

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKOS FAKULTETAS
KVANTINĖS ELEKTRONIKOS KATEDRA
BIOFOTONIKOS LABORATORIJA

Laboratorinis darbas (BAMST)

Biologiškai aktyvių molekulių sąveikos tyrimas

VILNIUS
2004

1. Darbo tikslas

Susipažinti su biologiškai aktyvių molekulių sąveikos dėsniniais.

2. Darbo užduotys

1. Susipažinti su skirtuminės sugerties spektroskopijos matavimo metodika.
2. Pagaminti fosfatinio buferio (PBS) tirpalą (pH=7.2).
3. Paruošti nedidelės koncentracijos ($C=10^{-6}M$) porfirino tirpalą bei didelės koncentracijos ($C=10^{-3} - 10^{-4}M$) žmogaus serumo albumino (HSA) arba buliaus serumo albumino (BSA) tirpalus.
4. Išmatuoti porfirino sugerties spektrą.
5. Apskaičiuoti porfirino, sąveikaujančio su baltymu, skirtuminius sugerties spektrus esant įvairioms įdėto baltymo koncentracijoms.
6. Naudojantis tyrimų rezultatais pagal Skečardo metodiką nustatyti baltymo sąveikos su porfirinu pobūdį, sąveikos konstantą K_{sav} , baltymo surišimo centrų skaičių.
7. Įvertinti atliktų matavimų paklaidas.

3. Teorinė dalis

3.1 Veiksniai, sudarantys sąlygas molekulių jungimuisi.

Visos ląstelės yra sudarytos iš molekulių, todėl aišku, kaip svarbu žinoti molekulių sąveikos mechanizmus, kurių dėka jos jungiasi tarpusavyje. Yra žinoma, kad mažų molekulių prisijungimas prie didelių yra daugelio biologinių procesų pagrindas, pvz., maisto medžiagų metabolizmo, hormonų veikimo. Molekulių tarpusavio sąveika lemia tokius procesus kaip raumenų susitraukimas, antibiotikų veikimas, nervinių impulsų perdavimas ir t.t.

Veiksniai, lemiantys molekulių asociaciją:

1. Van der Valso (Van der Waals) sąveikos;
2. Elektrostatinės sąveikos;
3. Vandeningos jungtis;
4. Hidrofobinės sąveikos;
5. Atitikimo (komplementarumo) principas.

1. *Van der Valso sąveikos.* Visi atomai arba molekulės daugiau ar mažiau traukia vieni kitus. Paprastai, nagrinėjant dideles sudėtingas molekules, išskiriamos Van der Valso jėgos: indukcinės, dispersinės ir stūmos. Jeigu šalia neutralios molekulės atsiranda kita molekulė, turinti dipolį, tai krūvių indukcijos dėka ji sukuria priešingo ženklo krūvį tiriamoje molekulėje. Dėl to molekulės pradeda viena kitą traukti. Indukcinės sąveikos potencialas $U_{ind} \sim -1/R^6$. Van der Valso jėgos gali pasireikšti ir tada, kai abi molekulės neturi dipolio. Krūvių fliktuacijos vienoje molekulėje dėka susidaro dipolis d_{fl} , kuris savo ruožtu indukuoja priešingo ženklo dipolį d_{ind} kitoje molekulėje, ir jos pradeda sąveikauti. Sąveikos dydis priklauso nuo molekulių poliarizuojamumo. Kuo didesnis poliarizuojamumas, tuo didesnė tikimybė krūviams persiskirstyti.

$$U_{disp} \sim -\frac{d_{fl}d_{ind}}{\epsilon_0 R^3} \approx \frac{\alpha_1 \alpha_2}{\epsilon_0 R^6}, \quad (1)$$

čia α_1 ir α_2 pirmos ir antros molekulių poliarizuojamumai atitinkamai, ϵ_0 – dielektrinė skvarba. Reikia pastebėti, kad sąveika tarp molekulių trunka $\sim 10^{-16}s$, tačiau per tiek laiko

krūviai molekulėse suspėja persiskirstyti ir sąveika „įvyksta“. Stūmos Van der Valso jėgos pasireiškia, kai atstumai tarp molekulių tampa visai maži. Tokiu atveju molekulių orbitalės pradeda persikloti, o ardančios orbitalės – pildytis. Kadangi ardančios orbitalės labiau ardo negu rišančios riša, atsiranda stūma. Stūmos potencialas $U_{st} \sim e^{-\gamma R}$. Kiekybiškai lyginant visas Van der Valso sąveikų rūšis, indukcinės sąveikos yra silpniausios, dispersinės – toliausiai veikiančios, todėl bendrą potencialą galima būtų išreikšti:

$$U_{vaw} = Ae^{-\gamma R} - b \frac{\alpha_1 \alpha_2}{\epsilon_0 R^6}. \quad (2).$$

2. *Elektrostatinės sąveikos.* Elektrostatinės sąveikos atsiranda tik tarp krūvį turinčių molekulių (dipolių). Žinome, kad elektrostatinė sąveika išreiškiama Kulono dėsniumi:

$$F_{el} = \frac{qq'}{4\pi\epsilon\epsilon_0 R^2}. \quad (3).$$

Neapibrėžtas dydis šioje formulėje yra dielektrinė skvarba ϵ , kadangi jos dydis taip pat priklauso nuo atstumo tarp molekulių:

$$\epsilon = D - \frac{D-1}{2} e^{-\kappa S} \{(RS)^2 + 2RS + 2\}, \quad (4),$$

kur $D=78$, $S=0.3$. Tai empirinė formulė vandeniui. Ši priklausomybė rodo, kad esant mažiems atstumams, dielektrinė skvarba apytiksliai lygi vienetui. Didėjant atstumui, ϵ sparčiai didėja ir tada, kai atstumas 20\AA pasiekia stacionarų dydį. Kaip rodo tyrimai, atstumas, pavyzdžiui, tarp karboksilo jono ir Ca^{2+} jono sudaro vos 2.4\AA . Esant tokiam atstumui sunku tiksliai nusakyti ϵ vertę. Didėjant atstumui, ϵ kitimas pasidaro nežymus, palyginti su $1/R^2$ priklausomybe.

Nagrinėjant sąveikas vandeniniuose ar kituose tirpikliuose, svarbu atsižvelgti į jonų solvatacijos reiškinį. Jis kaip tik ir atsiranda dėl elektrostatinių sąveikų tarp vandens ir ištirpusios medžiagos molekulių. Vandens molekulės apgaubia kiekvieną krūvį nešantį objektą. Hidratacijos efektas paprastai lemia tokius reiškinius kaip rūgščių ir šarmų stiprumas, ATP hidrolizės laisvoji energija, metalo jono sąveikos su neigiamai įkrauta grupe stiprumas ir kt.

