



UNIwersytet Jagielloński
w Krakowie

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Anna Kwasek

Kinetyczne i termodynamiczne badania oddziaływań hemu z ludzką α_1 -mikroglobuliną

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Biochemii Fizycznej
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytetu Jagiellońskiego
Promotorzy: prof. dr hab. Zygmunt Wasylewski
oraz prof. dr hab. Andrzej Kozik

Kraków, maj 2011

*Temat niniejszej pracy zawdzięczam mojemu pierwszemu Promotorowi,
śp. prof. dr. hab. Zygmuntowi Wasylewskiemu.
Pod Jego opieką przeprowadzona została
część eksperymentalna projektu.*

*Problematyka rozprawy jest wynikiem współpracy
z prof. dr. Bo Åkerströmem z Uniwersytetu w Lund w Szwecji,
pod którego adresem kieruję również wyrazy wdzięczności.*

*Składam serdeczne podziękowania mojemu obecnemu Promotorowi,
Panu prof. dr. hab. Andrzejowi Kozikowi,
za życzliwość, opiekę naukową
oraz cenne uwagi i sugestie
w trakcie pisania pracy.*

*Pani prof. dr hab. Marcie Dziedzickiej-Wasylewskiej
dziękuję za wyrozumiałość i przychyłność,
a wszystkim Pracownikom i Doktorantom
Zakładu Biochemii Fizycznej,
w szczególności
dr Agnieszce Polit, dr Sylwii Kędrackiej-Krok
i dr. Andrzejowi Góreckiemu,
za koleżeńską pomoc, wsparcie i przyjazną atmosferę.*

SPIS TREŚCI

1. STRESZCZENIE	1
2. ABSTRACT	4
3. WPROWADZENIE.....	7
3.1. BUDOWA, SYNTEZA I WYSTĘPOWANIE HEMU	7
3.2. ROLA HEMU W ORGANIZMIE	9
3.3. TOKSYCZNE DZIAŁANIE WOLNEGO HEMU	11
3.4. MECHANIZMY OCHRONY ORGANIZMU PRZED SZKODLIWYM DZIAŁANIEM WOLNEGO HEMU.....	13
3.4.1. ROLA OKSYGENAZY HEMOWEJ	13
3.4.2. BIAŁKA OSOCZA WIĄŻĄCE WOLNY HEM I HEMOGLOBINĘ.....	14
3.4.3. INNE CZYNNIKI ZMNIEJSZAJĄCE TOKSYCZNOŚĆ WOLNEGO HEMU.....	16
3.5. SYNTEZA I WYSTĘPOWANIE α_1 -MIKROGLOBULINY.....	16
3.6. α_1 -MIKROGLOBULINA JAKO PRZEDSTAWICIEL LIPOKALIN	17
3.7. WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE α_1 -MIKROGLOBULINY	20
3.8. ROLA α_1 -MIKROGLOBULINY	22
4. CEL PRACY	25
5. MATERIAŁY I METODY	26
5.1. MATERIAŁY I APARATURA	26
5.2. METODY.....	28
5.2.1. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK.....	28
5.2.2. POMIARY WIDM DICHROIZMU KOŁOWEGO.....	30
5.2.3. POMIARY WIDM ABSORPCYJNYCH I FLUORESCENCYJNYCH.....	31
5.2.4. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE I ELEKTROFOREZA W WARUNKACH NIEDENATURUJĄCYCH	32
5.2.5. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW HEMU I PROTOPORFIRYNY IX.....	33
5.2.6. SĄCZENIE MOLEKULARNE α_1 -MIKROGLOBULINY ORAZ JEJ KOMPLEKSÓW Z HEMEM I PROTOPORFIRYNA ̄ IX	33
5.2.7. PRZEWIDYWANE WARTOŚCI MASY CZĄSTECZKOWEJ ORAZ PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO	34
5.2.8. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE.....	34
5.2.9. POMIARY SZYBKIEJ KINETYKI WIĄZANIA LIGANDÓW PRZEZ α_1 -	

MIKROGLOBULINĘ METODĄ ZATRZYMANEGO PRZEPŁYWU	36
5.2.10. POMIARY ZANIKU W CZASIE ANIZOTROPII FLUORESCENCJI.....	37
6. WYNIKI.....	41
6.1. PODSTAWOWE WŁAŚCIWOŚCI REKOMBINOWANYCH FORM α_1-	
MIKROGLOBULINY	41
6.1.1. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE	41
6.1.2. PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNYCH NATURALNYCH ORAZ	
REKOMBINOWANYCH FORM LUDZKIEJ α_1 -MIKROGLOBULINY	42
6.1.3. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE I ELEKTROFOREZA W	
WARUNKACH NIEDENATURUJĄCYCH	44
6.1.4. SĄCZENIE MOLEKULARNE	45
6.1.5. POMIARY WIDM DICHROIZMU KOŁOWEGO ORAZ WYZNACZENIE	
ZAWARTOŚCI STRUKTUR DRUGORZĘDOWYCH W REKOMBINOWANYCH	
FORMACH α_1 -MIKROGLOBULINY.....	48
6.2. KOMPLEKSY α_1-MIKROGLOBULINY Z HEMEM ORAZ	
PROTOPORFIRYNĄ IX.....	51
6.2.1. WIDMA DICHROIZMU KOŁOWEGO KOMPLEKSÓW α_1 MIKROGLOBULINY	
Z LIGANDAMI.....	51
6.2.2. SĄCZENIE MOLEKULARNE KOMPLEKSÓW α_1 -MIKROGLOBULINY Z	
HEMEM I PROTOPORFIRYNĄ IX.....	53
6.2.3. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE HEMEM.....	55
6.2.4. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE PROTOPORFIRYNĄ	
IX	62
6.2.5. POMIARY SZYBKIEJ KINETYKI WIĄZANIA LIGANDA PRZEZ α_1 -	
MIKROGLOBULINY	67
6.2.6. ROZDZIELCZE W CZASIE POMIARY ANIZOTROPII FLUORESCENCJI	75
7. DYSKUSJA	86
7.1. WPŁYW MUTACJI PUNKTOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI LUDZKIEJ α_1-	
MIKROGLOBULINY	86
7.2. BADANIA SPEKTROFOTOMETRYCZNE WIĄZANIA HEMU I	
PROTOPORFIRYNY IX PRZEZ α_1-MIKROGLOBULINĘ.....	92
7.3. KINETYKA WIĄZANIA HEMU PRZEZ α_1-MIKROGLOBULINĘ.....	99
7.4. STRUKTURALNE BADANIA KOMPLEKSÓW α_1-MIKROGLOBULINY Z	

LIGANDAMI	101
8. PODSUMOWANIE.....	105
9. BIBLIOGRAFIA.....	106

Lista skrótów

- α_1 M – α_1 -mikroglobulina,
- ALA – kwas δ -aminolewulinowy (ang. *δ -aminolevulinic acid*),
- ALA-S – syntaza ALA,
- APS – nadsiarczan amonu, syst. nadtlenodisiarczan(VI) diamonu,
- BBP – białko wiążące bilinę (ang. *bilin-binding protein*),
- BLG – β -laktoglobulina,
- BSA – wołowa albumina osocza (ang. *bovine serum albumin*),
- DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethylsulfoxide*),
- DTT – ditiotreitrol,
- EDTA - kwas etylenodiaminotetraooctowy (ang. *ethylenediaminetetraacetic acid*),
- FABP – białka wiążące kwasy tłuszczowe (ang. *fatty acid-binding proteins*),
- FPLC – szybka chromatografia cieczowa białek (ang. *fast protein liquid chromatography*),
- GSH – zredukowany glutation,
- GuHCl – chlorowodorek guanidyny,
- HBP – białko wiążące hem (ang. *heme-binding protein*),
- HDL – frakcja lipoprotein o dużej gęstości (ang. *high-density lipoproteins*),
- HO – oksigenaza hemowa,
- HOMO – najwyższy obsadzony orbital molekularny (ang. *highest occupied molecular orbital*),
- HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. *high-performance liquid chromatography*),
- HRD – hemowa domena regulatorowa (ang. *heme-regulatory domain*),
- HRE – element odpowiedzi na hem (ang. *heme-response element*),
- HRI – hamująca translację kinaza regulowana przez hem (ang. *heme-regulated inhibitor*)
- HSA – ludzka albumina osocza (ang. *human serum albumin*)
- 1,5-I-AEDANS – kwas 5-[2-[(2-jodoacetylo)amino]etyloamino]naftaleno-1-sulfonowy,
- ICAM – wewnątrzkomórkowa cząsteczka adhezyjna (ang. *intracellular adhesion molecule*),
- IEF – ogniskowanie izoelektryczne (ang. *isoelectric focussing*)
- IL – interleukina,
- IPTG – izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozyd,
- LB – pożywka bakteryjna Luria Bertani Medium,

LDL – frakcja lipoprotein o małej gęstości (ang. *low-density lipoproteins*),

LUMO – najniższy nieobsadzony orbital molekularny (ang. *lowest unoccupied molecular orbital*)

MARE – sekwencja rozpoznawana przez czynniki transkrypcyjne z rodziny Maf (ang. *Maf-recognition element*),

MPI – rodzina inhibitorów metaloproteinaz,

MUP – białka z rodziny lipokalin występujące w moczu i wydzielinach większości kręgowców (ang. *major urinary proteins*),

NBT – błękit nitrotetrazolowy (ang. *nitroblue tetrazolium*),

NGAL – lipokalina związana z żelatynazą neutrofilową (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*)

NOS – syntaza tlenku azotu (ang. *nitric oxide synthase*),

NP – nitroforyny,

OBP – białka wiążące substancje zapachowe (ang. *odorant-binding proteins*),

OG – n-oktylo- β -D-glukozyd,

PAGE – elektroforeza w żelu poliakryloamidowym (ang. *polyacrylamide gel electrophoresis*),

PPIX – protoporfiryna IX,

RES – układ siateczkowo-śródbłonkowy (ang. *reticuloendothelial system*),

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen forms*),

SCR – zachowany region strukturalny (ang. *structurally conserved region*),

SDS – dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulphate*),

snRNP – mały jądrowy kompleks rybonukleoproteinowy (ang. *small nuclear ribonucleo-protein*),

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina,

VCAM – cząsteczka adhezyjna komórek śródbłonka naczyń (ang. *vascular adhesion molecule*),

VEGP – białko gruczołu von Ebnera (ang. *von Ebner's gland protein*),

wt – białko typu dzikiego (ang. *wild type*)

1. STRESZCZENIE

α_1 -Mikroglobulina (α_1 M), to niewielka glikoproteina z rodziny lipokalin, białek o strukturze antyrównoległej baryłki β z hydrofobowym wnętrzem, stanowiącym kieszeń wiążącą drobnocząsteczkowe ligandy. α_1 M posiada żółtobrazowe zabarwienie i jest heterogeniczna pod względem ładunku. Obydwie cechy wynikają z obecności niezidentyfikowanej substancji chromoforowej, która w ludzkiej α_1 M związana jest prawdopodobnie z jedyną wolną resztą cysteinową (Cys 34) oraz z trzema resztami lizynowymi (Lys 92, Lys 118 i Lys 130). Zgodnie z modelem strukturalnym wszystkie wspomniane reszty aminokwasowe leżą w pobliżu wejścia do kieszeni lipokalinowej. W moczu ludzkim wykryto dwie formy α_1 M; jedna ma pełną długość, a druga jest skrócona o C-końcowy tetrapeptyd Leu-Ile-Pro-Arg (LIPR). Funkcja biologiczna α_1 M nie została jak dotąd poznana, jednak ostatnie doniesienia wskazują coraz mocniej na jej rolę w ochronie antyoksydacyjnej organizmu. α_1 M wiąże hem oraz hemoglobinę, a forma pozbawiona tetrapeptydu LIPR degraduje hem z wytworzeniem charakterystycznego chromoforu. Komórki wątrobiaka poddane działaniu oksy-, czy też methemoglobiny, hemu lub utworzonych w wyniku reakcji Fentona rodników hydroksylowych prowadzą wzmożoną syntezę kodującego α_1 M RNA i samego białka, a także zwiększają jego wydzielanie. Stwierdzono także ochronną rolę α_1 M względem ludzkich komórek erytroidalnych poddanych działaniu oksydantów, takich jak hem, hemoglobina, czy rodniki hydroksylowe.

W niniejszej pracy badano rekombinowane warianty ludzkiej α_1 M, w tym typ dziki (wt), formę pozbawioną tetrapeptydu LIPR (wt Δ LIPR) oraz muteiny, w których wspomniane wyżej reszty: cysteinową oraz lizynowe zastąpiono, odpowiednio, resztami: serynową i treoninowymi. Pomiary widm dichroizmu kołowego potwierdziły prawidłową strukturę drugorzędową wszystkich badanych białek, charakteryzującą się zdecydowaną przewagą formy β -harmonijki. Widma absorpcyjne i fluorescencyjne wskazują na znacznie mniejszą zawartość charakterystycznego dla α_1 M chromoforu w białkach rekombinowanych, w porównaniu z odpowiednikami z osocza krwi i moczu ludzkiego. Metodą ogniskowania izoelektrycznego stwierdzono również znacznie większą jednorodność badanych białek pod względem ładunku. Różnice w widmach absorpcyjnych poszczególnych form rekombinowanych α_1 M wskazują na to, że wszystkie spośród poddanych mutacjom reszty aminokwasowe są istotne dla procesu tworzenia chromoforu.

Brak charakterystycznych pasm absorpcji i fluorescencji w widmach mutein z podstawieniem reszty Cys 34 sugeruje, że jest ona kluczowa dla etapu wiązania liganda. Muteina pozbawiona reszty Cys 34 wykazuje niewielką tendencję do tworzenia oligomerów, znacznie mniejszą w porównaniu z pozostałymi rekombinowanymi formami α_1M oraz białkami pozyskanymi z ludzkich płynów ustrojowych. W pomiarach zaniku anizotropii fluorescencji wykorzystano formy wt oraz wt Δ LIPR wyznakowane znacznikiem 1,5-I-AEDANS. Uzyskane wartości czasów rotacyjnej korelacji, około 14 ns, są zbliżone do wartości teoretycznej, obliczonej dla wspomnianego modelu α_1M . Przy założeniu sferyczności obiektu rotującego dane eksperymentalne odpowiadają cząsteczce o promieniu hydrodynamicznym około 2,4 nm. Położenie maksimum fluorescencji znacznika związanego z resztą Cys 34 obydwu białek przy długości fali około 460 nm świadczy o jego hydrofobowym otoczeniu, co może wskazywać na ulokowanie fluoroforu wewnątrz kieszeni wiążącej α_1M . Pozwala to wnioskować o rzeczywistym umiejscowieniu wyznakowanej reszty w pobliżu wejścia do kieszeni wiążącej, jak sugeruje opublikowany model strukturalny białka.

Główną część pracy stanowi badanie oddziaływania rekombinowanych form α_1M z potencjalnymi fizjologicznymi ligandami – hemem oraz protoporfiryną IX (PPIX). Pomiary spektrofluorymetryczne wskazują na przyłączanie dwóch cząsteczek hemu lub PPIX przez α_1M . Wartości obserwowanych stałych dysocjacji wyznaczone na podstawie tych badań wynoszą około $6 \cdot 10^{-8}$ M dla kompleksów hemu lub PPIX z białkiem typu dzikiego. Muteina pozbawiona reszty Cys 34 wykazuje nieco większe powinowactwo do badanych ligandów, podczas gdy podstawienie trzech reszt lizynowych powoduje niewielkie osłabienie wiązania, w szczególności w przypadku PPIX. Dane te wskazują na silne i specyficzne oddziaływanie obydwu ligandów z α_1M . Zbliżone parametry wiązania hemu i PPIX pozwalają przypuszczać, że jon żelaza nie jest zaangażowany w oddziaływanie białko-ligand w badanym układzie. Widma absorpcyjne i fluorescencyjne, jak również czasy życia fluorescencji PPIX związanej z poszczególnymi wariantami α_1M , wykazują cechy charakterystyczne dla formy monomerycznej tej porfiryny. Położenie pasma Soreta przy długości fali poniżej 400 nm wskazuje na obecność oddziaływań polarnych obydwu badanych ligandów z resztami aminokwasowymi znajdującymi się w pobliżu miejsca wiążącego.

Pomiary kinetyczne wykazały, że proces wiązania ligandów zachodzi w co najmniej dwóch etapach. Zależność wartości wyższej obserwowanej stałej szybkości reakcji (k_{1obs})

od stężenia hemu ma charakter malejący, co sugeruje, że obrazuje ona zmianę konformacyjną niewiążącej formy α_1M w formę zdolną do przyłączenia hemu. Parametr k_{2obs} , przyjmujący wartości o rząd wielkości mniejsze od poprzedniego, opisuje prawdopodobnie proces następujący po związaniu kolejnej cząsteczki liganda. Zależność stężeniowa tej stałej dla białka typu dzikiego ma charakter lekko rosnący. W pomiarach rozdzielczej w czasie anizotropii fluorescencji, prowadzonych dla wyznakowanych białek w obecności hemu, zaobserwowano pojawienie się krótszego czasu rotacyjnej korelacji, około 0,5 ns. Parametr ten przyporządkowano rotacji znacznika AEDANS lub też fragmentu łańcucha białkowego w bezpośrednim jego otoczeniu. Przy nadmiarze liganda obserwuje się również przesunięcie maksimum emisji znacznika w kierunku dłuższych fal, co może być efektem wypierania znacznika ulokowanego w kieszeni wiążącej białka przez hem. W przypadku obydwu badanych białek wartość dłuższej składowej czasu rotacyjnej korelacji ulega podwojeniu przy przejściu od formy nieskompleksowanej do w pełni wysyczonej ligandem, co wskazuje na proces dimeryzacji lub dalszej oligomeryzacji α_1M . W analogicznych pomiarach, lecz z wykorzystaniem fluorescencji liganda, wykonanych dla wszystkich rekombinowanych form α_1M w obecności ilości PPIX prawie równomolowej w stosunku do białka, uzyskano jeden czas rotacyjnej korelacji odpowiadający rotacji całej cząsteczki. Jego wartość dla form wt i wt Δ LIPR jest zgodna z uzyskanymi wcześniej wynikami eksperymentu wykonanego na białkach znakowanych. W przypadku mutein pozbawionych reszty Cys 34 uzyskano nieco wyższą wartość tego parametru, około 17 ns. Sugeruje to, że wspomniana reszta stabilizuje bardziej zwartą konformację białka.

Badania, przedstawione w rozprawie poszerzają wiedzę na temat właściwości strukturalnych α_1M w roztworze, natury jej unikalnego chromoforu oraz mechanizmu oddziaływania białka z hemem, protoporfiryną IX i hemoglobina.

2. ABSTRACT

α_1 -Microglobulin (α_1 M) is a small glycoprotein belonging to a family of lipocalins, proteins sharing an antiparallel β -barrel fold with a hydrophobic pocket acting as a ligand-binding site. α_1 M has a yellow-brown colour and is heterogeneous in charge. Both features result from the presence of unidentified chromophoric substance which in the human protein is bound to a single free cysteinyl residue, Cys 34, and three lysyl residues, Lys 92, Lys 118 and Lys 130. According to a structural model of α_1 M, all the mentioned residues are located near the entrance to the lipocalin pocket. In human urine two forms of α_1 M were found, the one with the full length and the other without the C-terminal tetrapeptide Leu-Ile-Pro-Arg (LIPR). Although biological functions of α_1 M remain largely unknown, the latest reports strongly suggest its role in the antioxidative protection of the organism. α_1 M binds heme and hemoglobin and its truncated form lacking LIPR tetrapeptide degrades heme, producing the characteristic chromophore. Hepatoma cells treated with oxy-, methemoglobin, heme or Fenton reaction-generated hydroxyl radicals secrete greater amounts of α_1 M and increase its production on both mRNA and protein levels. α_1 M also protects human erythroid cells against oxidation induced by heme, hemoglobin and hydroxyl radicals.

This thesis describes studies on the recombinant human α_1 M variants including wild type protein (wt), LIPR tetrapeptide-lacking form (wt Δ LIPR) and mutants with substituted cysteinyl and lysyl residues mentioned above. Circular dichroism spectra characteristic of mostly β -sheet structure confirmed the proper fold of all studied proteins. Absorption and fluorescence spectra reveal much lower amounts of the α_1 M's chromophore in the recombinant variants compared to the human plasma and urine proteins. As observed by isoelectric focusing, the recombinant α_1 Ms are also much more homogeneous in charge. Differences in the absorption spectra obtained for particular variants point at the important role of all mutated amino acid residues in the process of the chromophore formation. The characteristic absorption and fluorescence bands are absent in the appropriate spectra of α_1 M mutants lacking Cys 34 suggesting that the presence of this residue is pivotal for the ligand binding stage. Cys 34 mutated variant reveals slight tendency to form oligomers, much lower than other recombinant α_1 Ms and the natural α_1 Ms from human body fluids. Fluorescence anisotropy decays were measured for 1,5-I-AEDANS-labeled wt and wt Δ LIPR α_1 M forms. The obtained single rotational correlation time of about 14 ns is in

agreement with a theoretical value calculated for the above mentioned structural model of $\alpha_1\text{M}$. Assuming a spherical shape of the rotating unit the experimental data correspond to a molecule with a hydrodynamic radius of about 2.4 nm. The maximum fluorescence wavelength of the label bound to Cys 34 residue in both wt- and wt ΔLIPR - $\alpha_1\text{M}$ is about 460 nm, indicating hydrophobic surrounding of the label, possibly inside the β -barrel. This supports a conclusion that the labelled residue is indeed located close to the entrance to the lipocalin pocket as suggested by the structural model of $\alpha_1\text{M}$.

The main part of the project comprised studies of the interactions between recombinant proteins and $\alpha_1\text{M}$'s potential physiological ligands – heme and protoporphyrin IX (PPIX). According to the results of spectrofluorimetric titrations, single $\alpha_1\text{M}$ molecule binds two molecules of heme or PPIX. Apparent dissociation constants obtained for the complexes of the wild type protein with both ligands were of about $6 \cdot 10^{-8}$ M. Interestingly, the Cys 34 substituted mutant showed a higher affinity for both ligands, while substitution of the three lysyl residues reduced the binding strength slightly. The data indicate strong and specific interactions between $\alpha_1\text{M}$ and both ligands of interest. Similar binding parameters obtained for both heme and PPIX suggest that ferric ion does not participate in the protein-ligand interactions. Absorption and fluorescence spectra of the $\alpha_1\text{M}$ -bound PPIX, together with the fluorescence lifetime data are characteristic of the ligand in its monomeric form. The Soret band of heme- and PPIX- $\alpha_1\text{M}$ complexes appears at the wavelengths below 400 nm, suggesting polar interactions between the ligands and surrounding amino acid residues. Two stages of the ligand-binding reaction were observed in the kinetic experiments. The values of higher apparent reaction rate constant ($k_{1\text{obs}}$) decreased with increasing ligand concentration, thus probably reflecting a conformational change from the non-binding to the capable of ligand-binding $\alpha_1\text{M}$ form. The $k_{2\text{obs}}$ parameter for which values one order of magnitude lower than the previous ones were obtained seems to represent the following process of binding of the second ligand molecule. For the wild type $\alpha_1\text{M}$, the ligand-concentration dependence of the latter parameter was slightly ascending. Time-resolved fluorescence anisotropy measurements performed in the presence of heme revealed appearance of the shorter rotational correlation time component of about 0.5 ns. It was assigned to the rotational movement of the label alone or of the peptide chain in its proximity. When heme is in excess, the maximum fluorescence wavelength of protein-bound AEDANS is red-shifted. These data together imply that the label, possibly located to the lipocalin pocket in the uncomplexed protein, is displaced by the ligand. The value of

longer rotational correlation time component is doubled in the heme-saturated complex when compared to the free α_1M suggesting a ligand-induced protein dimerisation or further oligomerisation. Analogical experiments were also performed on all recombinant forms of α_1M in the presence of nearly equimolar amounts of PPIX where the ligand's fluorescence was monitored. One rotational correlation time that reflects rotation of the whole protein molecule was observed. The values of that parameter determined for the wt- and wt Δ LIPR- α_1M are in agreement with the results previously obtained using labeled proteins. Mutants with substituted Cys 34 residue show a slightly higher rotational correlation time of about 17 ns. It can be concluded that this amino acid residue stabilizes more compact conformation of α_1M .

The data reported in this thesis significantly deepen our knowledge of the structural properties of α_1M in solutions, the nature of its unique chromophore and the mechanism of α_1M interactions with heme, protoporphyrin IX and hemoglobin.

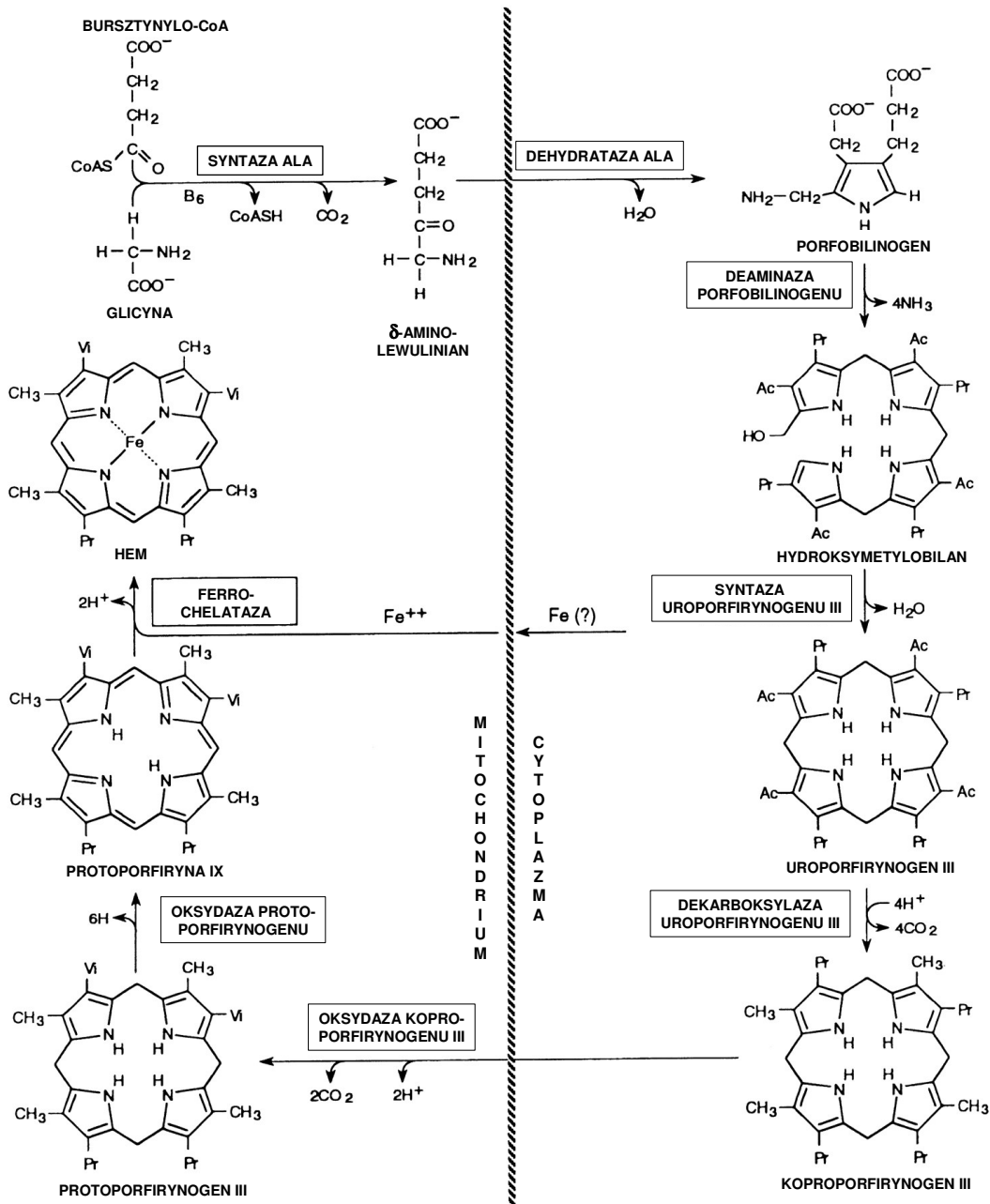
3. WPROWADZENIE

3.1. BUDOWA, SYNTEZA I WYSTĘPOWANIE HEMU

Hem to związek chelatowy zbudowany z pierścienia porfiryнового (protoporfiryna IX) oraz atomu żelaza skoordynowanego w jego wnętrzu [Lemberg i Legge, 1949]. Jest on niezbędny dla funkcjonowania wszystkich organizmów tlenowych. U człowieka występują trzy rodzaje hemu, oznaczane jako a, b i c. Spośród nich najczęściej występuje hem b, obecny w hemoglobinie, mioglobinie oraz innych białkach hemowych, za wyjątkiem cytochromów typu a i c [Kumar i Bandyopadhyay, 2005]. Hem a i hem b nie są kowalencyjnie związane z częścią białkową, w przeciwieństwie do hemu c, który poprzez grupy winylowe tworzy dwa tioeterowe wiązania z białkowymi resztami cysteinowymi [Dickerson i inni, 1971]. Hem a występuje m.in. w cząsteczce oksydazy cytochromowej [Caughey i inni, 1975], hem c natomiast w cytochromach c i w reduktazie cytochromowej (zwanej też kompleksem cytochromów bc₁). W dalszej części pracy skrócone określenie „hem” dotyczyć będzie hemu b.

Hem w organizmie ludzkim jest syntetyzowany we wszystkich komórkach jądrzastych, w największym jednak stopniu w komórkach erytroidalnych szpiku kostnego (85% całkowitej produkcji) oraz w hepatocytach (odpowiedzialnych niemal w całości za pozostałą część całkowitej produkcji hemu) [Ponka, 1997]. W pierwszym przypadku wytworzony hem przyłączany jest wyłącznie do hemoglobiny. Proces syntezy hemu i hemoglobiny przebiega w stadium różnicowania komórek i ustaje w dojrzałych erytrocytach. W hepatocytach hem wytwarzany jest w celu inkorporacji do różnego typu cytochromów, szczególnie klasy P-450, biorących udział w procesie detoksykacji.

Synteza hemu obejmuje serię reakcji enzymatycznych, z których jedne zachodzą w mitochondrium, inne natomiast w cytoplazmie (rys. 3.1) [Dailey, 1997]. Pierwszym enzymem szlaku biosyntezy jest mitochondrialna syntaza kwasu δ -aminolewulinowego (ALA-S – ang. *δ -aminolevulinic acid synthase*), katalizująca kondensację bursztynylokoenzymu A z glicyną. Występuje ona w dwóch izoformach: nieerytroidalnej, ALA-S1, obecnej w wątrobie i innych tkankach oraz erytroidalnej, ALA-S2 [Riddle i inni, 1989]. Kwas δ -aminolewulinowy (ALA) jest transportowany z mitochondrium do cytoplazmy, gdzie zachodzą dalsze reakcje – utworzenie porfobilinogenu, a następnie cyklicznego tetrapirolu – uroporfirynogenu III oraz dekarboksylacja łańcuchów bocznych.



Rysunek 3.1. Biosynteza hemu b. Ac – octan, Pr – propionian, Vi – grupa winylowa. Schemat wykonano na podstawie pracy [Ponka, 1997].

Końcowy etap syntezy hemu – utlenianie łańcuchów bocznych z utworzeniem protoporfiryny IX (PPIX) oraz inkorporacja jonu żelaza (II) (Fe^{2+}) przez ferrochelatazę, odbywa się znów w mitochondrium.

Mechanizm kontroli biosyntezy hemu jest odmienny w przypadku komórek erytroidalnych i pozostałych tkanek. W hepatocytach regulacja zachodzi na poziomie

ALA-S na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego przez produkt końcowy, poprzez zmniejszenie połowicznego czasu życia mRNA ALA-S1 oraz zablokowanie translokacji prekursora ALA-S1 do mitochondrium [Hamilton i inni, 1991; Yamauchi i inni, 1980]. Z kolei w komórkach erytroidalnych hem hamuje pobieranie żelaza z kompleksu z transferyną do komórki [Ponka i Neuwirt, 1969; Ponka i Schulman, 1985; Cox i inni, 1985], oraz powoduje zwiększenie aktywności enzymów szlaku własnej biosyntezy [Granick i Sassa, 1978; Hoffman i inni, 1980].

Żelazo hemowe może utleniać się w sposób odwracalny do Fe^{3+} , nadając całości cząsteczki ładunek dodatni. Kompleks PPIX z żelazem na III stopniu utlenienia nosi nazwę heminy i występuje w dwóch formach: hematyny, PPIX-Fe(III)-OH^- oraz chloroheminy, PPIX-Fe(III)-Cl^- [Maines, 1992]. W niniejszej pracy określenie „hem” będzie używane niezależnie od stopnia utlenienia atomu żelaza.

3.2. ROLA HEMU W ORGANIZMIE

Hem zaangażowany jest w większość biologicznych procesów utleniania i jako taki odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu homeostazy komórki i całego organizmu. Stanowi on grupę prostetyczną wielu niezwykle istotnych enzymów i innych białek, biorących udział w transporcie i magazynowaniu tlenu, oddychaniu mitochondrialnym, metabolizmie leków, syntezie sterydów, komórkowej ochronie antyoksydacyjnej oraz procesach transdukcji sygnału [Ryter i Tyrrell, 2000]. Wymienić tu należy hemoglobinę, mioglobinę, cytochromy, dioksygenazy, katalazy, peroksydazy, syntazy tlenku azotu (NOS – ang. *nitric oxide synthase*) oraz rozpuszczalną cyklazę guanylową.

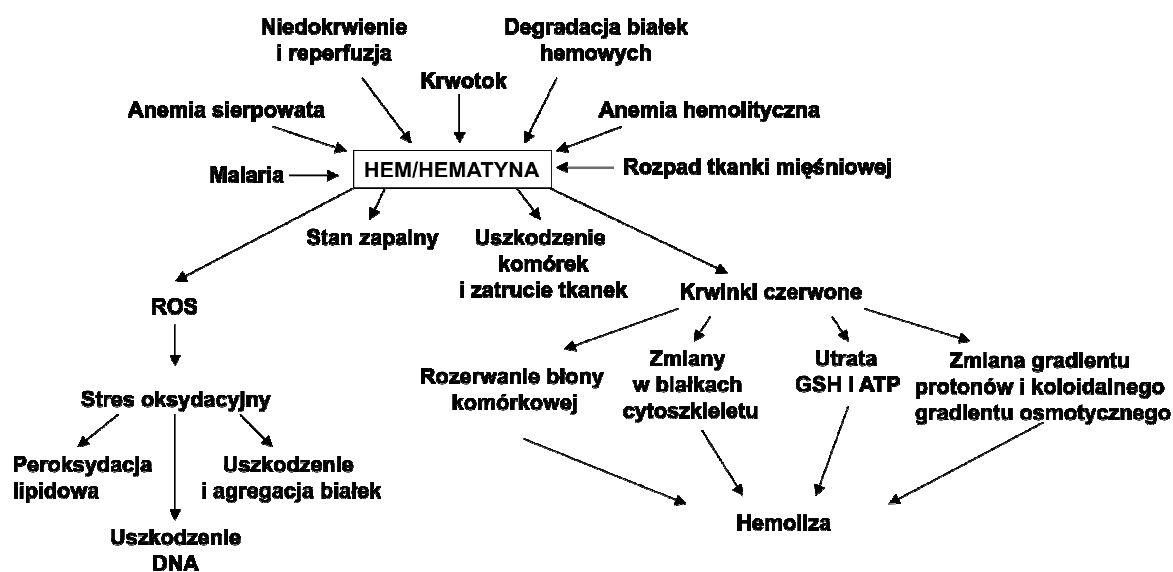
Poza funkcjami pełnionymi w białkach hemowych, sam hem może wpływać na ekspresję wielu genów. Reguluje on własną syntezę (patrz rozdział 3.1), jak również kontroluje produkcję różnych białek, w tym globin [Zucker i Schulman, 1968], cytochromów, mieloperoksydazy, indukowalnej formy oksygenazy hemowej (HO-1), receptora transferyny [Tsuji i inni, 1996; Wagener i inni, 2003] oraz ciężkiego łańcucha ferrytyny [Iwasaki i inni, 2006]. Geny wielu spośród tych białek regulowane są poprzez element odpowiedzi na hem (HRE - ang. *heme-response element*). Aktywacja transkrypcji globin odbywa się poprzez przyłączenie hemu do represora Bach1 (patrz niżej), co uniemożliwia jego wiązanie z sekwencją MARE (ang. *Maf-recognition element*) w obrębie odpowiednich genów [Tahara i inni, 2004a; 2004b]. Synteza białek w retikulocytach jest zależna od dostępności hemu. W sytuacjach niedoboru aktywuje on zależną od hemu

kinazę HRI (ang. *heme-regulated inhibitor*) fosforylującą czynnik eIF-2 α , przez co blokuje inicjację translacji białek [Ranu i London, 1976; Fagard i London, 1981]. Hem silnie indukuje geny niektórych białek niehemowych [Sassa i Nagai, 1996; Zhu i inni, 1999], np. białka p62 (białko komórkowe pełniące rolę adaptora w szlakach przenoszenia sygnału i zaangażowane w tak istotne funkcje biologiczne jak proliferacja i różnicowanie komórek, reakcja na stres oksydacyjny oraz odpowiedź immunologiczna), białka chaperonowego Tcp20, histonu H2A.Z oraz podjednostki małego jądrowego kompleksu rybonukleoproteinowego (snRNP – ang. *small nuclear ribonucleoprotein*). Może on również hamować ekspresję innych genów, takich jak gen podjednostki kanału protonowego H⁺-ATPazy, czy też gen wczesnej odpowiedzi komórkowej. U ssaków zidentyfikowano także regulatory transkrypcji o nazwie Bach1 i Bach2, które w formie heterodimerów z białkami Maf wiążą się z sekwencją MARE w obrębie genu [Oyake i inni, 1996]. Hem wiąże się bezpośrednio z represorem Bach1 uniemożliwiając jego oddziaływanie z DNA [Ogawa i inni, 2001], co skutkuje aktywacją transkrypcji genów posiadających sekwencje MARE przez czynniki spokrewnione z NF-E2 [Sun i inni, 2004].

Hem reguluje różnicowanie i proliferację różnego typu komórek. Stymuluje różnicowanie erytroidalne komórek białaczki [Hoffman i inni, 1979; Benz i inni, 1980], formowanie kolonii erytroidalnych w hodowlach ludzkiego i mysiego szpiku kostnego, wpływa na różnicowanie fibroblastów 3T3 w kierunku adipocytów (choć doniesienia odnośnie stymulacji, bądź hamowania tego procesu są sprzeczne [Chen i London, 1981; Gotoh i inni, 2008]) oraz przyspiesza namnażanie komórek w hodowlach fibroblastów [Verger i inni, 1983]. Wykazuje on ponadto aktywność antynowotworową stymulującą odpowiedź immunologiczną [Tsuji i inni, 1993]. Hem odgrywa również istotną rolę w chorobie Alzheimera [Atamna i Frey, 2004; Atamna i Boyle, 2006]. Stwierdzono, że hamuje agregację β -amyloidów 1-40 i 1-42 oraz chroni komórki neuronalne przed ich toksycznym działaniem [Howlett i inni, 1997]. Niedobór hemu w neuronach powoduje zmiany analogiczne do obserwowanych w komórkach mózgowych osób z chorobą Alzheimera [Atamna i inni, 2002; Gatta i inni, 2009].

3.3. TOKSYCZNE DZIAŁANIE WOLNEGO HEMU

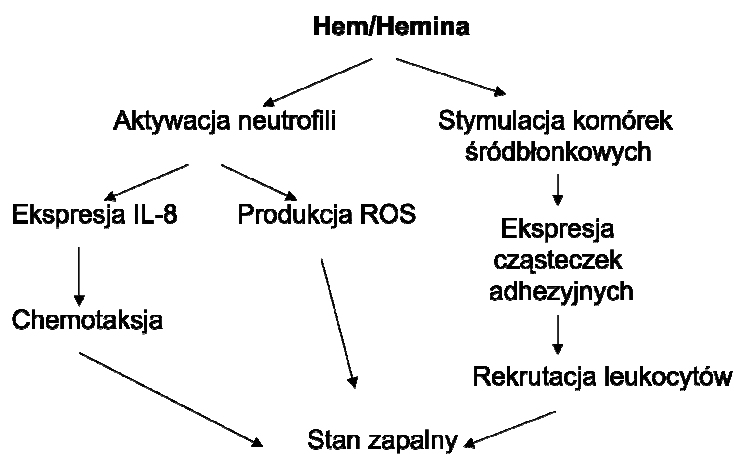
W prawidłowo funkcjonującym organizmie zużyte erythrocyty są usuwane z krwioobiegu i rozkładane w układzie siateczkowo-śródbłonkowym (RES, ang. *reticuloendothelial system*) śledziony, a także wątroby, nerek i szpiku kostnego [Ryter i Tyrrell, 2000]. Gdy dochodzi do rozpadu krwinki czerwonej, nieskompleksowana hemoglobina oraz uwolniony przez jej utlenioną formę (methemoglobinę) hem dostają się do krwioobiegu. W przypadku wystąpienia ciężkiej hemolizy, tkanki organizmu zostają wystawione na działanie dużych ilości wolnego hemu oraz białek hemowych. W takich przypadkach systemy ochronne organizmu zawodzą. Również w komórce pula niezwiązanego hemu może ulec zwiększeniu pod wpływem jego wysokiego stężenia na zewnątrz komórki, w wyniku jego zwiększonej syntezy, nieprawidłowej inkorporacji do białek hemowych lub ich przyspieszonego rozpadu oraz na skutek obniżonej aktywności oksygenazy hemowej (rys. 3.2).



Rysunek 3.2. Toksyczne działanie wolnego hemu. Schemat wykonano na podstawie pracy [Kumar i Bandyopadhyay, 2005].

Ze względu na niewielkie rozmiary i własności hydrofobowe hem może wnikać w błony komórkowe, zwiększając znacznie ich wrażliwość na działanie czynników utleniających [Balla i inni, 1993]. Naruszając błonę czerwonych krwinek powoduje on

hemolizę [Chou i Fitch, 1981; Kirschner-Zilber i inni, 1982], uszkadza także dwuwarstwę lipidową mitochondriów i jądra komórkowego [Wagener i inni, 2003] oraz destabilizuje cytoszkielet powodując sieciowanie oraz denaturację tworzących go białek [Solar i inni, 1991]. Poprzez atom żelaza generuje on tworzenie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) wywołując stres oksydacyjny, peroksydację lipidów [Tappel, 1955; Gutteridge i Smith, 1988], degradację białek i DNA (obserwowaną w badaniach *in vitro*) [Aft i Mueller, 1983; 1984]. Hem powoduje utlenianie lipoprotein o dużej (HDL, ang. *high-density lipoproteins*) i małej gęstości (LDL, ang. *low-density lipoproteins*), z utworzeniem produktów o właściwościach cytotoksycznych [Camejo i inni, 1998; Jeney i inni, 2002], a także wykazuje działanie karcynogenne, stymulując tworzenie związków N-nitrozowych [Cross i inni, 2003].



