*, 413:171–178.
- Toleikis, Z., Cimmerman, P., Petrauskas, V., and Matulis, D. (2012). Serum albumin ligand binding volumes using high pressure denaturation. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 52:24–29.
- Van Eldik, R., Asano, T., and Le Noble, W. (1989). Activation and reaction volumes in solution. 2. *Chemical Reviews*, 89(3):549–688.
- Vanzi, F., Madan, B., and Sharp, K. (1998). Effect of the protein denaturants urea and guanidinium on water structure: A structural and thermodynamic study. *Journal of the American Chemical Society*, 120(41):10748–10753.
- Wagner, G. and Wüthrich, K. (1982). Sequential resonance assignments in protein 1h nuclear magnetic resonance spectra. basic pancreatic trypsin inhibitor. *J Mol Biol*, 155(3):347–366.
- Wandinger, S. K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The hsp90 chaperone machinery. *J Biol Chem*, 283(27):18473–18477.
- Weber, G. and Drickamer, H. G. (1983). The effect of high pressure upon proteins and other biomolecules. *Q Rev Biophys*, 16(1):89–112.
- Weber, G. and Laurence, D. J. (1954). Fluorescent indicators of adsorption in aqueous solution and on the solid phase. *Process Biochem*, 56(325th Meeting):xxxii.
- Whitesell, L. and Lindquist, S. L. (2005). Hsp90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, 5(10):761–772.

- Whitten, S. T., Wooll, J. O., Razeghifard, R., García-Moreno E, B., and Hilser, V. J. (2001). The origin of ph-dependent changes in m-values for the denaturant-induced unfolding of proteins. *J Mol Biol*, 309(5):1165–1175.
- Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R., and Jakob, U. (1992). Hsp90 chaperones protein folding in vitro. *Nature*, 358(6382):169–170.
- Williamson, M. P., Havel, T. F., and Wüthrich, K. (1985). Solution conformation of proteinase inhibitor iia from bull seminal plasma by 1h nuclear magnetic resonance and distance geometry. *J Mol Biol*, 182(2):295–315.
- Yuan, T., Weljie, A. M., and Vogel, H. J. (1998). Tryptophan fluorescence quenching by methionine and selenomethionine residues of calmodulin: orientation of peptide and protein binding. *Biochemistry*, 37(9):3187–3195.
- Zavada, J., Zavadova, Z., Pastorek, J., Biesova, Z., Jezek, J., and Velek, J. (2000). Human tumour-associated cell adhesion protein mn/ca ix: identification of m75 epitope and of the region mediating cell adhesion. *British journal of cancer*, 82(11):1808.
- Zipp, A. and Kauzmann, W. (1973). Pressure denaturation of metmyoglobin. *Biochemistry*, 12(21):4217–4228.