3. *Vandenilinės jungtys.* Viena iš svarbiausių biologinių molekulių silpnų sąveikos rūšių yra vandenilinė jungtis. Pagrindinis vandenilinių ryšių pavyzdys yra vanduo. Pastebėta, kad vanduo, būdamas skystas, išlaiko tam tikrą į ledą panašią struktūrą. Kiekvienas vandens deguonies atomas kovalentiškai susijungia su dviem vandenilio atomais, tuo tarpu sudarydamas ir po dvi vandenilines jungtis su kitų molekulių vandenilio atomais. Vandenilinės jungties ilgis $\sim 2.8\text{\AA}$. Šių jungčių dėka vandenyje yra liekamoji struktūra, primenanti cikloheksano žiedus (susijungia trys H_2O molekulės), sujungtus tarpusavyje. Bendru atveju vietoj deguonies atomo gali būti azotas, fluoras, siera. Tačiau tarpe būtina turi būti vandenilio atomas. Vandenilinę jungtį galime vadinti donor-akceptorine. Vandenilinės jungties potencialą išreiškiame:

$$U_{Hj} = D\{1 - e^{-a(r-r_0)}\}^2 - D, \quad (5),$$

kur D – vandenilinės jungties disociacijos energija, a ir r_0 – konstantos. Reikėtų pažymėti, kad vandenilinės jungties energija yra 4–6 kartus didesnė negu Van der Valso jungties energija ($E_H \approx (16 \div 24)\text{kJ/mol}$).

4. *Hidrofobinės sąveikos.* Pagrindinis tirpiklis biologiniuose objektuose yra vanduo – molekulė, turinti dipolinį momentą (~ 2.8 debajai). Patekusi į vandenį, nepolinė molekulė suardo nemaža vandenilinių jungčių, todėl padidėja vandens entalpija H ($\Delta H > 0$). Toliau

vandens molekulės stengiasi persiskirstyti taip, kad sudarytų kuo daugiau vandenilinių jungčių tarpusavyje (gali sudaryti net daugiau negu buvo). Kita vertus, nepolinė molekulė sumažina vandens molekulių judrumą, dėl to sumažėja entropija S ($\Delta S < 0$). Laisvosios energijos pokytis $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ tokio virsmo (nepolinės molekulės perėjimas į vandenį) metu padidėja, o tai yra nenaudinga energetiškai. Tuo yra paaiškinamas blogas nepolinių molekulių tirpimas vandenyje. Jėgos, „neleidžiančios“ iširti, vadinamos hidrofobinėmis. Nepolinės molekulės, blogai tirpstančios vandenyje, pavyzdžiu gali būti angliavandeniliai, riebalai. Tokių molekulių agregaciją irgi galima paaiškinti hidrofobinių jėgų veikimu. Energetiškai naudinga, kad tokios molekulės kuo mažesniu paviršiumi sąveikautų su vandens molekulėmis, o tai įmanoma, jeigu tos molekulės sukimba kartu. Sukibusių molekulių viduje susidaro nepolinė (hidrofobinė) aplinka, be to, mažiau vandens molekulių sąveikauja su hidrofobinėmis sritimis. Tokiu principu yra sudarytos visos biologinės membranos. Dėl agregacijos vandens entropija padidėja, o tai energetiškai naudinga.

5. *Atitikimo (komplementarumo) principas.* Kadangi tarpmolekulinės sąveikos jėgos yra silpnos, molekulės gali stipriai susijungti tik tuo atveju, jeigu yra atitikimas tarp jų paviršių ir jeigu ryšyje dalyvauja daug atomų. Kad susidarytų tvirtas kompleksas, atitikimas turi būti pakankamai tikslus, t.y. paviršiai turi būti komplementarūs. Jeigu viena molekulė turi išsikišimą (pvz.: $-\text{CH}_3$ grupė), tai kitoje molekulėje turi būti įdubimas; priešais teigiamą krūvį turi būti neigiamas ir pan. Grupė, sugebanti atiduoti protoną, gali sudaryti vandenilinę jungtį, jeigu priešais yra komplementari grupė, turinti nepadalintą elektronų porą (O, N). Kad susidarytų hidrofobinis ryšys, nepolinės (hidrofobinės) grupės turi būti viena priešais kitą. Vienas iš svarbiausių biochemijos principų (komplementarumo principas) formuluojamas taip: dvi molekulės, kurių paviršiai yra komplementarūs, stengiasi sąveikauti ir sudaryti ryšius, o nekomplementarios molekulės nesąveikauja.

3.2. Porfirininio tipo pigmentų spektrai.

Porfirinų sugerties spektrams būdinga tai, kad UV srityje ties 400 nm yra didelio intensyvumo juosta, vadinama Soret juosta (SJ), o regimos šviesos srityje stebimos mažesnio intensyvumo (apie 1/10 SJ) juostos, vadinamos Q-juostomis. Toks spektras būdingas visiems porfirininės kilmės pigmentams. 1 pav. a. pavaizduotas artimosios UV srities TPPS sugerties spektras, o 1 pav. b. – regimosios srities TPPS spektras.

Hidrofobinių jėgų dėka vandeninėse terpėse porfirinai lengvai sudaro pusiausvyrinius agregatus. Esant didelei porfirino koncentracijai ($C=10^{-3} - 10^{-4}\text{M}$), gali susidaryti dimerai, trimerai ir aukštesnės eilės oligomerai. Porfirinų agregacija buvo užregistruota spektrofotometriškai, stebint ilgabangį Soret juostos poslinkį. Poslinkio dydis apie 30nm.

Minėti porfirinų agregatai gali būti suardyti keliant aplinkos temperatūrą. Aukštesnėse temperatūrose silpnos jungtys, atsakingos už porfirinų agregaciją, yra nutraukiamos ir dimerų agregacijos juosta nuo 375nm pasislenka ilgabangėn pusėn iki 400 nm, o tai atitinka porfirinų monomerų sugertį. Porfirinų agregacijos laipsnis taip pat priklauso nuo terpės rūgštingumo (pH), jonų sąveikos. Taigi pagal Soret juostos spektrinę padėtį ir formą galime kokybiškai nustatyti tiriamo porfirino agregacijos laipsnį. Mažų koncentracijų tirpaluose (mažiau nei $4 \cdot 10^{-6}\text{M}$) agregacija greičiausiai apibota dimerizacija, ir tirpaluose egzistuoja monomerų ir dimerų dinaminė pusiausvyra. Manoma, jog dimerizacijai sudaro sąlygas porfirinų hidrofobinės liekanos – jos vandeniniuose tirpaluose išsidėsto taip, kad hidrofobinė sritis sudarytų kuo mažesnę plotą, besiliečiantį su vandeniu. Numatoma struktūra turėtų būti „sumuštinio“ tipo dimeras, sudarytas iš dviejų užeinančių vienas ant kito porfirino žiedų ir stabilizuotas šių žiedų $\pi-\pi$ elektronų sąveikos.