Rysunek 3.3. Hem jako czynnik prozapalny. Schemat wykonano na podstawie pracy [Kumar i Bandyopadhyay, 2005].

Wspomniane działania skutkują dysfunkcją komórek tkanek i narządów, wliczając nerki [Nath i inni, 1995; 2001; Rodriguez i inni, 2003], wątrobę [Kim i inni, 2004], neurony [Goldstein i inni, 2003; Regan i inni, 2004] i komórki serca [Bhoite-Solomon i inni, 1993]. Wywołane przez hem uszkodzenia oksydacyjne oraz stan zapalny (rys. 3.3) mogą odgrywać istotną rolę w przypadkach różnorodnych stanów patofizjologicznych, takich jak niewydolność nerek, miażdżycza naczyń tętniczych, powikłania po transfuzji sztucznej krwi, niewydolność serca po przeszczepie oraz endometrioza otrzewnowa [Wagener i inni, 2003]. Pod wpływem działania hemu na komórki śródbłonkowe *in vitro* dochodzi do stymulacji ekspresji cząsteczek adhezyjnych wewnątrzkomórkowych, ICAM-1 (ang. *intracellular adhesion molecule*), naczyniowych, VCAM-1 (ang. *vascular adhesion*

molecule) oraz E-selektyny [Wagener i inni, 1997]. Substancje te są odpowiedzialne za rekrutację leukocytów, będącą jednym z etapów rozwoju stanu zapalnego. Podobne działania zaobserwowano również *in vivo* [Wagener i inni, 2001]. W organizmie myszy hem powodował zwiększoną przepuszczalność ścian naczyń krwionośnych, ekspresję cząsteczek adhezyjnych (ICAM-1, P-selektyn i fibronektyny) oraz rekrutację leukocytów. Hem indukuje chemotaksję i reorganizację cytoszkieletu ludzkich neutrofilii, wywołuje ekspresję interleukiny-8, wybuch tlenowy i produkcję ROS [Graça-Souza i inni, 2002; Porto i inni, 2007]. W przypadku ostrego stanu zapalnego, zaobserwowano zwiększoną produkcję białka ostrej fazy – α_2 -makroglobuliny pod wpływem hemu, co sugeruje, że uczestniczy on w regulacji ekspresji tego białka [Lyoumi i inni, 1999].

3.4. MECHANIZMY OCHRONY ORGANIZMU PRZED SZKODLIWYM DZIAŁANIEM WOLNEGO HEMU

3.4.1. ROLA OKSYGENAZY HEMOWEJ

U ssaków istnieje kilka mechanizmów obrony przed działaniem wolnego hemu i hemoglobiny. Pierwszym i najważniejszym z nich jest działająca w komórce oksygenaza hemowa (HO), enzym degradujący hem do tlenku węgla, biliwerdyny i żelaza [Tenhunen i inni, 1968; 1969]. Jest ona produkowana przez wszystkie żywe organizmy – bakterie, grzyby, rośliny i zwierzęta. U ssaków oksygenaza hemowa występuje w trzech formach, HO-1, HO-2 i HO-3, kodowanych przez odrębne geny, których ekspresja jest bardzo różna w zależności od typu komórek oraz wpływu różnorodnych bodźców [Maines i inni, 1986; Cruse i Maines, 1988; McCoubrey i inni, 1997a]. W warunkach fizjologicznych większość komórek produkuje niskie lub niewykrywalne ilości HO-1. Indukcja ekspresji tego białka następuje w sytuacjach potęgujących stres oksydacyjny, np. pod wpływem działania czynników takich jak metale ciężkie, lipopolisacharydy bakteryjne, niedotlenienie, nadmiar tlenu, szok cieplny, niedokrwienie, promieniowanie UV, nadtlenek wodoru, cytokiny, tlenek azotu, czynniki zmniejszające rezerwy zredukowanego glutationu w komórce oraz hem [Wagener i inni, 2003]. Ten ostatni reguluje produkcję HO-1 dezaktywując represor Bach1 [Sun i inni, 2002]. W regulację ekspresji genu HO-1 zaangażowane są ponadto kinazy oraz fosfatazy. Obniżenie ekspresji genu HO-1 powodują związki wyłapujące wolne rodniki tlenowe (np. N-acetylocysteina), a także angiotensyna II, interferon γ , prostaglandyna E2, transformujący czynnik wzrostu- β oraz IL-10. Ekspresja form HO-2 i HO-3 utrzymuje się właściwie na stałym poziomie.

Prawdopodobnie stanowią one pierwszą linię obrony w przypadku zagrożenia oksydacyjnego oraz stanu zapalnego. Transkrypcję genu HO-2 zwiększa jedynie kilka związków, takich jak opiaty [Li i Clark, 2000] i glukokortykoidy [Raju i inni, 1997]. Największą aktywność HO wykazują śledziona, jądra oraz mózg. HO-1 i HO-2 katalizują identyczną reakcję chemiczną, przebiega ona jednak w przypadku tych form z różną prędkością. Obydwa białka mają różną masę cząsteczkową, stabilność temperaturową i sekwencję łańcucha polipeptydowego (40% identyczności reszt aminokwasowych). Formy HO-2 i HO-3 wykazują znacznie wyższe podobieństwo struktury pierwszorzędowej (90%). Białka te oprócz domeny katalitycznej posiadają również dwa dodatkowe miejsca wiązania hemu, rozpoznane jako hemowe domeny regulatorowe, HRD (ang. *heme-regulatory domain*), których rola nie została dotąd poznana [McCoubrey i inni, 1997a; 1997b]. HO-3 posiada niską aktywność katalityczną.

3.4.2. BIAŁKA OSOCZA WIĄŻĄCE WOLNY HEM I HEMOGLOBINĘ

Poza komórką niekorzystne działanie hemu jest niwelowane poprzez jego wiązanie z obecnymi w osoczu białkami. Hemopeksyna jest glikoproteiną osocza wykazującą silne powinowactwo do hemu ($K_d < 1$ pM) [Hrkal i inni, 1974], który wiąże w stosunku molowym 1:1. Białko to hamuje indukowaną przez hem peroksydację lipidów [Gutteridge i Smith, 1988; Miller i inni, 1996] oraz aktywację jego własności peroksydacyjno-katalitycznych przez H_2O_2 [Grinberg i inni, 1999]. Hemopeksyna pełni podwójną rolę: z jednej strony tworzy „bezpieczny” kompleks z hemem w osoczu krwi, gdzie mógłby on wywierać niszczące działanie na okoliczne komórki i tkanki, z drugiej zaś dostarcza go do hepatocytów i innych komórek zaopatrzonych w odpowiedni receptor, gdzie może on zostać wykorzystany do produkcji nowych hemoprotein [Taketani i inni, 1987a] lub jest katabolizowany, zaś uwolnione żelazo wiązane jest przez ferrytynę. Hemopeksyna może również efektywnie wiązać i usuwać hem z błon erytrocytów [Solar i inni, 1989]. Kompleks hemopeksyna-hem wiąże się ze specyficznym receptorem obecnym w błonie komórkowej hepatocytów, a także makrofagów [Taketani i inni, 1987a] i syncytiotrofoblastów [Taketani i inni, 1987b]. Przez długi czas panowało przekonanie, że hem jest przenoszony poprzez błonę, natomiast hemopeksyna uwalniana jest z powrotem do krwioobiegu [Smith i Morgan, 1979; 1981]. W ostatnich latach zidentyfikowano receptor wiążący kompleks hemopeksyna-hem [Hvidberg i inni, 2005], którym okazało się białko o nazwie CD91, spokrewnione z receptorem dla LDL (LPR/CD91, ang. *low-density*

lipoprotein receptor-related protein). Jest ono równocześnie receptorem dla wielu różnorodnych ligandów i znajduje się na powierzchni wielu rodzajów komórek [Herz i Strickland, 2001; Moestrup i inni, 1992]. Kompleks hemopeksyna-hem ulega endocytozie, a następnie część białkowa ulega trawieniu w lizosomie. Tłumaczy to znacznie obniżone stężenie hemopeksyny obserwowane u osób z chorobami hemolitycznymi [Muller-Eberhard i inni, 1968]. Sama hemopeksyna jest katabolizowana w różnych tkankach organizmu [Potter i inni, 1993], jednak głównym miejscem przeznaczenia dla kompleksu hemopeksyna-hem jest wątroba. Po podaniu szczurom kompleksu hemopeksyna-hem obserwuje się 20-krotnie wyższą zawartość w wątrobie hemu niż hemopeksyny, jednak wstrzyknięcie samego hemu w ilości przewyższającej zdolności kompleksowania przez hemopeksynę powoduje znacznie zwiększoną degradację tej ostatniej w hepatocytach. Przewodopodobne jest więc, że *in vivo* hemopeksyna, w następstwie pobierania hemu z kompleksu hemopeksyna-hem przez komórki wątrobowe, może być zarówno uwalniana do krwioobiegu, jak i degradowana w hepatocytach.

Kolejnym białkiem wiążącym hem jest albumina, która tworzy z hemem dwa rodzaje kompleksów, w stosunku molowym 1:1 i 1:2. Wykazuje ona mniejsze powinowactwo do hemu niż hemopeksyna (K_d rzędu 10^{-8} M) i zarazem w mniejszym stopniu (50-60%) hamuje jego aktywność oksydacyjną [Grinberg i inni, 1999]. W badaniach *in vitro* hem dodany z zewnątrz jest w pierwszej kolejności wiązany przez albuminę, a następnie przekazywany do hemopeksyny [Morgan i inni, 1976]. Albumina wykazuje również zdolność do ekstrahowania hemu związanego z błonami erytrocytów, choć w mniejszym stopniu niż hemopeksyna [Shaklai i inni, 1985; Solar i inni, 1989]. W przeciwieństwie do hemopeksyny, albumina ulega utlenieniu w wyniku związania hemu [Vincent i inni, 1988].

Hemoglobina uwolniona do osocza wiązana jest przez haptoglobinę. Utworzenie kompleksu obu białek zapobiega utlenianiu oksyhemoglobiny do methemoglobiny, formy łatwo uwalniającej hem, obniżając akumulację rodników hydroksylowych i innych reaktywnych form tlenu [Kumar i Bandyopadhyay, 2005]. Kompleks haptoglobina-hemoglobina wiąże się z dużym powinowactwem z receptorem CD163 na powierzchni monocytów i makrofagów, a następnie ulega endocytozie, po czym białkowa część poddana jest trawieniu lizosomalnemu [Kristiansen i inni, 2001]. Haptoglobina zabezpiecza hemoglobinę przed oksydacją przez H_2O_2 i mostkowaniem podjednostek α , który to proces uniemożliwia usuwanie hemoglobiny za pośrednictwem receptora CD163 [Vallelian i inni, 2008; Buehler i inni, 2009]. W przypadku, gdy stężenie hemoglobiny

znacznie przewyższa możliwości jej kompleksowania przez haptoglobinę, natywna oraz zmodyfikowane formy hemoglobiny, występujące w warunkach fizjologicznych, mogą wiązać się bezpośrednio ze wspomnianym receptorem (choć ze znacznie niższym powinowactwem niż kompleksy z haptoglobiną), co stanowi alternatywną drogę jej usuwania z krwioobiegu [Schaer i inni, 2006].

3.4.3. INNE CZYNNIKI ZMNIEJSZAJĄCE TOKSYCZNOŚĆ WOLNEGO HEMU

U szczurów wykryto białko wiążące hem HBP 23 (ang. *heme-binding protein*) zwane również peroksyredoksyną I [Iwahara i inni, 1995]. Występuje ono w cytozolu, w największej ilości w komórkach wątroby, a także w nerkach, śledzionie, jelicie cienkim oraz sercu. Podobnie jak wcześniej wymienione białka, HBP23 tworząc kompleks z hemem ogranicza jego toksyczne działanie. Komórki i tkanki chroni przed stresem oksydacyjnym zredukowany glutation (GSH) [Day i Suzuki, 2006]. Utrzymuje on odpowiedni stan oksydoredukcyjny reszt sulfhydrylowych białek, redukuje szkodliwy nadtlenek wodoru oraz nadtlenki lipidów. GSH chroni również komórki przed stresem oksydacyjnym wywołanym przez hem, wyłapując generowane przez niego wolne rodniki tlenowe, a także degradując hem [Atamna i Ginsburg, 1995]. Proces ten jest zależny od stężeń GSH i hemu oraz obecności tlenu. Reakcję tę hamuje katalaza oraz dysmutaza ponadtlenkowa. Prawdopodobnie glutation pełni rolę ochronną wobec krwinek czerwonych, rozkładając hem związany z ich błonami. Degradację hemu mogą również prowadzić reduktaza NADPH-cytochrom P-450 za pośrednictwem H_2O_2 , oksydaza ksantynowa oraz występujący w mitochondriach komórek serca zależny od NADH układ rozkładający hem [Kumar i Bandyopadhyay, 2005]. Tylko w pierwszym przypadku tworzona jest biliwerdyna, aczkolwiek nie jako produkt główny, w pozostałych zaś przypadkach produktami są inne związki.

Ostatnie badania wskazują, że zaangażowana w ochronę organizmu przed niekorzystnym działaniem hemu oraz innych czynników prooksydacyjnych jest również α_1 -mikroglobulina.

3.5. SYNTEZA I WYSTĘPOWANIE α_1 -MIKROGLOBULINY

α_1 -Mikroglobulina (α_1M), zwana również białkiem HC (ang. *heterogenic in charge*) jest niewielką glikoproteiną o masie cząsteczkowej około 26 kDa, której obecność stwierdzono dotąd u ssaków, ptaków, płazów i ryb [Åkertsröm i inni, 2000]. U człowieka białko to

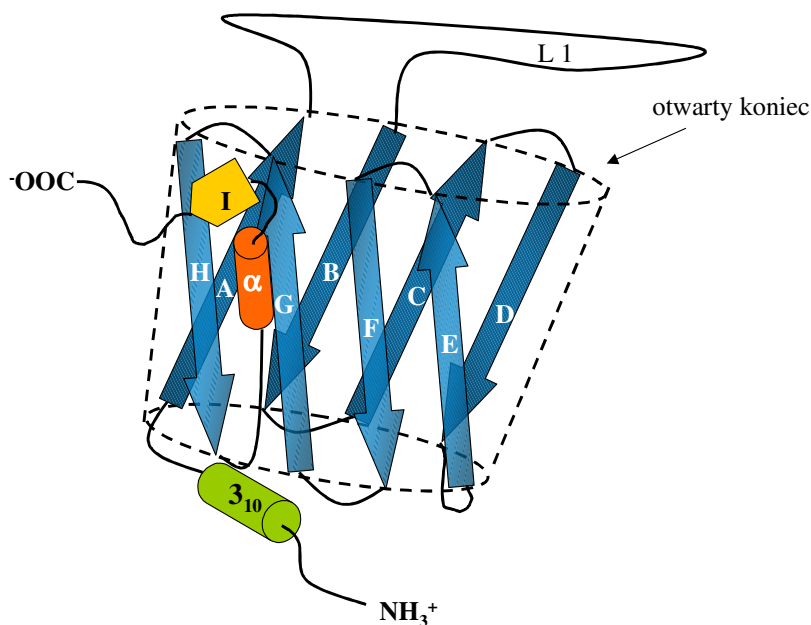
zbudowane jest ze 183 reszt aminokwasowych [Kaumeyer i inni, 1986]. We wszystkich przebadanych gatunkach α_1 M syntetyzowana jest w postaci prekursora, razem z innym białkiem osocza – bikuniną. Ta ostatnia jest inhibitorem proteinaz serynowych i wchodzi w skład kompleksów z rodziny inter- α -inhibitora [Salier i inni, 1996]. α_1 M i bikunina różnią się pod względem pełnionej funkcji oraz struktury i do tej pory nie udało się wyjaśnić przyczyn ich wspólnej syntezy. Głównym miejscem syntezy jest wątroba [Åkerström, 1983; Vincent i inni, 1987]. Obydwa białka, powstające z prekursora w aparacie Golgiego, są wydzielane do krwi, przez którą α_1 M rozprowadzana jest po organizmie [Bratt i inni, 1993].

α_1 M występuje w osoczu krwi oraz okołonaczyniowej tkance łącznej większości narządów [Berggård i inni, 1998; Ødum i Nielsen, 1994], obecna jest w naskórku oraz nabłonku jelit, a także w pęcherzykach płucnych oraz w łożysku [Lögberg i inni, 2000]. W skórze, łożysku i gojących się ranach zlokalizowana jest razem z kolagenem [Santin i Cannas, 1999; Berggård i inni, 1999a; Allhorn i inni, 2003], z którym wiąże się również *in vitro*. Podobnie jak wiele innych białek o niewielkiej masie cząsteczkowej, α_1 M przedostaje się do moczu pierwotnego, skąd przy prawidłowej pracy nerek ulega resorpcji zwrotnej w komórkach kanalików proksymalnych. Po raz pierwszy białko to wyizolowane zostało z moczu pacjentów z białkomoczem nerkowym [Ekström i inni, 1975]. Klinicznie stężenie α_1 M w moczu jest wykorzystywane jako wskaźnik ewentualnych chorób nerek [Kusano i inni, 1985; Penders i Delanghe, 2004]. W moczu ludzkim wykryto dwie formy α_1 M: jedna ma pełną długość a druga jest skrócona o C-końcowy tetrapeptyd Leu-Ile-Pro-Arg (LIPR) [Lopez i inni, 1982].

3.6. α_1 -MIKROGLOBULINA JAKO PRZEDSTAWICIEL LIPOKALIN

α_1 M jest jedną z pierwszych trzech poznanych lipokalin, obok β -laktoglobuliny i białka wiążącego retinol [Pervaiz i Brew, 1985]. Ta nieustannie powiększająca się rodzina, licząca obecnie ponad 30 białek, obejmuje w większości niewielkie białka zewnątrzkomórkowe, których łańcuch polipeptydowy zbudowany jest ze 160-190 reszt aminokwasowych [Flower, 1996]. Lipokaliny pełnią rozmaite funkcje, jednak wykazują wspólne cechy, takie jak: wiązanie niewielkich, na ogół hydrofobowych ligandów, wiązanie przez receptory na powierzchni komórek oraz tworzenie kompleksów wielocząsteczkowych. Przez długi czas uznawano, że lipokaliny są białkami typowo

eukariotycznymi, jednak pod koniec XX w. odkryto nowych przedstawicieli tej rodziny także wśród bakterii [Bishop, 2000].



Rysunek 3.4. Schemat struktury trzeciorzędowej lipokaliny. Osiem antyrównoległych łańcuchów β (A-H) tworzy strukturę β -baryłki, której wnętrzu stanowi miejsce wiązania liganda. Na rysunku zaznaczono również długą pętlę typu Ω (L1), znajdującą się przy N-końcu helisy typu 3_{10} , leżącą po spodniej stronie baryłki, a także krótki łańcuch β oznaczony literą I oraz poprzedzającą go krótką α -helisę.

Pomimo niewielkiego podobieństwa sekwencji występującego w tej grupie (około 15-20% identyczności reszt aminowkowych) wszyscy jej członkowie posiadają charakterystyczną strukturę trzeciorzędową, w postaci nieco spłaszczonej (o przekroju elipsy) β -baryłki utworzonej z ośmiu antyrównoległych łańcuchów β (rys. 3.4). Hydrofobowe na ogół wnętrze baryłki, wraz z otaczającymi otwarty koniec pętlami, stanowi miejsce wiązania drobnocząsteczkowych ligandów. Sześć spośród siedmiu pętli łączących poszczególne łańcuchy β to zwykłe pętle β , natomiast pętla L1 to długa pętla typu Ω , która może przesłaniać dostęp do wnętrza baryłki. Po przeciwnej stronie baryłkę „zamyka” helisa 3_{10} . W przypadku lipokaliny rdzennych (ang. *kernel lipocalins*) znamienna jest obecność trzech zachowanych regionów strukturalnych (SCR, ang. *structurally*

conserved regions), w obrębie których podobieństwo sekwencji jest znacznie wyższe. Są to kolejno motywy N-końcowej helisy 3_{10} i przylegającego do niej β -łańcucha A (SCR1), β -łańcuchy F i G wraz z łączącą je pętlą (SCR2) oraz łańcuch H i część α -helisy wraz z pętlą łączącą te dwa elementy struktury po stronie C-końcowej całego łańcucha polipeptydowego (SCR3) [Flower i inni, 1993]. W białkach tworzących bardziej zróżnicowaną grupę lipokalin pobocznych (ang. *outlier lipocalins*) obecny jest tylko jeden (SCR1) lub dwa z powyższych regionów sekwencji konserwatywnych.

Lipokaliny, wspólnie z białkami wiążącymi kwasy tłuszczowe (FABP – ang. *fatty acid-binding proteins*), rodziną awidyn (białek o niezwykle silnym powinowactwie do biotyny), grupą inhibitorów metaloproteinaz (MPI – ang. *metaloproteinase inhibitor*) oraz triabiną należą do nadrodziny kalicyn [Flower i inni, 2000]. Wszystkie te białka wykazują podobieństwo pod względem struktury trzeciorzędowej, jak również sposobu pełnienia swojej funkcji, poprzez wiązanie hydrofobowych ligandów i/lub oddziaływanie z innymi makrocząsteczkami. Baryłka β zbudowana jest z ośmiu (lipokaliny, awidyny i MPI) lub dziesięciu (FABP) antyrównoległych łańcuchów β .

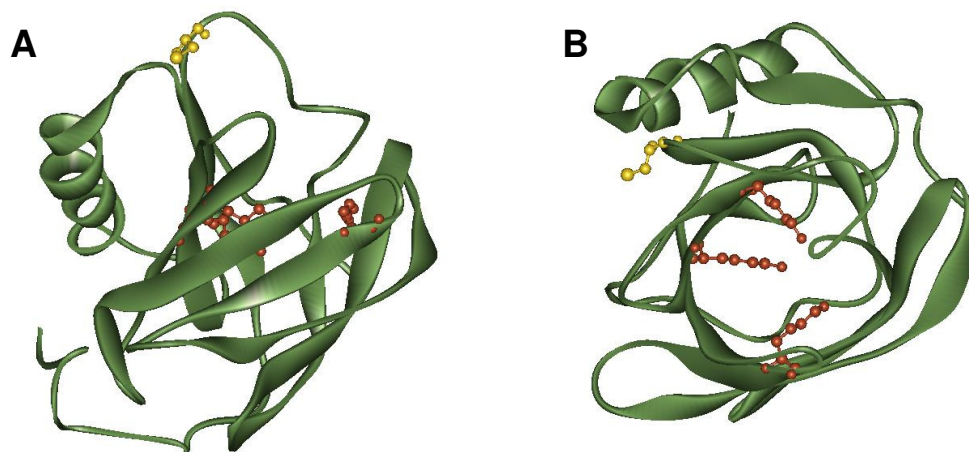
Pierwotnie lipokaliny uważane były głównie za białka transportujące, jednak obecnie znani są przedstawiciele tej rodziny pełniący różnorodne inne funkcje. Białka tej grupy biorą udział w odbieraniu bodźców zapachowych i smakowych (białka wiążące substancje zapachowe, OBP – ang. *odorant-binding proteins* [Snyder i inni, 1988]; białko gruczołu von Ebnera, VEGP – ang. *von Ebner's gland protein* [Schmale i inni, 1990]), prowadzą reakcje enzymatyczne (niezależna od glutationu syntaza prostaglandyny D_2 [Urade i inni, 1989; Nagata i inni, 1991]), uczestniczą w procesach związanych z przybieraniem barw ochronnych przez zwierzęta (np. białko wiążące bilinę, BBP – ang. *bilin-binding protein* występujące u motyla *Pieris brassicae* [Huber i inni, 1987; Schmidt i Skerra, 1994], krustacyjanina występująca w skorupie homara [Keen i inni, 1991], czy też cyjanina owadzia [Holden i inni, 1987]) oraz w transporcie feromonów (np. MUP – ang. *major urinary proteins* [Cavaggioni i inni, 1987; Knopf i inni, 1983; Kurtz i inni, 1976], afrodyzyna [Henzel i inni, 1988]). Niektóre lipokaliny, tworzące grupę immunokalin [Lögberg i Wester, 2000], biorą udział w regulacji odpowiedzi immunologicznej. W jej skład wchodzi α_1M , α_1 -kwaśna glikoproteina, białko wiążące retinol, glikodelina (inaczej białko ciężowe PP14 – ang. *pregnancy protein 14*), β -laktoglobulina, NGAL - lipokalina związana z żelatynazą neutrofilową (ang. *neutrophil gelatinase-associated lipocalin*) oraz czynnik dopełniacza C8 γ . Białka z rodziny lipokalin biorą też udział w procesach regulacji

komórkowej (QSP; apoD) [Flower, 1994]. Ciekawymi reprezentantami lipokalin są nitroforyny (NP1-7) – białka hemowe występujące w ślinie ssącego krew owada *Rhodnius prolixus* [Montfort i inni, 2000]. Grupa hemowa związana wewnątrz baryłki transportuje NO, który uwalniany w ciele żywiciela powoduje rozszerzenie naczyń krwionośnych oraz hamuje agregację płytek krwi. Nitroforyny wiążą również histaminę, a NP2 hamuje krzepnięcie krwi zapobiegając przemianie czynnika X w czynnik Xa.

3.7. WŁAŚCIWOŚCI STRUKTURALNE α_1 -MIKROGLOBULINY

α_1 M jest białkiem silnie glikozylowanym. U człowieka dwa spośród trzech łańcuchów cukrowych, przyłączone do reszt kwasu asparaginowego w pozycjach 17 i 96 łańcucha polipeptydowego, stanowią N-glikany złożonego typu, zawierające reszty kwasu sjałowego. Trzeci, prostszej budowy O-glikan połączony jest z resztą treoninową w pozycji 5 [Escribano i inni, 1990; Amoresano i inni, 2000]. Wszystkie reszty glikozydowe są niejednorodne strukturalnie, przy czym zjawisko to zaznacza się wyraźniej w przypadku białka wyizolowanego z moczu w porównaniu z białkiem wyizolowanym z płynu owodniowego.

Okolo 50% α_1 M obecnej w ludzkiej krwi stanowią kompleksy z innymi białkami osocza, w tym przede wszystkim z IgA, ale również z albuminą (około 7%) i protrombiną (ok. 1%) [Grubb i inni, 1983; Berggård i inni, 1997]. Białko to występuje również w formie dimerów utworzonych za pomocą częściowo redukowalnego wiązania. Kompleks z IgA tworzony jest poprzez nieredukowalne wiązanie pomiędzy jedyną wolną resztą cysteinową w pozycji 34 α_1 M, a przedostatnią resztą cysteinową łańcucha α IgA [Calero i inni, 1994]. Wiązanie między α_1 M a protrombiną jest całkowicie redukowalne. Prawdopodobnie także w tym przypadku w tworzeniu kompleksu uczestniczy wspomniana reszta cysteinowa w pozycji 34. Również u innych gatunków α_1 M znajdowana jest w postaci kompleksów wielkocząsteczkowych, jednakże różni są partnerzy białkowi. W krwi szczurzej α_1 M tworzy kompleksy z α_1 -inhibitorem-3 poprzez odporne na redukcję wiązanie [Falkenberg i inni, 1990] oraz z fibronektyną za pomocą mostka disiarczkowego [Falkenberg i inni, 1994]. Kompleksy z mostkiem disiarczkowym znaleziono również u płastugi [Lindqvist i Åkerström, 1999]. Prawdopodobnie kompleksy te służą jako rezerwuar α_1 M i zapobiegają jej łatwemu przedostawaniu się do moczu.



Rysunek 3.5. Model struktury α_1 -mikroglobuliny. Model obejmuje reszty 5-170 łańcucha polipeptydowego. Kolorem czerwonym zaznaczono reszty lizynowe w pozycjach 92, 118 i 130 łańcucha polipeptydowego, kolorem żółtym – resztę cysteinową w pozycji 34. **A:** widok z boku ukazujący strukturę β -baryłki; **B:** widok z góry do wnętrza baryłki. Rysunek wykonano za pomocą programu WebLab ViewerPro 3.7, na podstawie współrzędnych modelu zaprezentowanego w pracy [Villoutreix i inni, 2000].

Do charakterystycznych cech α_1 M należą żółtobrazowa barwa jak również znaczna heterogeniczność pod względem ładunku. Obydwie właściwości wynikają z obecności niezidentyfikowanego dotąd chromoforu, który związany jest z reaktywną resztą cysteinową w pozycji 34 oraz z trzema resztami lizynowymi w pozycjach 92, 118 i 130 [Berggård i inni, 1999b; Escribano i inni, 1991], chociaż pewien udział ma również zróżnicowanie struktur glikanów oraz sekwencji C-końcowego fragmentu łańcucha polipeptydowego [Amoresano i inni, 2000]. Zgodnie z wymodelowaną strukturą trzeciorzędową α_1 M, uzyskaną poprzez porównanie jej sekwencji aminokwasowej z innymi lipokalinami o znanej strukturze krystalograficznej [Berggård i inni, 1999b; Villoutreix i inni, 2000], reszta cysteinowa znajduje się na pętli omega, zaś trzy reszty lizynowe ulokowane są wokół wejścia do wnętrza β -baryłki (rys. 3.5). Kompleks IgA- α_1 M nie wykazuje absorpcji w regionie charakterystycznym dla chromoforu, co może wskazywać na jego wytwarzanie dopiero w wyniku reakcji determinujących fizjologiczną funkcję α_1 M. Z drugiej strony zabarwione białko uzyskiwano z hodowli hepatocytów prowadzonych w całkowicie syntetycznym środowisku, jak również w wyniku produkcji w komórkach owadzych transformowanych bakulowirusem z genem kodującym prekursor

α_1 M-bikunina [Åkerström i inni, 1995]. W tym ostatnim przypadku uzyskiwano zarówno nierozcięty prekursor jak i uwolnioną α_1 M, przy czym obydwie formy białka wykazywały charakterystyczne żółtobrązowe zabarwienie.

3.8. ROLA α_1 -MIKROGLOBULINY

Funkcja biologiczna α_1 M nie została do tej pory poznana. Jak wspomniano wcześniej, białko to należy do grupy immunokalin, obejmującej siedem lipokalin wykazujących właściwości immunoregulacyjne *in vitro*. α_1 M hamuje indukowany antygenem podział limfocytów krwi [Lögdberg i Åkerström, 1981; Lögdberg i inni, 1986], produkcję IL-2 przez komórki hybrydowe limfocytów T pomocniczych [Wester i inni, 1998], hamuje migrację [Lögdberg i Åkerström, 1981] i chemotaksję neutrofilii [Méndez i inni, 1986]. Stwierdzono także, że działa ona mitogennie na limfocyty [Babiker-Mohamed i inni, 1990a; 1990b]. Zaobserwowano zmniejszoną transkrypcję genu α_1 M przy niezmiennym stężeniu tego białka we krwi pacjentów, u których wystąpiła choroba o podłożu zapalnym [Daveau i inni, 1993], obniżony poziom mRNA u szczurów z indukowanym zapaleniem ogólnoustrojowym [Daveau i inni, 1998], jak również pod wpływem działania IL-6 na hodowle modelowych linii komórkowych ludzkiego wątrobiaka, HepG2 i HepG3 [Daveau i inni, 1993; Sarafan i inni, 1995]. Inne doniesienie mówi o zwiększonym wydzielaniu α_1 M przez hodowle szczurzych hepatocytów pod wpływem IL-6 [Pierzchalski i inni, 1992]. Obecność znacznych ilości α_1 M na powierzchniach kontaktu organizmu ze środowiskiem zewnętrznym, np. w naskórku, płucach, jelitach, wokół naczyń krwionośnych oraz w łożysku, również sugeruje jej ochronną rolę w organizmie.

W ciągu ostatnich lat pojawia się coraz więcej doniesień, świadczących o nowej roli α_1 M jako czynnika ochronnego organizmu w przypadkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez różnorodne czynniki, w tym przez hem i hemoglobinę. α_1 M wyizolowana z różnych gatunków wiąże hem oraz hemoglobinę [Larsson i inni, 2004]. Pod wpływem działania hemoglobiny oraz błon erytrocytów dochodzi do odcięcia C-końcowego tetrapeptydu LIPR. Powstała w ten sposób forma t- α_1 M degraduje hem z wytworzeniem charakterystycznego chromoforu [Allhorn i inni, 2002]. W płynie wysiękowym chronicznych owrzodzeń stwierdzono obecność α_1 M, hemu oraz żelaza, natomiast α_1 M dodana z zewnątrz wiąże hem i tworzona jest forma t- α_1 M [Allhorn i inni, 2003]. W wycinkach pobranych z ran zlokalizowano to białko wspólnie z hemem w

blonach podstawnych oraz w tzw. mankietach fibrynowych wokół naczyń krwionośnych. $\alpha_1\text{M}$ posiada także własności reduktazy i dehydrogenazy [Allhorn i inni, 2005a]. Zaobserwowano, że redukuje ona cytochrom c, jony Fe^{3+} oraz syntetyczny substrat: błękit nitrotetrazolowy (NBT ang. *nitroblue tetrazolium*), za pośrednictwem anionu ponadtlenkowego, jak również (w odmienny sposób) methemoglobinę i wykorzystuje NADH, NADPH oraz kwas askorbinowy jako kofaktory. Ze względu na występowanie biologiczne w zewnątrzkomórkowych płynach tkankowych, *in vivo* znaczenie odgrywa zapewne oddziaływanie z askorbinianem. Ten ostatni również w największym stopniu powodował wzrost szybkości redukcji wspomnianych substratów przez $\alpha_1\text{M}$. W reakcji redukcji zaangażowane są reszty lizynowe w pozycjach 92, 118 i 130 łańcucha polipeptydowego jak również reszta cysteinowa w pozycji 34. Usunięcie tetrapeptydu LIPR prowadzi do ponad sześciokrotnego wzrostu szybkości reakcji. $\alpha_1\text{M}$ hamuje także indukowaną przez hem oraz ROS oksydację LDL, lipidów błonowych oraz całych komórek, jak również usuwa wcześniejsze produkty utleniania kolagenu oraz frakcji LDL [Allhorn i inni, 2005b]. Komórki wątrobiaka poddane działaniu oksy-, czy też methemoglobiny, hemu lub utworzonych w wyniku reakcji Fentona rodników hydroksylowych prowadzą zwiększoną syntezę kodującego $\alpha_1\text{M}$ RNA i samego białka, a także zwiększają jego wydzielanie [Olsson i inni, 2007]. Postuluje się również własności wyłapywania oraz redukcji wolnych rodników przez $\alpha_1\text{M}$ [Åkerström i inni, 2007]. W badaniach stwierdzono wiązanie i redukcję syntetycznego rodnika ABTS oraz tworzenie kowalencyjnego połączenia z jego pochodną. Inna grupa badaczy zidentyfikowała pochodne kinureniny, metabolitu tryptofanu o własnościach prooksydacyjnych, związane z resztami lizynowymi $\alpha_1\text{M}$ występującej w moczu pacjentów hemodializowanych [Sala i inni, 2004]. Najświeższe doniesienia mówią o ochronnej roli $\alpha_1\text{M}$ względem ludzkich komórek erytroidalnych poddanych działaniu czynników oksydacyjnych, takich jak hem, hemoglobina, czy rodniki hydroksylowe [Olsson i inni, 2008]. Obserwowano zahamowanie przez $\alpha_1\text{M}$ wywołanych przez wspomniane czynniki wewnątrzkomórkowych reakcji utleniania oraz wzmożonej ekspresji HO-1. Nastąpiło także oczyszczenie komórek ze związanego do błon komórkowych hemu oraz powstrzymanie indukowanej przez niego śmierci komórkowej.

W ostatnich latach postuluje się powiązanie choroby nadciśnieniowej z występowaniem chronicznego stanu zapalnego. Wiele spośród wskaźników stanu zapalnego, m. in. białko C-reaktywne (CRP, ang. *C-reactive protein*), IL-6, czynnik

martwicy nowotworu α (TNF α , ang. *tumor necrosis factor- α*) oraz liczba białych krwinek wykazuje podwyższony poziom w przypadkach wystąpienia nadciśnienia lub powikłań w jego następstwie [Bautista i inni, 2005; Karthikeyan i Lip, 2006]. Pacjenci z nadciśnieniem skurczowym, u których obserwuje się większe stężenie białek fazy ostrej (białka CRP, amyloidu α i fibrynogenu), wykazują podwyższony poziom α_1 M w moczu [Vyssoulis i inni, 2007]. Zwiększony poziom mRNA oraz samej α_1 M w łożysku oraz zawartość formy t- α_1 M w moczu stwierdzono u kobiet, u których wystąpił stan przedrzucawkowy [Olsson i inni, 2010]. Jest to stan chorobowy występujący u 5-10% kobiet ciężarnych, objawiający się nadciśnieniem, białkomoczem oraz obrzękiem kończyn. W powyższych przypadkach podwyższona była równocześnie zawartość hemoglobiny F we krwi pępowinowej oraz hemoglobiny A we krwi obwodowej, zaobserwowano wzrost oksydacyjnej modyfikacji białek (poprzez pomiar białkowych grup karbonylowych) oraz obniżony poziom haptoglobiny.

4. CEL PRACY

Ogólnym celem niniejszej pracy było uzyskanie dodatkowych informacji o strukturze ludzkiej α_1M . Realizacja tego celu obejmowała następujące zadania szczególne:

- Zbadanie wpływu mutacji punktowych na strukturę, heterogeniczność ładunku, własności spektralne i hydrodynamiczne rekombinowanej α_1M . W tym celu wykorzystano techniki spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej, pomiary dichroizmu kołowego, sączenie molekularne, ogniskowanie izoelektryczne oraz elektroforezę w warunkach niedenaturujących.

- Wyznaczenie termodynamicznych stałych wiązania potencjalnych fizjologicznych ligandów: hemu oraz PPIX, przez α_1M typu dzikiego oraz jej muteiny. W badaniach posłużono się metodą miareczkowania spektrofluorymetrycznego, wykorzystując efekt wygaszania fluorescencji reszt tryptofanowych białka pod wpływem wiązania liganda.

- Analizę kinetyki wiązania hemu przez rekombinowane warianty α_1M za pomocą techniki zatrzymanego przepływu, poprzez obserwację emisji fluorescencji reszt tryptofanowych białka.

- Zbadanie wpływu związanego hemu oraz PPIX na strukturę drugorzędową badanych białek oraz ich ogólną konformację w roztworze. W tym celu wykonano pomiary widm dichroizmu kołowego kompleksów białko-ligand, sączenie molekularne oraz pomiary zaniku w czasie anizotropii fluorescencji kompleksów białko-PPIX (obserwacja fluorescencji związanego liganda) i kompleksów białko-hem (obserwacja fluorescencji znacznika dansylowego przyłączonego do reszty cysteinowej α_1M).

5. MATERIAŁY I METODY

5.1. MATERIAŁY I APARATURA

Podczas wykonywania pracy wykorzystano następujące odczynniki i materiały chemiczne:

- NaCl, hem, chlorowodorek guanidyny (GuHCl), arginina, β -merkaptoetanol, błękit Coomassie G-250 i R-250 (ang. *Coomassie Brilliant Blue*), TEMED (N,N,N',N'-tetraetylometylodiamina), zredukowany i utleniony glutation pochodzące z firmy Fluka;
- Tris-HCl zakupiony w firmie ICN;
- glicynę, cytochrom c, β -laktoglobulinę, owoalbuminę oraz ludzką (HSA) i wołową albuminę osocza (BSA), dodecylosiarczan sodu (SDS), akrylamid, izopropyl- β -tiogalaktopiranozyd (IPTG), kwas etylenodiaminotetraoocowy (EDTA), ditiotreitrol (DTT), oktyloglukozyd (OG) oraz celulozowe woreczki do dializy firmy Sigma;
- PPIX firmy Aldrich;
- 1,5-I-AEDANS (kwas 5-[2-[(2-jodoacetylo)amino]etyloamino]naftaleno-1-sulfonowy) zakupiony w firmie Molecular Probes;
- standard do elektroforezy Page RulerTM Protein Ladder z firmy Fermentas, mieszanina amfolitów do ogniskowania izoelektrycznego Bio-Lyte 3/10 oraz standard IEF o zakresie pI 4,45-9,6 firmy Bio-Rad;
- materiały do hodowli bakteryjnych: ekstrakt drożdżowy, hydrolizat kazeiny (ang. *Bacto Trypton*), agar do pożywek stałych wyprodukowane przez firmę GibcoBRL Life Technologies, jak również NaCl zakupiony w firmie POCH Gliwice oraz antybiotyki pochodzące z firm Jelfa (ampicylina) oraz Farm-Impex Sp. J. Gliwice (chloramfenikol);
- złoża Fractogel EMD Chelate (M) firmy Merck, Ni-NTA His•Bind Superflow firmy Novagen, Superdex 200 firmy Pharmacia LKB.

Skład buforów i pożywek:

- LB – 10 g Bacto Trypton, 10 g NaCl, 5 g ekstraktu drożdżowego na 1 l pożywki;
- bufor GuHCl – 6 M chlorowodorek guanidyny, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0;
- bufor do rozdzielów – 20 mM Tris-HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0;
- bufor do fałdowania – 0,5 M arginina, 0,65 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0;

- bufor Tris – 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5.

Do przygotowania wszelkich buforów oraz pożywek używano wody dejonizowanej z systemu Elix 5 firmy Millipore. Dodatkowo bufony były sączone przez sączki Millex-HV lub Millex-GP tejże firmy.

Ludzka α_1 M otrzymana z osocza i moczu oraz szczep BL21(DE3)pLysS *E.coli* i plazmidy kodujące poszczególne warianty rekombinowane ludzkiej α_1 M podarowane zostały przez prof. Bo Åkerströma z Uniwersytetu w Lund, Szwecja. W preparatyce białek i pomiarach wykorzystano następującą aparaturę:

- wirówki Sigma 3 K 30 i 6 K 15 firmy Sigma Laboratory Centrifuges,
- sonifikator UD-11 firmy Techpan,
- pompę perystaltyczną Econo Gradient Pump firmy Bio-Rad,
- łąźnię wodną F25 firmy Julabo,
- aparat do elektroforezy Mini Protean II firmy Bio-Rad,
- aparat do ogniskowania izoelektrycznego Mini IEF Cell Model 111 firmy Bio-Rad,
- zestaw do szybkiej chromatografii cieczowej białek (FPLC, ang: *fast protein liquid chromatography*) ÄKTA™ explorer 100 air firmy Pharmacia LKB,
- system HPLC składający się z pompy LC-10AT, detektora UV-VIS SPD-10A i mieszalnika FCV-10AL firmy Shimadzu oraz iniektora A0263 firmy Knauer,
- spektrofotometry UV-Vis Cary 400 oraz Cary 300 firmy Varian,
- spektrofluorymetr F-4500 firmy Hitachi,
- spektrofluorymetr FluoroLog firmy Jobin Yvon,
- spektropolarymetr Jasco-710 firmy Jasco,
- spektrofluorymetr do pomiarów szybkiej kinetyki metodą zatrzymanego przepływu, SX-17 MV firmy Applied Photophysics,
- spektrofluorymetr impulsowy do pomiarów fluorescencji rozdzielczej w czasie, zbudowany w Zakładzie Biochemi Fizycznej z podzespołów firmy IBH Horiba Jobin-Yvon.