Išskiriamos šios „sumuštinio“ tipo dimerams būdingos savybės:

1. Soret juostai charakteringas didelis (10-20 nm) trumpabangis postūmis bei jos išplitimas.

2. Soret juostos ilgabangėje pusėje yra petukai – sugerties juostos, kurių ekstinkcijos koeficientas 10^4 l/cm·M .

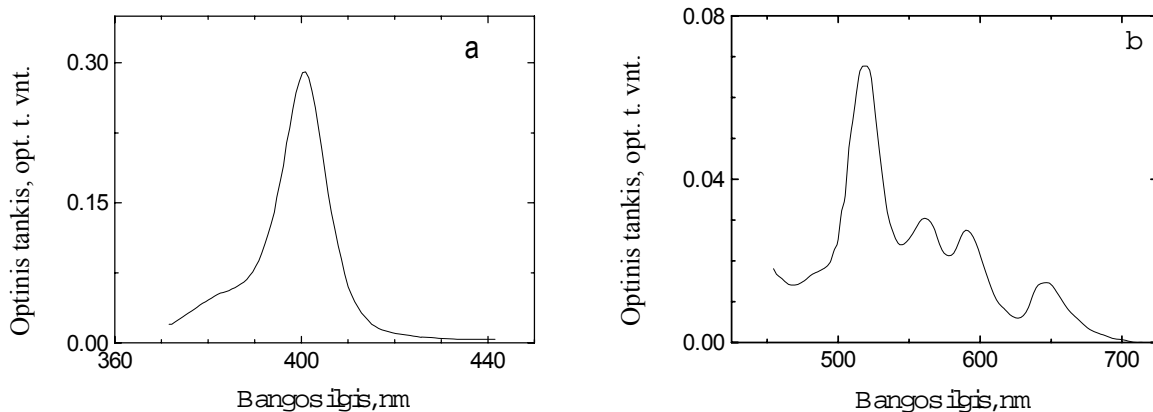
Kitas porfirinų agregatų modelis – dimerai, stabilizuoti šoninėmis porfirino žiedo jungtimis. Šiuo atveju molekulės yra kovalentiškai sujungtos per tiltelį (pavyzdžiui, metino $-\text{CH}_2-$), ir todėl jos gali išsidėstyti erdvėje kampu viena į kitą arba būti vienoje plokštumoje. Šie plokštuminiai dimerai lemia tokius spektrų pokyčius:

1. Soret juostos labai išplinta bei pasislenka į ilgabangę sritį mažiau negu „sumuštinio“ tipo dimerų atveju.

2. Žymiai išauga santykinis vibracinių juostų intensyvumas.

Be jau aprašytų dimerų egzistuoja dar keletas modelių. Pvz., manoma, kad porfirinai gali sudaryti „sumuštinio“ tipo dimerus, stabilizuotus ne žiedų $\pi-\pi$ sąveika, o šoninėmis kovalentinėmis kilmės jungtimis (viena arba dviem). Tokio dimero spektrinės savybės panašios į „sumuštinio“ tipo dimerų savybes, tačiau skiedžiant porfirinų tirpalus (mažinant koncentraciją), jie neskyla į monomerus.

Kovalentiškai sujungti agregatai gali būti daug aukštesnės eilės negu dimerai. Manoma, kad porfirininės kilmės pigmento fotofrino II agregatų masė siekia 30000. Laikant, kad porfirininio žiedo masė lygi 600, agregatus sudaro net 50 molekulių. Tačiau tokių agregatų santykinė dalis tirpale yra nedidelė.



1 pav. TPPS Soret juosta (a) ir regimosios srities spektras (b) ($C=10^{-6}$ M).

3.3. Baltymų bei amino rūgščių sugerties spektrai.

Žinome, kad baltymai yra labai sudėtingos molekulės, sudarytos iš amino rūgščių. Amino rūgštys baltymuose yra sujungtos peptidinėmis jungtimis, kurios pasižymi didele sugertimi UV srityje. Baltyminių molekulių chromoforus (grupės, kurios gali sugerti spinduliavimą) patogu suskirstyti į tris grupes: peptidinės grupės, šoninės amino rūgščių liekanos ir prostetinės grupės (nebaltyminė fermento dalis, kuri reikalinga fermento funkcionavimui).

Peptidinės grupės elektroninio šuolio $n \rightarrow \pi^*$ sugerties juosta paprastai yra 210-220 nm srityje. Jos intensyvumas yra nedidelis ($\epsilon_{\max} = 100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Kur kas stipresnė ($\epsilon_{\max} = 7000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) yra linija ties 190 nm. Ji apsprendžiama elektroniniu šuoliu $\pi \rightarrow \pi^*$. Amino rūgščių, tokių kaip asparginas, glutaminas, argininas ir histidinas, šoninių grupių

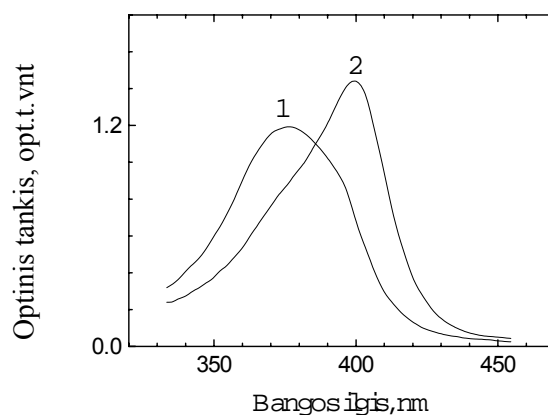
sugerties juostos yra kaip tik peptidinės jungties sugerties srityje (ties 190 nm). Užregistruoti tokius šuolius beveik neįmanoma, nes šių šuolių intensyvumas yra mažesnis už peptidinės jungties $\pi \rightarrow \pi^*$ šuolių intensyvumą, be to, šių amino rūgščių baltyme yra žymiai mažiau negu peptidinių jungčių. Todėl daugiausiai informacijos suteikia tos amino rūgštys, kurių sugertis pasireiškia ties bangos ilgiais, didesniais nei 230 nm. Artimoje UV srityje yra aromatinių amino rūgščių, tokių kaip fenilalaninas, tirozinas ir triptofanas, o taip pat dar dviejų šoninių grupių – histidininės ir disulfidinio tiltelio (cistino) sugerties juostos. Triptofano sugertis daug stipresnė negu dviejų kitų. Tačiau jis retai sutinkamas baltymuose dideliais kiekiais, todėl tirozino įtaka į spektrą tampa jaučiama. Fenilalanino ϵ_{\max} gerokai mažesnis – apie $200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ties 250 nm. Todėl aptikti jį baltyme, kuriame yra kitų aromatinių amino rūgščių, optiniais metodais beveik neįmanoma. Fenilalanino sugertis ties 250 nm lemiamą uždrausto $\pi \rightarrow \pi^*$ perėjimo. Tirozino lokalinė simetrija yra žymiai mažesnė, o perėjimas ties 274 nm – žymiai intensyvesnis ($\epsilon_{\max} = 1400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Triptofano šoninės indolinės grupės spektras daug sudėtingesnis: pakankamai siaurame spektriniame intervale (240 – 290 nm) vyksta trijų ar daugiau rūšių elektroniniai šuoliai.

Cis (cisteino) sugerties matavimas yra apsunkintas vėlgi tuo, kad sugerties smailė ties 230 nm sutampa su peptidinės grupės sugerties sritimi. Disulfidinių tiltelių sugerties juostos išsidėsčiusios kiek toliau, ties 250 – 270 nm, tačiau jų intensyvumas yra per mažas ($\epsilon_{\max} = 300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), kad paveiktų baltymo sugerties spektrą.

Reikėtų pažymėti, kad tiriamoje srityje (350 – 450 nm) baltymo sugertis yra daug mažesnė, negu porfirinų Soret juostos sugertis. Pavyzdžiui, TPPS ekstinkcijos koeficientas ties 400 nm yra $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, o baltymo šioje srityje – $2500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Taigi sugertis skiriasi dviem eilėmis ir baltymo įtakos į spektrą galime nepaisyti.

3.4. Porfirino-baltymo komplekso sugerties spektras.

Dėl sąveikos su baltymu porfirinų spektras pasikeičia: yra stebimas ilgabangis Soret juostos poslinkis (5-10 nm), be to, Soret juosta susiaurėja. Tai turėtų reikšti, kad baltymas suardo pusiausvyrinius porfirino agregatus. Pasislinkusios Soret juostos intensyvumas yra proporcingas baltymo ir porfirino sudarytų kompleksų koncentracijai (susijungusio baltymo koncentracijai). 6 pav. pavaizduota HP, ir HP sąveikaujančio su HSA, Soret juosta.



2 pav. Hp (1) ir Hp sąveikaujančio su baltymu (2) Soret juostos ($C=10^{-4} \text{ M}$).

Žinome, kad tam tikros medžiagos tirpalo optinis tankis yra tiesiškai proporcingas medžiagos koncentracijai tirpale. Tai išreiškiama Bugerio (Bouguer) – Lamberto (Lambert) – Bero (Beer) dėsnium:

$$I = I_0 10^{-\Delta A} \quad (6),$$

$$\Delta A = \varepsilon cl \quad (7),$$

čia I_0 – kritusios šviesos intensyvumas, I – praėjusios šviesos intensyvumas, ε – molinis sugerties (ekstinkcijos) koeficientas, c – ištirpusios medžiagos koncentracija, l – šviesos nueito kelio ilgis.

Laboratoriniame darbe naudojamosi Bugerio-Lamberto-Bero dėsniumi, kadangi matuojamas sugerties pokytis ΔA yra tiesiogiai proporcingas susidariusio komplekso koncentracijai. Sugerties pokytis turi būti matuojamas ties maksimalia komplekso sugertimi, o ne kitoje spektrinėje srityje.

4. Tyrimų metodika

Bazinis tirpalas ruošiamas tirpinant pasvertus pigmento miltelius 1-2 lašuose 100mM NaOH ir skiedžiant 100mM fosfatiniu buferiu (pH=7,2) iki 10^{-3} M koncentracijos. Visų kitų koncentracijų tirpalai turi būti gaminami iš bazinio tirpalo, skiedžiant jį fosfatiniu buferiu prieš pat matavimus.

4.1 Sąveikos ir disociacijos konstantos

Sąveikos tarp dviejų molekulių stiprį galima apibūdinti naudojant sąveikos konstantą K_{sav} [1].

Panagrinėkime molekulės S prisijungimą prie kitos molekulės E, kuri gali būti baltymas, nukleino rūgštis, metalo jonas ar kokia kita dalelė. Jeigu molekulė E gali sąveikauti tik su viena S rūšies molekule (turi vieną susijungimo su molekule S centrą), tai sąveika apibūdinama pirmos eilės cheminės reakcijos lygtimi (8), o pusiausvyros konstanta K_{sav} nustatoma (9) lygtimi:



$$K_{sav} = \frac{[ES]}{[E][S]}. \quad (9),$$

kur $[ES]$ yra ES komplekso koncentracija, $[S]$ – laisvo substrato koncentracija ir $[E]$ – laisvo baltymo koncentracija, arba surišimo centrų koncentracija.

K_{sav} dimensija šiuo atveju yra litrai moliui (arba M^{-1}); ši konstanta yra tiesioginis sąveikos stiprio matas – kuo ji didesnė, tuo stipresnė sąveika. Sąveikos stipris taip pat apibūdinamas standartinės laisvosios energijos pokyčiu ΔG^0 – kuo neigiamesnė ΔG^0 , tuo sąveika stipresnė.

$$\Delta G^0 = -RT \ln(K_{sav}). \quad (10).$$

Be sąveikos konstantos literatūroje dažnai vartojama ir disociacijos konstanta K_d :

$$K_d = \frac{1}{K_{sav}}. \quad (11).$$

4.2 Duomenų analizė

Mažos molekulės S sugebėjimą jungtis su molekule E (tarkim, baltymu) galima įvertinti keičiant S ir E koncentracijas ir stebint, kaip keičiasi komplekso ES koncentracija.

Pirmiausia reikia išsirinkti kokį nors fizikinį parametą arba dydį, tarkim, A , kuriuo galima kokybiškai bei kiekybiškai charakterizuoti komplekso susidarymą ir kuriuo kompleksas skiriasi nuo pradinių komponentų. Pvz., kompleksas ir pradiniai sandai skirtingai sugeria šviesą, suka poliarizacijos plokštumą ir kt. Jeigu fizikinis dydis, tarkim, yra tirpalo optinis tankis, tai stebėjimams pasirenkama tokia spektro sritis, kur sąveikos nulemti pokyčiai yra ryškiausi.