5.2. METODY

5.2.1. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE BIAŁEK

Każdorazowo wykonywano nową transformację bakterii kompetentnych BL21(DE3)pLysS plazmidami pET12a, zawierającymi sekwencje kodujące poszczególne warianty ludzkiej α_1M . W zastosowanym układzie ekspresyjnym fragment DNA kodujący białko docelowe znajduje się pod kontrolą silnego promotora faga T7, natomiast gen kodujący polimerazę faga T7 umieszczony jest w komórce gospodarza w odrębnym plazmidzie, pod kontrolą promotora lacUV5. Nadprodukcja białka indukowana jest dodatkiem do pożywki izopropyl- β -D-tiogalaktopiranozydu (IPTG), który bezpośrednio wywołuje syntezę polimerazy T7, ta ostatnia natomiast prowadzi następnie ekspresję genu docelowego. Dodatkowo zastosowany szczep bakterii *E. coli* posiada plazmid z genem lizozymu T7, będącego naturalnym inhibitorem polimerazy T7. Dzięki temu zahamowana jest produkcja białka docelowego przed właściwą indukcją, która ma miejsce z powodu „przeciekania” promotora typu lac i niewielkiej ekspresji polimerazy T7 nawet pod nieobecność IPTG. Białko ulegające nadprodukcji tworzy w komórce bakteryjnej ciała inkluzyjne.

Konstrukcję plazmidów pET12a, zawierających sekwencje kodujące poszczególne warianty ludzkiej α_1M opisano w artykule [Kłapyta, 2001]. W niniejszej pracy badano następujące białka rekombinowane: wt- α_1M (typ dziki); wt Δ LIPR- α_1M (forma pozbawiona C-końcowego tetrapeptydu LIPR), C34S- α_1M (muteina, w której resztę cysteinową w pozycji 34 zastąpiono resztą seryny), K(3)T- α_1M (muteina, w której trzy reszty lizynowe w pozycjach 92, 118 i 130 zastąpiono resztami treoniny), C34S/K(3)T- α_1M (muteina, w której zmienione zostały zarówno reszta cysteinowa jak i lizynowe). Nadprodukcja i oczyszczanie przebiegały zasadniczo jak opisano w pracy [Kwasek i inni, 2007], z drobnymi modyfikacjami. Do 150 μ l zawiesiny bakteryjnej dodawano ok. 0,5 μ g plazmidowego DNA i inkubowano na lodzie przez 1 h. Po tym czasie komórki poddawano szokowi termicznemu w temperaturze 42 °C przez 1 min, a następnie pozostawiano na 2 min w lodzie. Po dodaniu 0,8 ml pożywki LB bakterie były inkubowane przez 1 h w temperaturze 37 °C. Od tej pory wszelkie pożywki, zarówno płynne jak i stałe wzbogacone były ampicyliną (100 μ g/ml) oraz chloramfenikolem (34 μ g/ml), natomiast temperatura inkubacji i hodowli wynosiła 37 °C. Zawiesinę w ilości 200 μ l rozprowadzano do wchłonięcia na płytce agarowej i inkubowano przez noc. Z uzyskanych kolonii pobierano po jednej, zawieszano w 5 ml LB, namnażano wytrząsając przez kilka godzin w łaźni

wodnej, a następnie uzyskaną zawiesinę dodawano do 100 ml pożywki LB i hodowano dalej przez noc. Hodowlą bakteryjną zaszczepiano 1 l LB uważając, aby uzyskana OD₆₀₀ nie przekroczyła wartości 0,3 i wytrząsano do momentu, gdy uzyskała ona wartość ok. 1,1-1,2. Wówczas indukowano produkcję białek docelowych dodając IPTG do stężenia 1 mM, a następnie kontynuowano hodowlę przez kolejnych 5 h. Wszystkie stosowane w trakcie tej procedury pożywki były sterylne. Po zwirowaniu (8000 x g, 20 min, 4 °C) bakterie zawieszano w 0,5 l buforu do rozdzielów (połowa objętości hodowli) i dwukrotnie sonifikowano na lodzie przez 1 min, używając najwyższej mocy sonifikatora. Osad komórkowy wirowano (8000 x g, 15 min, 4 °C), ponownie zawieszano w 60 ml buforu do rozdzielów i sonifikowano na lodzie w 4 seriach po 30 sek., a następnie dodawano DNazy i RNazy do stężenia 10 µg/ml i pozostawiano w temperaturze pokojowej na 0,5 h. Po tym czasie próbki wirowano (15000 x g, 20 min, 4 °C), osad rozpuszczano w 50 ml buforu GuHCl i pozostawiano w temperaturze pokojowej na noc. Ekstrakt białkowy wirowano dwukrotnie (20000 x g, 30 min, 4 °C), a uzyskany klarowny roztwór nakładano na kolumnę wypełnioną złożem Fractogel EMD Chelate, zrównoważoną buforem GuHCl. Kolumnę przemywano 50 ml buforu GuHCl (5 objętości złoża), a następnie związane białka wymywano 0,5 M roztworem imidazolu w buforze GuHCl, zbierając frakcje o objętości ok. 1,5 ml. Prędkość przepływu wynosiła kolejno: 1,5 ml/min przy nakładaniu próbki, 2 ml/min przy przemywaniu i 1 ml/min w trakcie elucji. Frakcje zawierające α₁M łączono razem, mieszano ze zredukowanym glutationem (rozpuszczonym w ilości wody odpowiadającej połowie objętości połączonych frakcji) i tak otrzymany roztwór wkraplano do 15-krotnie większej objętości buforu do fałdowania, zawierającego utleniony glutation, umiarkowanie mieszając. Końcowe stężenia zredukowanego i utlenionego glutationu wynosiły odpowiednio 5 mM i 1 mM. Po wkropleniu całości roztworu białka mieszało wyłączano i roztwór odstawiano na noc w temperaturze 4 °C, aby umożliwić sfałdowanie cząsteczek białek. Kolejne etapy oczyszczania prowadzono także w tej temperaturze. Następnie próbki dializowano dwukrotnie w 2 l buforu do rozdzielów i po zwirowaniu (20000 x g, 30 min) supernatant nakładano na kolumnę wypełnioną żywicą Ni-NTA His-Bind Superflow zrównoważoną buforem do rozdzielów. Złoże przemywano kolejno 20 ml czystego buforu do rozdzielów i 100 ml 10 mM roztworu imidazolu, a następnie związaną α₁M wymywano 0,5 M roztworem imidazolu, zbierając frakcje po 1,5 ml. Oczyszczone w ten sposób białka dializowano dwukrotnie względem znacznego nadmiaru buforu Tris i przechowywano w temperaturze -20 °C. Efektywność procesu oczyszczania na

poszczególnych etapach, a także zawartość α_1M w eluowanych frakcjach sprawdzano na drodze elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (PAGE) w układzie Laemmli'ego [Laemmli, 1970]. Białka w próbkach zawierających $GuHCl$ wytrącano wcześniej za pomocą acetonu (20-50 μl próbki rozcieńczano do 200 μl , mieszano z 0,8 ml acetonu i pozostawiano na noc w temperaturze $-20\text{ }^\circ C$; po odwirowaniu osad zawieszano w odpowiedniej objętości buforu próbkowego do elektroforezy).

Stężenie oczyszczonych białek oznaczano przez pomiar absorbancji przy długości fali 278 nm, wykorzystując wartość współczynnika $A_{0,1\%}(278)=1,49$ (Allhorn, konsultacja osobista), zarówno dla typu dzikiego, jak i mutein rekombinowanej α_1M . W przypadku białek ludzkich wyizolowanych z osocza krwi oraz z moczu wspomniany współczynnik wynosił odpowiednio 1,6 oraz 1,8 (Allhorn, konsultacja osobista). Wszystkie pomiary prowadzono w buforze Tris (pH 8,5) o ile nie zaznaczono inaczej.

5.2.2. POMIARY WIDM DICHROIZMU KOŁOWEGO

Pomiary widm dichroizmu kołowego wykonano na spektropolarymetrze Jasco 710, w kuwecie kwarcowej o drodze optycznej 1 mm, w temperaturze pokojowej ($21\text{ }^\circ C$). W trakcie pomiaru układ optyczny oraz komorę pomiarową przedmuchiowano azotem (przepływ 6 l/min), aby zmniejszyć udział tła związanego z absorpcją promieniowania w zakresie dalekiego nadfioletu przez tlen. Zastosowano metodę skokową pomiaru (ang. *step-scan mode*) z rozdzielczością 1 nm, czasem odpowiedzi (ang. *response time*) 16 s i szerokością pasma 2 nm. Każde widmo zmierzono w zakresie 195-250 nm, jako średnią z pięciu powtórzeń, stosując próbki białka o stężeniu 10 μM . Zmierzono widma wszystkich wariantów rekombinowanej α_1M w formie nieskompleksowanej oraz w kompleksie z hemem lub PPIX (dla każdego liganda wykonano dwa pomiary w stosunku molowym białko:ligand 1:1 oraz 1:3), ludzkiej α_1M wyizolowanej z moczu, a także form wt i wt Δ LIPR po wyznakowaniu 1,5-I-AEDANS, aby sprawdzić, czy znacznik nie zaburzył struktury drugorzędowej tych białek. Dodatkowo zbadano wpływ etanolu na strukturę drugorzędową wszystkich form α_1M , ze względu na konieczność zastosowania roztworu PPIX w tym rozpuszczalniku do miareczkowania fluorescencyjnego. Po odjęciu widma, odpowiednio, czystego buforu albo buforu z dodatkiem hemu, PPIX lub etanolu, uzyskane krzywe przeliczono na jednostki średniej eliptyczności molowej dla pojedynczej reszty aminokwasowej $[\theta]$ [$deg \cdot cm^2 \cdot d mol^{-1}$], korzystając z zależności:

$$[\theta] = \frac{\theta}{10 \cdot c \cdot l \cdot n} \quad (5.1)$$

gdzie θ – eliptyczność, c – stężenie molowe, l – długość drogi optycznej, n – liczba reszt aminokwasowych w łańcuchu polipeptydowym. Tak przygotowane widma białek w formie nieskompleksowanej posłużyły do wyznaczenia zawartości struktur drugorzędowych, za pomocą dostępnego w internecie pakietu CDPro [Sreerama i Woody, 2004].

5.2.3. POMIARY WIDM ABSORPCYJNYCH I FLUORESCENCYJNYCH

Widma absorpcyjne badanych białek zmierzono na spektrofotometrze Cary 400 firmy Varian, w zakresie 260-600 nm, z prędkością skanowania 300 nm/min. Próbki umieszczono w kuwecie o drodze optycznej 1 cm. Uzyskane widma przeliczono w taki sposób, aby wartość A_{280} była równa 1. Widma absorpcyjne PPIX oraz hemu, niezwiązanych oraz w kompleksach z α_1M , zmierzono na spektrofotometrze Cary 300 firmy Varian w zakresie od 300 do 700 nm. Dane zbierano z prędkością skanowania 200 nm/min. Wszystkie widma absorpcyjne mierzono w temperaturze pokojowej.

Trójwymiarowe widma fluorescencji zmierzono na spektrofluorymetrze Hitachi F-4500 w zakresie wzbudzenia od 280 do 500 nm oraz emisji od 290 do 600 nm. Prędkość skanowania wynosiła 1200 nm/min, czas odpowiedzi 4 ms, szerokość szczeliny ustawiono na 5 nm dla wzbudzenia i 10 nm dla emisji, odstęp pomiarowy (ang. *sampling interval*) dla światła wzbudzającego jak i emitowanego był równy 5 nm. Stężenia białek rekombinowanych użytych do pomiarów mieściły się w zakresie 20-27 μM , natomiast ludzkiej α_1M z krwi i z moczu wynosiły odpowiednio 7,5 i 10 μM . Pomiarów wykonano w kuwecie kwarcowej o przekroju 1 cm x 1 cm, w temperaturze pokojowej. Uzyskane widma przeliczono w taki sposób, aby maksymalny sygnał (maksimum emisji reszt tryptofanowych) był równy 10000 jednostek.

Widma fluorescencji wt- α_1M miareczkowanej roztworem hemu lub PPIX, widma PPIX miareczkowanej roztworem wt- α_1M oraz widma emisji AEDANS (przyłączonego do białek wt i wt Δ LIPR) podczas dodawania roztworu hemu, rejestrowano za pomocą spektrofluorymetru Fluorolog-3 firmy HORIBA Jobin-Yvon. W pierwszym przypadku próbkę wzbudzano światłem o długości fali 297 nm i obserwowano fluorescencję w zakresie od 305 do 420 nm z rozdzielczością 1 nm. Szerokość szczelin monochromatorów światła wzbudzającego i emitowanego ustawiono, odpowiednio, na 3 i 5 nm. Do próbki białka o stężeniu 1 μM dodawano mikrolitrowe ilości 100 μM (hem) lub 200 μM (PPIX)

roztworu liganda, po każdym dodatku odczekując 1 min przed dokonaniem pomiaru. W przypadku miareczkowania PPIX białkiem długość fali wzbudzenia wynosiła 395 nm, zaś widmo emisji rejestrowano w zakresie od 595 do 740 nm z rozdzielczością 1 nm. W jednym eksperymencie do roztworu PPIX o stężeniu 0,5 μM dodawano po 2 μl 50 μM roztworu wt- $\alpha_1\text{M}$. Szczeliny monochromatorów wzbudzenia i emisji ustawiono na szerokość odpowiednio 2 i 2,5 nm. W innej serii pomiarowej stężenie PPIX wynosiło 2 μM , a dodawano 110 μM roztwór hemu. AEDANS w wyznakowanych białkach wzbudzano światłem o długości fali 340 nm i mierzono widmo fluorescencji w zakresie 350 do 600 nm z rozdzielczością 0,5 nm. Szczeliny monochromatorów wynosiły odpowiednio 2 i 5 nm dla światła wzbudzającego i emitowanego. Warunki pomiaru były identyczne jak dla miareczkowania z obserwacją fluorescencji reszt tryptofanowych białka. W każdym z wymienionych eksperymentów pomiar dokonywany był po upływie 1 min od dodatku titranta, z prędkością 120 nm/min.

5.2.4. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE I ELEKTROFOREZA W WARUNKACH NIEDENATURUJĄCYCH

Ogniskowanie izoelektryczne wykonano przy użyciu aparatu Mini IEF Cell Model 111 firmy Bio-Rad. Żel poliakrylamidowy przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta, stosując roztwór amfolitów Bio-Lyte 3/10 tej samej firmy. Próbki białek rekombinowanych przedializowano wcześniej do buforu 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 bez dodatku soli. Na żel nakładano po ok. 5 μg każdego białka w objętości nie większej niż 1,4 μl . Rozdział prowadzono w następujących warunkach: 100 V przez 15 min, 200 V przez kolejne 15 min, a następnie 60 min pod napięciem 450 V. Po zakończeniu eksperymentu żel wybarwiano przez 1 h w roztworze o składzie: 3,5% kwas chlorowy (VII), 0,025% błękit Coomassie G-250, a następnie utrwalono w 7% kwasie octowym.

Elektroforezę PAGE w warunkach niedenaturujących [Davis, 1964] prowadzono w aparacie Mini Protean II firmy Bio-Rad. Żel poliakrylamidowy przygotowano wg przepisu:

4% żel zagęszczający (10 ml): mieszanina akrylamid-bisakrylamid – 1,5 ml; 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 – 2,5 ml; H₂O – 6 ml; N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina (TEMED) – 10 μl ; 10% roztwór nadsiarczanu amonu (APS) – 30 μl

10% żel rozdzielający (10 ml): mieszanina akrylamid-bisakrylamid – 3,375 ml; 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8; H₂O – 3,765 ml; TEMED – 5 μl ; 10% APS – 25 μl .

Próbki mieszano z 5-krotnie stężonym buforem obciążającym (40% sacharoza, 0,25% błękit bromofenolowy w buforze elektrodowym) i nakładano na żel. Bufor elektrodowy 5-krotnie stężony przygotowano wg przepisu (na 1 l): 15 g Tris-HCl, 72 g glicyny, pH 8,3. Rozdział prowadzono początkowo przy natężeniu prądu 40 mA (w żelu zagęszczającym), a następnie zwiększono natężenie do 80 mA. Białka wybarwiano w roztworze o składzie: 40% metanol, 10% kwas octowy, 0,2 g/l błękit Coomasie G 250 i 2 g/l błękit Coomassie R 250, a następnie odbarwiano żel w roztworze zawierającym 40% metanol i 10% kwas octowy.

5.2.5. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW HEMU I PROTOPORFIRYNY IX

Roztwory PPIX i hemu przygotowywano w dniu pomiaru, chroniąc przed dostępem światła. Niewielką porcję PPIX rozpuszczano w 64% etanolu, po zwirowaniu uzyskując roztwór o stężeniu około 3-4 mM. Stężenie oznaczano spektrofotometrycznie w 2,7 M HCl, stosując molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_{408} = 262000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Kuszaj i inni, 1996]. Hem rozpuszczano w 0,1 M NaOH i po zwirowaniu oznaczano stężenie w 20 mM NaOH, stosując molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_{385} = 58500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [Solar i inni, 1989]. W pomiarach stosowano roztwór rozcieńczony odpowiednim dodatkiem buforu.

5.2.6. SĄCZENIE MOLEKULARNE α_1 -MIKROGLOBULINY ORAZ JEJ KOMPLEKSÓW Z HEMEM I PROTOPORFIRYNĄ IX

Sączenie molekularne białek rozpuszczonych w buforze Tris wykonano na kolumnie Superdex 200 HR 10/30 podłączonej do systemu HPLC składającego się z pompy LC-10AT, detektora UV-VIS SPD-10A i mieszalnika FCV-10AL firmy Shimadzu oraz iniektora firmy Knauer. Na kolumnę nakładano 50 μl próbki o stężeniu 25 μM . W przypadku próbek z ligandem białko mieszano z PPIX lub hemem w stosunku molowym 1:1 i inkubowano w ciemności przez 1 h w temperaturze pokojowej. Rozdział prowadzono przy prędkości przepływu 0,6 ml/min. Jako standardy masowe zastosowano cytochrom c, mioglobinę, β -laktoglobulinę, owoalbuminę oraz ludzką albuminę osocza (HSA, ang. *human serum albumin*). Dane pomiarowe zbierano korzystając z programu ChromaX for Windows, v3.26, firmy Pol-Lab, natomiast analizę chromatogramu przeprowadzono za pomocą programu Chr-mod, v3.26 tego samego producenta. Chromatografię próbek zawierających wyższe stężenia NaCl oraz ditiotretitol (DTT) lub n-oktylo- β -D-glukozyd (OG) wykonano również na kolumnie Superdex 200 wykorzystując system chromatografii

cieczowej ÄKTA FPLC firmy Pharmacia LKB. Białka przedializowano do buforów zawierających 250 mM lub 0,5 M NaCl lub dodano DTT do stężenia 1 mM i inkubowano 40 min w temperaturze 4 °C i 20 min w temperaturze pokojowej lub inkubowano z 5 mM OG przez 48 h w temperaturze 4 °C. Na kolumnę nakładano 100 µl próbki o stężeniu około 20-40 µM i eluowano z prędkością przepływu 0,8 ml/min.

5.2.7. PRZEWIDYWANE WARTOŚCI MASY CZĄSTECZKOWEJ ORAZ PUNKTU IZOELEKTRYCZNEGO

Wartości teoretyczne masy cząsteczkowej poszczególnych białek oraz ich punktów izoelektrycznych (pI) obliczono przy pomocy narzędzia ProtParam dostępnego na serwerze ExPASy [Gasteiger i inni, 2005], na podstawie sekwencji aminokwasowej, z uwzględnieniem ośmiohistydynowej etykiety oraz miejsca cięcia dla enterokinazy, obecnych w każdym konstrukcie.

5.2.8. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE

Pomiary wykonano na spektrofluorymetrze Fluorolog-3 firmy HORIBA Jobin Yvon, korzystając z kuwety kwarcowej o przekroju 1 cm x 1 cm. W trakcie pomiaru próbka była termostatowana do zadanej temperatury za pomocą łaźni wodnej Julabo F25. Długości fal promieniowania wzbudzającego i emitowanego wynosiły odpowiednio 297 i 332 nm. Szerokość szczelin w torach wzbudzenia i emisji ustawiono odpowiednio na 3 i 5 nm. Do próbek α_1 M o stężeniu 1 µM dodawano porcje po 2 µl 200 µM roztworu PPIX lub po 4 µl 100 µM roztworu hemu, po każdym dodatku odczekując 1 min przed dokonaniem pomiaru. Wartość intensywności fluorescencji przy kolejnych stężeniach liganda mierzono jako średnią z 5 powtórzeń, przy czym każdy pojedynczy pomiar trwał 10 sek. Dla każdego białka wykonano od 3-5 niezależnych serii pomiarowych z każdym z ligandów. Stężony roztwór PPIX rozcieńczano 64% etanolem do stężenia 200 µM. Roztwór hemu natomiast rozcieńczano do stężenia 100 µM buforem, w którym prowadzono pomiar. Podczas miareczkowania mierzono równocześnie absorbancję przy długościach fali wzbudzenia i emisji po każdym dodatku liganda. Pomiary prowadzone były w temperaturze 37 °C, w buforze Tris pH 8,5 (wszystkie muteiny; PPIX i hem). Dodatkowo wykonano miareczkowania wt- α_1 M w buforze o identycznym składzie oraz pH równym 8,0 i 7,5, w temperaturze 37 °C, jak również w buforze Tris pH 8,5 w temperaturze 25 °C. Końcowe stężenie etanolu w próbkach miareczkowanych PPIX wynosiło 1,86%.

Sprawdzono, że rozpuszczalnik ten w zastosowanym stężeniu nie wywiera wpływu na fluorescencję białka, jak również nie powoduje zmian w jego strukturze (pomiar widm dichroizmu kołowego). Wartości fluorescencji zmierzone dla poszczególnych próbek przeliczono wg równania:

$$F_{(kor)i} = (F_{pi} - F_{bi}) \cdot \frac{V_i}{V_0} \cdot 10^{0,5(A_{(297)i} + A_{(332)i})} \quad (5.2)$$

gdzie F_p i F_b stanowią wartości fluorescencji odpowiednio dla białka i dla buforu, V_0 i V to, odpowiednio, objętość początkowa i końcowa próbki, A_{297} i A_{332} to wartości absorbancji przy długościach fali 297 i 332 nm (czyli wzbudzenia i emisji), zaś indeks „i” odpowiada kolejnemu dodatkowi liganda (PPIX lub hem).

Otrzymane krzywe miareczkowania analizowano na dwa sposoby. Pierwszym było zastosowanie programu DynaFit [Kuzmič, 1996]. Ponadto posłużono się metodą wyznaczenia wartości „obserwowanych” stałych dysocjacji, przedstawioną w pracy [Cogan i inni, 1976]. W tym celu sporządzono wykres zależności $P_0 \cdot \alpha$ od $L_t / [d(1-\alpha)]$, gdzie P_0 i L_t to, odpowiednio, całkowite stężenie białka oraz liganda, natomiast α to frakcja niezajętych miejsc wiążących białka. Wykres taki stanowi prostą opisaną poniższym równaniem:

$$P_0 \cdot \alpha = \frac{1}{n} \cdot \frac{L_t \cdot \alpha}{1 - \alpha} - \frac{K'_d}{n}, \quad (5.3)$$

gdzie n jest liczbą miejsc wiążących, zaś K'_d jest obserwowaną stałą dysocjacji dla pojedynczego miejsca wiążącego. Wartość α obliczono dla każdego punktu krzywej miareczkowania zgodnie z równaniem:

$$\alpha = \frac{F - F_{\min}}{F_0 - F_{\min}}, \quad (5.4)$$

gdzie F – wartość intensywności fluorescencji przy danym stężeniu liganda, F_0 i F_{\min} – wartości intensywności fluorescencji odpowiednio pod nieobecność liganda oraz przy całkowitym wysyceniu miejsc wiążących białka. Wartość F_{\min} wyznaczono z zależności $1/F$ od $1/L_t$, jako odwrotność wartości granicznej F przy $1/L_t \rightarrow 0$. Na podstawie równania (5.3) dla każdej serii pomiarowej wyznaczono wartość n jako odwrotność nachylenia prostej, a następnie K'_d z wartości wyrazu wolnego prostej.

5.2.9. POMIARY SZYBKIEJ KINETYKI WIĄZANIA LIGANDÓW PRZEZ α_1 -MIKROGLOBULINĘ METODĄ ZATRZYMANEGO PRZEPŁYWU

Pomiary kinetyczne wykonano na spektrofluorymetrze SX 17 MV firmy Applied Photophysics w temperaturze 37 °C (wszystkie warianty α_1 M) oraz 25 °C (jedynie wt- α_1 M). Reagenty mieszano w stosunku objętościowym 1:1 i obserwowano wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych białka pod wpływem wiązania hemu. Czas martwy urządzenia, czyli czas potrzebny na wymieszanie reagentów oraz przebycie przez mieszaninę reakcyjną drogi do komórki pomiarowej, wynosił 1,8 ms. Próbkę wzbudzano światłem o długości fali 297 nm, emisję fluorescencji natomiast obserwowano stosując filtr odcinający światło o długości fali poniżej 315 nm firmy Åndover Corporation. Napięcie na fotopowielaczu ustawiono na 400 V, skala czasowa wynosiła 0,5 s, każdorazowo zbierano 2000 punktów pomiarowych. Pomiar prowadzono zachowując stałe stężenie białka (po zmieszaniu 1 μ M) i zmieniając końcowe stężenie liganda, w granicach od 0,5-3,5 μ M, co 0,25 μ M. Przed pomiarem próbki inkubowano w strzykawkach przez 5 min. Wynik uzyskany dla każdego stężenia stanowi średnią z 12-14 pomiarów. Dla każdego białka wykonano co najmniej 3 serie pomiarów w całym zakresie stężeń. Dodatkowo wykonano pojedynczą serię pomiarową dla białka wt- α_1 M o stężeniu końcowym 0,5 μ M, w zakresie stężeń hemu 0,25-3,0 μ M, co 0,25 μ M, ustawiając napięcie na fotopowielaczu równe 420 V i analogiczny pomiar, w którym jako liganda użyto PPIX (zastosowano dodatkowo filtr 001FG09-50S firmy Åndover Corporation, eliminujący fluorescencję liganda). W innym eksperymencie obserwowano wygaszanie fluorescencji PPIX pod wpływem wiązania do α_1 M. W tych pomiarach stężenie PPIX było stałe (końcowe 2,5 μ M), natomiast stężenie białka wynosiło kolejno: 0,5; 1; 1,25; 1,5; 1,7; 1,9 μ M. Próbkę wzbudzano przy długości fali 390 nm, emisję fluorescencji obserwowano przez filtr odcinający światło o długości fali poniżej 475 nm firmy Åndover Corporation. Napięcie na fotopowielaczu wynosiło 450 V, a dane zbierano w skali czasowej 0,5 s.

Otrzymane krzywe kinetyczne analizowano za pomocą programu DynaFit [Kuzmič, 1996], pozwalającego dopasowywać różnorodne modele wiązania do danych eksperymentalnych, uzyskiwanych w trakcie badań oddziaływań białko-ligand. Zastosowano ponadto uproszczone, ale mniej ściśle podejście, polegające na rozkładaniu krzywych kinetycznych na eksponencjalne składowe, co prowadzi do oszacowania pozornych pseudopierwszorzędowych stałych szybkości dla hipotetycznych etapów sumarycznej reakcji. W tym celu dane pomiarowe przeliczono najpierw na wartości

fluorescencji względnej, korzystając z równania:

$$F = \frac{F_{ex}}{F_0}, \quad (5.5)$$

gdzie F_{ex} – zmierzona fluorescencja próbki przy danym stężeniu liganda, F_0 – średnia wartość fluorescencji białka pod nieobecność liganda. Dla końcowych stężeń hemu powyżej 1,75 μM do przebiegów zmian intensywności fluorescencji w czasie dopasowywano krzywe mono- lub wieloeksponecjalne opisane równaniem:

$$F(t) = \sum_{i=1}^n A_i \exp(-k_{iobs}t) + F_{\infty}, \quad (5.6)$$

gdzie A – amplituda zmian, F_{∞} – wartość graniczna intensywności fluorescencji dla $t \rightarrow \infty$, k_{obs} – stała obserwowana szybkości reakcji, a indeks „ i ” określa poszczególne procesy. Wartość n zwiększano do momentu uzyskania możliwie najlepszego dopasowania krzywych teoretycznych do danych eksperymentalnych, co oceniano na podstawie rozkładu residuów oraz wartości współczynnika χ^2 . Dalsza interpretacja polegała na ocenie charakteru zależności uzyskanych w ten sposób wartości stałych obserwowanych k_{iobs} od stężenia całkowitego liganda. W analizach tych korzystano z oprogramowania Sigma Plot v7.0.

5.2.10. POMIARY ZANIKU W CZASIE ANIZOTROPII FLUORESCENCJI

α_1 -MIKROGLOBULINA ZNAKOWANA 1,5-IAEDANS

Białka wt i wt Δ LIPR, przedializowane wcześniej do buforu Tris pH 8,0, zmieszano z kilkoma mikrolitrami 50 mM roztworu 1,5-I-AEDANS w dimetylosulfotlenku (DMSO) tak, aby stosunek molowy białko:znacznik wynosił 1:3. Końcowe stężenie DMSO nie przekraczało 0,6%. Próbkę inkubowano przez 25 min w ciemności, w temperaturze pokojowej, a następnie dializowano względem buforu Tris pH 8,5, w celu usunięcia niezwiązanego znacznika. Stopień wyznakowania oznaczono spektrofotometrycznie stosując molowy współczynnik absorpcji $\epsilon_{340} = 6000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ dla znacznika 1,5-I-AEDANS i przyjmując, że jego absorbancja przy długości fali 278 nm stanowi 25% wartości zmierzonej przy 340 nm [Hudson i Weber, 1973]. Zgodnie z powyższym absorbancję samego białka wyliczono korzystając z zależności:

$$A_{278}(\alpha_1 m) = A_{278} - 0,25 \cdot A_{340} \quad (5.7)$$

Pomiary zaniku w czasie fluorescencji znacznika związanego kowalencyjnie z białkiem wykonano metodą zliczania pojedynczych fotonów na pikosekundowym

spektrofluorymetrze impulsowym, w skład którego wchodziły moduł pikosekundowej detekcji fotonów TBX-04 i stacja danych IBH Datastation Hub firmy HORIBA Jobin Yvon. Układ optyczny wraz z termostatowanym domkiem został skonstruowany w Zakładzie Biochemii Fizycznej WBBiB UJ. Jako źródło światła posłużyła dioda impulsowa 372 nm NanoLED firmy HORIBA Jobin Yvon, o częstotliwości repetycji 1 MHz. Fluorescencję próbki obserwowano przez filtr odcinający światło o długości fali poniżej 408 nm firmy Åndover Corporation oraz Bright Line Fluorescence Emitter 483/32 firmy Semrock. W celu polaryzacji światła wzbudzającego i emitowanego przez próbkę zastosowano polaryzatory Glana-Thompsona. Profil aparaturowy mierzono poprzez pomiar światła rozproszonego przez roztwór glikogenu, przy wertykalnym ustawieniu polaryzatorów wzbudzenia i emisji oraz przy braku filtrów emisji. Intensywność fluorescencji badanych próbek mierzono przy wertykalnym ustawieniu polaryzatora wzbudzającego oraz przy dwóch ustawieniach polaryzatora emisyjnego: wertykalnym (VV) oraz horyzontalnym (VH). Pomiary wykonano dla wyznakowanej $\alpha_1\text{M}$ oraz kompleksów białko-hem. W drugim przypadku białko mieszano z hemem w stosunku 1:1, a następnie 1:3, każdorazowo inkubując próbkę w temperaturze pomiaru przez 1 h. W trakcie pomiaru próbkę białka o stężeniu 1 μM termostatowano w temperaturze 20 °C. Dane zbierano z rozdzielczością 10 ps/kanal w skali czasowej 200 ns. Dodatkowo dla każdej serii pomiarowej dokonywano pomiaru intensywności fluorescencji przy horyzontalnym ustawieniu polaryzatora oraz horyzontalnym (HH) i wertykalnym (HV) ustawieniu analizatora, w celu korekty o współczynnik G, określony równaniem:

$$G = \frac{I_{HV}}{I_{HH}} \quad (5.8)$$

Pozwoliło to na eliminację wpływu różnic w czułości detektora dla światła spolaryzowanego w tych dwóch kierunkach, na wartość mierzonych intensywności fluorescencji. Dane pomiarowe zbierano korzystając z oprogramowania IBH DataStation w wersji 2.1.6.

Analizę danych przeprowadzono używając programu IBH DAS6 (Data Analysis Software for Windows, v 6.1.99). Krzywa $F(t)$ rejestrowana przez aparaturę jest splotem funkcji opisującej rzeczywisty zanik intensywności fluorescencji $I(t)$ oraz funkcji $L(t)$ będącej odpowiedzią układu pomiarowego na impuls wzbudzenia, co przedstawia poniższe równanie:

$$F(t) = \int_0^t L(t-t')I(t')dt', \quad (5.9)$$

Gdy profil aparaturowy jest wąski w porównaniu z zanikiem intensywności fluorescencji badanej próbki, wówczas można dopasować krzywe teoretyczne bezpośrednio do zmierzonych przebiegów czasowych, metodą regresji nieliniowej. W przeciwnym wypadku należy zastosować procedurę rozplatania funkcji. Dane pomiarowe analizowano stosując obydwie metody.

W pierwszej kolejności wyznaczono czasy życia fluorescencji znacznika, na podstawie krzywej zaniku całkowitej fluorescencji, obliczonej zgodnie z równaniem:

$$I(t) = I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t) \quad (5.10)$$

Do danych doświadczalnych dopasowywano krzywe eksponencjalnego zaniku fluorescencji, opisane równaniem ogólnym:

$$I(t) = \sum_{i=1}^n b_i \exp(\tau_i / t) \quad (5.11)$$

gdzie τ_i jest i -tą składową czasu życia zaś b_i jest jej amplitudą. Stosowano modele o wzrastającej liczbie eksponent, do momentu, gdy wartość współczynnika χ^2 oraz rozkład residuów nie ulegały dalszej poprawie. Znając składowe czasu życia oraz ich udziały (α_i) w całkowitym zaniku fluorescencji, dla poszczególnych białek oraz ich kompleksów z hemem obliczono średni czas życia znacznika, korzystając ze wzoru:

$$\langle \tau \rangle = \sum_{i=1}^n \alpha_i \tau_i \quad (5.12)$$

Niepewność pomiarową średniego czasu życia fluorescencji obliczono na podstawie prawa przenoszenia niepewności pomiarowych metodą różniczki zupełnej, przyjmując poziom ufności p równy 95% oraz liczbę stopni swobody $n-1$, dla serii n pomiarów.

Przebiegi czasowe intensywności fluorescencji I_{VV} oraz I_{VH} przeliczono na wartości anizotropii korzystając z równania:

$$r(t) = \frac{I_{VV}(t) - GI_{VH}(t)}{I_{VV}(t) + 2GI_{VH}(t)} \quad (5.13)$$

Do uzyskanych w ten sposób krzywych dopasowywano funkcje opisane równaniem:

$$r(t) = r_\infty + \sum_{i=1}^n A_i \exp(-t / \theta_i) \quad (5.14)$$

gdzie A_i jest amplitudą składowej o czasie rotacyjnej korelacji θ_i , a r_∞ jest anizotropią

graniczną. Wartość anizotropii początkowej r_0 obliczono na podstawie zależności:

$$r_0 = r_\infty + \sum_{i=1}^n A_i \quad (5.15)$$

Uzyskane wartości czasu rotacyjnej korelacji posłużyły do wyznaczenia promieni hydrodynamicznych, r_h , zgodnie z zależnością:

$$r_h = \sqrt[3]{\frac{3kT\theta}{4\pi\eta}} \quad , \quad (5.16)$$

gdzie k -stała Boltzmanna, T – temperatura bezwzględna, η - lepkość. Powyższe równanie zakłada kulistość cząsteczki.

Teoretyczny czas rotacyjnej korelacji wyznaczono dla α_1M za pomocą programu HYDROPRO v 5.a [Garcia de la Torre i inni, 2000], w oparciu o współrzędne modelu białka przedstawionego w pracy [Villoutreix i inni, 2000], dla temperatury 20 °C i przyjmując lepkość rozpuszczalnika równą 1 cP oraz cząstkową objętość właściwą białka równą 0,702 cm³/g.

KOMPLEKSY α_1M -PPIX

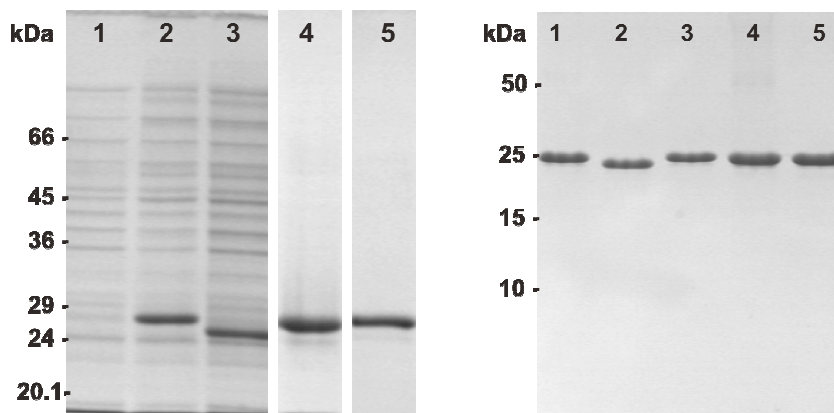
Każdy z wariantów rekombinowanej α_1M o stężeniu 1,2 μM inkubowano w temperaturze pokojowej z 1 μM PPIX przez 0,5 – 1h. Pomiar oraz analizę danych prowadzono jak w przypadku białek znakowanych 1,5-I-AEDANS, przy czym fluorescencję obserwowano z użyciem filtrów 475FG03-50S oraz 550FD26-25 firmy Åndover Corporation.

6. WYNIKI

6.1. PODSTAWOWE WŁAŚCIWOŚCI REKOMBINOWANYCH FORM α_1 -MIKROGLOBULINY

6.1.1. NADPRODUKCJA I OCZYSZCZANIE

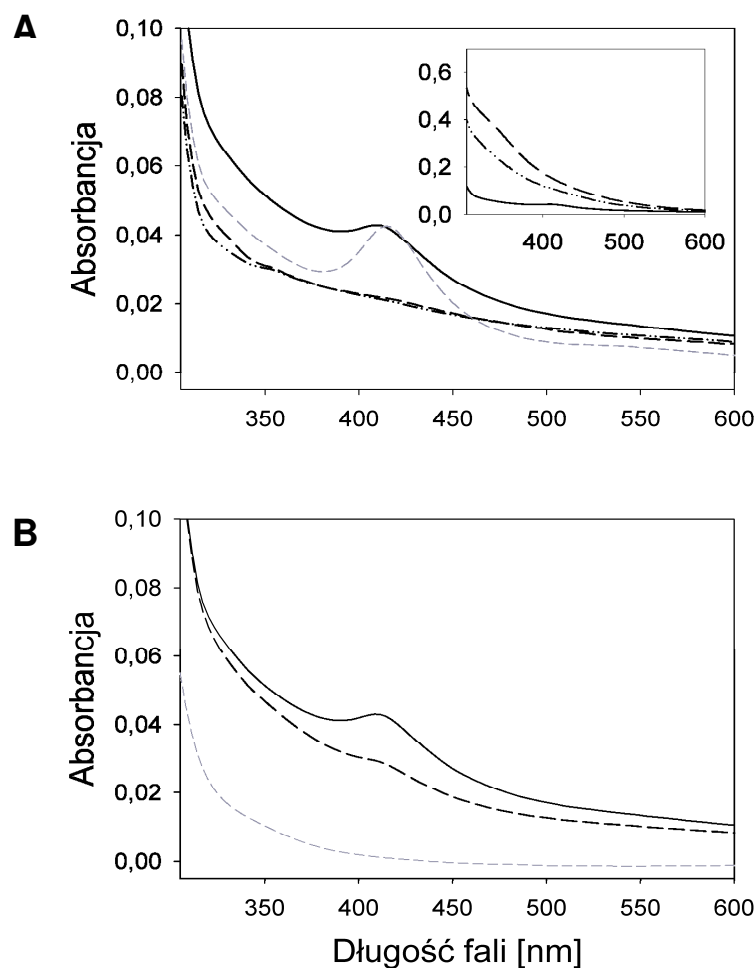
Nadprodukcję rekombinowanych form α_1 M przeprowadzono w hodowlach szczepu BL21(DE3)pLysS *E. coli*. Każdorazowo transformację odpowiednim plazmidem wykonywano bezpośrednio przed założeniem hodowli. Białka rekombinowane produkowane były w postaci ciałek inkluzyjnych. Oczyszczanie obejmowało ekstrakcję α_1 M za pomocą 6 M roztworu chlorowodoru guanidyny, chromatografię powinowactwa do jonów metalu (dzięki obecności w konstrukcie etykiety histydynowej), etap fałdowania i kolejną chromatografię powinowactwa do immobilizowanych jonów metalu, tym razem w warunkach niedenaturujących. Czystość α_1 M na poszczególnych etapach procesu oczyszczania sprawdzano za pomocą elektroforezy PAGE w układzie Laemmli'ego. Ostatecznie z 1 l hodowli uzyskiwano ok. 30-40 mg białka o czystości powyżej 95% (rys. 6.1).