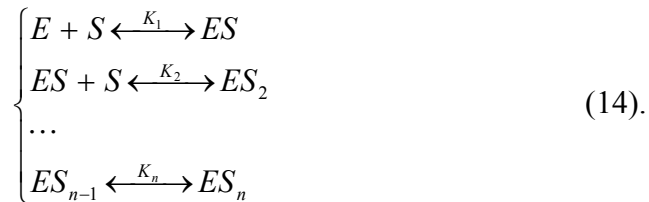
Nepriklausomai nuo to, kokio fizikinio dydžio pasikeitimą stebime eksperimentiškai, didėjant komplekso koncentracijai, tas pokytis turi didėti. Paprastai E koncentracija palaikoma pastovi, o S koncentracija keičiama plačiose ribose (nuo labai mažos iki labai didelės) E koncentracijos atžvilgiu. Esant didelei S koncentracijai, palyginus su E koncentracija, beveik visi surišimo centrai E molekulėje yra užimti substratu S ir stebimos savybės pasikeitimas (pavyzdžiui ΔA) nustoja didėti. Šis efektas vadinamas įsisotinimu. Soties atveju ΔA įgauna maksimalią galimą vertę ΔA_{\max} . Komplekso ES koncentracijos ir pilnos S koncentracijos santykis vadinamas soties laipsniu α . Jeigu E molekulė turi daugiau nei vieną sąveikos centrą, tai α rodo užima sąveikos centrų dalį tirpale. Paprastai laikome, kad $\alpha = \Delta A / \Delta A_{\max}$. Molekulėms, turinčioms daugiau nei vieną sąveikos centrą, šis sąryšis galioja tik tada, kai kiekvienos naujos molekulės S įnešimas į tirpalą sukelia vienodą sugerties pokytį. Taip būna ne visada, tačiau jeigu tenkinamos šios sąlygos, tai turi galioti ir

$$\alpha = \sum_i n \frac{[ES_i]}{n[S_i]}, \quad (12),$$

čia i – S ligandų, prisijungusių prie E, skaičius, kuris kinta nuo 0 iki n . Kai $n=1$,

$$\alpha = \frac{K_{sav}[S]}{1 + K_{sav}[S]}. \quad (13).$$

Tarkime, kad molekulė E turi n nepriklausomų sąveikos centrų S rūšies molekulėms, kurių kiekvieno sąveikos konstanta yra $K_i (i=1, \dots, n)$. Tada turėsime n -tosios eilės cheminių lygčių sistemą:



i -osios reakcijos sąveikos konstanta bus:

$$K_i = \frac{[ES_i]}{[ES_{i-1}][S]}. \quad (15).$$

S molekulių molių skaičius, sąveikaujančių su vienu moliu E yra $n\alpha$; tai gauname sumuodami koncentracijas $[ES] + [ES_2] + \dots$ ir dalindami iš visų E formų koncentracijų sumos. Kai $n = 2$,

$$2\alpha = \frac{[ES] + 2[ES_2]}{[S] + [ES] + [ES_2]}. \quad (16).$$

Bendru atveju sąveikos konstanta lygi

$$K_{sav} = \frac{\sum_i i[ES_i]}{[S] + \sum_i [ES_i]} \quad (17).$$

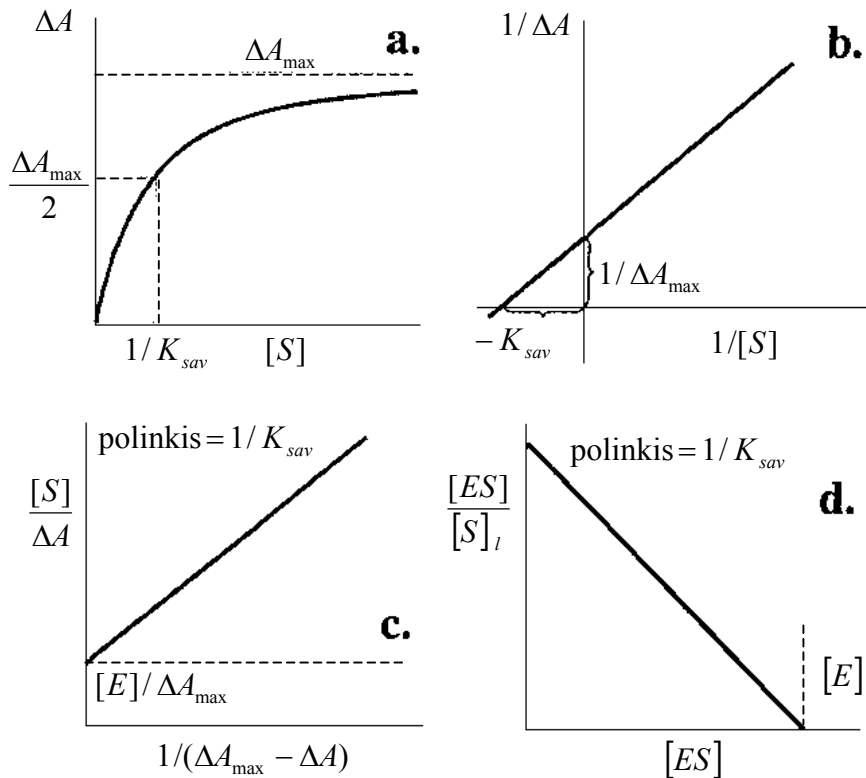
Patogiausias ir vaizdžiausias molekulių tarpusavio sąveikos analizės būdas yra pavaizduoti eksperimentinius duomenis grafiškai. Yra daug grafinių molekulių tarpusavio sąveikos eksperimentinių duomenų pavaizdavimo būdų (Pav. 4). Labiausiai paplitęs yra adsorbcijos izotermės grafinis metodas (pav. 4. a.). Naudojantis (13) lygtimi, ją galime perrašyti ir kitaip:

$$\frac{\Delta A}{\Delta A_{\max}} = \frac{K_{sav}[S]}{1 + K_{sav}[S]} \quad (18)$$

arba

$$\Delta A = \Delta A_{\max} \frac{K_{sav}[S]}{1 + K_{sav}[S]} \quad (19).$$

Šiuo atveju abscisių ašyje yra atidedama įdėto į tirpalą substrato koncentracija $[S]$, o ordinačių – atitinkamas fizikinio dydžio A pokytis ΔA . Sąveikos konstanta nustatoma taip: įvertinamas dydis ΔA_{\max} ; surandama substrato koncentracija, kuriai esant sugerties pokytis lygus $\Delta A_{\max} / 2$. Sąveikos konstanta bus lygi atvirkštiniam tos koncentracijos dydžiui. Taip pat sąveikos konstantą galima nustatyti atliekant aproksimaciją Michaelis-Menten dėsniumi. Naudojantis adsorbcijos izotermės būdu, vaizdžiausiai matomas sąveikos procesui būdingas įsisotinimas. Šis metodas palankus tuo atveju, jei yra tik vienas surišimo centras ir sąveika stipri. Esant silpnai sąveikai, įsisotinimas pasiekiamas labai lėtai ir sunku nustatyti maksimalų fizikinio dydžio pokytį ΔA_{\max} , o taip pat ir tiksliai nustatyti sąveikos konstantą. Šiuo metodu negalima nustatyti, kiek baltymas turi surišimo centrų.



Pav. 4. Skirtingi molekulių sąveikos duomenų grafinio atvaizdavimo būdai. a) adsorbcijos izotermė; b) Lainuevero-Berko atvaizdas; c) Bagšou-Haris atvaizdas; d) Skečardo grafikas.

Be adsorbcijos izotermės sąveikos eksperimentinių duomenų pavaizdavimui dažnai naudojamos vadinamos atvirkštinės koordinatės (pav. 4, b) arba Lineweaver-Berko (Lineweaver-Burk) atvaizdas. Matematinė šio atvaizdo išraiška gaunama iš (19) formulės atitinkamai ją pertvarkius. Išreiškę abiejų kintamųjų atvirkštinius dydžius, gauname:

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{\Delta A_{\max}} \frac{1}{K_{sav} [S]} + \frac{1}{\Delta A_{\max}} \quad (20).$$

Abscisių ašyje atidedant $1/[S]$, o ordinačių – $1/\Delta A$, gaunama tiesė, kuri abscisių ašyje atkerta dydį $-K_{sav}$ o ordinačių ašyje – dydį $1/\Delta A_{\max}$. Pagal tiesės polinkį nustatome $1/K_{sav} \Delta A_{\max}$. Reikia paminėti, kad šis metodas yra žymiai tikslesnis nustatant ΔA_{\max} , palyginus su adsorbcijos izotermės metodu.

Tarkime, kad ΔA_{\max} nustatomas kitu metodu ir yra žinomas. Tada labai pravartus Bagšou-Haris (Bagshaw-Harris) atvaizdas. Eksperimentiškai išmatuojamas fizikinio dydžio pokytis ΔA , ir, esant bet kuriai įdėto substrato koncentracijai $[S]$, suskaičiuojamas soties laipsnis $\alpha = \Delta A / \Delta A_{\max}$. Jei, esant pusiausvyrai su substratu, sąveikaujančio baltymo dalis yra α , tai laisvų surišimo centrų (laisvo baltymo) koncentracija $[E]_l$ bus lygi

$$[E]_l = [E](1 - \alpha), \quad (21),$$

komplekso koncentracija bus lygi

$$[ES] = \alpha [E], \quad (22),$$

likusio laisvo substrato koncentracija $[S]_l$ bus lygi

$$[S]_l = [S] - [ES] = [S] - \alpha [E]. \quad (23).$$

Pagal apibrėžimą sąveikos konstanta yra lygi:

$$K_{sav} = \frac{[ES]}{[E]_l [S]_l} \quad (24),$$

$$K_{sav} = \frac{\alpha}{(1 - \alpha)([S] - \alpha [E])} \quad (25).$$

Pertvarkius gauname:

$$\frac{[S]}{\alpha} = \frac{1}{K_{sav}} \frac{1}{(1 - \alpha)} + [E], \quad (26),$$

arba, įstačius $\alpha = \Delta A / \Delta A_{\max}$, gauname galutinę išraišką:

$$\frac{[S]}{\Delta A} = \frac{1}{K_{sav}} \frac{1}{(\Delta A_{\max} - \Delta A)} + [E]. \quad (27).$$

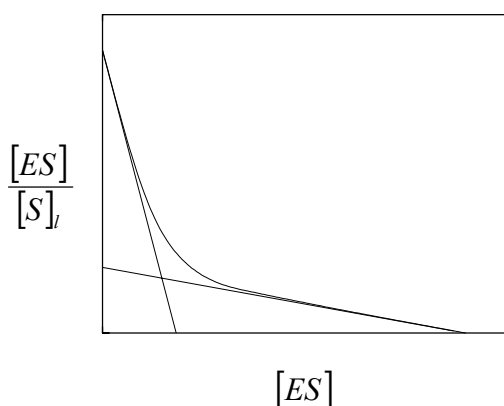
Šios lygties kintamieji yra įdėto substrato koncentracija $[S]$ bei fizikinio dydžio pokytis ΔA . Abscisių ašyje atidedant $1/(\Delta A_{\max} - \Delta A)$ o ordinačių $[S]/\Delta A$ turėtume gauti tiesę (pav. 4 c), kurios polinkis nurodytų $1/K_{sav}$ o ordinačių ašyje atkertama atkarpa būtų lygi $[E]/\Delta A_{\max}$. Dydis $[E]$ yra lygus surišimo centrų koncentracijai tirpale ir, palyginę jį su žinoma baltymo koncentracija, gauname surišimo centrų skaičių n . Taip pat informatyvūs ir gautos kreivės nukrypimai nuo tiesės. Jeigu kreivė yra įdubusi, tai byloja apie teigiamą kooperatinį efektą (įsisotinimo laipsniui didėjant, sąveikos konstanta taip pat didėja), o iškili kreivė rodytų esant neigiamą kooperatinį efektą arba, labiau tikėtina, daugelį skirtingo giminingumo sąveikos centrų skaičių (tiriamam substratui) baltymo molekulėje.

Vienas tiksliausių ir patikimiausių sąveikos duomenų vaizdavimo būdų yra grafinis Skečardo metodas (Pav. 4, d). Lygtį (17) galime pertvarkyti ir taip:

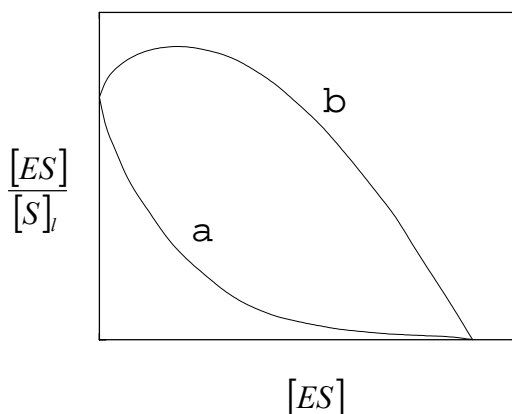
$$\frac{[ES]}{[S]_l} = -\frac{[ES]}{K_{sav}} + [E] \quad (28).$$

Abscisių ašyje atidedant ferment-substratinio komplekso koncentraciją $[ES]$, o ordinačių ašyje $\frac{[ES]}{[S]}$, esant vienam surišimo centrui gauname tiesę, kurios polinkis bei ordinačių ašyje atkerta atkarpa tiksliai nusako sąveikos konstantą. Kai baltymas turi keletą surišimo centrų su skirtingomis sąveikos konstantomis, Skečardo grafikas yra kelių tiesių (tiek kiek yra surišimo centrų) superpozicija.