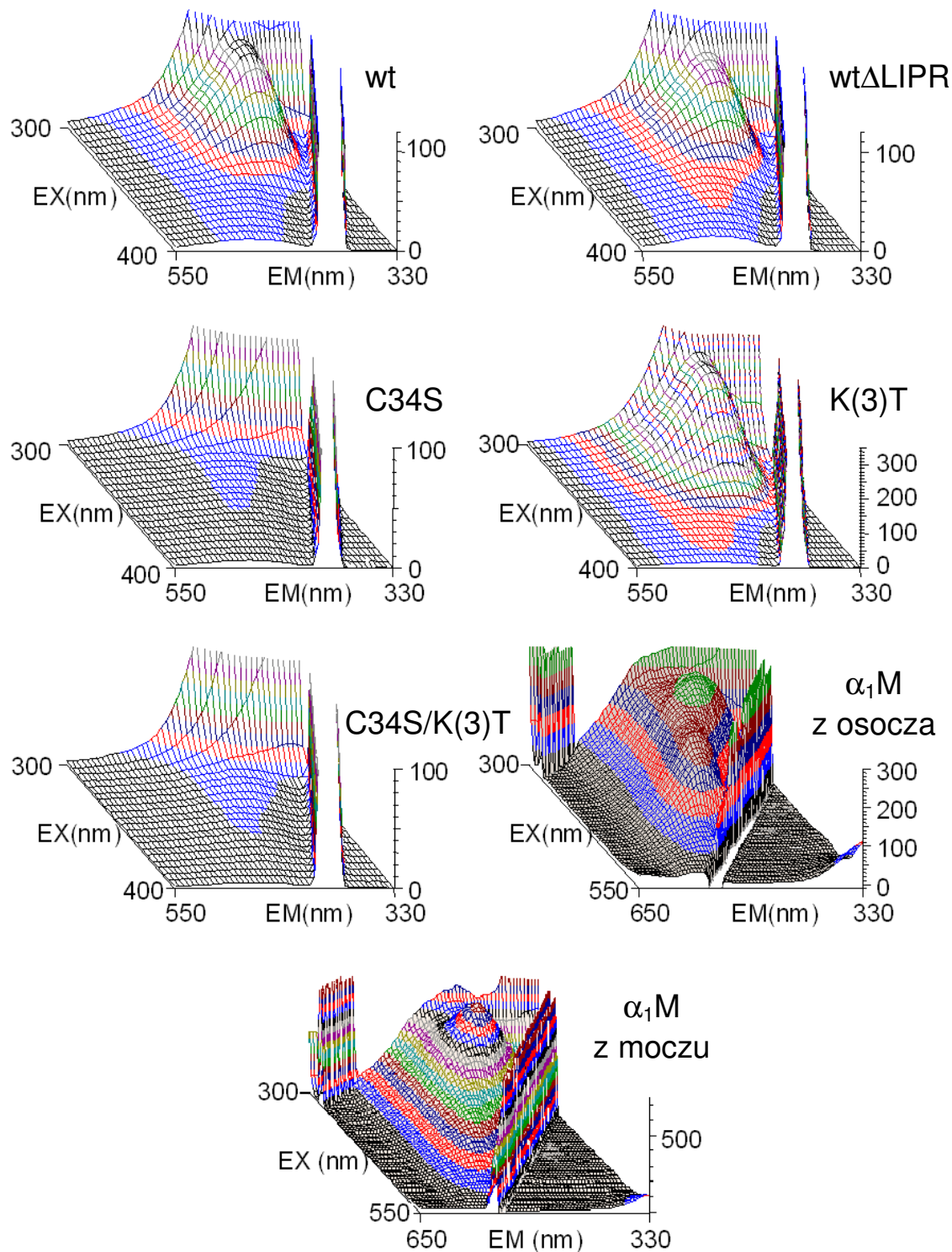
Rysunek 6.1. Otrzymywanie α_1 -mikroglobuliny. Panel lewy: elektroforeza w 12% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących i redukujących, przedstawiająca kolejne etapy oczyszczania. Ścieżka 1: lizat bakteryjny przed indukcją IPTG; ścieżki 2 i 3: lizat bakteryjny po indukcji IPTG, prążki odpowiadają odpowiednio białku wt oraz wt Δ LIPR; ścieżka 4: wt- α_1 M po pierwszej chromatografii powinowactwa do immobilizowanych jonów metalu w warunkach denaturujących; ścieżka 5: całkowicie oczyszczone białko wt- α_1 m w formie natywnej. Panel prawy: SDS-PAGE (żel 15%) oczyszczonych białek rekombinowanych. Ścieżki 1-5 odpowiadają kolejno białkom: wt- α_1 M, wt Δ LIPR- α_1 M, C34S- α_1 M, K(3)T- α_1 M oraz C34S/K(3)T- α_1 M.

6.1.2. PORÓWNANIE WŁAŚCIWOŚCI SPEKTRALNYCH NATURALNYCH ORAZ REKOMBINOWANYCH FORM LUDZKIEJ α_1 M

W widmach absorpcyjnych rekombinowanej α_1 M (rys. 6.2) wyróżnić można dwa składniki – pierwszy z nich, to pik o maksimum przy długości fali około 410 nm, drugi natomiast, to szerokie pasmo ciągnące się w zakresie 300-500 nm.



Rysunek 6.2. Widma absorpcyjne rekombinowanych form α_1 M oraz preparatów α_1 M wyizolowanych z moczu i krwi ludzkiej. **A:** linia ciągła czarna – wt- α_1 M; – – – C34S- α_1 M; linia przerywana szara – K(3)T- α_1 M; linia przerywana czarna – C34S/K(3)T- α_1 M. **Wstawka:** linia ciągła – wt- α_1 M; linia przerywana – α_1 M z moczu; – – – α_1 M z osocza krwi; **B:** linia ciągła czarna – wt- α_1 M; linia przerywana czarna – wt- Δ LIPR- α_1 M; linia przerywana szara – BSA. Widma znormalizowano do wartości $A_{280} = 1$.



Rysunek 6.3. Trójwymiarowe widma fluorescencji rekombinowanych wariantów α_1M oraz ludzkiej α_1M z osocza krwi i z moczu. Na rysunku zostały przedstawione fragmenty widm w zakresie charakterystycznym dla chromoforu. Widma zostały przeliczone w taki sposób, aby sygnał fluorescencji reszt tryptofanu wynosił 10000. Pomiary wykonano dla białek w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5.

Wt- α_1 M wykazuje obecność obydwu składników, podczas gdy w przypadku wariantu wt Δ LIPR praktycznie nie obserwuje się pików przy 410 nm. Z kolei w widmie muteiny K(3)T dominujący jest pierwszy ze składników, brak natomiast szerokiego pasma. Pozostałe muteiny (C34S- α_1 M oraz C34S/K(3)T- α_1 M) wykazują bardzo niską absorpcję w całym badanym zakresie, wyższą jednak niż BSA.

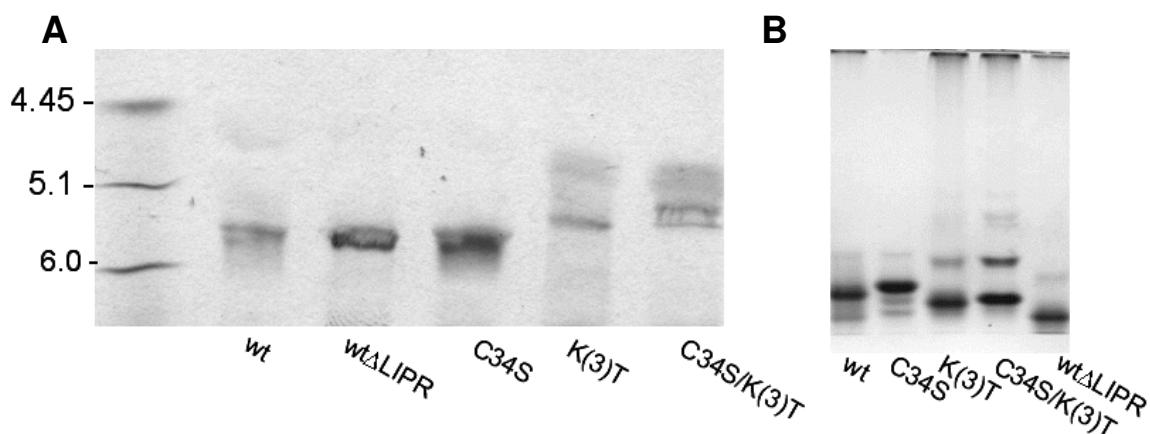
W trójwymiarowym obrazie fluorescencji białek rekombinowanych (rys. 6.3) obserwuje się tylko jeden pik, o maksimum emisji przy długości fali około 400 nm i maksimum wzbudzenia przy 320 nm. Intensywność fluorescencji wariantu wt Δ LIPR- α_1 M jest nieco niższa niż dla wt- α_1 M, natomiast w przypadku białka K(3)T sygnał jest niemal 3-krotnie wyższy. Obydwie muteiny pozbawione wolnej reszty cysteinowej, a więc C34S- oraz C34S/K(3)T- α_1 M, wykazują śladową fluorescencję w badanym zakresie. α_1 M wyizolowana z osocza oraz z moczu ludzkiego dała znacznie bardziej rozbudowane widma, w których wyróżnić można kilka pików. Największą intensywność fluorescencji obserwuje się przy długości fali promieniowania emitowanego około 450 nm i długości fali wzbudzenia około 350 nm. Wspomniany pik zdecydowanie dominuje w widmie uzyskanym dla α_1 m otrzymanej z moczu, sygnał jest w tym przypadku niemal dwukrotnie wyższy niż dla białka osocza. Wyraźnie zaznacza się również mniejsze ramie, o maksimum przy długościach fali wzbudzenia i emisji równych, odpowiednio, 365 i 480 nm. Kolejny pik znajduje się przy długościach fali równych 495 i 435 nm, odpowiednio dla promieniowania emitowanego i wzbudzającego.

6.1.3. OGNISKOWANIE IZOELEKTRYCZNE I ELEKTROFOREZA W WARUNKACH NIEDENATURUJĄCYCH

Na rysunku 6.4A przedstawiono wyniki ogniskowania izoelektrycznego oraz elektroforezy w warunkach niedenaturujących. W ogniskowaniu izoelektrycznym dominujący prążek dla białek wt-, wt Δ LIPR- i C34S- α_1 M uzyskano w pI równym 5,7, natomiast drugi prążek o bardzo niskiej intensywności zaobserwowano w okolicach pI równego 4,8. W przypadku wariantów K(3)T- α_1 M i C34S/K(3)T- α_1 M uzyskany obraz ogniskowania jest bardziej złożony. Muteina K(3)T daje dwa prążki, jeden przy wartości pI równej 5,6 oraz drugi, nieco rozmyty w okolicach pI 5,0. Muteina C34S/K(3)T- α_1 M charakteryzuje się dodatkowo obecnością trzeciego prążka w pI równym 5,4. Wartości teoretyczne pI, wyznaczone jak opisano w rozdziale 5.2.6, wynoszą odpowiednio 6,17 dla form wt- i C34S- α_1 M, 6,05 dla formy wt Δ LIPR- α_1 M oraz 5,81 dla mutein K(3)T- i C34S/K(3)T-

α_1 M.

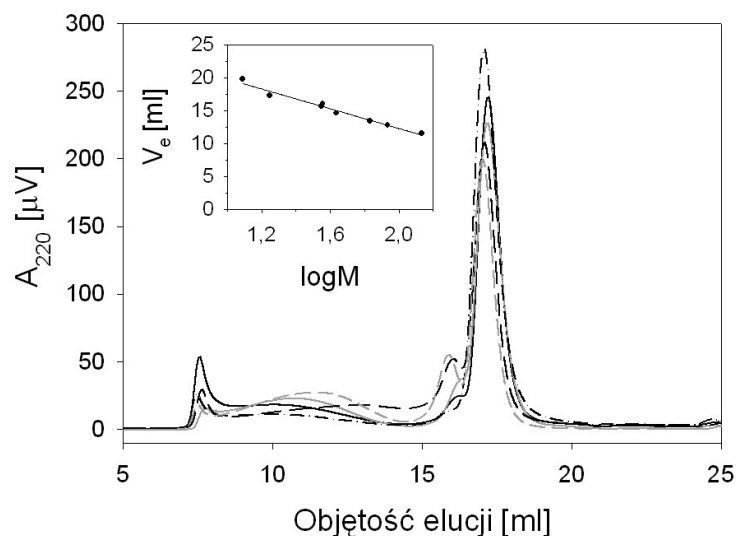
W obrazie elektroforezy w warunkach niedenaturujących (rys. 6.4B), obok głównego pasma białkowego, widoczne są pasma o znacznie niższej ruchliwości, prawdopodobnie reprezentujące formy oligomeryczne. Ich zawartość jest największa w przypadku mutein K(3)T- α_1 M i C34S/K(3)T- α_1 M, natomiast w obrazie muteiny C34S zaobserwować można jedynie śladowe ilości rozbudowanych agregatów. Formy K(3)T- α_1 M i C34S/K(3)T- α_1 M, a zwłaszcza wt Δ LIPR- α_1 M wykazują większą prędkość migracji w stosunku do pozostałych wariantów rekombinowanej α_1 M. W pierwszych dwóch przypadkach przyczyną jest zapewne bardziej ujemny ładunek wypadkowy cząsteczek białka, powstały na skutek wymiany trzech dodatnio naładowanych reszt lizynowych na obojętne reszty treoninowe, natomiast w przypadku formy wt Δ LIPR – niższa masa cząsteczkowa.



Rysunek 6.4. Ogniskowanie izoelektryczne i elektroforeza w warunkach niedenaturujących rekombinowanych wariantów α_1 M. A: IEF w zakresie pH 3-10; na żel nakładano po około 5 μ g białek w buforze 25 mM Tris-HCl, pH 8,5; B: PAGE w warunkach niedenaturujących; około 2 μ g białek w buforze 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5 rozdzielano w 10% żelu poliakryloamidowym i barwiono błękitem Coomassie.

6.1.4. SĄCZENIE MOLEKULARNE

Chromatografia żelowa (rys. 6.5) potwierdziła obecność dimerów oraz wyższych oligomerów tworzonych przez poszczególne warianty rekombinowanej α_1 M. Chromatogram uzyskany dla muteiny C34S wskazuje na obecność jedynie śladowych ilości dimeru, niewielka jest również frakcja wyższych oligomerów.



Rysunek 6.5. Sączenie molekularne poszczególnych wariantów rekombinowanej α_1 M. Linia ciągła, czarna – wt- α_1 M; linia ciągła szara – wt Δ LIPR- α_1 M; – – C34S- α_1 M; linia przerywana czarna – K(3)T- α_1 M; linia przerywana szara – C34S/K(3)T- α_1 M. **Wstawka:** kalibracja kolumny białkowymi standardami.

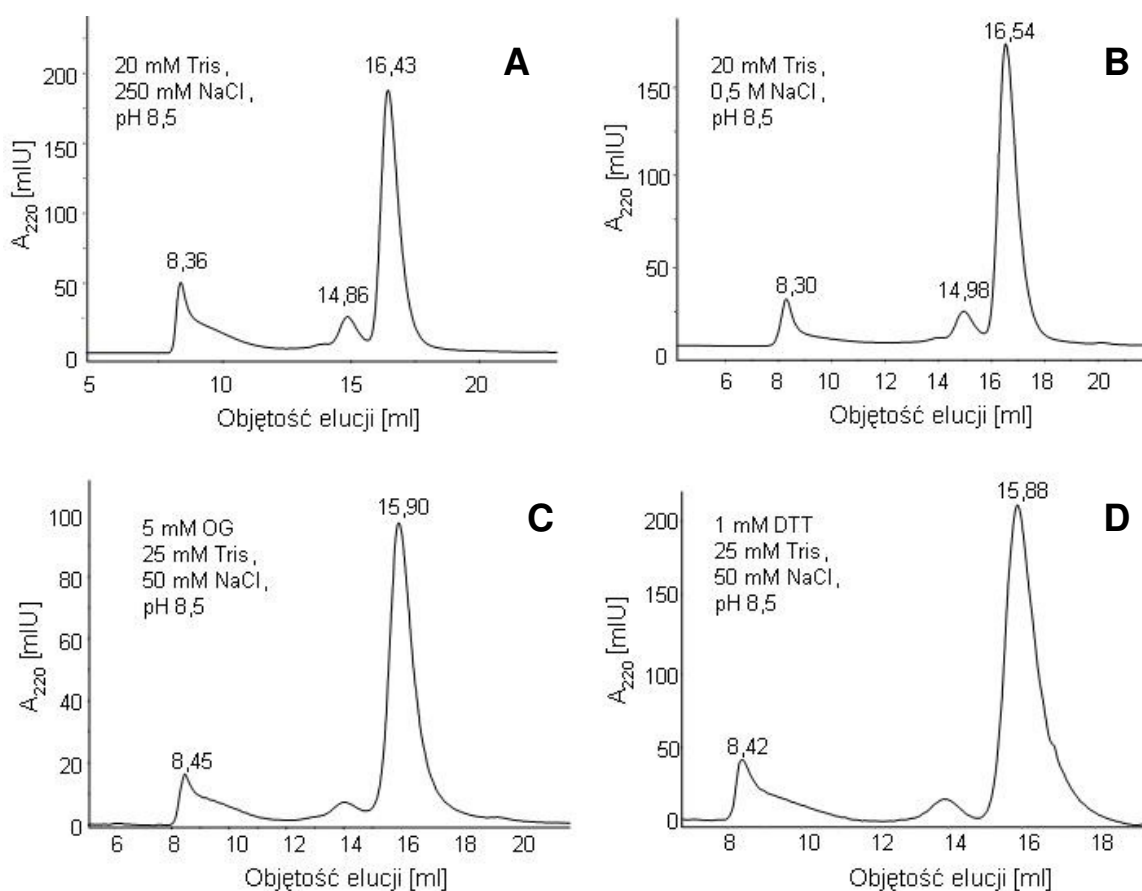
Wymiana trzech reszt lizynowych wzmacnia proces dimeryzacji. Największą zawartość oligomerów wyższego rzędu można zaobserwować w przypadku muteiny C34S/K(3)T. Zawartości poszczególnych form, wyznaczone na podstawie pól powierzchni pod odpowiednimi pikami chromatogramu, oraz masy cząsteczkowe monomerów poszczególnych wariantów α_1 M, obliczone na podstawie położenia pików, wraz z wartościami przewidywanymi teoretycznie, zebrano w tabeli 6.1.

Tabela 6.1. Wartości teoretyczne ($M_{\text{teor.}}$) i doświadczalne ($M_{\text{dośw.}}$) masy cząsteczkowej monomerów α_1 M oraz udziały procentowe form o różnym stopniu oligomeryzacji.

Białko	$M_{\text{dośw.}}$ (kDa)	$M_{\text{teor.}}$ (kDa)	% monomery	% dimery	% wyższe oligomery
wt	22,0	22,433	67,3	5,1	27,6
wt Δ LIPR	22,0	21,953	64,3	7,1	28,6
C34S	23,1	22,417	84,8	-	15,2
K(3)T	24,3	22,35	56,5	11,3	32,2
C34S/K(3)T	23,1	22,336	53,3	12,9	33,8

Masy cząsteczkowe uzyskane dla białek w formie monomerycznej zgadzają się dość dobrze z wartościami teoretycznymi – 22,433 kDa dla wt- α_1 M, 21,953 kDa dla białka

wt Δ LIPR, oraz 22,417 kDa, 22,352 kDa i 22,336 kDa odpowiednio dla mutein C34S, K(3)T oraz C34S/K(3)T. Objętość elucji dimerów α_1 M odpowiada białku o masie cząsteczkowej około 30 kDa, co może świadczyć o bardziej zwartej strukturze tej formy białka. W przypadku mutein pozbawionych reszty cysteinowej oraz muteiny K(3)T elucja monomerów i dimerów zachodziła nieco wcześniej, co sugeruje nieco większą objętość cząsteczkową tych białek.



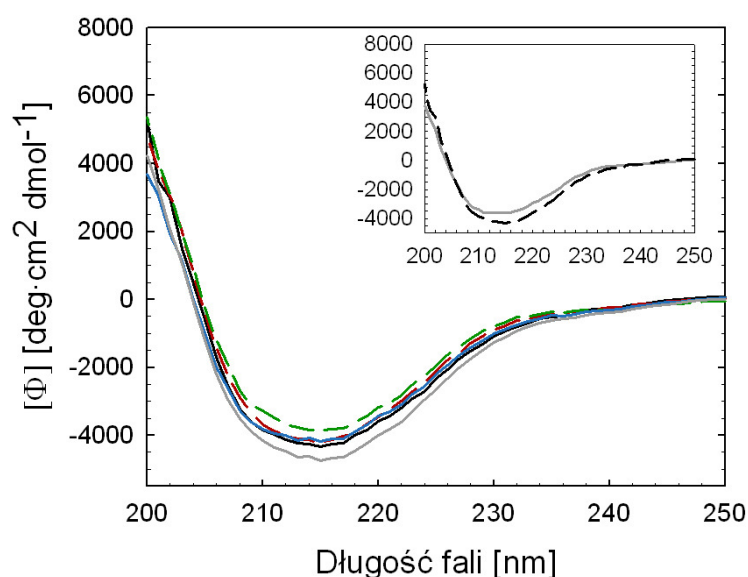
Rysunek 6.6. Wpływ wyższego stężenia NaCl, OG oraz DTT na tworzenie oligomerów przez wt- α_1 M. Próbkę białka przedializowano do odpowiednich buforów (A, B) lub inkubowano 48 h z 5 mM OG (C) albo dodano DTT do stężenia 1 mM i inkubowano 1 h (D); na kolumnę nakładano po 100 μ l próbki o stężeniu 20-40 μ M.

Dążąc do wyeliminowania form zagregowanych α_1 M badano wpływ wyższych stężeń soli, a także obecności substancji redukującej (DTT) oraz niskich stężeń łagodnego detergentu (OG) na zawartość frakcji dimerów oraz wyższych oligomerów w próbce wt- α_1 M (rys. 6.6). Dopiero 0,5 M stężenie chlorku sodu pozwoliło na zauważalne, choć

dalekie od zupełnego, zmniejszenie zawartości agregatów o wysokiej masie cząsteczkowej. Próbki α_1 M poddane działaniu DTT lub OG nie wykazały zauważalnych różnic w stosunku do białka w czystym buforze. Dlatego zdecydowano się na prowadzenie dalszych badań w pierwotnie wybranym buforze Tris (50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5), w którym białka wykazywały największą stabilność (wg badań prowadzonych w grupie prof. Bo Åkerströma).

6.1.5. POMIARY WIDM DICHROIZMU KOŁOWEGO ORAZ WYZNACZENIE ZAWARTOŚCI STRUKTUR DRUGORZĘDOWYCH W REKOMBINOWANYCH FORMACH α_1 -MIKROGLOBULINY

Widma dichroizmu kołowego poszczególnych wariantów rekombinowanej α_1 M wykazują minimum przy długości fali około 214 nm, charakterystyczne dla struktury β -arkusza (rys. 6.7). Kształt widm jest niemal identyczny dla wszystkich badanych białek i bardzo zbliżony do widma uzyskanego dla ludzkiej α_1 M wyizolowanej z moczu. Na podstawie uzyskanych krzywych wyliczono zawartości procentowe poszczególnych struktur drugorzędowych za pomocą pakietu programów CDPro [Sreerama i Woody, 2004]. Jest to dostępny w internecie zestaw programów, stosujących różne algorytmy obliczeniowe, wraz z obszerną bazą białek o znanej z badań krystalograficznych zawartości struktur drugorzędowych oraz przyporządkowanych im widm dichroizmu kołowego. W zależności od zakresu pomiarowego, warunków pomiaru (białka natywne bądź zdenaturowane), typu białek (rozpuszczalne, błonowe) oraz sposobu zdefiniowania struktur drugorzędowych, stworzonych jest kilka baz danych. Dobór bazy najbardziej odpowiedniej dla badanego białka sugerowany jest automatycznie przez program konstruuający plik danych wejściowych. Dodatkowo w pakiecie dostępny jest program CLUSTER, który na podstawie kształtu widma generuje bazę białek o zbliżonej do badanego strukturze trzeciorzędowej (ang. *tertiary class specific protein database*) [Sreerama i inni, 2001]. W tabeli 6.2 przedstawiono wyniki stanowiące średnią z wartości wyliczonych programami CDSStr oraz Continll. Ze względu na lepsze dopasowanie wybrano wyniki uzyskane z zastosowaniem bazy nr 4 (baza 43 białek rozpuszczalnych w wodzie). Rysunek 6.8 przedstawia przykładowe widmo CD (wt- α_1 M) wraz z krzywymi dopasowanymi przez programy Continll i CDSStr z zastosowaniem bazy nr 4 oraz bazy CLUSTER (baza utworzona przez program CLUSTER). Badane białka zostały zaliczone do klasy $\beta\beta$.



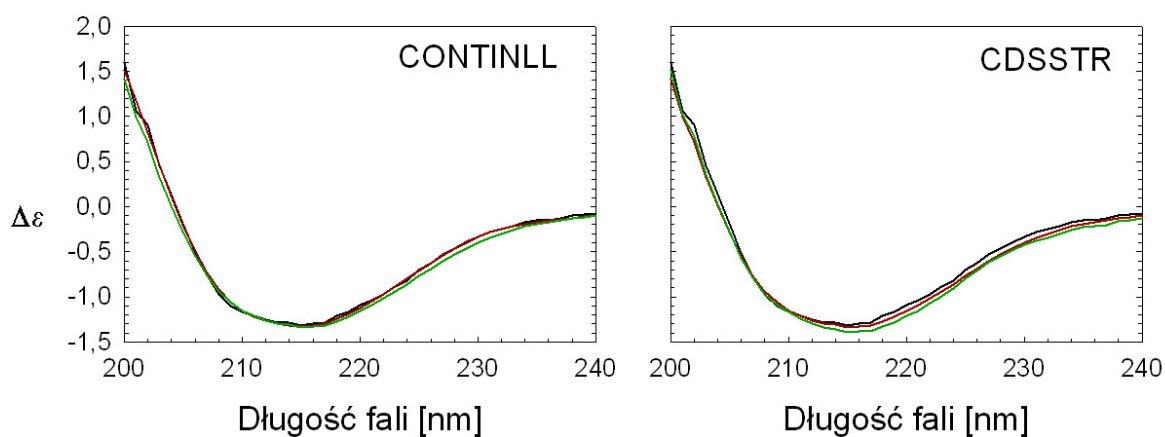
Rysunek 6.7. Widma dichroizmu kołowego wariantów rekombinowanej α_1M oraz białka ludzkiego wyizolowanego z moczu. Pomiary wykonano w temperaturze pokojowej, dla próbek białka o stężeniu $10 \mu M$ w buforze o składzie 50 mM NaCl , 25 mM Tris-HCl , $\text{pH } 8,5$. Linia ciągła czarna – wt- α_1M ; linia przerywana czerwona – wt Δ LIPR- α_1M ; linia przerywana zielona – C34S- α_1M ; linia ciągła niebieska – K(3)T- α_1M ; linia ciągła szara – C34S/K(3)T- α_1M . Wstawka: linia przerywana czarna – wt- α_1M ; linia ciągła szara – ludzka α_1M z moczu.

Tabela 6.2. Procentowe zawartości struktur drugorzędowych w rekombinowanych i ludzkiej α_1M .

Białko	Regularna α -helisa	Zaburzona α -helisa	Regularny β -arkusz	Zaburzony β -arkusz	β -skręt	Struktura nieuporządkowana
wt	$1,2 \pm 1,8$	$5,1 \pm 0,4$	$28,0 \pm 1,7$	$12,3 \pm 0,4$	$21,4 \pm 0,1$	$32,0 \pm 0,2$
wt Δ LIPR	$1,0 \pm 1,4$	$4,7 \pm 0,4$	$29,3 \pm 1,8$	$12,1 \pm 0,8$	$20,9 \pm 0,7$	$31,5 \pm 0,8$
C34S	$0,5 \pm 1,8$	$4,9 \pm 0,1$	$28,3 \pm 1,0$	$12,4 \pm 0,7$	$21,5 \pm 0,3$	$31,7 \pm 0,2$
K(3)T	$0,8 \pm 1,6$	$4,9 \pm 0,5$	$27,7 \pm 1,6$	$12,3 \pm 0,7$	$21,6 \pm 0,6$	$32,3 \pm 0,2$
K(3)T/C34S	$1,3 \pm 1,1$	$5,0 \pm 0,6$	$27,2 \pm 1,4$	$12,4 \pm 0,4$	$21,6 \pm 0,6$	$32,0 \pm 0,6$
α_1M osocza	$1,2 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,1$	$28,3 \pm 1,1$	$12,6 \pm 0,9$	$21,4 \pm 0,1$	$32,2 \pm 0,2$
α_1M moczu	$0,5 \pm 1,8$	$5,1 \pm 0,1$	$28,0 \pm 1,1$	$12,1 \pm 0,8$	$21,3 \pm 0,2$	$32,3 \pm 0,1$

Dane przedstawione w tabeli to średnie wraz z odchyleniem standardowym wartości uzyskanych przy użyciu programów Continll i CDSstr oraz bazy 43 białek rozpuszczalnych w wodzie, dostępnych w pakiecie CDPro.

Wyniki uzyskane dla poszczególnych białek są bardzo zbliżone, wartości pokrywają się w granicach błędów. Obliczona zawartość α -helisy regularnej jest bardzo niska i dodatkowo obarczona wysokim błędem. Prawdopodobnie w strukturze białka występuje jedynie helisa zaburzona. Arkusz β regularny i zaburzony oraz struktura β -skreću obejmują łącznie powyżej 60% struktury badanych białek.

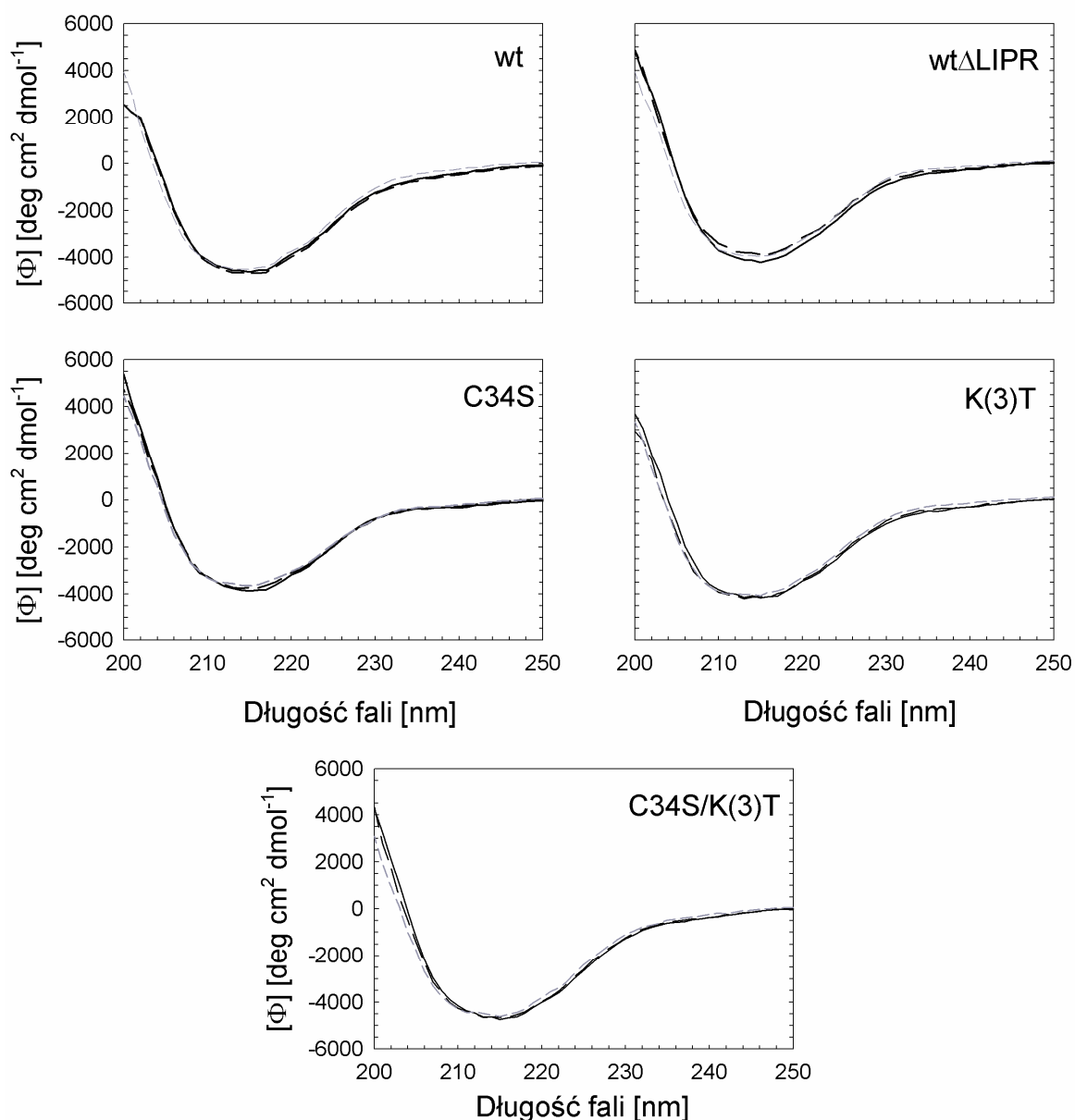


Rysunek 6.8. Porównanie krzywych dopasowanych do przykładowego widma dichroizmu kołowego wt- α_1 M za pomocą programów Continll i CDSStr z pakietu CDPro. Linia czarna – widmo zmierzone; linia czerwona – krzywa uzyskana z zastosowaniem bazy nr 4 (43 białka rozpuszczalne); linia zielona – krzywa uzyskana z zastosowaniem bazy wygenerowanej przez program CLUSTER.

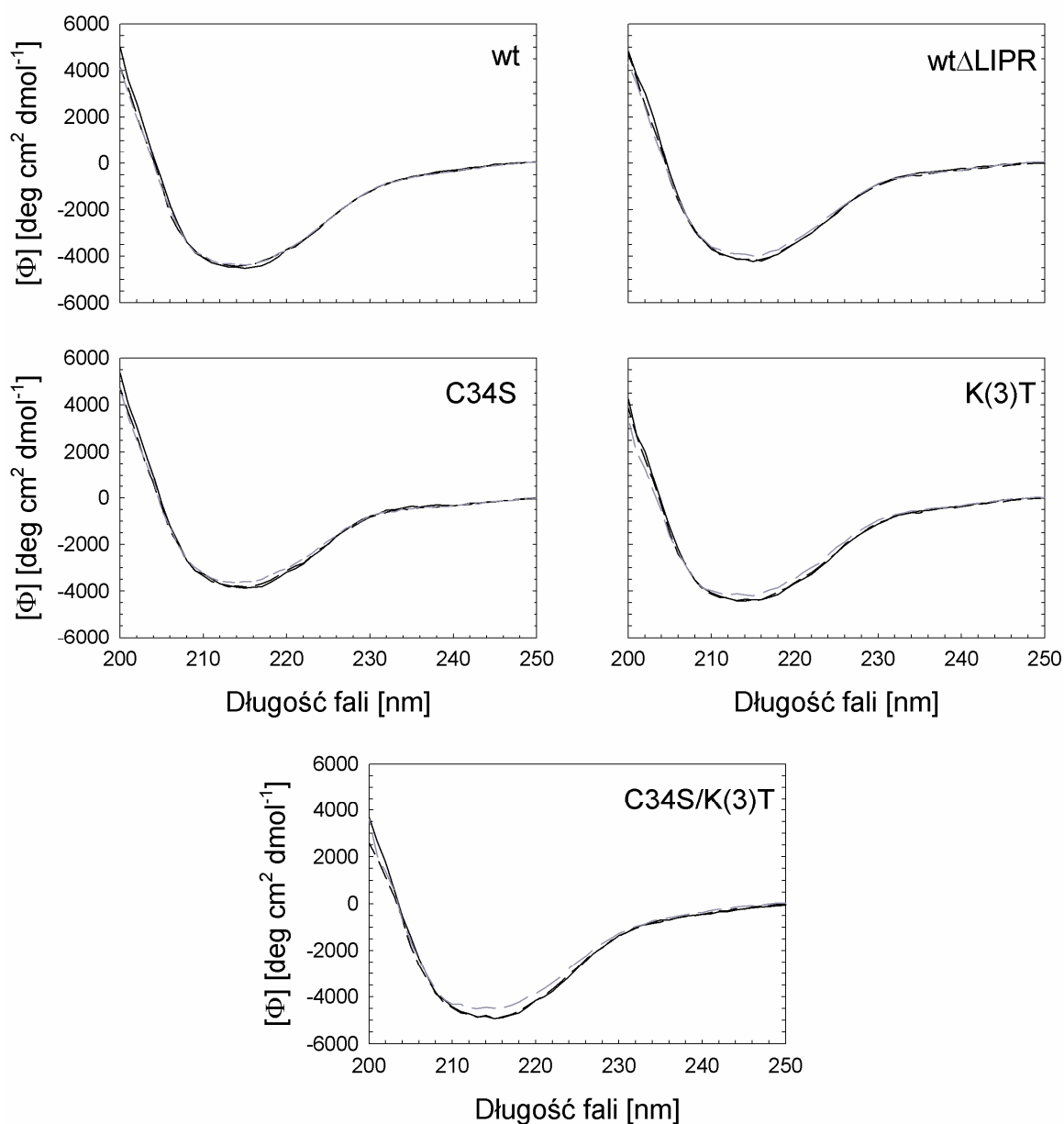
6.2. KOMPLEKSY α_1 -MIKROGLOBULINY Z HEMEM ORAZ PROTOPORFIRYNĄ IX

6.2.1. WIDMA DICHROIZMU KOŁOWEGO KOMPLEKSÓW α_1 -MIKROGLOBULINY Z LIGANDAMI

Związanie liganda może prowadzić do przyjęcia przez białko odmiennej konformacji, prowadząc czasem do rearanzacji fragmentów łańcucha polipeptydowego i zmiany zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych. W celu określenia ewentualnych przemian, zachodzących w strukturze badanych białek pod wpływem wiązania ligandów, zmierzono widma dichroizmu kołowego każdego z wariantów α_1 M po dodaniu równomolowej oraz 3-krotnie przewyższającej stężenie białka ilości hemu lub PPIX. Uzyskane widma dichroizmu kołowego przedstawiono na rysunkach 6.9 i 6.10. Można zaobserwować niemal idealną zgodność krzywych odpowiadających mieszaninom białko-ligand w stosunkach molowych 1:1 oraz 1:3 z widmem nieskompleksowanego białka, zarówno w przypadku hemu jak i PPIX. Pozwala to wnioskować, że w następstwie związania liganda nie zachodzą zmiany w strukturze drugorzędowej α_1 M. Niewielkie odchylenia zauważyć można jedynie w przypadku krzywych uzyskanych dla kompleksów 1:1 i 1:3 białka wt Δ LIPR z hemem oraz kompleksu 1:3 białka C34S/K(3)T z PPIX. Przyczyną może być błąd pomiarowy (niewielka zmiana stężenia białka, spowodowana częściowym jego wytrąceniem na skutek przedłużonego pomiaru w temperaturze pokojowej) lub rzeczywista zmiana konformacji łańcucha polipeptydowego, wywołana związaniem liganda. Za pierwszą ewentualnością przemawia fakt zaobserwowania zmian w kształcie widma jedynie dla tych konkretnych kompleksów (z hemem w przypadku wt Δ LIPR i z PPIX w przypadku muteiny cysteinowo-lizynowej), przy równoczesnym braku jakichkolwiek zauważalnych zmian w widmach kompleksów z odmiennym ligandem oraz pozostałych badanych białek.



Rysunek 6.9. Widma CD kompleksów α_1M z hemem. Pomiar wykonano w buforze o składzie 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, w temperaturze pokojowej. Stężenie białka wynosiło 10 μ M. W przypadku kompleksów do białka dodawano stężony rozwór hemu i próbkę inkubowano 0,5 h przed pomiarem w temperaturze pokojowej. Linia ciągła czarna – α_1M wolna; linia przerywana czarna – mieszanina α_1M i hemu w stosunku molowym 1:1; linia przerywana szara – α_1M zmieszana z hemem w stosunku molowym 1:3.

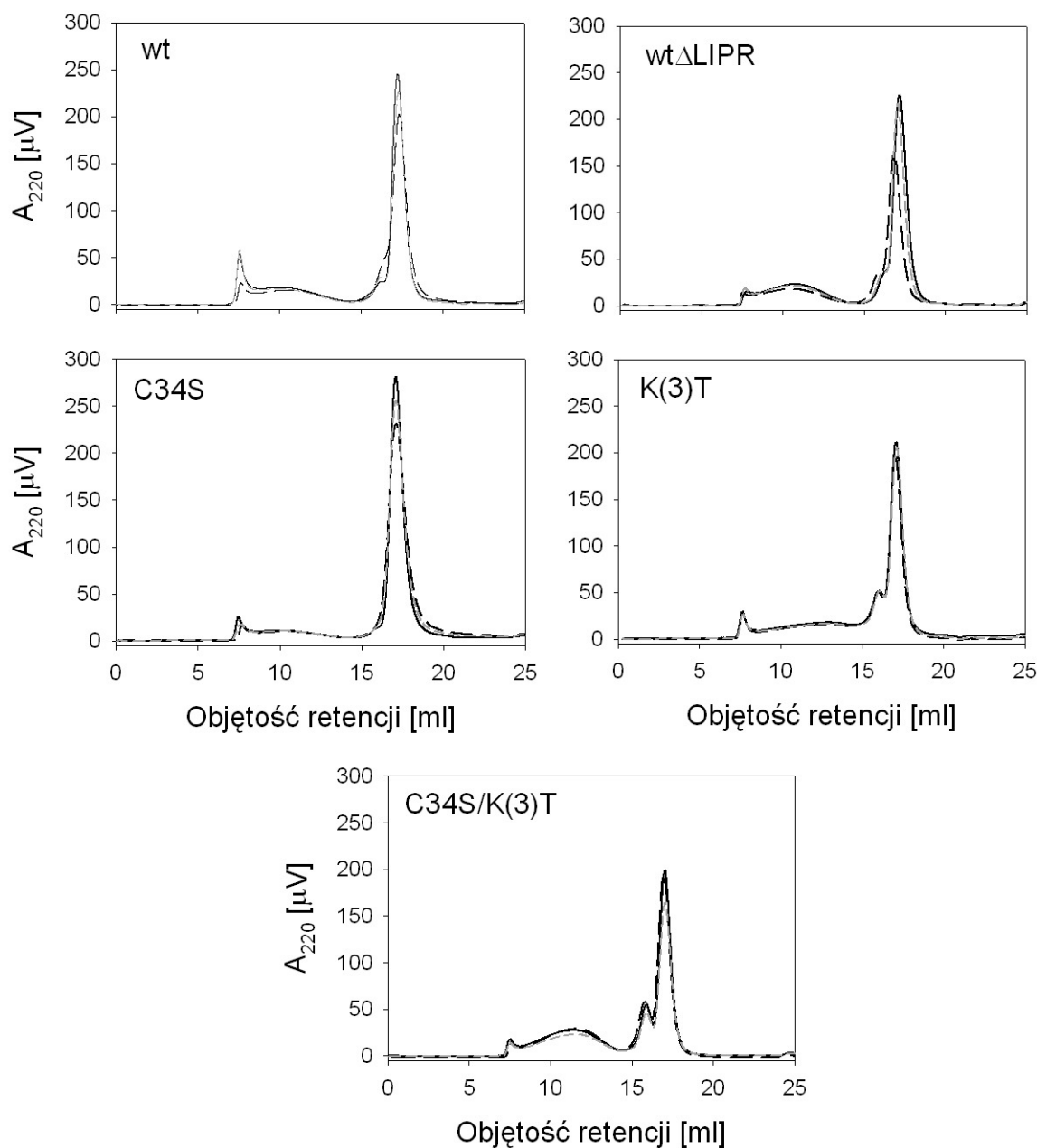


Rysunek 6.10. Widma CD kompleksów $\alpha_1\text{M}$ z PPIX. Warunki pomiaru identyczne jak w eksperymentach zilustrowanych na rysunku 6.9 Linia ciągła czarna – $\alpha_1\text{M}$; linia przerywana czarna – $\alpha_1\text{M}$ i PPIX zmieszane w stosunku molowym 1:1; linia przerywana szara – $\alpha_1\text{M}$ zmieszana z PPIX w stosunku molowym 1:3.