Tegul molekulė E turi du surišimo centrus, tada Skečardo grafikas turės du tiesinius segmentus su lūžio tašku (5 pav.). Jeigu surišimo centrų yra daug, tai kreivė turės 6 pav. a pavaizduotą pavidalą. Jeigu kiekvienos naujos molekulės prisijungimas skatina prisijungti kitą naują molekulę (didina giminingumą), tai Skečardo grafikas turės išgaubtą pavidalą, kaip pavaizduota 6 pav. b.



5pav. Skečardo grafikas, esant dviem surišimo centrams.



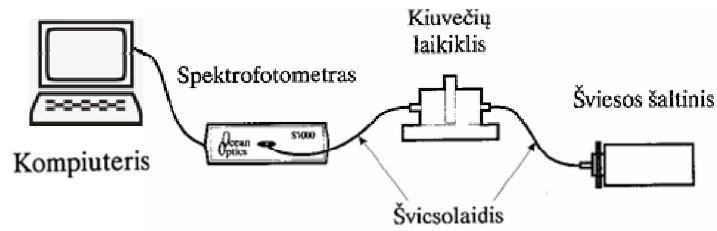
6pav. Skečardo grafikai esant daugeliui priklausomų surišimo centrų.

5. Eksperimentas

Sąveiką tarp porfirinų ir baltymų galima tirti naudojant skirtuminės sugerties spektroskopijos metodą, kadangi porfirininės kilmės pigmentams (Hp, TPPS₄, DMHp bei PF) ir C₆₀ dėl sąveikos su baltymu būdingas Soret juostos postūmis į ilgabangę pusę per 4-15 nm, lyginant su laisvu sensibilizatoriumi.

Šiame darbe naudojamas šviesolaidinis spektrometras „Ocean Optics“ PC1000. Jis sudarytas iš šviesos šaltinio, kiuvečių laikiklio ir kompiuteryje įmontuotos plokštės (7pav.).

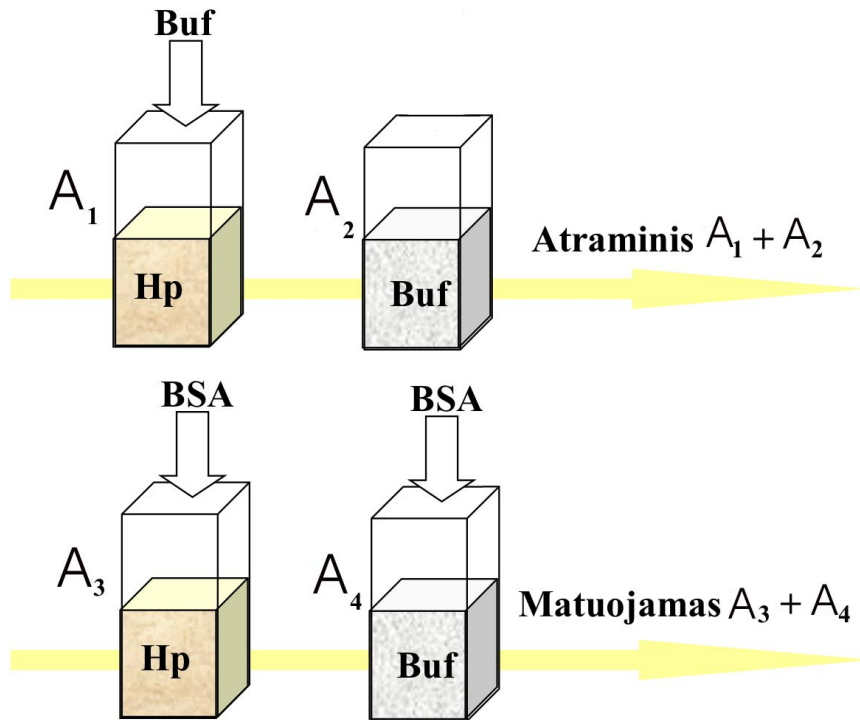
Kompiuterinėje plokštėje yra sumontuota difrakcinė gardelė, kuri šviesos signalą išskleidžia į spektrą.



Pav. 7. Kompiuteriškai įmontuoto spektrometro schema.

Spektras yra registruojamas diodine liniuote. Spektrofotometras yra valdomas programiškai: parenkant parametrus galima keisti spektrų registravimo dažnį, spektro skiriamąją gebą, jautrį. Visi spektrometro komponentai yra sujungti šviesolaidžiais. Laboratorinio darbo metu gali būti naudojami dviejų rūšių šviesos šaltiniai: ksenono lempa (UV spektro sričiai) ir halogeninė lempa (regimajai sričiai matuoti). Prireikus tarp šviesos šaltinio ir šviesolaidžio galima įstatyti šviesos filtrą. Priklausomai nuo šviesos šaltinio parenkami ir šviesolaidžiai: kvarcinis arba paprasto stiklo.

Porfirinų sąveikos su HSA principinė tyrimų schema pavaizduota pav. 8. Dirbant su „Ocean Optics“ PC1000 spektrometru, į optinį stovą vienu metu telpa tik viena kiuvetė, todėl skirtuminiai porfirino sąveikos su baltymu spektrai gali būti gauti po tokios matavimų sekos. Eksperimentui atlikti reikės 4 kiuvečių (pvz. 10 mm skersmens). Dvi kiuvetės turi būti skirtos atraminiams matavimams (1 ir 2 kiuvetės), dvi – sąveikos matavimams (3 ir 4 kiuvetės). Taigi, turime du „hipotetinius“ kanalus: „atraminį“ ir „matavimo“ (pav. 8).



8 pav. Porfirinų sąveikos su baltymu principinė matavimo schema.

Prieš sugerties spektrų registravimą užrašomas tamsinis spektras (be šviesos šaltinio). Vėliau į antrą ir ketvirtą kiuvetę pilamas fosfatinio buferio (PBS) tirpalas (2ml), o į pirmą ir trečią – toks pats porfirino tirpalo ($C = 10^{-5} - 10^{-6}$ M) tūris (kiuvetės turi būti ypatingai švarios). Po to, užrašomas atraminis spektras, pvz. „matavimo“ kanalui (kiuvetė nr. 4), bei užregistruojamas porfirino tirpalo sugerties spektras (kiuvetė nr. 3). Analogiška matavimų seka atliekama ir „atraminiam“ kanalui.