6.2.2. SĄCZENIE MOLEKULARNE KOMPLESÓW α_1 -MIKROGLOBULINY Z HEMEM I PROTOPORFIRYNĄ IX

Chromatografię żelową przeprowadzono, aby ocenić czy wiązanie liganda powoduje naruszenie równowagi pomiędzy formami białka o różnym stopniu oligomeryzacji. Chromatogramy uzyskane dla poszczególnych wariantów rekombinowanej $\alpha_1\text{M}$ w

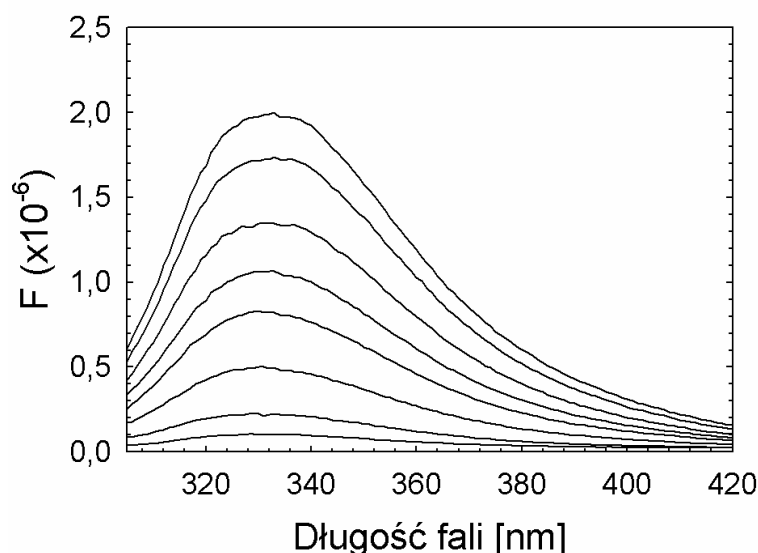
obecności równomolowych ilości hemu oraz PPIX przedstawiono na rysunku 6.11. Profil elucji dla każdego z białek pozostał praktycznie niezmienny po związaniu zarówno hemu jak i PPIX. Zawartość wyższych oligomerów oraz dimerów α_1M pozostała równie wysoka, jak w przypadku form nieskompleksowanych.



Rysunek 6.11. Sączenie molekularne α_1M w kompleksie z hemem lub PPIX. Białka o stężeniu 25 μ M w buforze o składzie 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, nieskompleksowane bądź po 1 h inkubacji w temperaturze pokojowej z hemem lub PPIX w stosunku molowym 1:1, rozdzielano na kolumnie Superdex 200. α_1M – czarna linia ciągła, α_1M -hem – czarna linia przerywana; α_1M -PPIX – szara linia przerywana.

6.2.3. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE HEMEM

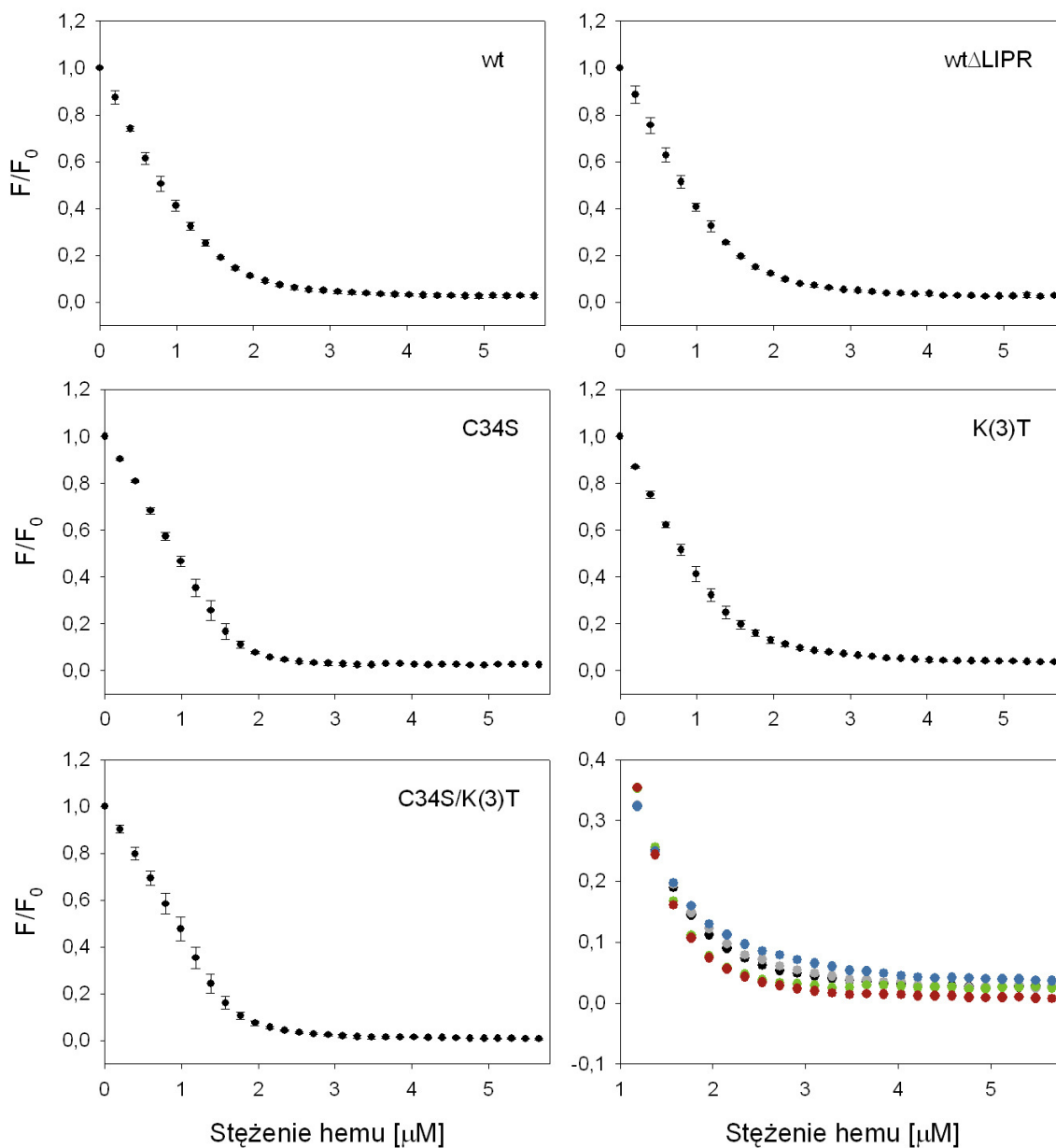
W celu określenia liczby miejsc wiążących oraz wyznaczenia termodynamicznych stałych wiązania hemu przez poszczególne warianty α_1M wykonano serię miareczkowań spektrofлуometrycznych, wykorzystując wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych białka pod wpływem wiązania liganda (rys. 6.12).



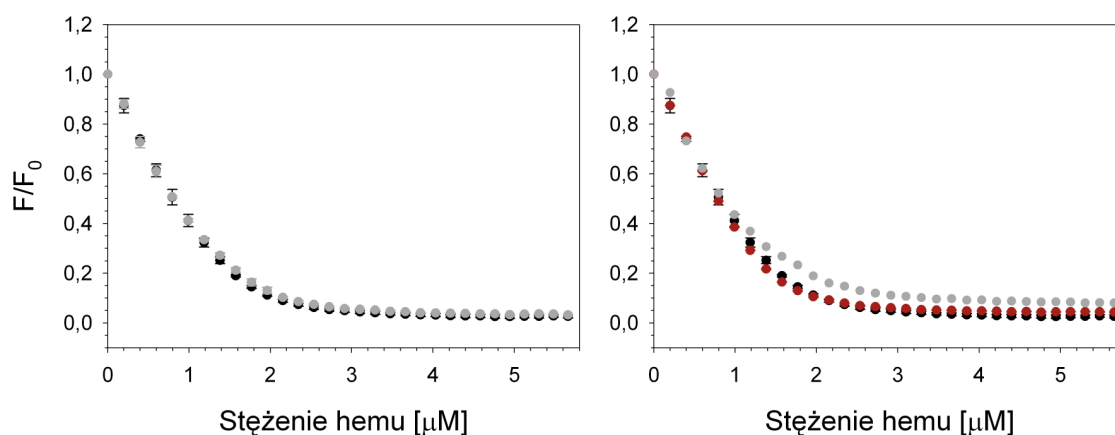
Rysunek 6.12. Wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych α_1M pod wpływem wiązania hemu.

Próbkę białka o stężeniu 1 μM w buforze o składzie 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, wzbudzano światłem o długości fali 297 nm. Pomiar wykonano w temperaturze 37 °C.

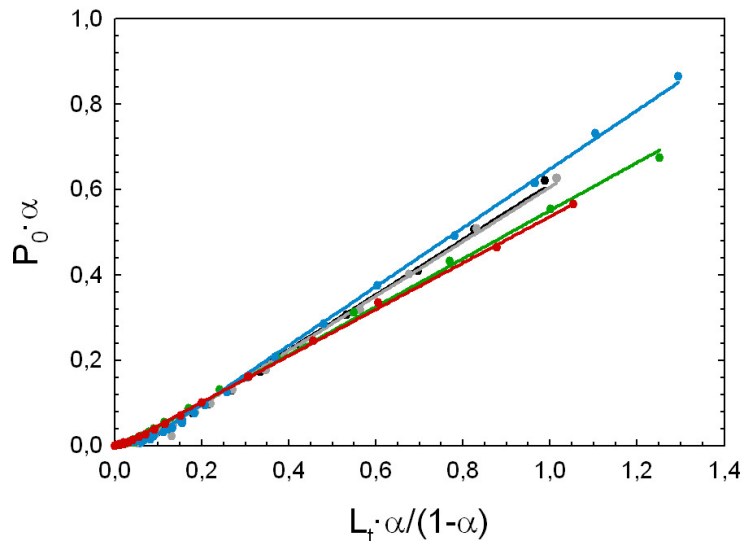
Krzywe miareczkowania hemem (przedstawione w jednostkach fluorescencji względnej, F/F_0) uzyskane dla poszczególnych mutein w buforze Tris pH 8,5 w temperaturze 37 °C oraz krzywe uzyskane dla białka wt- α_1M w różnych temperaturach i wartościach pH, zamieszczono odpowiednio na rysunkach 6.13 i 6.14. Poszczególne punkty prezentują wartość uśrednioną z kilku pomiarów wraz z odchyleniem standardowym. Drobne, ale zauważalne są różnice w kształcie krzywych miareczkowania mutein pozbawionych reszty Cys34, w stosunku do pozostałych wariantów. W każdym jednak przypadku można stwierdzić, że stechiometria wiązania jest bliska 1:2 (α_1M :hem). Krzywe miareczkowania formy wt- α_1M w temperaturze 25 i 37 °C są zgodne. Nie obserwuje się zmian w przebiegu krzywej miareczkowania przy zmianie pH z równego 8,5 na 8,0, jednak dalsze obniżenie pH powoduje spadek siły wiązania (patrz tabela 6.4).



Rysunek 6.13. Miareczkowanie α_1 M hemem. Próbki białka o stężeniu $1 \mu\text{M}$ w buforze o składzie 50 mM NaCl , 25 mM Tris-HCl , $\text{pH } 8,5$ miareczkowano $100 \mu\text{M}$ roztworem hemu w tym samym buforze, w temperaturze $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Każdy punkt jest wartością średnią z kilku niezależnych pomiarów wraz z odchyleniem standardowym. Ostatni panel prezentuje różnice w przebiegu krzywych uzyskanych dla poszczególnych białek: (●) wt; (●) wt Δ LIPR; (●) C34S; (●) K(3)T; (●) C34S/K(3)T.



Rysunek 6.14. Miareczkowanie wt- α_1 M hemem. Panel A: białko o stężeniu 1 μM w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5 miareczkowane 100 μM roztworem hemem w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ (●) lub 25 $^{\circ}\text{C}$ (●). **Panel B:** analogiczne pomiary prowadzone w temperaturze 37 $^{\circ}\text{C}$ w buforze o identycznym składzie i pH równym 8,5 (●), 8,0 (●) lub 7,5 (●). Każdy punkt przedstawia wartość średnią z trzech pomiarów wraz z odchyleniem standardowym (za wyjątkiem krzywej dla pH 7,5 – pojedynczy pomiar).



Rysunek 6.15. Wyznaczanie obserwowanych stałych dysocjacji kompleksów α_1 M z hemem. Punkty przedstawiają reprezentatywne dane doświadczalne uzyskane dla każdej z form α_1 M: (●) wt; (●) wt Δ LIPR; (●) C34S; (●) K(3)T; (●) C34S/K(3)T, linie ciągłe – dopasowane funkcje liniowe.

Na podstawie uzyskanych krzywych miareczkowania próbowano wyznaczyć wartości stałych wiązania oraz ustalić mechanizm przyłączania cząsteczek liganda do białka za

pomocą programu DynaFit [Kuzmič, 1996]. Niestety próby te zakończyły się niepowodzeniem – uzyskiwane wartości dla poszczególnych serii pomiarowych były rozbieżne i obarczone bardzo wysokimi błędami. Ze względu na trudności w wyznaczeniu wartości stałych wiązania oraz zaproponowaniu modelu wiązania liganda za pomocą tego programu, dane z miareczkowań posłużyły do wyznaczenia „obserwowanych” stałych dysocjacji (K'_d) oraz stechiometrii wiązania (liczby miejsc wiążących, n) metodą przedstawioną w pracy [Cogan i inni, 1976] i opisaną w rozdziale Metody, rozdział 5.2.8. W metodzie tej zakłada się identyczność wszystkich miejsc wiążących białka. Dla każdego z badanych białek wykreślono zależność iloczynu $P_0 \cdot \alpha$ od wyrażenia $L_t \cdot \alpha / (1 - \alpha)$, przy czym każdorazowo miała ona charakter liniowy (rys. 6.15). Uzyskane wartości współczynnika korelacji R^2 , informującego o dobroci dopasowania prostej do danych doświadczalnych, były zawsze wyższe niż 0,99. Liniowy charakter wspomnianej zależności sugeruje trafność założenia o identyczności miejsc wiążących.

Tabela 6.3. Wartości obserwowanych stałych dysocjacji oraz liczby miejsc wiążących w kompleksach α_1M z hemem.

Białko	K'_d (10^{-8} M)*	n *
wt	$6,05 \pm 0,50$	$1,49 \pm 0,09$
wt Δ LIPR	$6,7 \pm 1,0$	$1,50 \pm 0,12$
C34S	$1,50 \pm 0,56$	$1,83 \pm 0,09$
K(3)T	$7,73 \pm 0,72$	$1,45 \pm 0,07$
C34S/K(3)T	$0,58 \pm 0,36$	$1,83 \pm 0,31$

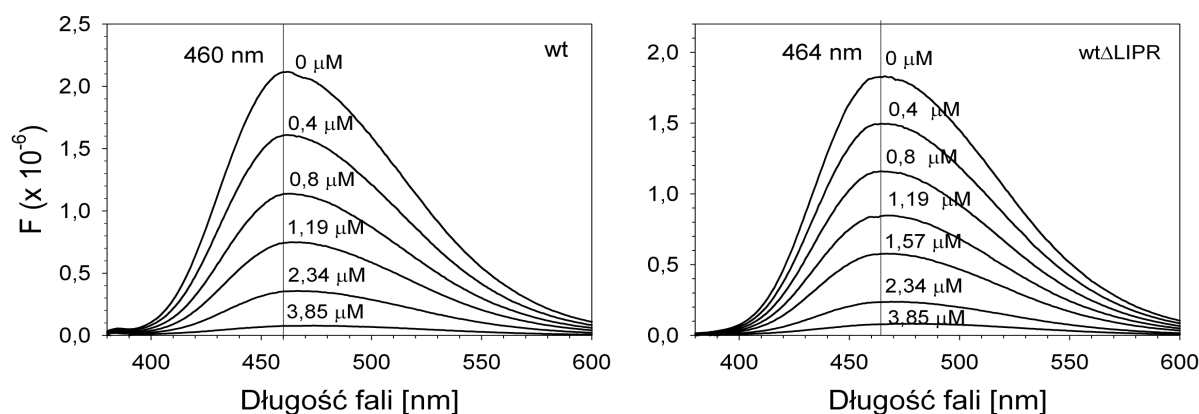
*Prezentowane wartości dotyczą pomiarów wykonanych w buforze 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, w temperaturze 37 °C.

Tabela 6.4. Porównanie obserwowanych stałych dysocjacji oraz liczby wiązanych cząsteczek liganda dla kompleksów wt- α_1M z hemem w różnych pH i temperaturach.

Warunki*	K'_d (10^{-8} M)	n
pH 8,5; t = 37 °C	$6,05 \pm 0,50$	$1,49 \pm 0,09$
pH 8,0; t = 37 °C	$5,30 \pm 0,14$	$1,42 \pm 0,01$
pH 7,5; t = 37 °C	13,70	1,37
pH 8,5; t = 25 °C	$5,65 \pm 0,49$	$1,47 \pm 0,06$

*Wszystkie pomiary wykonano w buforze o identycznym składzie (25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl)

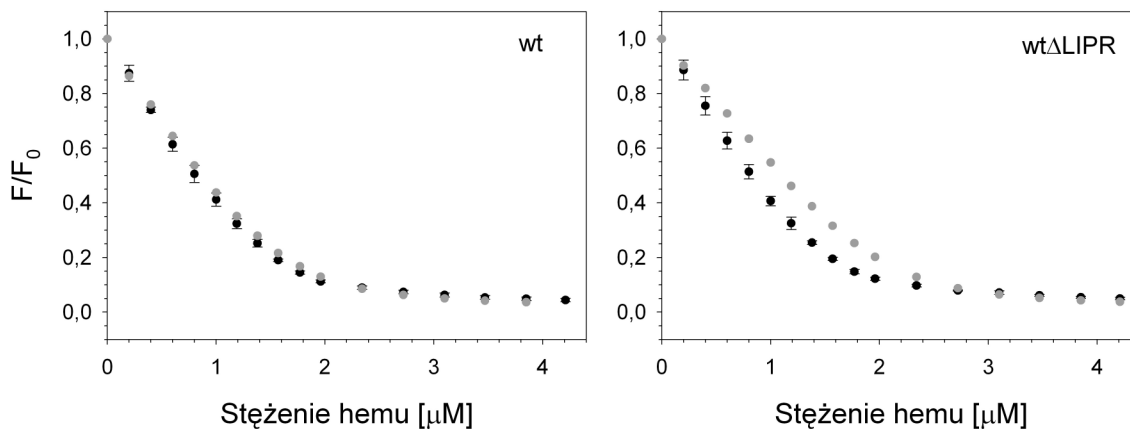
Wartości parametrów K'_d oraz n zamieszczono w tabelach 6.3 (dla pomiarów przeprowadzonych w temperaturze 37 °C i w pH 8,5, dla wszystkich rekombinowanych form α_1M) oraz 6.4 (dla pomiarów wykonanych jedynie dla formy wt- α_1M , w różnych warunkach temperatury i pH). Obserwowane stałe dysocjacji pokrywają się w granicach błędu dla form wt i wt Δ LIPR. Muteina K(3)T wykazuje nieco niższe powinowactwo do hemu niż forma dzika, natomiast brak reszty cysteiny w pozycji 34 łańcucha polipeptydowego zwiększa siłę wiązania hemu przez α_1M . Wzrasta także nieco wartość parametru n . Obniżenie temperatury pomiaru nie spowodowało zmian w sile wiązania, podobnie jak zmiana pH z 8,5 na 8,0. Wyraźne zwiększenie wartości stałej dysocjacji zachodzi jednak po obniżeniu pH do wartości 7,5.



Rysunek 6.16. Zmiany widm fluorescencji znacznika AEDANS związanego z białkami wt- i wt Δ LIPR- α_1M . Białko wt- lub wt Δ LIPR- α_1M o stężeniu 1 μM , wyznakowane 1,5-I-AEDANS, miareczkowano 100 μM roztworem hemu. Próbkę wzbudzano światłem o długości fali 340 nm. Pomiaru prowadzono w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5 w temperaturze 37 °C.

Wiązanie hemu śledzono również poprzez obserwację zmian intensywności fluorescencji znacznika AEDANS związanego kowalencyjnie z resztą Cys34 białek wt i wt Δ LIPR. Ze wzrostem stężenia hemu obserwowano wygaszanie fluorescencji znacznika (rys. 6.16), podobnie jak w przypadku pomiarów fluorescencji reszt tryptofanowych białka. Maksimum emisji reszty AEDANS związanej z wt- oraz wt Δ LIPR- α_1M w nieobecności hemu leży odpowiednio przy długości fali 460 nm i 464 nm, co świadczy o hydrofobowym otoczeniu znacznika [Hudson i Weber, 1973; Merrill i inni, 1990]. Przy wyższych stężeniach liganda (stosunek stężeń α_1M :hem bliski 1:2,5) obserwuje się

przesunięcie maksimum emisji do wartości długości fali równej odpowiednio ok. 475 i 480 nm.

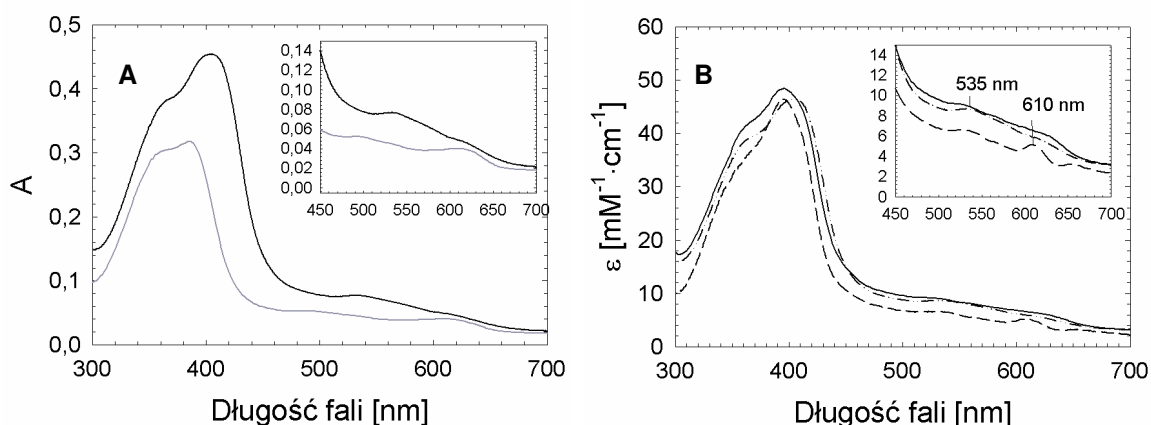


Rysunek 6.17. Krzywe miareczkowania wyznakowanych 1,5-I-AEDANS wt- i wt Δ LIPR- α_1 M hemem, wyznaczone poprzez pomiary fluorescencji znacznika. Wt- lub wt Δ LIPR- α_1 M o stężeniu 1 μ M wyznakowane 1,5-I-AEDANS (\bullet), miareczkowano 100 μ M roztworem hemu. Próbkę wzbudzano przy długości fali 340 nm, emisję obserwowano przy długości fali 460 nm (wt) lub 464 nm (wt Δ LIPR). Pomiary prowadzono w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5, w temperaturze 37 °C. Dla porównania zamieszczono krzywe uzyskane dla białek nieznanowanych (\bullet), poprzez pomiar emisji reszt tryptofanowych (porównaj rys. 6.13).

Na rysunku 6.17 przedstawiono zestawienie krzywych miareczkowania hemem wt- i wt Δ LIPR- α_1 M, uzyskanych z pomiarów zmian intensywności fluorescencji reszt tryptofanowych niewyznakowanych białek oraz znacznika AEDANS w białkach wyznakowanych. W przypadku formy wt obydwie krzywe pokrywają się, co (obok pomiarów widm CD) potwierdza zachowanie niezmięnionej struktury łańcucha polipeptydowego po przyłączeniu fluoroforu. Krzywa miareczkowania wyznakowanej formy wt Δ LIPR odbiega znacząco od tej uzyskanej dla białka niewyznakowanego. Prawdopodobnie dochodzi do zaburzenia struktury α_1 M przez znacznik, co zaobserwowano również w pomiarach dichroizmu kołowego (rozdz. 6.2.6, str. 75). Z analizy krzywych miareczkowania znakowanych białek uzyskano następujące wartości obserwowanej stałej dysocjacji oraz liczby miejsc wiążących: $K'_d = 6,8 \cdot 10^{-8}$ M i $n = 1,58$, w przypadku białka wt oraz $K'_d = 5,7 \cdot 10^{-8}$ M i $n = 2,10$, w przypadku białka wt Δ LIPR.

Na skutek wiązania hemu przez α_1 M zmienia się widmo absorpcyjne liganda (rys. 6.18A). Zarówno niezwiązany hem jak i jego kompleks z α_1 M wykazują obecność dwóch

maksimów w regionie pasma Soreta, jednak po związaniu z białkiem zmienia się intensywność obu pasm oraz ich położenie. Hem w buforze wykazuje absorpcję o szerokim paśmie z dwoma maksimami o zbliżonej intensywności, położonymi przy długościach fali 360 i 385 nm. Dodanie liganda do α_1M w stosunku stechiometrycznym 1:1 wywołuje efekt batochromowy, przesuając obydwie pasma odpowiednio do wartości λ_{max} równej 365 i 404 nm, oraz hiperchromowy, z dominacją maksimum niższej energetycznego. Zmiany zachodzą również w obrębie pasm Q – dla hemu w roztworze położone są one przy długościach fali 498 oraz 615 nm. Związaniu z białkiem towarzyszy przesunięcie pierwszego pasma do wartości λ_{max} równej około 530 nm. Zwiększając stosunek hem:białko obserwuje się ponowne przesunięcie maksimum pasma Soreta do długości fali równej około 396 nm (rys. 6.18B). Położenia poszczególnych maksimów absorpcji dla hemu w roztworze oraz jego kompleksu z α_1M zestawiono w tabeli 6.5.



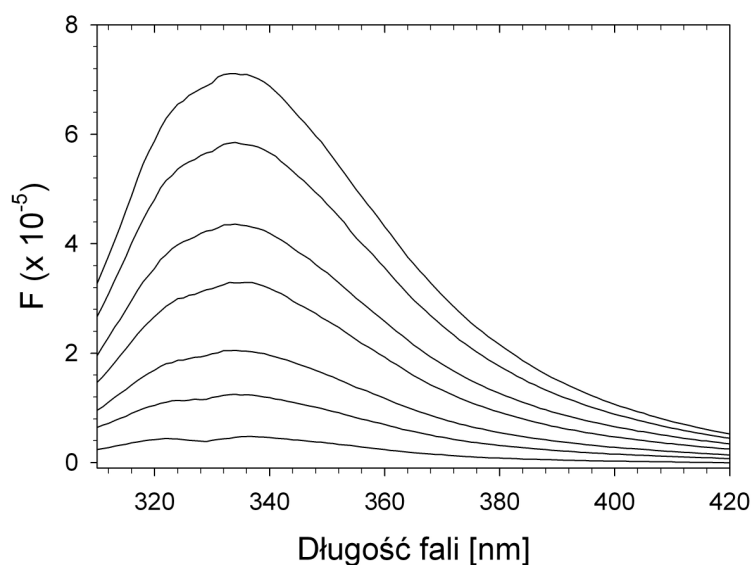
Rysunek 6.18. Porównanie widm absorpcyjnych hemu i kompleksów α_1M z hemem. **A:** Zmiany w kształcie widma absorpcyjnego hemu związanego z białkiem (linia czarna) w porównaniu do niezwiązanego liganda w buforze (linia szara). Wstawka przedstawia zbliżenie fragmentu widma w obszarze pasm Q. Hem o stężeniu 10 μM zmieszano z równomolową ilością wt- α_1M (linia ciągła) lub pozostawiono bez zmian i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min. **B:** Wt- α_1M zmieszano z hemem w stosunku stechiometrycznym 1:1 (linia kreska-kropki) lub 1:3 (linia ciągła) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 min; wyznakowane 1,5-I-AEDANS białko wt Δ LIPR- α_1M zmiareczkowane hemem, końcowy stosunek stężeń α_1M :hem równy ok. 1:4,5 (linia przerywana). Widma przedstawiono w jednostkach molowego współczynnika absorpcji hemu.

Tabela 6.5. Położenia pasm absorpcyjnych hemu w roztworze oraz w kompleksie z α_1M .

	Region pasma Soreta	Pasma Q
hem w buforze	360 nm	495 nm
	385 nm	615 nm
kompleks hem- α_1M 1:1	365 nm	535 nm
	404 nm	615 nm
kompleks hem- α_1M 3:1	365 nm	535 nm
	396 nm	615 nm

6.2.4. MIARECZKOWANIE SPEKTROFLUORYMETRYCZNE PROTOPORFIRYNĄ IX

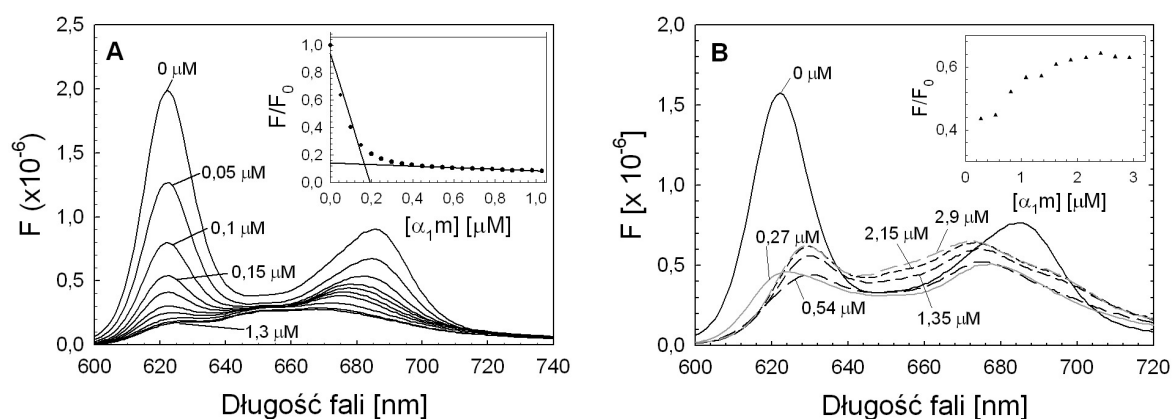
Analogicznie do wcześniejszych pomiarów z hemem badano wiązanie PPIX przez wszystkie rekombinowane formy α_1M . Również w tym przypadku wskutek tworzenia kompleksu białko-ligand obserwuje się wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych białka (rys. 6.19).



Rysunek 6.19. Wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych α_1M pod wpływem wzrastających stężeń PPIX. Pomiar wykonano dla wt- α_1M o stężeniu 1 μM w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5, w temperaturze 37 °C; fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 297 nm.

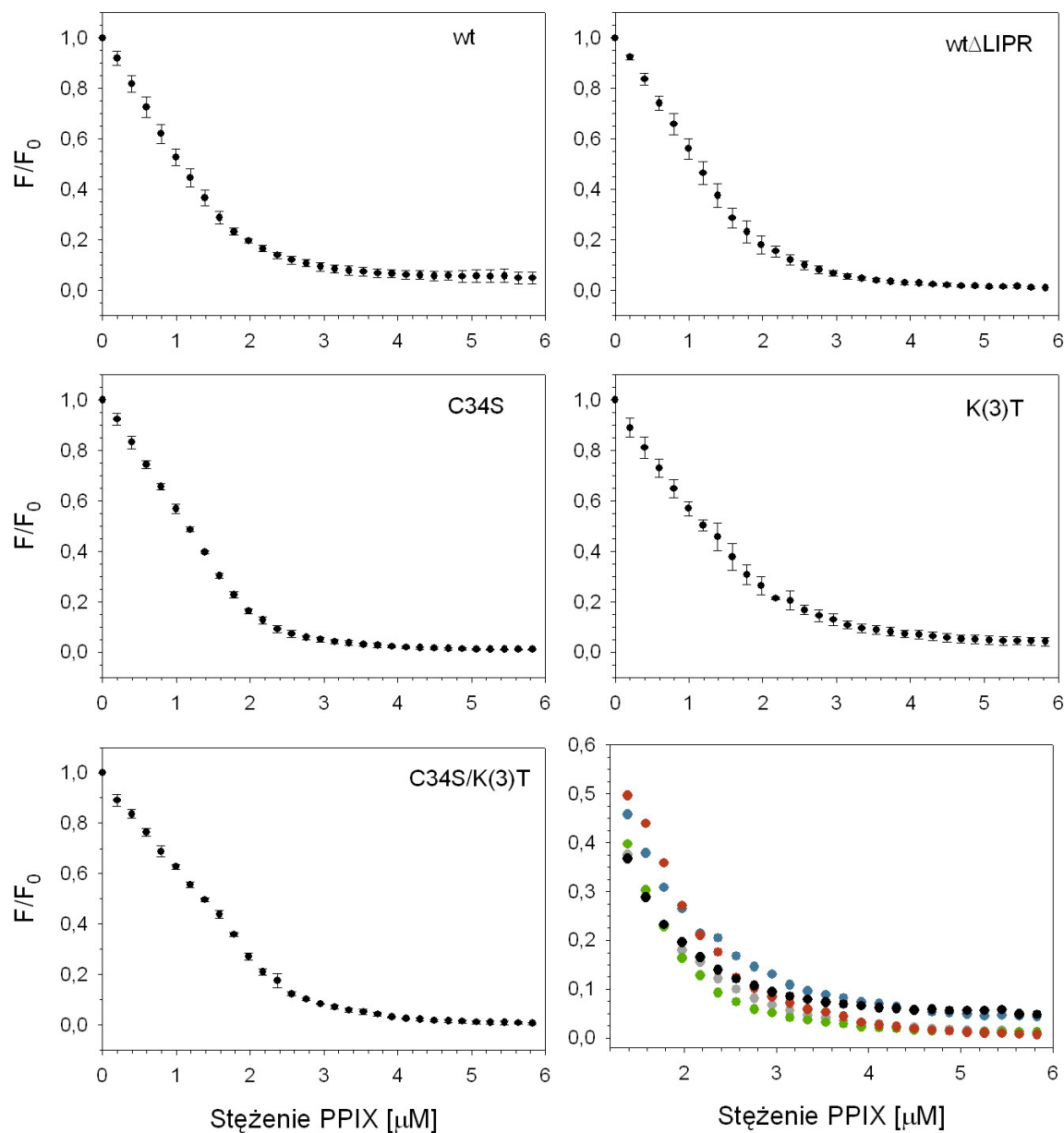
Równocześnie dochodzi do znaczących zmian w widmie fluorescencji PPIX (rys. 6.20). W widmie fluorescencji nieskompleksowanej PPIX obecne są dwa piki – większy, położony przy długości fali równej 622 nm oraz mniejszy, o maksimum przy 686 nm. W zależności od stężenia wyjściowego PPIX obserwuje się różny przebieg zmian w jej

widmach fluorescencji pod wpływem wiązania przez α_1M . Przy niskim stężeniu liganda ($0,5 \mu M$) uzyskano obraz przedstawiony na rysunku 6.20A. Ze wzrostem stężenia białka intensywność obydwu pasm spada, przy czym maksimum pasma niżej energetycznego przesuwają się stopniowo w stronę fal krótszych, aż do osiągnięcia wartości λ_{max} równej około 675 nm. Na rysunku 6.20B przedstawiono przebieg zmian obserwowanych w przypadku stężenia wyjściowego PPIX równego $2 \mu M$. Wraz ze wzrostem stężenia α_1M dochodzi początkowo do szybkiego spadku intensywności fluorescencji i przesunięcia pasma niżej energetycznego w kierunku fal krótszych (do $\lambda_{max} = 670$ nm), a następnie pasmo wyżej energetyczne przesuwają się w stronę fal dłuższych (do $\lambda_{max} = 629$ nm), przy czym zachodzi stopniowy wzrost intensywności obydwu pasm. Podobne zachowanie (początkowy spadek, a następnie wzrost mierzonego sygnału fluorescencji podczas zwiększania stężenia białka) zaobserwowano w późniejszych pomiarach kinetycznych (rozdział 6.2.5, str. 74). Krzywa zmian intensywności fluorescencji w maksimum pasma głównego podczas miareczkowania wskazuje na stechiometrię wiązania bliską 1:2,5 (α_1M :PPIX).



Rysunek 6.20. Zmiany w widmach fluorescencji PPIX pod wpływem tworzenia kompleksu z α_1M .

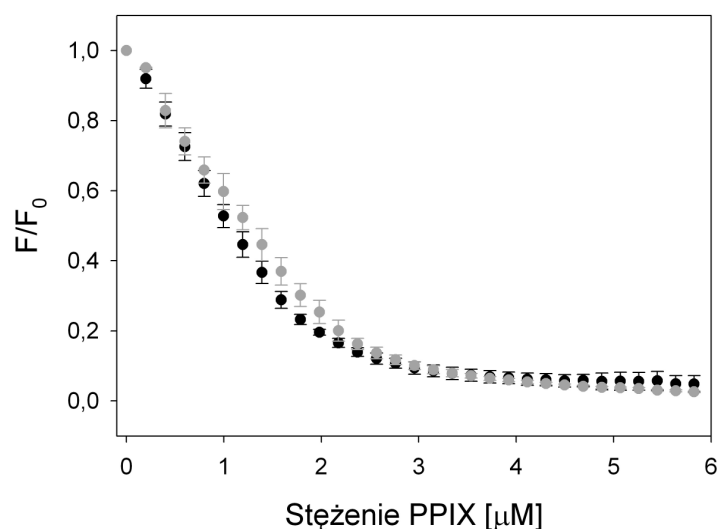
A: Wygaszanie fluorescencji PPIX na skutek wiązania przez wt- α_1M . Do $0,5 \mu M$ roztworu PPIX dodawano stopniowo $50 \mu M$ roztwór wt- α_1M . Na rysunku zaznaczono końcowe stężenie białka dla wybranych widm. Długość fali światła wzbudzającego wynosiła 395 nm. Wstawka przedstawia zmiany względnej fluorescencji PPIX mierzonej przy $\lambda = 622$ nm ze wzrostem stężenia białka. **B:** Do $2 \mu M$ roztworu PPIX dodawano po $5 \mu l$ $110 \mu M$ roztworu wt- α_1M . Długość fali wzbudzenia wynosiła 395 nm. Na rysunku zaznaczono końcowe stężenia białka dla poszczególnych widm. Wstawka przedstawia zmiany względnej fluorescencji PPIX mierzonej przy $\lambda = 629$ nm ze wzrostem stężenia białka.



Rysunek 6.21. Miareczkowanie $\alpha_1\text{M}$ roztworem PPIX. Próbkę białka o stężeniu 1 μM w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5 miareczkowano 200 μM roztworem PPIX w 64% etanolu, w temperaturze 37 °C. Fluorescencję wzbudzano światłem o długości fali 297 nm i obserwowano przy 332 nm. Każdy punkt jest wartością średnią z kilku niezależnych pomiarów wraz z odchyleniem standardowym. Ostatni panel prezentuje różnice w przebiegu krzywych uzyskanych dla poszczególnych białek: (●) wt; (●) wt Δ LIPR; (●) C34S; (●) K(3)T; (●) C34S/K(3)T.

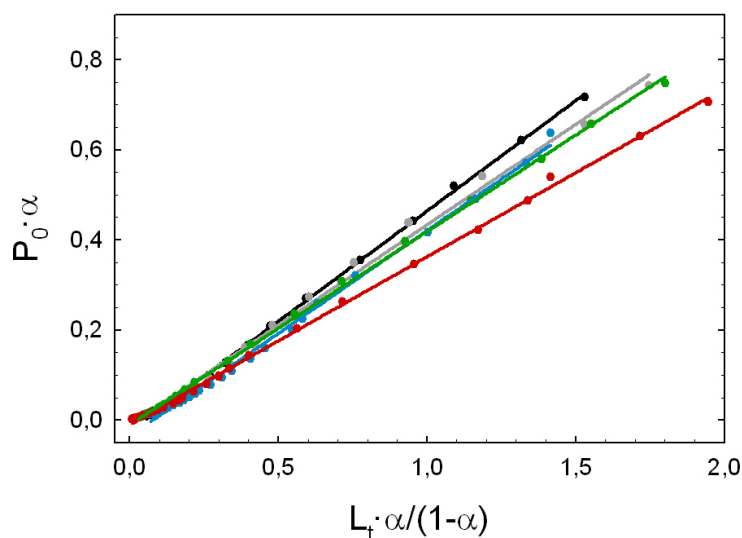
Krzywe miareczkowania spektrofluorymetrycznego poszczególnych wariantów $\alpha_1\text{M}$ PPIX, w temperaturze 37 °C i w pH 8,5, przedstawia rysunek 6.21. Ich przebieg jest

bardzo zbliżony do krzywych uzyskanych w przypadku hemu. Analogicznie, stechiometria wiązania jest bliska 1:2 ($\alpha_1\text{M}:\text{PPIX}$). Na rysunku 6.22 zestawiono krzywe uzyskane dla białka wt- $\alpha_1\text{M}$ w temperaturze 25 i 37 °C. Biorąc pod uwagę granice błędów, nie można stwierdzić zmian w ich przebiegu. W pomiarach stosowano roztwór PPIX w 64% etanolu. Nie stwierdzono, aby rozpuszczalnik ten wywoływał jakiegokolwiek zmiany intensywności fluorescencji lub przebiegu widm CD badanych białek w stosowanym zakresie stężeń (wyniki nie prezentowane w tej pracy).



Rysunek 6.22. Wpływ temperatury na wiązanie PPIX przez wt- $\alpha_1\text{M}$. Warunki pomiaru jak dla rysunku 6.21 za wyjątkiem temperatury, która wynosiła 37 °C (●) lub 25 °C (◐). Każdy punkt prezentuje średnią z kilku niezależnych pomiarów wraz z odchyleniem standardowym.

Krzywe miareczkowania posłużyły do wyznaczenia obserwowanych stałych dysocjacji kompleksów $\alpha_1\text{M}$ z PPIX. Podobnie jak w przypadku kompleksów z hemem dla wszystkich badanych form białka uzyskano liniową zależność iloczynu $P_0 \cdot \alpha$ od wyrażenia $L_T \cdot \alpha / (1 - \alpha)$ (rys. 6.23). Obliczone na podstawie współczynników nachylenia i wyrazów wolnych otrzymanych prostych wartości obserwowanych stałych dysocjacji oraz liczby miejsc wiążących zestawiono w tabeli 6.6. Drugi parametr przyjmuje dla każdego z białek wartości wyższe, niż uzyskane w przypadku odpowiednich kompleksów z hemem. W odniesieniu do wartości stałych K'_d zaznacza się podobną zależność, jak obserwowano dla hemu, mianowicie muteina K(3)T wiąże PPIX słabiej, natomiast obydwie muteiny pozbawione reszty Cys34 – silniej niż forma dzika.



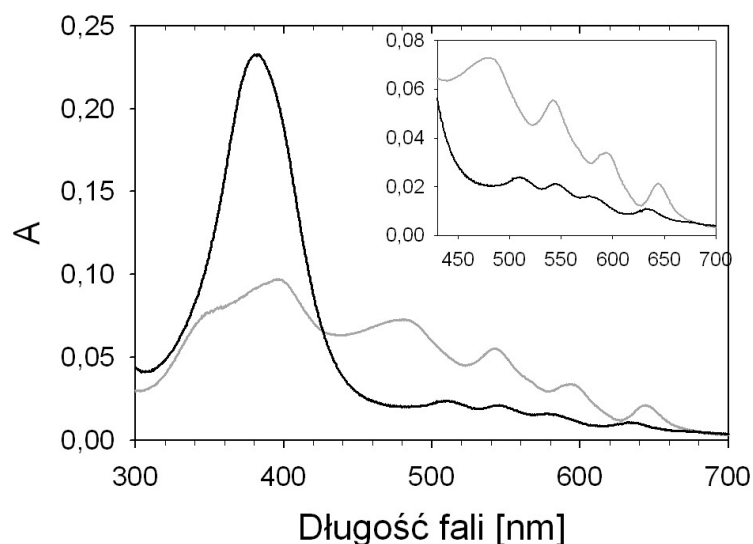
Rysunek 6.23. Wyznaczanie obserwowanych stałych dysocjacji kompleksów $\alpha_1\text{M-PPIX}$. Punkty przedstawiają dane uzyskane dla reprezentatywnych serii pomiarowych każdej z badanych form $\alpha_1\text{M}$: (•) wt; (◐) wtALIPR; (◑) C34S; (◒) K(3)T; (◓) C34S/K(3)T, linie ciągłe, to dopasowane funkcje liniowe.

Tabela 6.6. Wartości obserwowanych stałych dysocjacji oraz liczby miejsc wiążących w kompleksach $\alpha_1\text{M}$ z PPIX.

Białko	K'_d (10^{-8} M)	n
wt	$6,6 \pm 3,8$	$2,05 \pm 0,42$
wt, $t=25$ °C	$7,5 \pm 1,1$	$2,32 \pm 0,17$
wtALIPR	$3,9 \pm 1,4$	$2,24 \pm 0,23$
C34S	$2,88 \pm 0,43$	$2,27 \pm 0,10$
K(3)T	$12,1 \pm 2,3$	$2,15 \pm 0,13$
C34S/K(3)T	$4,5 \pm 1,1$	$2,65 \pm 0,06$

Widma absorpcyjne PPIX w buforze oraz formy związanej z $\alpha_1\text{M}$ przedstawia rysunek 6.24. W przypadku wolnej PPIX obserwuje się dwa piki o niewielkiej intensywności, których maksima położone są przy długościach fali 346 i 387 nm. Widmo takie charakterystyczne jest dla dimerów oraz wyższych oligomerów PPIX. Po zmieszaniu PPIX z białkiem, na widmie uzyskuje się znacznie silniejsze, pojedyncze pasmo Soreta, z maksimum przy długości fali 380 nm. Sugeruje to, że PPIX wiązana jest przez $\alpha_1\text{M}$ w formie monomerycznej. Podobnie jak w przypadku kompleksów z hemem, po związaniu PPIX z białkiem zmienia się położenie pasm Q i równocześnie spada ich intensywność.

Nie zaobserwowano różnic w położeniu oraz wysokości pików absorpcyjnych uzyskanych dla kompleksów PPIX z różnymi formami rekombinowanej $\alpha_1\text{M}$. Położenia maksimów poszczególnych pasm dla wolnej i związanej PPIX zestawiono w tabeli 6.7.



Rysunek 6.24. Widmo absorpcyjne PPIX niezwiązanej oraz w kompleksie z $\alpha_1\text{M}$. Pomiar wykonano w temperaturze pokojowej dla 1 μM wt- $\alpha_1\text{M}$ zmiareczkowanej PPIX (stężenie ok. 5,8 μM) oraz identycznego stężenia PPIX w czystym buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5. Wstawka prezentuje zbliżenie regionu pasm Q.

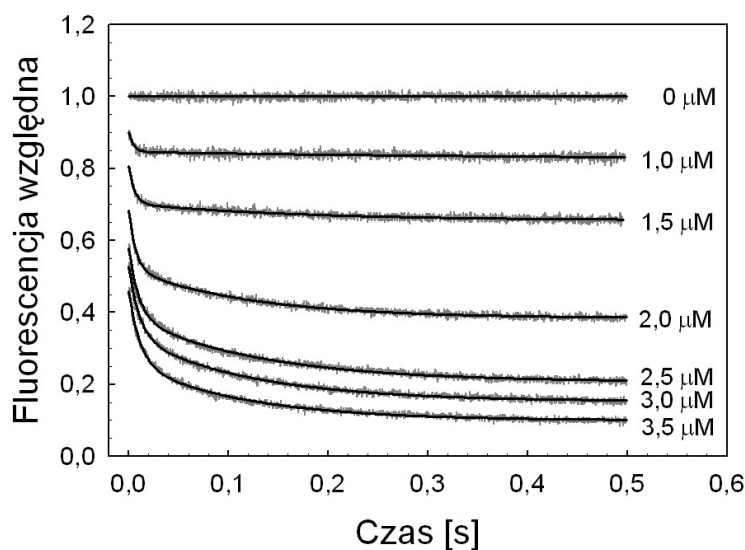
Tabela 6.7. Położenia maksimów pasm absorpcyjnych PPIX w roztworze wodnym oraz w kompleksie z $\alpha_1\text{M}$.

	Pasma Soreta	Pasma Q			
		IV	III	II	I
$\alpha_1\text{M}$-PPIX	380 nm	510 nm	545 nm	580 nm	635 nm
PPIX	346, 387 nm	480 nm	541 nm	592 nm	642 nm

6.2.5. POMIARY SZYBKIEJ KINETYKI WIĄZANIA LIGANDA PRZEZ α_1 -MIKROGLOBULINĘ

Kinetykę wiązania hemu przez $\alpha_1\text{M}$ badano obserwując zmiany w czasie intensywności fluorescencji reszt tryptofanowych białka. Wszystkie pomiary kinetyczne prowadzone były w warunkach reakcji drugiego rzędu, ze względu na słabą rozpuszczalność stosowanych ligandów w roztworach wodnych.

Poszukiwania modelu wiązania, prowadzone przy zastosowaniu programu DynaFit, nie przyniosły zadowalających wyników. Podobnie jak w przypadku krzywych miareczkowania fluorescencyjnego, wyliczone przez program wartości stałych kinetycznych dla poszczególnych serii pomiarowych były rozbieżne i często obarczone błędem zbliżonym, a nawet przewyższającym wartości obliczonych parametrów. Rozkład wartości residuów dla wybranego przez program modelu był często również niesatysfakcjonujący.



Rysunek 6.25. Przebiegi kinetyczne wiązania hemu przez wt- α_1 M. Białko o stężeniu końcowym 1 μ M mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem hemu o różnych stężeniach, w temperaturze 37 °C. Na rysunku zaznaczono końcowe wartości stężenia liganda. Linia szara prezentuje dane doświadczalne, linia czarna – dopasowanie funkcji dwueksponencjalnej.

Z tych względów zastosowano dodatkowo uproszczony i mniej ścisły sposób analizy, polegający na dopasowywaniu do przebiegów czasowych funkcji opisanych równaniem 5.6, o wzrastającej liczbie eksponent do momentu, gdy nie obserwowano już dalszej poprawy jakości dopasowania. Przykładowy wynik analizy przedstawiono na rysunku 6.25. Dla każdego z białek najlepszym dopasowaniem do danych doświadczalnych była funkcja dwueksponencjalna, co sugeruje, że obserwowany proces przebiega w dwóch etapach. Wykresy zależności obydwu pozornych stałych („pseudopierwszorzędowych”) szybkości reakcji od stężenia liganda zebrano na rysunku 6.26. Można zauważyć, że wartość wyższej stałej (k_{1obs}) maleje ze wzrostem stężenia hemu. Z taką sytuacją mamy do

czynienia np. gdy cząsteczka białka występuje w dwóch stanach konformacyjnych, z których tylko jeden wiąże ligand efektywnie [Johnson, 1992]. Schemat takiej reakcji można zapisać następująco:



Przy takich założeniach krzywe kinetyczne dobrze opisuje funkcja matematyczna będąca sumą dwóch członów eksponencjalnych, zaś obserwowane stałe szybkości są zależne od wszystkich stałych szybkości:

$$k_{obs1} = k_c + k_{-c} + k_1[L] + k_{-1} \quad (6.2a)$$

$$k_{obs2} = \frac{k_c(k_{-1} + k_1[L]) + k_{-c}k_{-1}}{k_c + k_{-c} + k_1[L] + k_{-1}} \quad (6.2b)$$

W pierwszym przybliżeniu można przyjąć, że szybka faza reakcji odpowiada wiązaniu liganda do P , podczas gdy wolna faza przebiega ze stałą szybkości, która w wysokich stężeniach $[L]$ jest limitowana przez k_c .

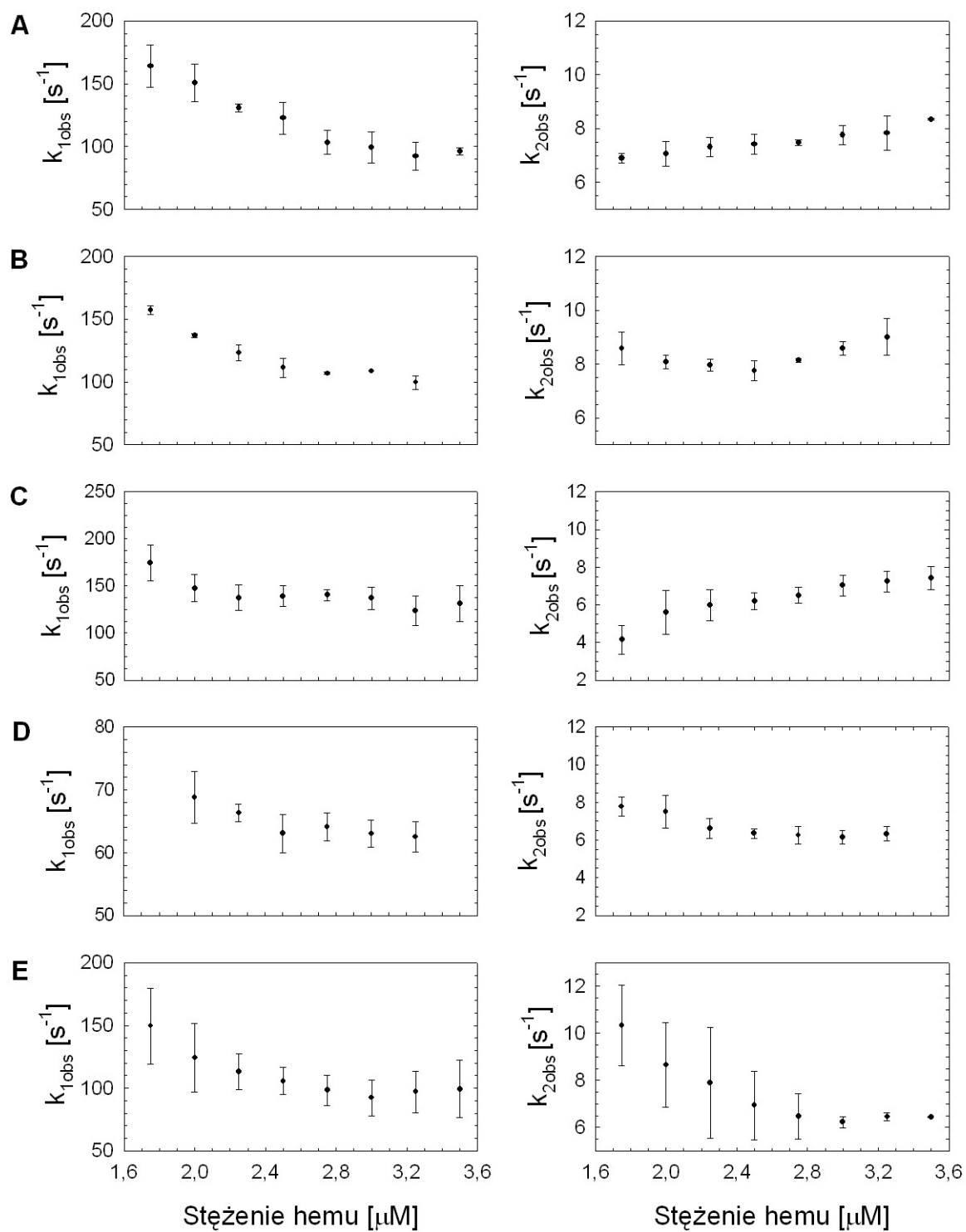
Jeżeli etap zmiany konformacyjnej jest dużo wolniejszy niż etap wiązania, wzory na obserwowane stałe szybkości upraszczają się:

$$k_{1obs} = k_1[L] + k_{-1} \quad (6.3a)$$

$$k_{2obs} = k_c + k_{-c} \frac{K}{[L] + K}, \quad (6.3b)$$

gdzie $K = \frac{k_{-1}}{k_1}$. Jak można zauważyć k_{2obs} jest malejącą funkcją stężenia $[L]$. Ponieważ

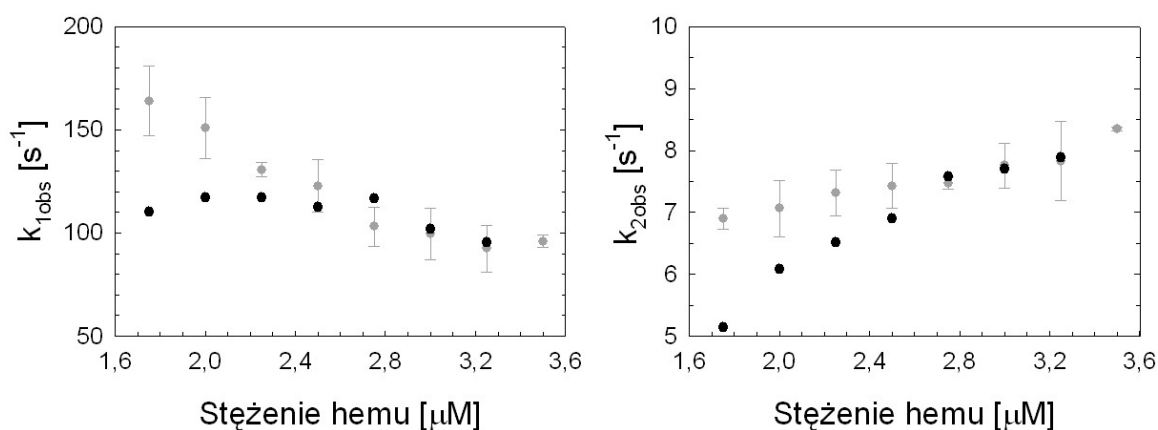
dla mechanizmu, w którym zmiany konformacyjne następują po etapie wiązania liganda zależność k_{2obs} od $[L]$ jest funkcją rosnącą, zależność ta umożliwia rozróżnienie pomiędzy tymi dwoma modelami kinetycznymi.



Rysunek 6.26. Zależności obserwowanych stałych szybkości reakcji od stężenia hemu dla poszczególnych form rekombinowanej $\alpha_1\text{M}$. Wykresy A-E odpowiadają odpowiednio formom: wt, wt ΔLIPR , C34S, K(3)T oraz C34S/K(3)T.

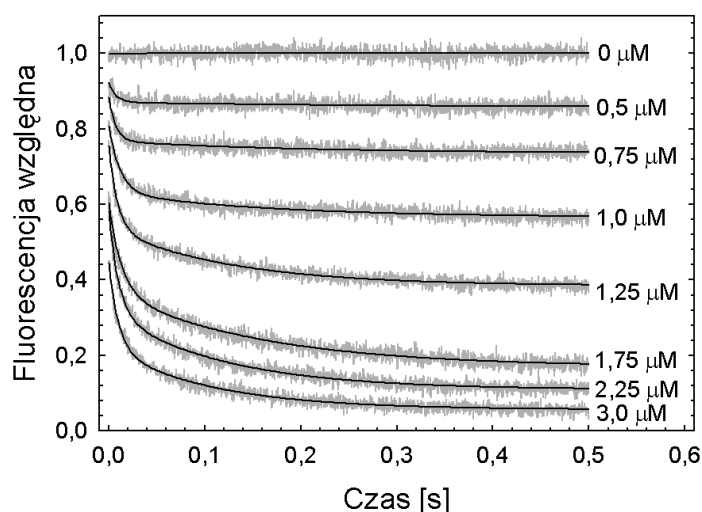
Zależność drugiej stałej obserwowanej, o mniejszej wartości, od stężenia hemu ma charakter rosnący w przypadku form wt-, wt Δ LIPR- oraz C34S- α_1 M. Dla pozostałych muteinów zależność ta jest trudna do zinterpretowania, ze względu na wysoką wartość błędu (muteina C34S/K(3)T) lub niejednoznaczny przebieg przy wyższych wartościach stężenia liganda (muteina K(3)T).

Rysunek 6.27 przedstawia porównanie przebiegów zależności obydwu stałych obserwowanych reakcji od stężenia liganda, uzyskanych dla temperatur 37 °C i 25 °C. W obecności niewielkich stężeń liganda obydwa obserwowane procesy przebiegają szybciej w wysokiej temperaturze. Przy wyższych stężeniach liganda wartości stałych obserwowanych szybkości ustalają się na jednakowym poziomie dla obydwu temperatur.

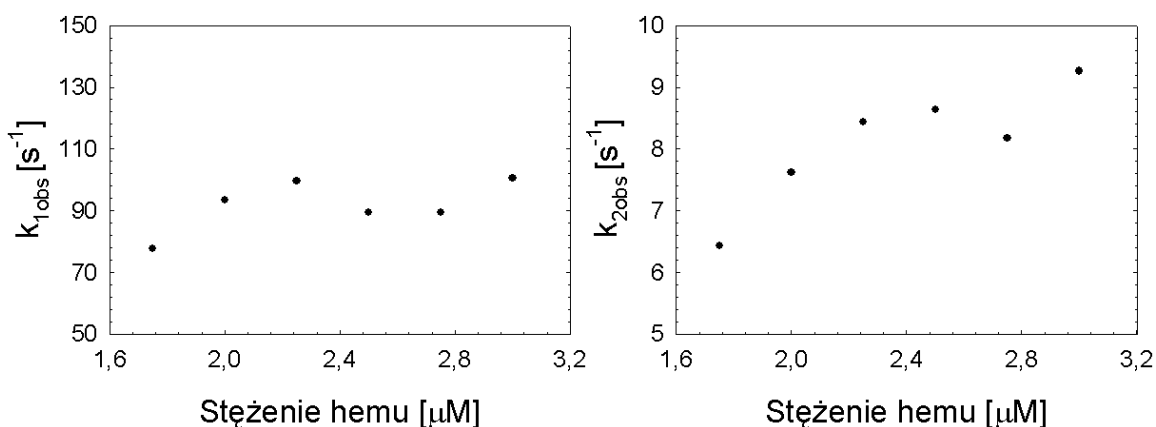


Rysunek 6.27. Zależności stałych obserwowanych szybkości procesów 1 i 2 od stężenia hemu w różnych temperaturach. Kolorem szarym przedstawiono dane uzyskane w temperaturze 37 °C, kolorem czarnym – zmierzone w temperaturze 25 °C.

Dla formy wt- α_1 M przeprowadzono dodatkowo dwa pojedyncze pomiary, w których stężenie białka wynosiło 0,5 µM, a ligandem był hem lub PPIX. Przebiegi kinetyczne dla pomiarów wiązania hemu przedstawiono na rysunku 6.28. Podobnie jak dla pomiarów przy wyższym stężeniu białka do krzywych zaniku fluorescencji w czasie dopasowywano funkcje eksponencjalne, najlepszy rezultat dopasowania uzyskując dla dwu eksponent. Zależności uzyskanych w ten sposób stałych obserwowanych reakcji od stężenia liganda przedstawia rysunek 6.29. Wartości stałej k_{2obs} wykazują tendencję wzrostową, natomiast przebieg zależności w przypadku stałej k_{1obs} jest trudny do określenia. Eksperyment został wykonany jednorazowo, a uzyskany wynik niestety nie jest jednoznaczny.

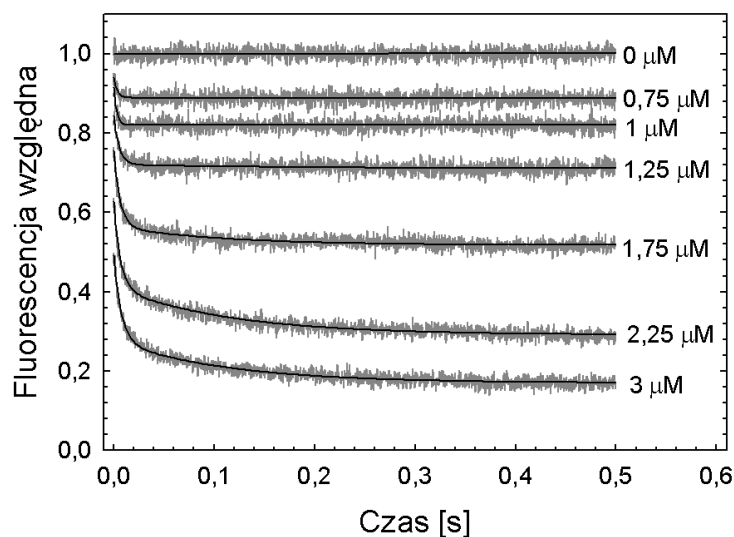


Rysunek 6.28. Przebiegi kinetyczne wiązania hemu przez wt- α_1 M. Białko o stężeniu końcowym 0,5 μ M mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem hemu o różnych stężeniach, w temperaturze 37 °C. Na rysunku zaznaczono końcowe wartości stężenia liganda. Linia szara prezentuje dane doświadczalne, linia czarna – dopasowanie funkcji dwueksponencjalnej.

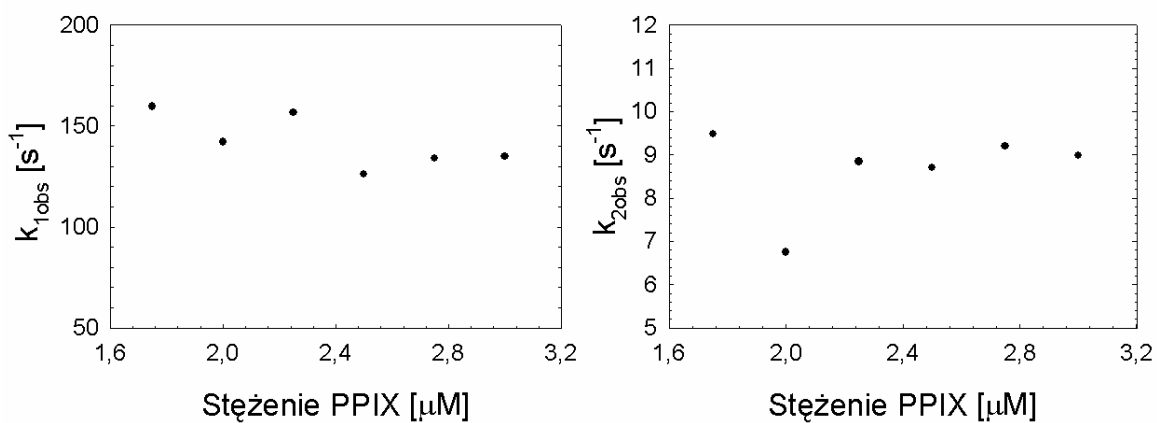


Rysunek 6.29. Zależności obserwowanych stałych szybkości reakcji wiązania hemu przez wt- α_1 M od stężenia liganda. Warunki eksperymentu jak dla rysunku 6.28.

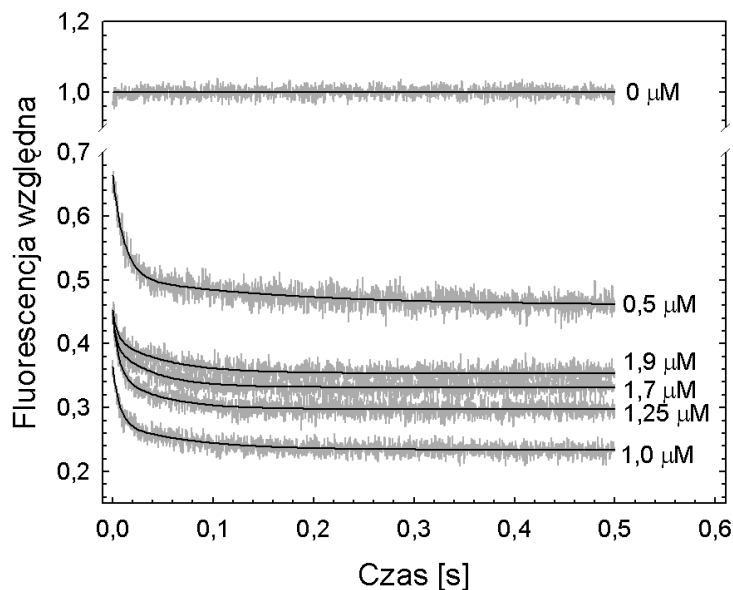
Przebiegi czasowe zaniku fluorescencji dla pomiarów z PPIX jako ligandem ilustruje rysunek 6.30. Również w tym przypadku najlepsze dopasowanie do danych eksperymentalnych wykazywała funkcja dwueksponencjalna. Można zauważyć nieco mniejszy spadek intensywności fluorescencji białka przy jednakowych stężeniach liganda, w porównaniu z pomiarem wykonanym dla hemu. Stałą $k_{1,obs}$ cechuje niewielki spadek wartości ze wzrostem stężenia PPIX, natomiast zależność stężeniowa drugiej stałej jest niejednoznaczna (rys. 6.31).



Rysunek 6.30. Przebiegi kinetyczne wiązania PPIX przez wt- α_1 M. Białko o stężeniu końcowym 0,5 μ M mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem PPIX o różnych stężeniach, w temperaturze 37 °C. Na rysunku zaznaczono końcowe wartości stężenia liganda. Linia szara prezentuje dane doświadczalne, linia czarna – dopasowanie funkcji dwueksponencjalnej.

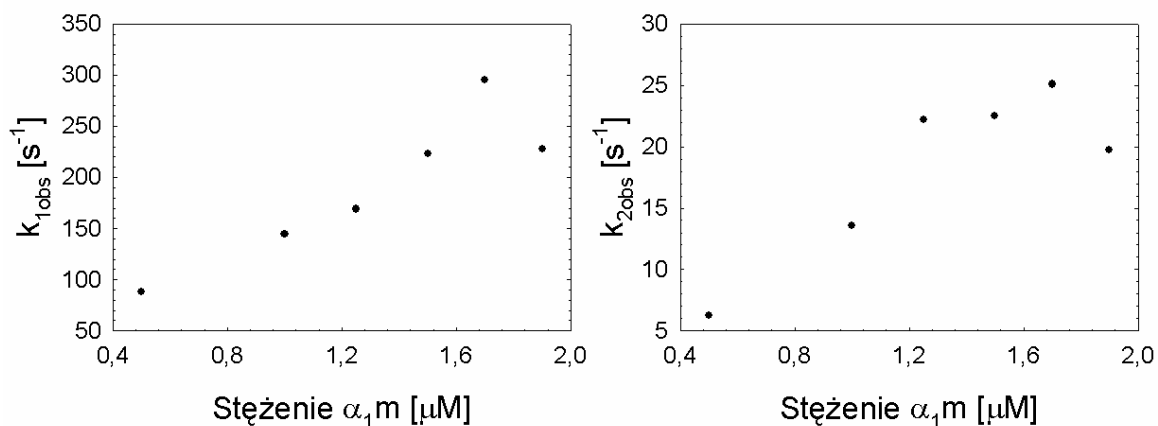


Rysunek 6.31. Zależności stałych obserwowanych szybkości reakcji od stężenia PPIX dla procesu wiązania PPIX przez wt- α_1 M. Warunki eksperymentu jak dla rysunku 6.30.



Rysunek 6.32. Przebiegi kinetyczne wiązania PPIX przez wt- α_1 M. PPIX o końcowym stężeniu 2,5 μ M mieszano w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem białka o różnych stężeniach, w temperaturze 37 °C. Na rysunku zaznaczono końcowe wartości stężenia białka. Linia szara prezentuje dane doświadczalne, linia czarna – dopasowanie funkcji dwueksponencjalnej.

Przeprowadzono również eksperyment, w którym przebieg reakcji monitorowano obserwując fluorescencję PPIX. W doświadczeniu tym stężenie liganda pozostawało stałe i równe 2,5 μ M, zmieniano natomiast stężenie białka. Zmierzone przebiegi kinetyczne przedstawiono na rysunku 6.32. Przy niskich stężeniach białka obserwuje się zachowanie analogiczne jak w przypadku pozostałych pomiarów kinetycznych, tzn. ze wzrostem stężenia α_1 M fluorescencja liganda jest stopniowo wygaszana, przy czym efekt ten jest maksymalny dla stosunku stężeń białko:PPIX równego 1:2,5. Przy dalszym wzroście stężenia białka dochodzi do głosu inny proces, który powoduje wzrost intensywności fluorescencji. Wynik ten potwierdza zaobserwowane wcześniej zmiany w widmie fluorescencji PPIX podczas miareczkowania roztworem α_1 M. Z dopasowania funkcji dwueksponencjalnych do przebiegów kinetycznych wyznaczono stałe obserwowane reakcji, których zależność od stężenia białka przedstawia rysunek 6.33. W obydwu przypadkach zależność ta ma charakter wyraźnie rosnący.

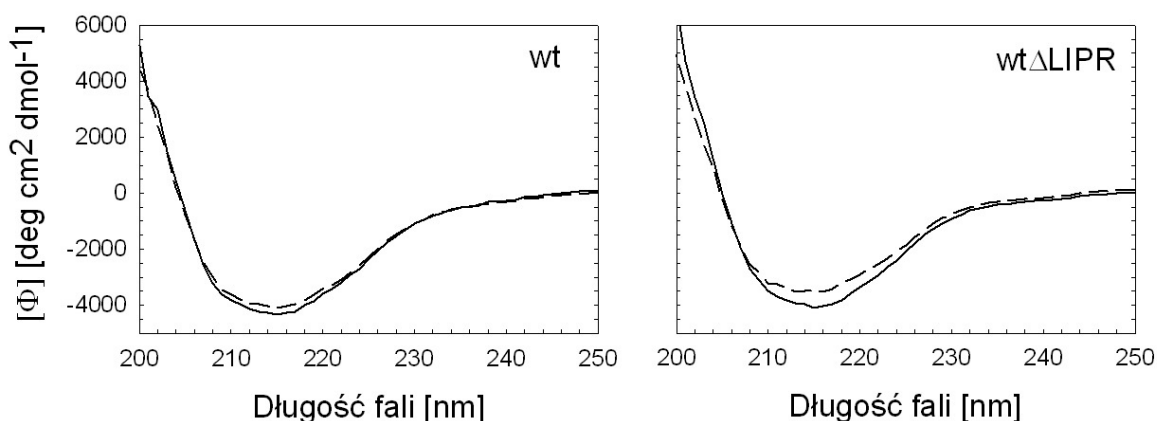


Rysunek 6.33. Zależności stałych obserwowanych szybkości od stężenia białka dla procesu wiązania PPIX przez wt- α_1M . Warunki eksperymentu jak dla rysunku 6.32.

6.2.6. ROZDZIELCZE W CZASIE POMIARY ANIZOTROPII FLUORESCENCJI

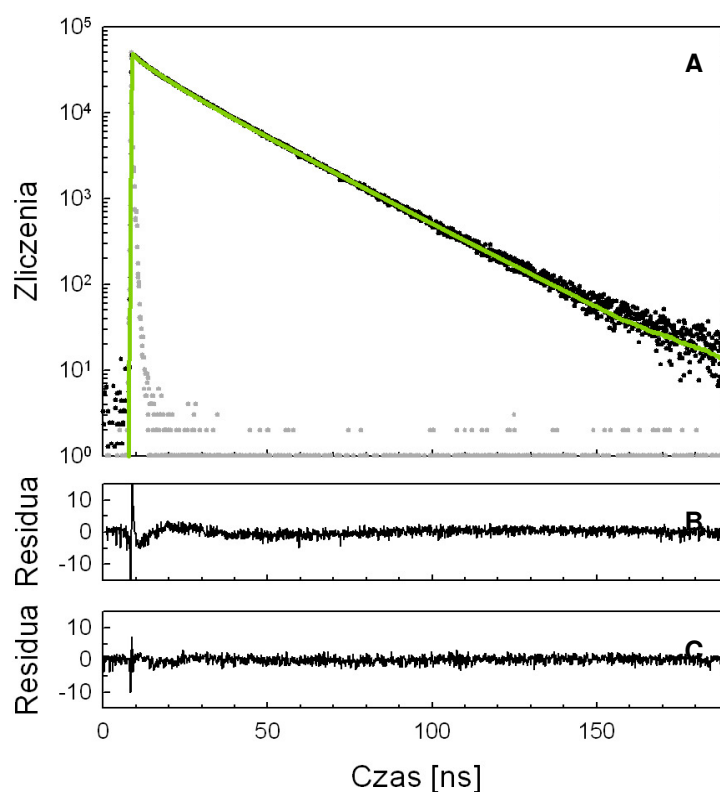
KOMPLEKSY α_1 -MIKROGLOBULINY ZNAKOWANEJ 1,5-I-AEDANS Z HEMEM

W celu zbadania właściwości hydrodynamicznych α_1M oraz jej kompleksów z hemem wykorzystano metodę rozdzielczych w czasie pomiarów anizotropii fluorescencji, obserwując emisję znacznika 1,5-I-AEDANS związanego kowalencyjnie z resztą Cys34 form wt oraz wt Δ LIPR.



Rysunek 6.34. Porównanie widm dichroizmu kołowego wt- i wt Δ LIPR- α_1M przed i po wyznakowaniu 1,5-I-AEDANS. Pomiar wykonano w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5, w temperaturze pokojowej, stężenie białka wynosiło 10 μM . Linie ciągła i przerywana prezentują widma uzyskane, odpowiednio, przed i po wyznakowaniu 1,5-I-AEDANS.

Pomiary wykonano w buforze Tris, w temperaturze 20 °C, dla nieskompleksowanego białka oraz w obecności hemu w stosunku molowym białko:hem równym 1:1 i 1:3 (pełne wysycenie białka, na podstawie pomiarów spektrofluorymetrycznych). Stopień wyznakowania, odpowiednio dla form wt Δ LIPR i wt, wyniósł 0,7 i 0,8 mola znacznika na mol białka. Na rys. 6.34 przedstawiono widma CD białek przed i po wyznakowaniu. Krzywe uzyskane dla formy wt- α_1 M są niemal identyczne, co pozwala wnioskować o zachowaniu niezmięnionej struktury białka po wyznakowaniu. W przypadku białka wt Δ LIPR można zaobserwować zmianę w kształcie krzywej uzyskanej dla wyznakowanej α_1 M. Ze względu na fakt, że zaobserwowano również różnice w sile wiązania hemu do wyznakowanej formy wt Δ LIPR, należy brać pod uwagę możliwość zmian na poziomie struktury drugorzędowej tego białka, na skutek ulokowania się znacznika wewnątrz kieszeni lipokalinowej (roz. 6.2.3, str. 60).



Rysunek 6.35. Przykładowy zanik fluorescencji znacznika AEDANS związanego z białkiem wt Δ LIPR- α_1 M. Pomiar wykonano w buforze 25 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 8,5, w temperaturze 20 °C, stężenie białka wynosiło 1 μ M (stopień wyznakowania 0,7). **A:** kolorem czarnym przedstawiono zanik fluorescencji znacznika, kolorem szarym – profil aparaturowy. Linia ciągła zielona przedstawia dopasowanie modelu trójeksponencjalnego zaniku do danych eksperymentalnych. **B i C:** wartości odchylenia odpowiednio dla modelu dwu- ($\chi^2 = 2,32$) i trójeksponencjalnego ($\chi^2 = 1,25$).

Przykładowy zanik całkowitej fluorescencji znacznika zmierzony dla białka wt Δ LIPR przedstawiono na rysunku 6.35. Stosując procedurę opisaną w rozdziale 5.2.10 wyznaczono czasy życia fluorescencji znacznika związanego z badanymi białkami. Do zmierzonego zaniku całkowitej fluorescencji AEDANS dopasowywano modele o wzrastającej liczbie eksponent. Najlepsze dopasowanie (ustalone na podstawie oceny rozkładu residuów oraz wartości współczynnika χ^2) uzyskano dla funkcji trójeksponencjalnej. Wartości poszczególnych składowych czasu życia fluorescencji oraz ich udziałów procentowych w całkowitym zaniku fluorescencji, a także wartości średniego czasu życia, uzyskane dla białek wt i wt Δ LIPR i ich kompleksów z hemem, zestawiono w tabeli 6.8. Dla obydwu białek średni czas życia fluorescencji ulega skróceniu od wartości około 20 ns do około 15 ns, przy przejściu od formy nieskompleksowanej do w pełni wysyczonej ligandem.

Tabela 6.8. Czasy życia fluorescencji znacznika AEDANS kowalencyjnie związanego z białkami wt i wt Δ LIPR dla białek w postaci wolnej oraz w kompleksach z hemem.

Białko	τ_1 [ns] ^a	f_1 [%]	τ_2 [ns] ^a	f_2 (%)	τ_3 [ns] ^a	f_3 [%]	$\langle \tau \rangle$ [ns] ^b
wt	7,79 ± 0,89	9,26	21,18 ± 0,37	87,87	0,34 ± 0,04	2,89	19,4 ± 1,3
α_1 M:hem 1:1	7,42 ± 0,60	12,03	21,24 ± 0,36	84,28	0,32 ± 0,04	3,70	18,8 ± 1,0
α_1 M:hem 1:3	5,85 ± 0,29	25,86	20,80 ± 0,19	65,66	0,33 ± 0,05	8,48	15,2 ± 1,9
wt Δ LIPR	8,30 ± 0,63	9,73	21,60 ± 0,15	88,02	0,45 ± 0,15	2,26	19,8 ± 1,9
α_1 M:hem 1:1	7,17 ± 0,41	21,40	21,30 ± 0,05	73,24	0,59 ± 0,31	5,41	17,2 ± 3,2
α_1 M:hem 1:3	6,47 ± 0,76	31,51	20,66 ± 0,13	61,77	0,66 ± 0,16	6,72	14,9 ± 3,0

τ_i i f_i – wartość oraz udział w całkowitym zaniku fluorescencji i -tej składowej czasu życia fluorescencji

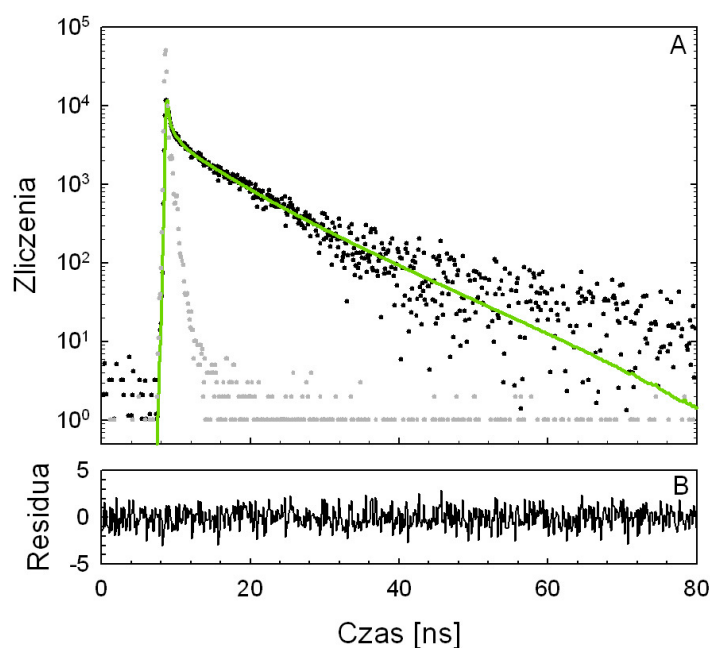
$\langle \tau \rangle$ – średni czas życia fluorescencji

^a wartości niepewności wyliczono ze wzoru na odchylenie standardowe średniej

^b wartości niepewności obliczono metodą różniczki zupełnej

Zaniki anizotropii fluorescencji analizowano na dwa sposoby. W pierwszej kolejności wykorzystano metodę rozplatania funkcji, opisaną w rozdziale 5.2.10. Przykładowy wynik analizy, otrzymany dla mieszaniny białka wt Δ LIPR z hemem (stosunek molowy 1:3), wraz z rozkładem residuów przedstawia rysunek 6.36. Stosując tę metodę analizy najlepsze dopasowanie do danych pomiarowych, zarówno w przypadku nieskompleksowanych białek jak i ich kompleksów z ligandem, wykazywał model dwueksponencjalny. Wartości

wyznaczonych parametrów zebrano w tabeli 6.9. Początkowa anizotropia fluorescencji przyjmuje wartości mieszczące się w granicach 0,17 – 0,25. Wartość dłuższego czasu rotacyjnej korelacji (θ_1) wzrastała stopniowo od 15,5 ns pod nieobecność hemu, do około 30 ns w przypadku obecności hemu w trzykrotnym nadmiarze molowym względem białka. Wartości czasu θ_2 mieściły się w przedziale 0,1-1 ns i malały przy wzroście wysycenia ligandem. Udział tej składowej w całkowitym zaniku anizotropii fluorescencji wynosił ok. 0,1 % i dodatkowo obarczony był wysokim błędem.