Į „matuojamame“ kanale esančią kiuvetę (nr. 3) su porfirino tirpalu dedama pirmoji koncentruoto ($C=5 \cdot 10^{-5}$ M) baltymo porcija (50 μ l). Norint išvengti skiedimo efekto, į „atraminio“ kanalo kiuvetę (nr. 1) su porfirinu dedamas atitinkamas PBS tūris. Taip pat, norint išvengti baltymo sugerties, į atraminio kanalo kiuvetę su PBS (nr. 4) dedamas atitinkamas baltymo tūris. Nusistovėjus pusiausvyrai (po 1-2 min.), paeiliui užrašomi sugerties spektrai „atraminiame“ ir „matuojamajame“ kanaluose. Toliau vis pridedama baltymo ir, leidus sistemai nusistovėti, vėl užrašomi reikalingi spektrai (vėliau galima dėti ir didesnius baltymo kiekius). Kad per daug neatskiestume porfirino, vėliau galime naudoti koncentruotesnį baltymo tirpalą ($C = 10^{-4}$ M). Baltymas (porcijomis) dedamas tol, kol procesas pasiekia sotį (kai tolesnis baltymo koncentracijos padidėjimas sukelia nykstamai mažus sugerties (Soret) juostos poslinkius).

Apdorojant tyrimų rezultatus, pradžioje paskaičiuojama baltymo koncentracija (C_{balt}) kiuvetėje nr. 3 po kiekvieno bandymo (baltymo porcijos pridėjimo). Taip pat iš eksperimentinių duomenų apskaičiuojamas sugerties pokytis, kurį sukelia atitinkama baltymo koncentracija. Tam nubraižomi porfirino sąveikos su baltymu skirtuminiai spektrai* tiriamai sugerties juostai (skirtuminių sugerties spektrų pavyzdys pateiktas pav. 9).

Pav. 9. DHp sąveikos su HSA Soret juostos skirtuminis spektras.

Sąveikos konstantos K_{sav} nustatymui naudojamas pirmos eilės cheminės reakcijos modelis (tai aprašyta šio darbo 4.2 skyriuje). Apytiksliai pradiniam sąveikos konstantos nustatymui naudotina adsorbcijos izotermės grafinė metodika. Iš gautų eksperimentinių rezultatų nubrėžiama sugerties pokyčio ΔA priklausomybė nuo įdėto į tirpalą fotosensibilizatoriaus koncentracijos [S]. Eksperimento duomenys aproksimuojami Michaelis-Menten dėsnio ((18) formulė), pvz. naudojantis programiniu paketu „Origin 4.0“. Tokiu būdu įvertinama ΔA_{max} (taip pat ir α) ir sąveikos konstanta K_{sav} .

Sąveikos konstantą galima įvertinti, abscisių ašyje atidėjus baltymo koncentraciją kiuvetėje nr. 3, o ordinačių ašyje – sugerties pokytį ΔA . Įvertinamas maksimalus sugerties

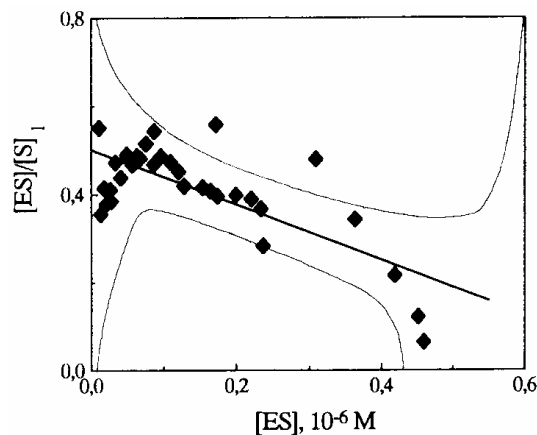
* Skirtuminiai sugerties spektrai randami skaitmeniniu būdu, pvz. naudojant „Windows“ operacinės sistemos programinį paketą „Origin 4.0“.

pokytis ΔA_{\max} . Ties $1/2\Delta A_{\max}$ surandama atitinkama baltymo koncentracija. Sąveikos konstanta bus lygi:

$$K_{sav} = \frac{1}{2} \frac{1}{C_{balt}} \quad (29)$$

Po pradinio įvertinimo būtina panaudoti visas aukščiau aprašytas (grafines) sąveikos konstantos nustatymo metodikas.

Tikslesniam sąveikos konstantos nustatymui bei sąveikos pobūdžio įvertinimui naudojama grafinė Skečardo (Scatchard) metodika. Šiuo atveju abscisių ašyje atidedame sugerties pokytį ΔA , o ordinačių ašyje – $\Delta A/C_{balt}$. Skečardo grafikas aproksimuojamas tiesiškai. Pagal tiesės polinkį nustatoma sąveikos konstantos K_{sav} vertė. Yra nustatyta, kad mažos eksperimentinės paklaidos tampa didelėmis netoli abiejų Skečardo grafiko ašių. Remiantis šiuo teiginiu, aproksimacijai rekomenduojama naudoti tik taškus, esančius grafiko tiesinėje dalyje, o taškus su didelėmis paklaidomis grafiko pakraščiuose at mesti (Pav. 10).



Pav. 10. Plona linija parodytos galimos Skečardo grafiko paklaidos grafiko kraštuose.

Kai kuriais atvejais vienas surišimo centras yra nepriimtinas, nes skaičiuojant gaunami taškai su neigiamomis vertėmis. Todėl reikia įvesti keletą surišimo centrų. Tam tikslui $[ES] = \alpha[E]$ turi būti pakeičiama į $[ES] = \alpha[E]/n$ kur n – surišimo centrų skaičius baltymo molekulėje. Tada (28) lygtis keičiama:

$$\frac{[ES]}{[S]} = \frac{[ES]}{n[S] - [ES]} \quad (30)$$

Varijuojant skaičių n , gaunami racionalūs (be neigiamų verčių) Skečardo grafikai. Kai Skečardo grafikas akivaizdžiai rodo keletą surišimo centrų su skirtingomis sąveikos konstantomis, reikia taikyti tiesines aproksimacijas su skirtingais tiesių polinkiais. Kiekvienos tiesės polinkis atspindi atitinkamo sąveikos centro sąveikos konstantą.

6. Kontroliniai klausimai

1. Veiksniai, lemiantys molekulių jungimąsi.
2. Porfirininės kilmės pigmentai. Jų sugerties spektrai.
3. Baltymų bei amino rūgščių sugerties spektrai.
4. Molekulių sąveikos stiprio įvertinimo metodikos.

7. Literatūra

1. Мецлер Д. Как молекулы соединяются друг с другом. Биохимия. М., Мир, 1980, т.1, с.242-252.
2. Moan J., Rimington C., Western A. The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin. *Chimica Clin. Acta*, 1985, v. 145, p. 227-236.
3. Кантор Ч, Шиммел П. Биофизическая химия. Т. 2-3. М., Мир, 1984.
4. Берштейн ИЯ, Каминский ЮЛ. Спектрофотометрический анализ в органической химии. Ленинград, Химия, 1986.