Rysunek 6.36. Przykładowy wynik analizy metodą rozplatania funkcji zaniku anizotropii fluorescencji znacznika AEDANS przyłączonego do α_1 M. Dane uzyskano dla białka wtALIPR o stężeniu 1 μ M (stopień wyznakowania 0,7) w kompleksie z hemem. Białko i ligand zmieszano w stosunku molowym 1:3. Pomiar przeprowadzono w buforze o składzie 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, w temperaturze 20 °C. **A:** kolorem czarnym przedstawiono różnicę intensywności fluorescencji zmierzonej przy wertykalnym i horyzontalnym ustawieniu analizatora, kolorem szarym – profil aparaturowy, zielona linia ciągła przedstawia dopasowanie modelu dwueksponencjalnego zaniku anizotropii fluorescencji do danych eksperymentalnych. **B:** rozkład residuów dla dopasowanej funkcji.

Taki wynik analizy budził wątpliwości przy wzrokowej ocenie uzyskanych zaników anizotropii fluorescencji. Porównanie krzywych zmierzonych dla białek i ich kompleksów przedstawiono na rysunku 6.37. Jak widać, krzywe uzyskane dla obydwu białek pod nieobecność liganda cechuje jednostajny, powolny spadek anizotropii fluorescencji. Po dodaniu hemu można zaobserwować pojawienie się w początkowej fazie zaniku nagłego

spadku intensywności fluorescencji, przechodzącego następnie w wolno opadające ramię. Wskazuje to na pojawienie się krótszej składowej czasu rotacyjnej korelacji, nieobecnej w przypadku wolnego białka.

Tabela 6.9. Czasy rotacyjnej korelacji oraz anizotropia początkowa znacznika AEDANS związanego z białkami wt- i wt Δ LIPR- α_1 M pod nieobecność i w obecności hemu, uzyskane metodą analizy danych z dekonwolucją.

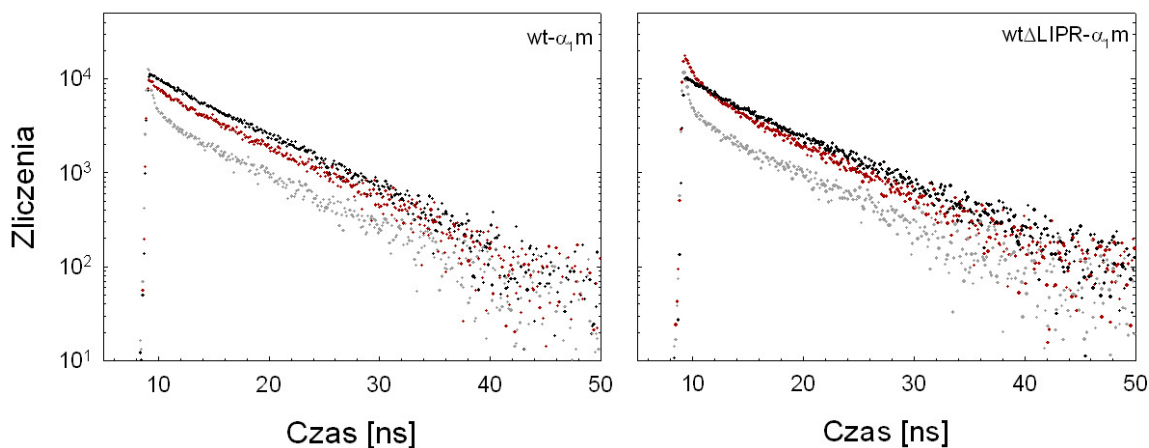
Białko	θ_1 [ns] ^a	θ_2 [ns] ^a	r_0 ^a	χ^2
wt	15,50 ± 0,32	0,75 ± 0,43	0,18 ± 0,01	1,46
α_1 M:hem 1:1	15,50 ± 0,97	1,10 ± 0,18	0,17 ± 0,01	1,81
α_1 M:hem 1:3	33,00 ± 3,27	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,04	1,90
wt Δ LIPR	15,50 ± 0,76	2,30 ± 2,38	0,20 ± 0,03	1,29
α_1 M:hem 1:1	17,21 ± 0,66	0,96 ± 0,74	0,18 ± 0,03	1,61
α_1 M:hem 1:3	28,50 ± 2,91	0,11 ± 0,02	0,25 ± 0,04	1,12

θ_i – i-ta składowa czasu rotacyjnej korelacji

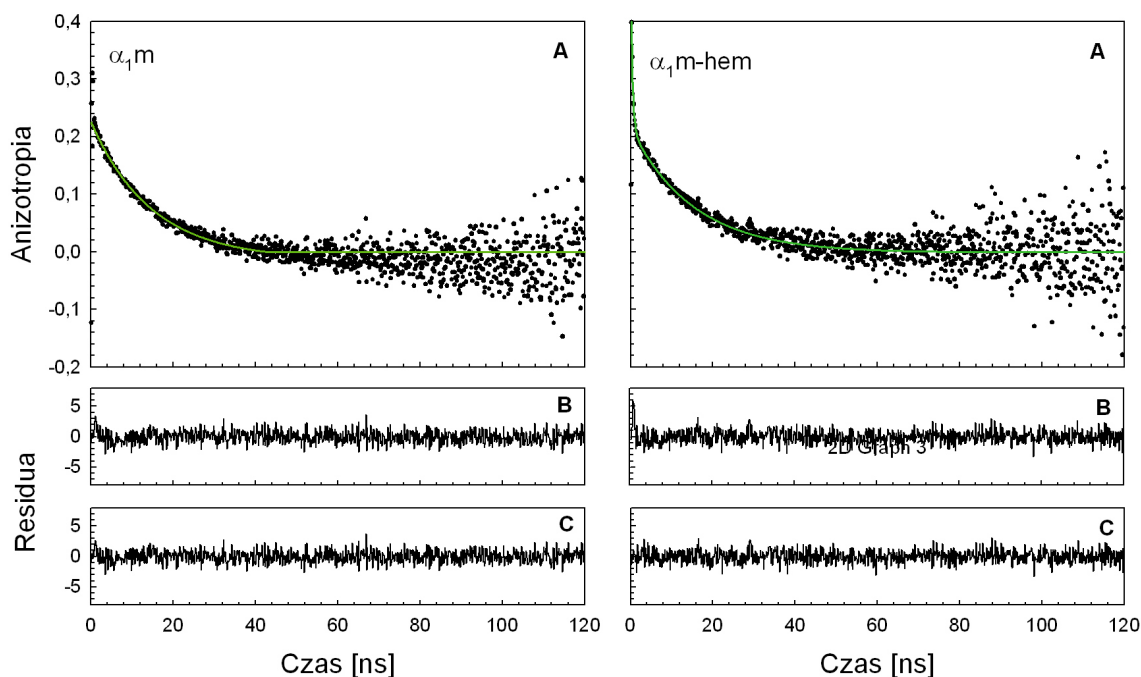
r_0 – początkowa wartość anizotropii fluorescencji

χ^2 – parametr dobroci dopasowania

^a wartości niepewności wyliczono ze wzoru na odchylenie standardowe średniej



Rysunek 6.37. Porównanie krzywych różnicowych intensywności fluorescencji znacznika AEDANS przyłączonego do białek wt i wt Δ LIPR dla białek wolnych i skompleksowanych z hemem. Krzywe prezentują różnice intensywności fluorescencji zmierzonej przy wertykalnym i horyzontalnym ustawieniu analizatora. Kolorem czarnym przedstawiono dane uzyskane dla białek nieskompleksowanych, kolorem czerwonym – dla mieszanin białko-ligand w stosunku molowym 1:1, natomiast kolorem szarym – w stosunku 1:3.



Rysunek 6.38. Przykładowe zaniki anizotropii fluorescencji znacznika AEDANS związanego kowalencyjnie do wt- α_1 M pod nieobecność hemu oraz w kompleksie 1:1 α_1 M-hem. Pomiar przeprowadzono w buforze 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, w temperaturze 20 °C, stężenie białka wynosiło 1 μ M (stopień wyznakowania 0,8). **A:** Linia czarna – zanik anizotropii fluorescencji znacznika, linia zielona – dopasowanie modelu jedno- (α_1 M) lub dwueksponencjalnego zaniku anizotropii (α_1 M-hem) do danych eksperymentalnych, metodą bez dekonwolucji. **B i C:** rozkłady residuów dla dopasowania funkcji jedno- i dwueksponencjalnej do danych pomiarowych. Wartości parametru χ^2 dla wolnej α_1 M równe odpowiednio 0,96 i 0,94 dla modelu jedno- i dwueksponencjalnego zaniku, dla kompleksu α_1 M-hem analogiczne wartości równe odpowiednio 1,16 i 1,02.

Bardzo krótki czas odpowiedzi zastosowanego układu pomiarowego (ok. 350 ps) umożliwił wykonanie dodatkowej analizy danych pomiarowych bez dekonwolucji sygnału, w celu weryfikacji wyniku uzyskanego z zastosowaniem poprzedniej metody. Do krzywych zaniku anizotropii fluorescencji dopasowywano bezpośrednio funkcje eksponencjalne, jak opisano w rozdziale 5.2.10. Na podstawie rozkładu residuów oraz wartości parametru χ^2 najlepsze dopasowanie w przypadku obydwu nieskompleksowanych białek uzyskano dla modelu monoeksponencjalnego. Przebiegi zmierzone dla mieszanin białek z hemem (zarówno w stosunku molowym 1:1 jak i 1:3) najlepiej opisywała funkcja dwueksponencjalna. Przykładowy wynik analizy dla wolnej α_1 M i kompleksu α_1 M-hem prezentuje rysunek 6.38.

Wartość dłuższego czasu rotacyjnej korelacji wzrasta stopniowo od około 14,5 ns (dla

wolnej α_1M) do około 28 ns (w przypadku mieszanin białka z trzykrotnym molowym nadmiarem hemu), analogicznie, jak to zaobserwowano w wyniku analizy danych z dekonwolucją. Równocześnie podczas wiązania kolejnych cząsteczek liganda pojawia się krótsza składowa o wartości ok. 0,5 ns, której udział w całkowitym zaniku anizotropii wzrasta o kilka procent, przy zwiększeniu stosunku białko:ligand z 1:1 do 1:3 i jest wyższy w przypadku wariantu białka pozbawionego C-końcowego tetrapeptydu. Teoretyczny czas rotacyjnej korelacji, wyznaczony za pomocą programu HYDROPRO (rozdział 5.2.10, str. 40) dla modelu monomeru α_1M , ma wartość 11,37 ns, czyli jest o około 30% niższy od uzyskanego doświadczalnie. Z wartości czasu θ_i obliczono także obserwowany promień hydrodynamiczny rotującej cząstki, przy założeniu jej sferyczności. Parametr ten pod nieobecność liganda przyjmuje wartość około 2,4 nm, która wzrasta stopniowo do około 3 nm w wyniku wysycenia miejsc wiążących białka hemem. Wyniki analizy danych metodą bez dekonwolucji sygnału zestawiono w tabeli 6.10.

Tabela 6.10. Czasy rotacyjnej korelacji znacznika AEDANS związanego z białkami wt- i wt Δ LIPR- α_1M pod nieobecność liganda i w kompleksach z hemem uzyskane metodą analizy danych bez dekonwolucji.

Białko	θ_i [ns] ^a	f_i [%]	θ_i/θ_{teoret}	r_h [nm] ^a	θ_2 [ns] ^a	χ^2
wt	14,46 ± 0,37	100	1,27	2,41 ± 0,02	-	1,02
α_1M :hem 1:1	15,90 ± 0,71	97,38	1,39	2,49 ± 0,04	0,52 ± 0,11	1,00
α_1M :hem 1:3	27,5 ± 2,4	93,40	2,44	2,98 ± 0,09	0,44 ± 0,03	1,11
wt Δ LIPR	14,33 ± 0,73	100	1,27	2,40 ± 0,04	-	1,03
α_1M :hem 1:1	17,76 ± 0,59	94,08	1,56	2,58 ± 0,03	0,54 ± 0,13	1,00
α_1M :hem 1:3	28,6 ± 5,1	89,27	2,5	3,02 ± 0,16	0,42 ± 0,04	1,12

θ_i – i-ta składowa czasu rotacyjnej korelacji

r_h – obserwowany promień hydrodynamiczny

f_i – udział w całkowitym zaniku anizotropii fluorescencji

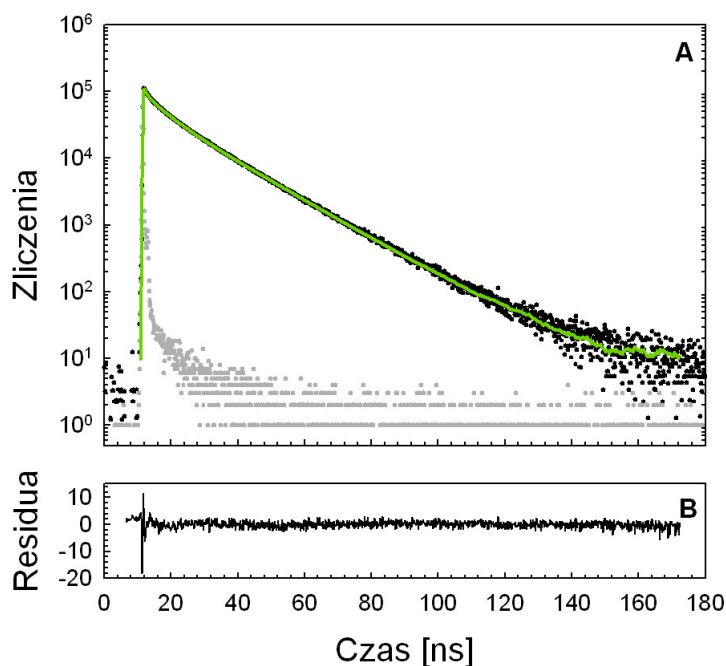
θ_{teoret} – wartość teoretyczna czasu rotacyjnej korelacji obliczona za pomocą programu HYDROPRO

χ^2 – parametr dobroci dopasowania

^a wartości niepewności wyliczono ze wzoru na odchylenie standardowe średniej

KOMPLEKSY α_1 M Z PPIX

Właściwości hydrodynamiczne kompleksów każdej z form rekombinowanej α_1 M z PPIX badano obserwując fluorescencję liganda. Na rysunku 6.39 przedstawiono typowy zanik całkowitej fluorescencji PPIX w kompleksie z muteiną K(3)T- α_1 M.



Rysunek 6.39. Przykładowy zanik fluorescencji PPIX w kompleksie z białkiem K(3)T- α_1 M. **A:** Białko o stężeniu 1,2 μ M inkubowano przez 1 h z 1 μ M PPIX. Pomiar wykonano w buforze 50 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl, pH 8,5, w temperaturze 20 °C. Kolorem czarnym przedstawiono całkowitą intensywność fluorescencji, kolorem szarym – profil aparaturowy. Zielona linia ciągła przedstawia dopasowanie funkcji trójeksponencjalnej do danych eksperymentalnych. **B:** Rozkład residuów dla wybranego modelu.

Do zmierzonych zaników fluorescencji dopasowywano funkcje o wzrastającej liczbie eksponent, najlepszy wynik uzyskując dla modelu trójeksponencjalnego. Wartości poszczególnych składowych czasu życia fluorescencji, ich udziałów procentowych oraz średniego czasu życia fluorescencji $\langle \tau \rangle$ zebrano w tabeli 6.11. Największy udział procentowy w całkowitym zaniku fluorescencji, około 70-79%, ma najdłuższa składowa czasu życia, o wartości około 15 ns. Nieco krótsza składowa równa około 5 ns stanowi, w zależności od muteiny, 18-25% całkowitego zaniku. Najkrótszy z czasów ma wartość około 0,5 ns i bardzo niewielki udział w całkowitej fluorescencji. Wartości

poszczególnych czasów życia fluorescencji pokrywają się w granicach błędu dla wszystkich badanych białek.

Tabela 6.11. Czasy życia fluorescencji PPIX w kompleksach z białkiem typu dzikiego oraz muteinami α_1M .

Białko	$\tau_1 [ns]^a$	f_1 [%]	$\tau_2 [ns]^a$	f_2 (%)	$\tau_3 [ns]^a$	f_3 [%]	$\langle \tau \rangle [ns]^b$
wt	4,93 ± 0,22	21,09	14,50 ± 0,10	76,10	0,51 ± 1,12	2,81	12,09 ± 0,94
wt Δ LIPR	5,18 ± 0,02	21,08	14,6 ± 0,07	76,04	0,52 ± 0,06	2,89	12,22 ± 0,63
C34S	5,20 ± 0,22	25,35	14,50 ± 0,07	70,80	0,64 ± 0,10	3,84	11,59 ± 0,71
K(3)T	5,36 ± 0,11	18,51	14,8 ± 0,06	78,77	0,82 ± 0,04	2,72	12,67 ± 0,62
C34S/K(3)T	5,44 ± 0,26	18,60	15,00 ± 0,06	78,94	0,66 ± 0,16	2,47	12,85 ± 0,70

τ_i i f_i – wartość oraz udział w całkowitym zaniku fluorescencji i -tej składowej czasu życia fluorescencji

$\langle \tau \rangle$ – średni czas życia fluorescencji

^a wartości niepewności wyliczono ze wzoru na odchylenie standardowe średniej

^b wartości niepewności obliczono metodą różniczki zupełnej

Tabela 6.12. Czasy rotacyjnej korelacji oraz początkowa anizotropia fluorescencji PPIX w kompleksach z różnymi formami α_1M . Przedstawione wartości uzyskano metodą analizy danych z dekonwolucją.

Białko	$\theta_1 [ns]^a$	f_1 [%]	$r_h [nm]^a$	$\theta_2 [ps]^a$	R_0^a	χ^2
wt	14,20 ± 1,33	99,78	2,39 ± 0,07	27,4 ± 29,3	0,17 ± 0,03	1,07
wt Δ LIPR	15,10 ± 1,19	99,83	2,44 ± 0,06	35,9 ± 73,3	0,16 ± 0,02	1,07
C34S	17,70 ± 1,71	99,61	2,57 ± 0,08	48,5 ± 47,6	0,15 ± 0,01	1,07
K(3)T	14,10 ± 1,24	98,86	2,39 ± 0,07	218,0 ± 28,3	0,14 ± 0,01	1,05
C34S/K(3)T	17,75 ± 1,35	99,90	2,58 ± 0,07	15,0 ± 16,0	0,14 ± 0,02	1,02

θ_i – i -ta składowa czasu rotacyjnej korelacji

f_i – udział w całkowitym zaniku anizotropii fluorescencji

r_h – obserwowany promień hydrodynamiczny

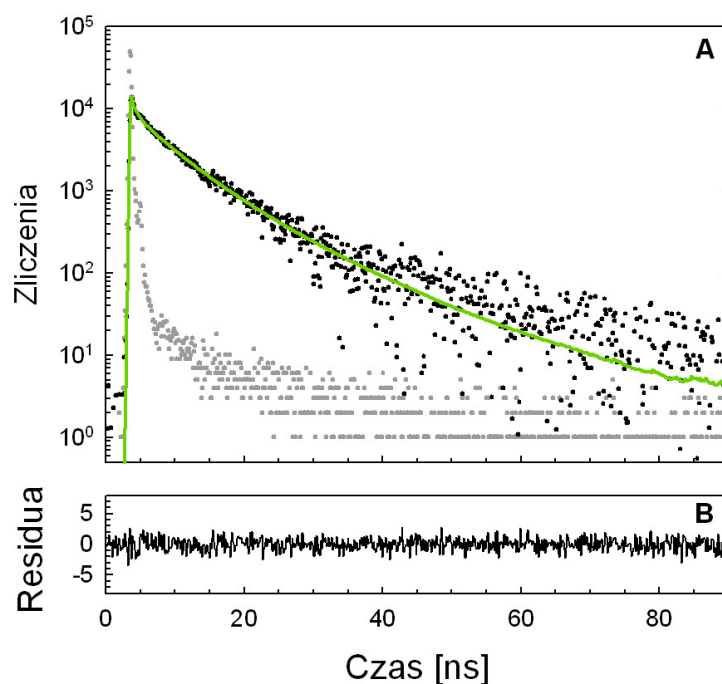
r_0 – początkowa wartość anizotropii fluorescencji

χ^2 – parametr dobroci dopasowania

^a wartości niepewności wyliczono ze wzoru na odchylenie standardowe średniej

Zaniki anizotropii fluorescencji PPIX analizowano stosując metodę rozplatania funkcji

oraz bezpośredniego dopasowania funkcji eksponencjalnych do danych eksperymentalnych. Wyniki uzyskane obydwoma sposobami są porównywalne, dlatego w dalszej części pracy omówione zostaną jedynie obliczenia z zastosowaniem dekonwolucji mierzonego sygnału. Typowy przykład zaniku anizotropii fluorescencji, wraz z dopasowaną funkcją eksponencjalną, przedstawiono na rysunku 6.40. Dla każdego z białek krzywe zaniku anizotropii fluorescencji najlepiej opisywał model dwueksponencjalny, jednak udział drugiej składowej był bliski zeru (poniżej 0,5%). Dodatkowo wartość krótszego czasu rotacyjnej korelacji obarczona była dużym błędem, dlatego przyjęto, że wielkość ta nie jest związana z dodatkową ruchliwością PPIX i wynika z błędu obliczeniowego.



Rysunek 6.40. Przykładowy zanik anizotropii fluorescencji PPIX w kompleksie z wt- α_1 M. **A:** Warunki pomiaru jak dla rysunku 6.39. Kolorem czarnym przedstawiono różnicę intensywności fluorescencji zmierzonej przy wertykalnym i horyzontalnym ustawieniu analizatora, kolorem szarym – profil aparaturowy. Zielona linia ciągła przedstawia dopasowanie funkcji dwueksponencjalnej do danych doświadczalnych. **B:** Rozkład residuów dla wybranego modelu zaniku anizotropii fluorescencji.

Wartość dłuższego czasu rotacyjnej korelacji (θ_l) odpowiada dobrze wartości teoretycznej obliczonej dla monomeru α_1 M (11,37 ns) i jest jednakowa (w granicach błędu) dla form wt, wt Δ LIPR oraz K(3)T. Dla obydwu mutein pozbawionych reszty Cys

34 czas θ_l ulega wydłużeniu, wzrasta również nieznacznie wartość obserwowanego promienia hydrodynamicznego (r_h) obliczonego w oparciu o wartość tego parametru, przy założeniu sferyczności rotującego obiektu. Anizotropia początkowa przyjmuje wartość ok. 0,15, jednakową, w granicach błędu, dla każdego z badanych białek. Wszystkie wyznaczone parametry zebrano w tabeli 6.12.

7. DYSKUSJA

Badanie fizykochemicznego mechanizmu oddziaływania białek z innymi biomolekułami jest niezwykle istotnym krokiem na drodze do poznania ich funkcji. Na poziomie strukturalnej charakterystyki miejsc wiążących ligand w cząsteczce białka często stosuje się technikę wprowadzania mutacji punktowych i obserwuje zmiany parametrów fizykochemicznych oraz biochemicznych danego białka.

Jak dotąd nie udało się poznać struktury trzeciorzędowej α_1M w badaniach krystalograficznych, niepowodzeniem zakończyły się również dotychczasowe próby zastosowania w tym celu spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego – NMR. Dążąc do uzyskania informacji o wybranych aspektach struktury α_1M w roztworze, w niniejszej pracy posłużono się szczególnie nadającymi się do tego celu różnymi technikami spektroskopii fluorescencyjnej [Brown i Royer, 1997; Albani, 2004]. Na podstawie widm fluorescencyjnych można wnioskować o otoczeniu zastosowanej w badaniach sondy fluorescencyjnej oraz śledzić zmiany w nim zachodzące pod wpływem np. wiązania liganda. Często wykorzystuje się naturalnie występujące w białkach fluorofory, głównie reszty tryptofanowe, których fluorescencja jest bardzo czuła na wszelkie zmiany środowiska. Technika rozdzielczej w czasie anizotropii fluorescencji daje możliwość oceny rozmiarów i/lub kształtu badanego układu oraz jego dynamiki w roztworze. Z kolei wykorzystując chiralność łańcucha polipeptydowego możliwe jest wyznaczenie zawartości poszczególnych struktur drugorzędowych w badanym białku z zastosowaniem pomiarów dichroizmu kołowego.

7.1. WPŁYW MUTACJI PUNKTOWYCH NA WŁAŚCIWOŚCI LUDZKIEJ α_1 -MIKROGLOBULINY

Do charakterystycznych cech α_1M , które zachowane są we wszystkich przebadanych dotąd gatunkach, należą heterogeniczność ładunku oraz obecność chromoforu nadającego białku żółtobrazowe zabarwienie [Åkerström i inni, 2000]. Wszystkie białka rekombinowane przebadano pod kątem tych właściwości. Oceniono równocześnie poprawność fałdowania oraz dynamikę w roztworze.

Widma absorpcyjne i fluorescencyjne α_1M wskazują na zdecydowanie mniejszą zawartość charakterystycznego dla α_1M chromoforu w białkach rekombinowanych, w porównaniu z odpowiednikami z osocza krwi i moczu ludzkiego. W przypadku tych

ostatnich większa intensywność oraz złożoność zmierzonych widm świadczy o bardziej rozbudowanej strukturze bądź obecności kilku grup chromoforowych. W pracy [Allhorn i inni, 2002] pokazano, że w wyniku reakcji pomiędzy α_1 M oraz poddanymi lizie erytrocytami dochodzi do uwolnienia C-końcowego tetrapeptydu LIPR oraz utworzenia silnie zabarwionej formy t- α_1 M. W komórkach erytrocytów zachodzi powolny proces autooksydacji hemoglobiny z utworzeniem niestabilnych form, łatwo ulegających denaturacji. Formy te, jak również niezwiązany hem oraz żelazo, odkładają się w błonie komórkowej czerwonych krwinek, po jej stronie cytozolowej [Browne i inni, 1998]. Wspomniana reakcja α_1 M zachodzi w kontakcie z frakcją cytozolową czerwonych krwinek, jak i samą hemoglobina, jednak najszybciej przebiega w przypadku inkubacji białka z frakcją błonową erytrocytów. W wyniku powyższego procesu w widmie absorpcyjnym ludzkiej α_1 M pojawia się pik o maksimum przy długości fali 410 nm (charakterystyczny dla absorpcji hemu) oraz szerokie pasmo w zakresie 300-500 nm. Analogiczne składowe można wyróżnić w przedstawionych w niniejszej pracy widmach absorpcyjnych rekombinowanych form α_1 M (por. rys. 6.2, str 42). Różnice w widmach uzyskanych dla poszczególnych wariantów białka wskazują na to, że wszystkie spośród poddanych mutacjom reszty aminokwasowe są istotne dla procesu wiązania oraz tworzenia charakterystycznego chromoforu. Obecność reszty Cys34 wydaje się kluczowa dla etapu wiązania liganda, reszty lizynowe są konieczne dla jego transformacji do chromoforu, hamowanej częściowo przez tetrapeptyd LIPR.

Jako chromofor związany do reszt lizynowych α_1 M wyizolowanej z moczu pacjentów hemodializowanych zidentyfikowano hydroksantomatynę, jedną z pochodnych kinureniny, których absorpcję charakteryzuje szerokie pasmo w zakresie 300-600 nm [Sala i inni, 2004]. Tworzenie pochodnych kinurenylowych zaobserwowano także w hemoglobinie poddanej działaniu nadtlenu wodoru [Jia i inni, 2007]. Fakt ten narzuca intrygujące pytanie o możliwość powstania zidentyfikowanych przez Salę i współpracowników chromoforów analogiczną drogą, w wyniku oddziaływania kompleksu α_1 M-hem z endogennym H_2O_2 . α_1 M wykazuje właściwości reduktazy w stosunku do cytochromu c, jonów żelaza (III) i błękitu nitrotetrazolowego, działając za pośrednictwem anionu ponadtlenkowego, jak również redukuje methemalbuminę wykorzystując inny mechanizm działania [Allhorn i inni, 2005]. Białko wyizolowane z osocza krwi, a w szczególności α_1 M z płynu owodniowego, wykazują słabszą absorpcję w regionie charakterystycznym dla chromoforu. Ta ostatnia również wykazuje mniejszą niejednorodność pod względem

ładunku. Prawdopodobne jest więc, że charakterystyczne zabarwienie α_1M powstaje w wyniku reakcji białka z różnymi substancjami i jej udziału w różnorodnych procesach. W pracy [Kłapyta, 2001] pokazano, że tworzeniu chromoforu sprzyja środowisko utleniające. Rekombinowana wt- α_1M , produkowana i oczyszczana z zastosowaniem pożywek i buforów zawierających kwas askorbinowy, była bezbarwna i nie wykazywała cech spektralnych charakterystycznych dla chromoforu.

W trójwymiarowych widmach fluorescencji rekombinowanych α_1M wyróżnia się pojedynczy pik o maksimum wzbudzenia przy około 320 nm i maksimum emisji przy około 400 nm (por. rys. 6.3, str. 43). Pasma to występuje jedynie w przypadku form posiadających resztę cysteinową w pozycji 34 i wykazuje największą intensywność dla muteiny K(3)T- α_1M . Znacznie bardziej rozbudowane widma fluorescencji uzyskano dla białek wyizolowanych z krwi i moczu ludzkiego, w których maksima dwóch głównych pików położone są przy długościach fali wzbudzenia i emisji równych, odpowiednio, około 350 i 450 nm oraz 425 i 495 nm. Taki obraz fluorescencji sugeruje obecność wielu różnych frakcji fluoroforów w puli ludzkiej α_1M , w porównaniu ze znacznie mniejszą różnorodnością grup związanych z odpowiednikami rekombinowanymi. Wynika to zapewne z faktu, że α_1M wyizolowana z ludzkich płynów ustrojowych reprezentuje białko, które miało możliwość uczestniczenia w procesach stanowiących o jego biologicznej roli, w przeciwieństwie do białek rekombinowanych. We wcześniejszej pracy zaobserwowano wzrost intensywności fluorescencji chromoforu oraz przesunięcie maksimum emisji z około 464 nm do 482 nm w wyniku redukcji i denaturacji białka [Berggård i inni, 1999b]. Można przy tym zauważyć wyraźnie asymetryczny kształt widma uzyskanego w przypadku białka zdenaturowanego. Nagababu i Rifkind zaobserwowali, że w wyniku reakcji oksyhemoglobiny z nadtlakiem wodoru (również na drodze autooksydacji białka) dochodzi do degradacji hemu z uwolnieniem atomu żelaza [Nagababu i Rifkind, 1998, 2000]. W efekcie powstają fluoryzujące produkty, charakteryzowane przez dwa piki o maksimach wzbudzenia i emisji położonych odpowiednio przy 321 i około 460 nm oraz 465 i 525 nm. Pierwszy z nich powstaje również *in vivo*, gdzie reakcji ulega hemoglobina związana do błon komórkowych czerwonych krwinek [Nagababu i inni, 2010]. Substancja ta powstaje także w wyniku działania nadtlenu wodoru na niezwiązany hem i w postaci nieskompleksowanej charakteryzuje się maksimum fluorescencji położonym przy długości fali 442 nm. Związanie do oksy- lub methemoglobiny powoduje przesunięcie pasma emisji odpowiednio do 465 lub 480 nm. Ludzka α_1M oddziałuje z błonami erytrocytów, w

wyniku czego tworzy się forma t- α_1 M pozbawiona C-końcowego tetrapeptydu, o wysokiej zawartości charakterystycznego chromoforu [Allhorn i inni, 2002]. Podobna reakcja zachodzi również pomiędzy wyizolowaną methemoglobiną i α_1 M. Podobieństwo charakterystyki spektralnej oraz okoliczności wytworzenia w warunkach *in vitro* chromoforu α_1 M oraz obserwowanych w przypadku hemoglobiny produktów fluorescencyjnych degradacji hemu pozwalają spekulować o ich zbliżonej naturze.

Badanie metodą izoelektroogniskowania pozwoliło na porównanie białek rekombinowanych pod kątem ładunku i jego heterogeniczności. Względne różnice wartości pI pomiędzy poszczególnymi formami α_1 M są zgodne z oczekiwaniami, zauważyć można jednak niezgodność danych doświadczalnych z wartościami obliczonymi teoretycznie. W białku natywnym reszty aminokwasowe o charakterze kwaśnym są prawdopodobnie w większym stopniu wyeksponowane do roztworu, podczas gdy reszty zasadowe pozostają w znacznej mierze ukryte wewnątrz cząsteczki białka. Takie rozumowanie znajduje poparcie we wcześniejszych pracach. Wartości pI ludzkiej α_1 M uzyskane w warunkach denaturujących leżą w zakresie 5,6-6,4 [Vincent i inni, 1987], natomiast w warunkach niedenaturujących – w zakresie 4,0-4,9 [Vincent i inni, 1987] lub 4,3-4,8 [Lopez i inni, 1982]. W przypadku wt-, wt Δ LIPR- i C34S- α_1 M uzyskano jeden główny prążek, co sugeruje względną jednorodność pod względem ładunku (por. rys. 6.4A, str. 45). Wynik uzyskany dla form K(3)T i C34S/K(3)T – obecność kilku słabych prążków w elektroforegramie, wskazuje na niejednorodność pod względem ładunku. Widma absorpcyjne i fluorescencyjne muteiny K(3)T i białka rekombinowanego typu dzikiego nie wykazują większych różnic (za wyjątkiem względnej intensywności obserwowanych pasm), a te uzyskane dla muteiny C34S/K(3)T wskazują na nieobecność chromoforu. Dlatego taki wynik IEF nie jest związany ze zróżnicowaniem na poziomie grup chromoforowych. Ze względu na warunki prowadzenia eksperymentu (bufor pozbawiony dodatku soli) stabilność badanych białek była zmniejszona, a zatem możliwa była wzmożona agregacja, zwłaszcza w przypadku białek o większej liczbie wprowadzonych mutacji. Prawdopodobne jest, że ładunek powierzchniowy form białka o różnym stopniu oligomeryzacji jest odmienny, w wyniku czego obserwuje się prążki przy kilku wartościach pI. Obecność reszt kwasu sjałowego w ludzkiej α_1 M tłumaczy niższą wartość pI w porównaniu z białkami rekombinowanymi, które obdarzone są dodatkowym ładunkiem dodatnim etykiety histydynowej.

Wyniki elektroforezy w warunkach niedenaturujących oraz sączenia molekularnego

świadczą o tendencji wszystkich rekombinowanych α_1M do tworzenia dimerów oraz wyższych oligomerów (por. rys. 6.4 B, str. 45 oraz rys. 6.5 i tabela 6.1, str. 46), podobnie jak obserwowano wcześniej w przypadku ludzkiej α_1M wyizolowanej z moczu i osocza krwi [Ekström i Berggård, 1977; Berggård i inni, 1997; Sala i inni, 2004]. Zjawiska tego nie udało się zmniejszyć stosując wysokie stężenie soli, dodatek substancji redukującej (DTT), lub łagodnego detergentu (OG) (por. rys. 6.6, str. 47). Muteina C34S zawierała tylko niewielką ilość wyższych oligomerów, natomiast frakcja dimerów była praktycznie nieobecna. Nieco wyższą tendencję do oligomeryzacji zaobserwowano natomiast w przypadku muteiny K(3)T, która wykazywała również wyższą niż białko typu dzikiego absorpcję oraz fluorescencję w rejonie charakterystycznym dla chromoforu. Analogicznie, silnie zabarwiona α_1M wyizolowana z moczu łatwo tworzy dimery i wyższe agregaty, podczas gdy jej odpowiednik z płynu owodniowego pozostaje w formie monomerycznej [Sala i inni, 2004]. Również zabarwione peptydy powstałe w wyniku trawienia białka trypsyną tworzyły trwałe kompleksy [Berggård i inni, 1999b]. Sugeruje to, że chromofor α_1M jest zaangażowany w proces oligomeryzacji, co *in vivo* może służyć jego odizolowaniu i zabezpieczeniu środowiska przed jego szkodliwym działaniem (por. rozdział 7.4).

W niedawno opublikowanej pracy [Kozak i Grubb, 2007] badano ludzką α_1M metodą niskokątowego rozpraszania promieni Roentgena (ang. SAXS – *Small Angle X-ray Scattering*). Wyznaczono masy cząsteczkowe białka w formie monomeru oraz dimeru, równe odpowiednio 25 oraz 51 kDa. Maksymalną długość cząsteczki monomeru obliczono na 6,3 nm, natomiast dimeru - 9,5 nm. Stosunek tych wartości jest bliski 2:3, co może tłumaczyć położenie pików elucji frakcji monomeru i dimeru uzyskanych metodą sączenia molekularnego (w której kształt i wielkość cząsteczek migrujących ma podstawowe znaczenie) zamieszczonych w niniejszej pracy oraz wartości mas cząsteczkowych wyznaczonych na tej podstawie i równych odpowiednio około 22 kDa i około 30 kDa (por. rys. 6.5, str. 46). Według modelu przestrzennego zamieszczonego we wspomnianej pracy monomery α_1M są względem siebie ułożone w taki sposób, że częściowo stykają się od strony wejścia do kieszeni lipokalinowej. Jest to w niejaki sprzeczności z charakterystyką struktury tego białka podaną we wcześniejszym artykule [Villoutreix i inni, 2000], w którym model α_1M uzyskano metodą „klasycznego modelowania” bazując na strukturze krystalograficznej innej lipokaliny, MUP (ang. *major urinary protein*). Według tego modelu na tzw. „otwartym końcu” α_1M (por. rys. 3.4, str. 18) znajduje się rejon dodatnio

naładowany, w którym umiejscowione są liczne reszty argininowe (w pozycjach 43, 66, 68, 166 łańcucha polipeptydowego), lizynowe (w pozycjach 38, 69 i 94) oraz histydynowe (w pozycjach 122 i 123). Zgodnie z powyższym, kontakt dwóch cząsteczek białka w obrębie tego rejonu byłby energetycznie niekorzystny, ze względu na wzajemne odpychanie dodatnio naładowanych obszarów. Można jednak spekulować, że kontakt zachodzi za pośrednictwem związanych ligandów, które zaburzają ten niekorzystny ze względu na wzajemne oddziaływanie monomerów α_1M rozkład ładunków.

Widma dichroizmu kołowego wszystkich badanych białek wykazują podobny przebieg, z minimum przy długości fali około 214 nm, charakterystycznym dla struktury β -arkusza. Pomimo nieznacznych odchyłeń w intensywności uzyskanych widm dichroizmu kołowego, obliczenia nie wykazały różnic w zawartości poszczególnych typów struktury drugorzędowej w badanych rekombinowanych formach oraz ludzkich naturalnych α_1M . Warto jednak wspomnieć, że współczynniki korelacji pomiędzy wartościami uzyskanymi ze struktur krystalograficznych oraz wyliczonymi za pomocą wspomnianych programów wynoszą odpowiednio: dla regularnej α -helisy – ok. 0,93, dla zaburzonej α -helisy i zaburzonego arkusza β – blisko 0,80, powyżej 0,60-0,65 w przypadku struktury regularnego arkusza β , a najniższą zgodność, w granicach 0,30-0,45, uzyskuje się dla struktur β -skrętu i nieuporządkowanej [Sreerama i Woody, 2000].

Metodą rozdzielczej w czasie anizotropii fluorescencji badano właściwości hydrodynamiczne form wt- α_1M oraz wt Δ LIPR- α_1M wyznakowanych 1,5-I-AEDANS. Znacznik ten wiąże się kowalencyjnie do reszt sulfhydrylowych cysteiny [Hudson i Weber, 1973]. W przypadku α_1M jest nią jedyna wolna, silnie reaktywna reszta cysteinowa w pozycji 34. W przypadku obydwu znakowanych białek położenie maksimum pasma fluorescencji znacznika odpowiada środowisku o charakterze hydrofobowym zbliżonym do etanolu (por. rys. 6.16, str. 59). Przyjmuje się, że takie warunki panują we wnętrzu białka [Nozaki i Tanford, 1972], co wskazywać może na wiązanie AEDANS w kieszeni lipokalinowej. Potwierdzałoby to lokalizację reszty Cys 34 w pobliżu otwartego końca α_1M , jak sugeruje model przedstawiony w pracy [Villoutreix i inni, 2000]. W pomiarach rozdzielczej w czasie anizotropii fluorescencji znakowanego 1,5-I-AEDANS białka stwierdzono tylko jeden czas rotacyjnej korelacji o wartości około 14 ns, który należy przyporządkować rotacji całej cząsteczki α_1M . Jego wartość jest bliska teoretycznej, obliczonej dla modelu monomeru α_1M . Odchylenie wynikać może z nieobecności w zastosowanym modelu C-terminalnego fragmentu łańcucha oraz N-terminalnej etykiety

histrydnowej i miejsca cięcia enzymu enterokinazy, obecnych w rzeczywistych konstrukcjach, jak również z większej od zakładanej hydratacji łańcucha polipeptydowego. Na tej podstawie można przypuszczać, że w badanym zakresie stężeń α_1M występuje w postaci monomerycznej. Wartość obserwowanego promienia hydrodynamicznego, obliczonego przy założeniu sferyczności rotującego obiektu, wynosi około 2,4 nm. Pomiary sączenia molekularnego wykonane były w stężeniach 20-krotnie wyższych, co może tłumaczyć wzrost stopnia agregacji. Nie można jednakże wykluczyć możliwości ukrycia reszty Cys34 w wyniku tworzenia dimerów oraz wyższych oligomerów, przez co staje się ona niedostępna dla substancji znakującej (1,5-I-AEDANS). W tym wypadku wyznakowaniu ulegałyby tylko frakcja monomeryczna α_1M .

7.2. BADANIA SPEKTROFOTOMETRYCZNE WIĄZANIA HEMU I PROTOPORFIRYNY IX PRZEZ α_1 -MIKROGLOBULINĘ

Zarówno hem jak i jego prekursor, PPIX, stanowią trudny materiał do badań oddziaływań z białkami, ze względu na niezwykle słabą rozpuszczalność w roztworach wodnych i zdolność tworzenia dimerów oraz wyższych agregatów [Brown i inni, 1970; 1976]. Z tego względu w badaniach stosowano stężony roztwór PPIX w 64% etanolu, który dodawano bezpośrednio do roztworu białka. W stosowanym zakresie stężeń rozpuszczalnik ten nie wywoływał zmian w strukturze białek, jak również w ich właściwościach spektroskopowych, wykorzystywanych w badaniach oddziaływania z ligandem (wyniki niepokazane w niniejszej pracy). Hem rozpuszczano w 0,1 M NaOH, a następnie rozcieńczano buforem, w którym wykonywano pomiar. Roztwory obydwu stosowanych w badaniach ligandów przygotowywane były zawsze w dniu pomiaru i przechowywane bez dostępu światła.

W widmie absorpcyjnym porfiryn wyróżnia się intensywne pasmo B, zwane również pasmem Soreta, położone w rejonie od 350 do około 450 nm oraz cztery niewielkie pasma Q, zlokalizowane w obszarze widzialnym, w zakresie długości fali 500-700 nm. Pasma B powstaje na skutek przejść elektronowych pomiędzy orbitalami HOMO (ang. *highest occupied molecular orbital*) i LUMO (ang. *lowest unoccupied molecular orbital*) atomów węgla pierścienia tetrapirrolowego. Pasma Q (numerowane od I-IV w kierunku fal krótszych) powstają na skutek przejść elektronowych pomiędzy orbitalami atomów azotu pierścieni pirolowych. Ich względna intensywność zależy od podstawników pierścienia porfirynowego. Widmo absorpcyjne porfiryn zależy od ich stopnia agregacji.

W przypadku form monomerycznych w obszarze pasma Soreta obserwuje się pojedynczy pik o wysokim współczynniku absorpcji. Tworzeniu dimerów i wyższych oligomerów towarzyszą efekty hipso- i hipochromowy oraz wyraźne poszerzenie pasma absorpcji. Przyłączenie atomu metalu powoduje wzrost symetrii układu i degenerację poziomów energetycznych. W efekcie w widmie absorpcyjnym metaloporfiryn obecne są tylko dwa pasma Q, oznaczane α i β , powstałe w wyniku połączenie odpowiednio pasm I i III oraz II i IV [Owens i O'Connor, 1988].

Tabela 7.1. Położenia pasm absorpcyjnych oraz emisyjnych PPIX w zależności od pH roztworu wodnego, w DMSO oraz w kompleksie z globinami.

Warunki	Położenie pasma B [nm]	Położenie pasma Q [nm]				λ_{em} [nm]
		IV	III	II	I	
woda pH=1 ^a	406	516	554	600	626	604; 660
woda pH=5 ^a	352, 450	534	566	594	644	620; 676
woda pH=12 ^a	382	510	545	578	626	624; 684
DMSO ^a	408	506	542	577	630	-
α Hb-PPIX ^b	405,6	506,8	541,6	570,8	623,0	627; 692
β Hb-PPIX ^b	405	505,5	540,5	572,5	624,5	630; 691,5
$\alpha\beta$ Hb-PPIX ^b	403,5	506	541,5	571,0	624,0	628; 692
apoHb-PPIX ^c	402,5	506	541	568	622	624
apoMb-PPIX ^c	409	508	543	574	626	628
α_1 M-PPIX	380	510	545	580	635	629; 670

^a dane zaczerpnięte z pracy [Scolaro i inni, 2002]

^b dane zaczerpnięte z pracy [Sudhakar i inni, 1994]

^c dane zaczerpnięte z pracy [Postnikova i Yumakova, 1991]

Widmo absorpcyjne PPIX związanej z α_1 M wykazuje bardzo duże podobieństwo do widma jej kompleksu z mioglobina, jak również hemoglobina oraz jej podjednostkami [Sudhakar i inni, 1994; Postnikova i Yumakova, 1991]. Jediną różnicę stanowi położenie pasma B (Soreta), które w przypadku kompleksów z α_1 M jest znacznie przesunięte w kierunku fal krótszych (por. rys. 6.24 i tabela 6.7, str. 67). W pracy [Scolaro i inni, 2002] wykonano badania stopnia agregacji PPIX w roztworach wodnych, w zależności od wartości pH oraz siły jonowej. Podane w powyższej pracy położenia maksimum pasma Soreta oraz pasm Q (za wyjątkiem niewielkiego odchylenia w przypadku pasma I) dla pH 12, w przypadku którego stwierdzono występowanie formy dimerycznej PPIX, doskonale

zgadza się z widmem uzyskanym dla kompleksu PPIX z $\alpha_1\text{M}$ (por. tabela 7.1). Pozostałe wyniki uzyskane w niniejszej pracy (położenie pasm fluorescencji oraz czas życia fluorescencji) pozostają jednak w sprzeczności z taką tezą i wykazują cechy charakterystyczne dla monomeru PPIX. W tej sytuacji najlepszą interpretacją jest założenie oddziaływania pomiędzy PPIX a resztami aminokwasowymi o charakterze polarnym, znajdującymi się w bezpośrednim jej otoczeniu, których nie obserwuje się w wymienionych białkach wiążących hem i/lub porfiryny. Oddziaływania typu dipol-dipol pomiędzy ligandem a otoczeniem powodują przesunięcie pasma absorpcji w stronę fal krótszych, natomiast przesunięcie batochromowe obserwuje się w środowisku apolarnym, w którym wspomniane oddziaływania są słabe [Albani, 2004]. Według modelu $\alpha_1\text{M}$ [Villoutreix i inni, 2000] wokół wejścia do kieszeni lipokalinowej znajdują się liczne grupy o charakterze zasadowym, co może tłumaczyć obserwowane położenie pasma Soreta. Ponadto reszty te mogą wykazywać działanie przyciągające ligand obdarzony ładunkiem ujemnym, z kolei w cząsteczce PPIX znajdują się dwa podstawniki 2-karboksyetylowe. Taka sytuacja stwarza więc warunki sprzyjające oddziaływaniu białko-ligand w badanym układzie.

Tabela 7.2. Położenia pasm absorpcyjnych oraz pierwszego pasma fluorescencji PPIX w różnych rozpuszczalnikach.

Rozp.	pasmo B	IV	III	II	I	λ_{em}
Woda	400	506	541	568	621	623
DMSO	405	504	539	575	629	631
DMF	406	505	539	575	631	632
Metanol	403	504	539	574	629	632
Etanol	401	503	538	576	627	632
Dioxan/H ₂ O	402	503,5	538	574	630	-
Dioxan	405	504	538	575	630,5	635

Dane na podstawie pracy [Albani, 2004]

Pomiary metodą miareczkowania spektrofluorymetrycznego wskazują na obecność dwóch miejsc wiążących PPIX o jednakowej stałej wiązania. Najprawdopodobniej obydwie cząsteczki wiążą się w kieszeni lipokalinowej, a zatem ich odległość wzajemna jest niewielka. Można zatem również spekulować, że dochodzi do oddziaływań pomiędzy pierścieniami porfirynewymi, co skutkuje położeniem pasma Soreta w pozycji

charakterystycznej dla formy dimerycznej PPIX.

Ze względu na drastyczny spadek wydajności kwantowej oraz czasu życia fluorescencji w wyniku tworzenia dimerów oraz wyższych agregatów, za emisję odpowiedzialna jest głównie forma monomeryczna PPIX [Albani, 2004]. Potwierdza to obraz widma wzbudzenia porfiryn, w którym brak ramienia lub piku położonego w okolicy 360 nm, charakterystycznego dla form oligomerycznych [Richelli, 1995]. Zmierzone widmo fluorescencji PPIX w buforze wykazuje obecność dwóch pasm. Położenie głównego pasma emisyjnego przy długości fali równej 622 nm wskazuje na postać monomeryczną PPIX [Richelli, 1995]. Maksimum drugiego pasma leży przy długości fali 686 nm. Zmiany w obrazie widma zachodzące pod wpływem dodatku białka mają różny przebieg, w zależności od początkowego stężenia PPIX. Przy niższej jego wartości (0,5 μM) obserwuje się stopniowy spadek intensywności obydwu pasm fluorescencji, przy czym maksimum pasma głównego nie zmienia swego położenia, natomiast maksimum drugiego pasma przesuwa się w stronę fal krótszych. Gdy początkowe stężenie liganda jest nieco wyższe (2 μM) pod wpływem wzrostu stężenia $\alpha_1\text{M}$ obserwuje się początkowo silne wygaszanie fluorescencji (szybki spadek intensywności obydwu pasm), a następnie stopniowy wzrost intensywności i przesuwanie się maksimum głównego pasma w kierunku fal dłuższych, do pozycji $\lambda_{\text{max}} = 629$ nm, natomiast drugiego pasma w kierunku fal krótszych, do $\lambda_{\text{max}} = 670$ nm. Różny przebieg obserwowanych zmian w zależności od stężenia liganda wskazuje na dwufazowość przebiegającego procesu. W niższych stężeniach liganda obserwuje się fazę pierwszą, podczas gdy wyższe stężenie PPIX pozwala na zaobserwowanie drugiej fazy procesu wiązania. Zmiana położenia pasma głównego jest zgodna z ogólną tendencją obserwowaną w przypadku przejścia monomerycznej PPIX ze środowiska wodnego do apolarnego (tabele 7.1 i 7.2 oraz [Kuszaj i inni, 1996]). Niespodziewane i trudne do zinterpretowania jest natomiast zachowanie drugiego pasma emisyjnego. W przypadku wiązania PPIX przez hemopeksynę lub albuminę obydwa pasma przesuwają się w stronę fal dłuższych, przy przejściu od formy niezwiązanej do kompleksu z białkiem [Lamola i inni, 1981]. Analogiczne przesunięcie pasm fluorescencji obserwuje się również w przypadku wiązania hematoporfiryny przez lipoproteiny [Beltramini i inni, 1987]. Najwyraźniej w miejscu wiążącym $\alpha_1\text{M}$ dochodzą do głosu oddziaływania innej natury, na co wskazano wcześniej przy omawianiu widm absorpcyjnych. Podobny charakter zmian intensywności fluorescencji (początkowy spadek, a następnie wzrost sygnału wraz ze wzrostem stężenia białka) obserwowano w

pomiarach szybkiej kinetyki wiązania PPIX do wt- α_1 M.

Widma absorpcyjne hemu w buforze oraz w kompleksie z wt- α_1 M znacznie się różnią (por. rys. 6.18A, str. 61). Położenie i kształt pasma Soreta w przypadku niezwiązanego hemu wskazują na jego dimeryzację. W obecności białka wzrasta intensywność pasma Soreta, a jego maksimum przesuwają się w stronę fal dłuższych, pozostaje ono jednak asymetryczne, z mniejszym ramieniem przy około 365 nm. Podobne zmiany w widmie absorpcyjnym hemu obserwowano wcześniej pod wpływem jego wiązania do różnych białek, w tym do albuminy i hemopeksyny [Kuželová i inni, 1997]. Asymetryczna postać pasma Soreta obserwowana jest również w methemalbuminie oraz peroksydazie chrzanowej [Kamal i Behere, 2002]. Analogiczne widmo absorpcyjne ludzkiej α_1 M w tym rejonie zaobserwowano wcześniej, w wyniku jej inkubacji z methemoglobina unieruchomioną na podłożu agarozowym [Allhorn i inni, 2002; Larsson i inni, 2004], co wskazywać może na wiązanie liganda w postaci monomerycznej. W niniejszej pracy zaobserwowano zmianę położenia pasma Soreta w zależności od stosunku stężeń białko:hem. W przypadku mieszanin w stosunku molowym 1:1 maksimum główne pasma Soreta leży przy długości fali 404 nm, podczas gdy mieszanina 1:3 wykazuje maksimum przy około 396 nm (por. rys. 6.18B, str. 61). Widoczna jest również różnica w kształcie widma kompleksu białko-hem utworzonego w wyniku jednorazowego dodatku stężonego roztworu hemu do białka, oraz w wyniku jego stopniowego miareczkowania tym ligandem. W tym ostatnim przypadku uzyskane widmo najbardziej przypomina widmo methemalbuminy przedstawione w pracy [Adams i Berman, 1980]. Powyższe różnice mogą świadczyć o złożonym przebiegu procesu wiązania. W roztworach wodnych hem obecny jest w formie monomerów oraz dimerów, znajdujących się w stanie równowagi [Brown i inni, 1970]. Obecność białka oraz wiązanie monomerycznej formy hemu zaburza tę równowagę. Przy każdorazowym dodatku niewielkiej porcji roztworu hemu stężenie końcowe wolnego liganda w próbce jest niskie, faworyzując obecność formy monomerycznej. Przy wyższych stężeniach hem występuje w przeważającej części jako dimer. W pracy [Kuželová i inni, 1997] podobne powolne zmiany, obserwowane w widmie absorpcyjnym hemu w roztworze wodnym po dodaniu hemopeksyny lub albuminy, interpretowano jako wynik rozpadu dimerycznej formy hemu do monomerów i wiązania tej ostatniej formy do białka. Wyniki uzyskane dla kompleksów PPIX z α_1 M wskazują, że w tym przypadku dochodzi najprawdopodobniej do wiązania formy monomerycznej liganda. Ze względu na bardzo zbliżone wartości stałych dysocjacji oraz

ogólną charakterystykę procesu wiązania obserwowaną dla PPIX i hemu można przypuszczać, że również w tym drugim przypadku wiązaniu ulega jedynie monomer. Nie można jednak wykluczyć, że α_1M jest zdolna do wiązania hemu w postaci zarówno dimerycznej jak i monomerycznej, jak również, że forma dimeryczna hemu ulega pod wpływem związania do białka powolnej dysocjacji do monomerów. Pasma Q hemu w buforze położone są przy długościach fali 495 i 615 nm. Po związaniu z białkiem pojawia się szerokie pasmo ze słabo zarysowanym pikiem o maksimum przy ok. 530 nm (stechiometria 1:1) lub 535 nm (stechiometria 1:3) oraz ramieniem w okolicy 565 nm, pasmo w okolicy 615 nm pozostaje niezmienione. Dokładna analiza położenia poszczególnych pasm widma pozwala na ustalenie natury ligandów aksjalnych oraz stanu spinowego atomu żelaza [Owens i O'Connor, 1988]. W widmach absorpcyjnych kompleksów, w których atom żelaza jest w stanie wysokospinowym, pasmo Soreta położone jest przy niższych długościach fali (około 400 nm) i obecne są pasmo CT1 (ang. *charge transfer*) w regionie 600-650 nm i CT2 w regionie 480-510 nm. Z kolei kompleksy niskospinowe charakteryzuje przesunięte batochromowo pasmo Soreta (około 420 nm) oraz pasma α i β , leżące odpowiednio w okolicach 555-600 nm i 525-555 nm [Brill i Sandberg, 1968]. W przypadku kompleksów o mieszanym stanie spinowym obserwuje się większość lub wszystkie te pasma. W pracy [Nanzyo i Sano, 1968] zaobserwowano, że pod wpływem oddziaływania heminy c z histydyną dochodziło do przesunięcia pasma Soreta z 392 do 398 nm oraz zaniku pasm Q położonych przy długościach fali 495 i 615 nm, wraz ze stopniowym pojawianiem się nowego pasma z maksimum przy 530 nm. W okolicach 615 nm położone jest pasmo przeniesienia ładunku CT1, charakterystyczne dla sześciokoordynowanego wysokospinowego stanu atomu żelaza hemowego, które występuje w przypadku, gdy jednym z ligandów hemu jest cząsteczka wody [Nanzyo i Sano, 1968; Vitagliano i inni, 2004]. Można zatem przypuszczać, że w kompleksie z wt- α_1M żelazo hemowe znajduje się częściowo w stanie wysokospinowym, a częściowo w stanie niskospinowym. Bardzo zbliżony obraz zmian widma absorpcji heminy zaobserwowano w następstwie jej wiązania z białkiem rekombinowanym CcmE, co zinterpretowano jako tworzenie kompleksu wysokospinowego [Stevens i inni, 2003]. Ze względu na podobny charakter konstruktów użytych w niniejszej pracy, warto wspomnieć, że w powyższym artykule badano wpływ etykiety histydynowej na wiązanie hemu przez białko CcmE. Widmo o praktycznie identycznym kształcie do otrzymanego w przypadku α_1M (charakteryzujące się szerokim, asymetrycznym pasmem Soreta w pobliżu 400 nm)

uzyskano tam dla kompleksu heminy z białkiem pozbawionym etykietyki histydynowej, podczas gdy kompleks hemu z białkiem zaopatrzonym w tę etykietykę dawał widmo o symetrycznym pasmie z maksimum przy 413 nm [Daltrop i inni, 2002]. Również w przypadku badania kompleksów hemu z rekombinowanymi domenami białka HRI odnotowano podobne różnice w obrazie widm absorpcyjnych. Konstrukt zaopatrzony w etykietykę histydynową [Rafie-Kolpin i in., 2000] wykazywał cechy charakterystyczne dla kompleksu z atomem żelaza w stanie niskospinowym (maksimum pasma Soreta przy 415 nm), natomiast białko jej pozbawione dawało widmo typowe dla kompleksów z atomem żelaza w stanie wysokospinowym (szerokie pasmo położone w okolicach 400 nm) [Hirai i inni, 2007]. Można zatem przypuszczać, że w przypadku badanych w niniejszej pracy rekombinowanych wariantów α_1M nie dochodzi do oddziaływań hemu z etykietyką histydynową, a obserwowane zmiany dotyczą specyficznego wiązania liganda w obrębie kieszeni lipokalinowej. Potwierdzają to również zamieszczone w niniejszej pracy wyniki badań wiązania PPIX, które wskazują na tworzenie kompleksu o zbliżonej charakterystyce (stałej dysocjacji i liczbie miejsc wiążących). W tym wypadku ligand pozbawiony jest atomu żelaza, a więc obecność etykietyki histydynowej nie powinna mieć wpływu na parametry jego wiązania. Ta część konstrukt białkowego nie miała również wpływu na prowadzoną przez α_1M reakcję redukcji cytochromu c [Allhorn i inni, 2005a], co pozwala wnioskować o jej oddaleniu od miejsca aktywnego.

Pomiary metodą miareczkowania spektrofluorymetrycznego wskazują na obecność najprawdopodobniej dwóch miejsc wiążących zarówno dla hemu, jak i PPIX. Wynik taki uzyskano śledząc zmiany fluorescencji zarówno reszt tryptofanowych białka, znacznika AEDANS związanego do białek wt oraz wt Δ LIPR, jak również PPIX. Również w pracy Larssona i współpracowników [Larsson i inni, 2004] wyznaczona z zależności Scatcharda wartość liczby miejsc wiążących hem dla monomeru ludzkiej α_1M wyniosła około 2,7. W powyższej publikacji podano wartość obserwowanej stałej dysocjacji kompleksu hemu z α_1M oraz IgA- α_1M równą odpowiednio 2,4 μ M i 1,6 μ M, zaznaczono jednak, że ze względu na ograniczenia zastosowanej metody, wartości te mogą być znacznie zaniżone. W niniejszej pracy uzyskano wartości obserwowanej stałej dysocjacji kompleksu białko-hem rzędu $6 \cdot 10^{-8}$ M dla form wt i wt Δ LIPR (por. tabela 6.3, str. 58), a więc ponad 26-krotnie mniejsze od powyższych. Podobne rozbieżności w wartościach stałych dysocjacji wyznaczonych tymi dwiema technikami (tj. dializy równowagowej oraz miareczkowania spektrofluorymetrycznego) zaobserwowano już wcześniej [Muresan i inni, 2001].

Interesujący jest fakt niespodziewanie silniejszego wiązania hemu i PPIX przez muteinę C34S- α_1 M, dla której wyznaczona wartość obserwowanej stałej dysocjacji wyniosła $1,5 \cdot 10^{-8}$ M (por. tabela 6.3 oraz tabela 6.6, str 66). Z kolei białko K(3)T- α_1 M wiązało zarówno hem jak i PPIX nieco słabiej od formy dzikiej. Można spekulować, że dodatkowo naładowane łańcuchy boczne reszt lizynowych α_1 M oddziałują z resztami kwasu propionowego obecnymi w PPIX i hemie, stabilizując kompleks białko-ligand. Ich nieobecność we wspomnianej muteinie zmniejsza siłę wiązania. Wartości pozornych stałych dysocjacji uzyskane w niniejszej pracy są zbliżone do znajdujących w literaturze danych dla kompleksów białek z niewielkimi ligandami i wskazują na specyficzne i stosunkowo silne wiązanie. Dla porównania stała dysocjacji kompleksu albuminy z hemem (dotycząca miejsca wiążącego o wysokim powinowactwie do hemu) jest rzędu 10^{-8} - 10^{-9} M [Beaven i inni, 1974; Adams i Berman, 1980], natomiast kompleksu albuminy z monomeryczną PPIX rzędu 10^{-9} M [Rotenberg i inni, 1987]. β -Laktoglobulina (BLG), inne białko z rodziny lipokalin, wiąże hem oraz PPIX z pozorną stałą dysocjacji równą odpowiednio $2,5 \cdot 10^{-7}$ M oraz $4 \cdot 10^{-7}$ M [Dufour i inni, 1990]. W innej pracy zaobserwowano wiązanie przez to białko dwóch cząsteczek monomerycznego hemu (w postaci kompleksu z tlenkiem węgla) ze średnią obserwowaną stałą dysocjacji równą $5 \cdot 10^{-7}$ M [Marden i inni, 1994]. BLG poza kieszenią lipokalinową posiada również zewnętrzną szczelinę, co do której istnieją doniesienia, że wiąże retinol oraz kwas retinowy [Monaco i inni, 1987; Lange i inni, 1998]. Stałe dysocjacji rzędu 10^{-8} M wyznaczano dla kompleksów innych lipokalin z różnymi ligandami, np. dla kompleksów bilirubiny i biliwerdyny z syntazą prostaglandyny D [Beuckmann i inni, 1999] oraz dla białek wiążących retinol z ich ligandem [Noy i Blaner, 1991]. Wartości stałych obserwowanych dysocjacji wyznaczone w różnych temperaturach są zgodne w granicach błędów, co może wskazywać, że proces wiązania badanych ligandów do α_1 M nie jest sterowany entalpowo. Brak zauważalnych różnic w wartościach stałych obserwowanych dysocjacji uzyskanych dla kompleksów badanych białek z hemem oraz PPIX sugeruje, że obecność jonów żelaza nie jest kluczowa dla procesu wiązania liganda przez α_1 M.

7.3. KINETYKA WIĄZANIA HEMU PRZEZ α_1 -MIKROGLOBULINĘ

Badania kinetyczne procesu wiązania hemu z α_1 M prowadzono obserwując wygaszanie fluorescencji reszt tryptofanowych białka. Krzywe przebiegów czasowych opisywała najlepiej funkcja dwueksponencjalna, co wskazuje na istnienie dwóch obserwowanych

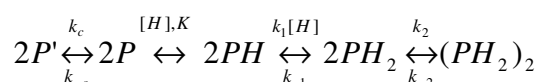
etapów reakcji. Zależności wartości stałych obserwowanych reakcji k_{1obs} i k_{2obs} od stężenia liganda miała odpowiednio charakter malejący oraz rosnący. Ze względu na zastosowanie w pomiarach ograniczonego zakresu stężeń ligandów nie było możliwości wyznaczenia rzeczywistych stałych szybkości poszczególnych etapów reakcji.

Znajdowane w literaturze dane dotyczące drugorzędowej stałej szybkości reakcji tworzenia kompleksu białko-hem zawierają bardzo zróżnicowane wartości, leżące w przedziale 10^4 - 10^8 $M^{-1} s^{-1}$. W pracy [Phelps i Antonini, 1969] podano przybliżoną wartość stałej szybkości reakcji asocjacji apoperoksydazy z monomeryczną formą hemu (w formie kompleksu z tlenkiem węgla (II)) wynoszącą około $5 \cdot 10^8$ $M^{-1} s^{-1}$, taką samą, jaką uzyskano wcześniej dla reakcji globiny z tym ligandem [Gibson i Antonini, 1960]. W reakcji wiązania hemu przez hemopeksynę w środowisku mieszaniny wody i 40% DMSO lub w wodnym roztworze kofeiny wyznaczono stałą asocjacji białko-ligand równą, odpowiednio, $1,8 \cdot 10^6$ $M^{-1} s^{-1}$ oraz $3,9 \cdot 10^7$ $M^{-1} s^{-1}$ [Pasternack i inni, 1983]. Z kolei dla reakcji wiązania hemu przez albuminę prowadzonej w roztworze będącym mieszaniną wody i DMSO w stosunku 5:3, parametr ten miał wartość $1,7 \cdot 10^5$ $M^{-1} s^{-1}$. [Adams i Berman, 1980]. W przypadku zastosowania do badań kinetycznych heminy w roztworze wodnym, proces wiązania tego liganda z globinami przebiegał wieloetapowo, co tłumaczono wspomnianą już wcześniej agregacją liganda i obecnością różnorodnych jego form [Gibson i Antonini, 1960]. Wartości stałych szybkości asocjacji wyznaczone metodą powierzchniowego rezonansu plazmonowego (ang. *surface plasmon resonance*) dla reakcji rekonstrukcji mioglobiny i peroksydazy chrzanowej wynoszą odpowiednio $2,01 \cdot 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$ oraz $0,22 \cdot 10^4$ $M^{-1} s^{-1}$ [Fruk i inni, 2008]. Prawdopodobnie wartości te są zaniżone ze względu na warunki przeprowadzenia eksperymentu, biorąc pod uwagę znacznie wyższe wartości tego parametru notowane we wspomnianych wcześniej pracach. Wartość drugorzędowej stałej szybkości reakcji tworzenia kompleksu PPIX z apoperoksydazą cytochromu c jest równa $1,40 \cdot 10^6$ $M^{-1} s^{-1}$ [Asakura i inni, 1974].

Na ogół przyjmuje się, że tworzenie kompleksu białko-ligand jest procesem zachodzącym szybciej niż zmiana konformacyjna [Johnson, 1992]. Kolejne przebiegi czasowe uzyskane dla badanych form α_1M rozpoczynają się przy coraz niższych wartościach fluorescencji względnej przy wzroście stężenia hemu (por. rys. 6.25, str. 68). Można przypuszczać, że do asocjacji hemu/PPIX z α_1M dochodzi w skali czasowej leżącej poniżej możliwości pomiarowych stosowanej aparatury (czas martwy równy około 1,8 ms). Przy takim założeniu wyznaczona w doświadczeniu wartość k_{1obs} może obrazować

proces zmian konformacyjnych formy niewiążącej α_1M w formę zdolną do przyłączenia hemu. W warunkach prowadzenia eksperymentu zarówno hem jak i PPIX występują najprawdopodobniej w stanie oligomerycznym. Obserwowane zmiany są wynikiem wszystkich procesów zachodzących w badanej próbce. Zakładając, że α_1M wiąże jedynie formę monomeryczną, proces rozpadu dimerów lub wyższych oligomerów badanych ligandów powinien decydować o szybkości tworzenia kompleksu białko-ligand. Zmiany w widmie absorpcyjnym hemu zachodzące podczas jego wiązania z hemopeksyną oraz albuminą i interpretowane jako wynik powolnej dysocjacji oligomerycznych form hemu do monomerów, wiązanych ostatecznie przez białko [Kuželová i inni, 1997], odbywają się jednak w znacznie dłuższej skali czasowej, niż ta, w jakiej obserwowano zmiany fluorescencji reszt tryptofanowych α_1M , czy też PPIX (w badaniach kinetycznych z detekcją emisji tego liganda).

Parametr k_{2obs} , przyjmujący wartości o rząd wielkości mniejsze od poprzedniego, wydaje się opisywać proces następujący po związaniu kolejnej cząsteczki liganda. Pomiary rozdzielczej w czasie anizotropii fluorescencji wskazują na możliwość tworzenia dimerów lub wyższych oligomerów w obecności nadmiaru hemu. Być może właśnie temu procesowi odpowiada niższa stała obserwowana szybkości. Sumarycznie, w oparciu o badania hydrodynamiczne oraz kinetyczne można zaproponować następujący schemat reakcji, zachodzących po zmieszaniu roztworów białka i hemu:



7.4. STRUKTURALNE BADANIA KOMPLEKSÓW

α_1 -MIKROGLOBULINY Z LIGANDAMI

Pomiary widm dichroizmu kołowego nie wykazały zmian w strukturze drugorzędowej białka pod wpływem wiązania zarówno hemu jak i PPIX. Cząsteczka liganda nie indukuje zatem zmian w ułożeniu łańcucha polipeptydowego na tym poziomie organizacji, nie wyklucza to jednak wzajemnego przemieszczenia poszczególnych struktur względem siebie lub też pojawienia się oddziaływań pomiędzy całymimi cząsteczkami białka.

Jak wspomniano wcześniej (roz. 7.1, str. 91), w rozdzielczych w czasie pomiarach anizotropii fluorescencji znakowanego 1,5-I-AEDANS białka w nieobecności liganda stwierdzono tylko jeden czas rotacyjnej korelacji, który przyporządkowano rotacji całej

cząsteczki α_1M . W obecności hemu pojawia się krótszy czas rotacyjnej korelacji równy około 0,5 ns, który interpretować należy jako rotację znacznika AEDANS lub też fragmentu łańcucha białkowego w bezpośrednim jego otoczeniu. Pod wpływem wiązania hemu z białkiem fluorescencja znacznika ulega wygaszeniu. Krzywe miareczkowania hemem, uzyskane poprzez pomiar zmian intensywności fluorescencji względnej reszt Trp białka nieznakowanego oraz reszty AEDANS w białku wyznakowanym pokrywają się w przypadku formy wt (por. rys. 6.17, str. 60). Wnioskować stąd można o niezmienionej strukturze wyznakowanej α_1M , jak również o współobecności wszystkich tych reszt fluoroforowych w obrębie lub w pobliżu miejsc wiążących ligand, co jest w zgodzie z modelem strukturalnym α_1M (rys. 7.1). Zaobserwowano także skrócenie średniego czasu życia fluorescencji znacznika pod wpływem wiązania kolejnych cząsteczek hemu, co sugeruje większą dostępność związanego z białkiem AEDANS dla wygaszaczy kolizyjnych. Nie ulegają przy tym zmianie wartości poszczególnych składowych czasu życia fluorescencji, a jedynie zmienia się rozkład ich udziałów w całkowitym zaniku fluorescencji. Można zasugerować, że cząsteczka hemu wiążąc się z kieszenią lipokalinową powoduje przesunięcie równowagi dynamicznej w kierunku formy białka, w której znacznik jest bardziej eksponowany do roztworu. Taki wniosek potwierdza zmiana położenia maksimum emisji znacznika przy wyższym stężeniu liganda, aż do przesunięcia o około 15 nm w stronę fal dłuższych, świadcząca o bardziej polarnym otoczeniu sondy fluorescencyjnej w kompleksie białko-hem. Powyższe wyniki wskazują, że wyznakowana reszta cysteinowa (Cys 34) znajduje się w pobliżu wejścia do kieszeni lipokalinowej, prawdopodobnie w obrębie ruchliwej pętli Ω , jak to zobrazowano w modelu teoretycznym przedstawionym w pracy [Villoutreix i inni, 2000]. Wartość dłuższej składowej czasu rotacyjnej korelacji ulega podwojeniu przy przejściu od formy nieskompleksowanej do w pełni wysyczonej ligandem, co wskazuje na proces dimeryzacji lub dalszej oligomeryzacji. Hemopeksyna, główne białko wiążące hem, zbudowana jest z dwóch podjednostek, które pod wpływem wiązania hemu łączą się ściśle ze sobą, zamykając wewnątrz cząsteczkę hemu [Baker i inni, 2003]. W wyniku tego procesu nie ulega zmianie struktura drugorzędowa białka. Być może w przypadku α_1M wiązanie hemu prowadzi na podobnej zasadzie do utworzenia dimeru białka. Wiązaniu liganda, podobnie jak to ma miejsce w hemopeksynie, nie towarzyszą zmiany struktury drugorzędowej białka (por. rys. 6.9 i 6.10, str. 52-53). Uzyskane wyniki znajdują poparcie w obserwowanej tendencji do większej agregacji silnie zabarwionej α_1M wyizolowanej z moczu w porównaniu z zawierającym

niewielką ilość chromoforu odpowiednikiem z płynu owodniowego [Sala i inni, 2004].



Rysunek 7.1. Struktura α_1 M z zanaczonymi resztami Cys34 (kolor żółty), Lys(92, 118 i 130) (kolor czerwony) oraz resztami tryptofanowymi (kolor jasnozielony).

Zanik fluorescencji PPIX związanej z rekombinowanymi α_1 M zachodzi zgodnie z modelem trójeksponencjalnym (tabela 6.11, str. 83). Najdłuższa składowa czasu życia, zarazem o największym udziale (około 70-78%) przyjmuje wartość około 14,5-15 ns, charakterystyczną dla monomeru PPIX [Richelli, 1995; Kuszaj i inni, 1996], dwie krótsze składowe są równe około 5 ns oraz 0,5-0,8 ns. Te ostatnie wartości odbiegają od wyznaczonych dla dimeru PPIX, który wykazuje dwueksponencjalny zanik fluorescencji o składowych czasie życia wynoszących około 8 ns oraz 2-3 ns [Richelli, 1995]. Dane te pozwalają wnioskować, że do rekombinowanych α_1 M przyłącza się monomeryczna PPIX. Trójeksponencjalny zanik intensywności fluorescencji o bardzo zbliżonych wartościach składowych czasu życia fluorescencji zaobserwowano dla kompleksów PPIX z globinami [Sudhakar i inni, 1994]. Prawdopodobnie jest to wynikiem istnienia kilku stanów konformacyjnych białka, dla których mikrootoczenie fluoroforu oraz stopień jego ekspozycji do roztworu są różne. Możliwe jest również gaszenie dynamiczne fluorescencji PPIX wewnątrz cząsteczki białka przez otaczające ją reszty aminokwasowe. Wartości poszczególnych czasów życia fluorescencji pokrywają się w granicach błędów dla poszczególnych mutein, zauważalne są jednak różnice w udziałach poszczególnych frakcji w całkowitym zaniku fluorescencji, szczególnie w przypadku czasów τ_2 oraz τ_1 . Udział

składowej τ_2 jest najniższy (około 70%) w przypadku muteiny C34S, a najwyższy w przypadku mutein K3T oraz C34S/K3T (około 78%). Pośredni wynik (około 76%) uzyskano dla form wt i wt Δ LIPR. Spadek lub wzrost udziału najdłuższej składowej kompensowany jest odpowiednią zmianą udziału komponenty τ_1 . Prawdopodobne jest zatem, że brak reszty cysteinowej w pozycji 34, uważanej za kluczową dla funkcji białka, powoduje przesunięcie równowagi konformacyjnej białka w kierunku stanu, w którym dostępność związanej PPIX dla wygaszaczy jest większa. Dane te sugerują również, że usunięcie trzech reszt lizynowych umożliwia głębsze osadzenie pierścienia porfirynowego wewnątrz kieszeni wiążącej α_1 M.

Czas rotacyjnej korelacji PPIX w tetrametylofuranie (TMF) wynosi około 0,17 ns [Balasubramaniam i Natarajan, 1997]. Z kolei po jej związaniu do cząsteczki mioglobiny wartość składowej tego parametru określająca swobodę rotacyjną fluoroforu przyjmuje wartości 1,9 ns i 0,5 ns, odpowiednio w temperaturze 15 i 35 °C [Albani i Alpert, 1986]. Krótszy czas rotacyjnej korelacji wyznaczony w badaniach kompleksów α_1 M z PPIX ma wartość o jeden lub dwa rzędy wielkości mniejszą (10^{-11} s) od wymienionych powyżej. Ze względu na bardzo niewielki jego udział w całkowitym zaniku anizotropii fluorescencji oraz wysoką niepewność wyznaczenia, parametr ten uznano za artefakt. Główny czas rotacyjnej korelacji, równy około 14 ns w przypadku form wt, wt Δ LIPR (nieco wyższa wartość, jednak zgodna w ramach błędu) oraz K(3)T rekombinowanej α_1 M, bardzo dobrze odpowiadają wartościom uzyskanym dla pomiarów znakowanych I-AEDANS białek. Jak wspomniano wcześniej, obrazuje on rotację monomeru białka i odpowiada cząsteczce sferycznej o promieniu hydrodynamicznym około 2,4 nm. Nieco wyższą wartość tego ostatniego parametru, około 2,6 nm, uzyskano dla obydwu mutein pozbawionych reszty cysteinowej (wariant C34S oraz K(3)T/C34S). Omawiane wcześniej pomiary wskazują, że reszta ta znajduje się w pobliżu kieszeni wiążącej, na ruchliwej pętli typu omega, która w białkach z rodziny lipokalin może pełnić rolę wieczka przesłaniającego wejście do wnętrza β -baryłki. Można spekulować, że obecność w formie dzikiej białka reszty Cys 34 faworyzuje konformację białka z zamkniętym wieczkiem, podczas gdy jej brak powoduje „otwarcie” β -baryłki, wpływając na zwiększenie objętości rotującej bryły.

8. PODSUMOWANIE

W wyniku przeprowadzonych badań ustalono, że rekombinowane formy ludzkiej α_1M zawierają znacznie mniejszą ilość chromoforu o prostszej strukturze od białek naturalnych, jak również wykazują wyższą jednorodność pod względem ładunku. Reaktywna reszta Cys 34 znajduje się najprawdopodobniej w pobliżu kieszeni wiążącej α_1M , zgodnie z modelem strukturalnym i stabilizuje bardziej zwartą konformację białka.

α_1M wiąże najprawdopodobniej monomeryczne formy hemu i PPIX, przy czym na jedną cząsteczkę białka przypadają dwie cząsteczki liganda. Wartości obserwowanych stałych dysocjacji badanych kompleksów są rzędu 10^{-8} M, co wskazuje na specyficzne wiązanie o sile porównywalnej ze spotykanymi w przyrodzie oddziaływaniami innych białek z ich fizjologicznymi ligandami. W badaniach kinetycznych obserwowano dwa etapy reakcji wiązania ligandów. Szybszy proces stanowi najprawdopodobniej przejście konformacyjne α_1M w formę zdolną do wiązania liganda, zaś etap wolniejszy mogą stanowić zmiany następujące po związaniu kolejnej cząsteczki hemu lub PPIX. Tworzeniu kompleksu nie towarzyszą zmiany w strukturze drugorzędowej białka, jednak uzyskane w pomiarach parametry hydrodynamiczne wskazują, że nadmiar hemu indukuje dimeryzację lub dalszą oligomeryzację białka.

9. BIBLIOGRAFIA

Adams, P.A., Berman, M.C. (1980) Kinetics and mechanism of the interaction between human serum albumin and monomeric haemin. *Biochem. J.* **191**: 95-102

Aft, R.L., Mueller, G.C. (1983) Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.* **258**: 12069-12072

Aft, R.L., Mueller, G.C. (1984) Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J. Biol. Chem.* **259**: 301-305

Albani, J.R. (2004) Structure and dynamics of macromolecules: absorption and fluorescence studies. Elsevier, Amsterdam

Albani, J., Alpert, B. (1986) Porphyrin motions in the myoglobin heme-pocket. *Chem. Phys. Letters* **131**: 147-151

Allhorn, M., Berggard, J., Nordberg, J., Olsson, M.L., Åkerström, B. (2002) Processing of the lipocalin α_1 -microglobulin by hemoglobin induces heme-binding and heme-degradation properties. *Blood* **99**: 1894-1901

Allhorn, M., Kłapyta, A., Åkerström, B. (2005a) Redox properties of the lipocalin α_1 -microglobulin: reduction of cytochrome c, hemoglobin and free iron. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 557-567

Allhorn, M., Larsson, J., Olsson, M.G., Olofsson, T., Åkerström, B. (2005b) Oxidative modifications on collagen and low-density lipoprotein are inhibited by the lipocalin α_1 -microglobulin. Doctoral dissertation: α_1 -microglobulin – heme-binding protein, reductase and antioxidant. Lund University.

Allhorn, M., Lundqvist, K., Schmidtchen, A., Åkerström, B. (2003) Heme-scavenging role of α_1 -microglobulin in chronic ulcers. *J. Invest. Dermatol.* **121**: 640-646

Amoresano, A., Minchiotti, L., Cosulich, M.E., Campagnoli, M., Pucci, P., Andolfo, A., Gianazza, E., Galliano, M. (2000) Structural characterization of the oligosaccharide chains of human α_1 -microglobulin from urine and amniotic fluid. *Eur. J. Biochem.* **267**: 2105-2112

Asakura, T., Kobayashi, T., Chance, B. (1974) Kinetic studies on the reaction between apocytochrome c peroxidase and protoporphyrin IX. *J. Biol. Chem.* **249**: 1799-1805

Atamna, H., Boyle, K. (2006) Amyloid- β peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 3381-3386

Atamna, H., Frey, W.H. 2nd (2004) A role for heme in Alzheimer's disease: heme binds amyloid β and has altered metabolism. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 11153-11158

Atamna, H., Ginsburg, H. (1995) Heme degradation in the presence of glutathione. A proposed mechanism to account for the high levels of non-heme iron found in the membranes of hemoglobinopathic red blood cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 24876-24883

Atamna, H., Killilea, D.W., Killilea, A.N., Ames, B.N. (2002) Heme deficiency may be a factor in the mitochondrial and neuronal decay of aging. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14807-14812

Åkerström, B. (1983) Synthesis of α_1 -microglobulin by guinea-pig liver. *Eur. J. Biochem.* **133**: 235-239

Åkerström, B., Bratt, T., Enghild, J.J. (1995) Formation of the α_1 -microglobulin chromophore in mammalian and insect cells: a novel post-translational mechanism? *FEBS Lett.* **362**: 50-54

Åkerström, B., Lögdberg, L.E., Berggård, T., Osmark, P., Lindqvist, A. (2000) α_1 -Microglobulin: a yellow-brown lipocalin. *Biochem. Biophys. Acta* **1482**: 172-184

Åkerström, B., Maghzal, G.J., Winterbourn, C.C., Kettle, A.J. (2007) The lipocalin α_1 -microglobulin has radical scavenging activity. **282**: 31493-31503

Babiker-Mohamed, H., Åkerström, B., Lögdberg, L. (1990a) Mitogenic effect of α_1 -microglobulin on mouse lymphocytes. Evidence of T- and B-cell cooperation, B-cell proliferation, and a low-affinity receptor on mononuclear cells. *Scand. J. Immunol.* **32**: 37-44

Babiker-Mohamed, H., Olsson, M.L., Boketoft, A., Lögdberg, L., Åkerström, B. (1990b) α_1 -microglobulin is mitogenic to human peripheral blood lymphocytes. Regulation by both enhancing and suppressive serum factors. *Immunobiology* **180**: 221-234

Baker, H.M., Anderson, B.F., Baker, E.N. (2003) Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 3579-3583

Balasubramaniam, E., Natarajan, P. (1997) Photophysical properties of protoporphyrin IX and thionine covalently attached to macromolecules. *J. Photoch. Photobiol. A: Chem.* **103**: 201-211

Balla, J., Jacob, H.S., Balla, G., Nath, K., Eaton, J.W., Vercellotti, G.M. (1993) Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 9285-9289

Bautista, L.E., Vera, L.M., Arenas, I.A., Gamarra, G. (2005) Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **19**: 149-154

Beaven, G.H., Chen, S.H., d'Albis, A., Gratzer, W.B. (1974) A spectroscopic study of the haemin-human-serum-albumin system. *Eur. J. Biochem.* **41**: 539-546

Beltramini, M., Firey, P.A., Ricchelli, F., Rodgers, M.A., Jori, G. (1987) Steady-state and time-resolved spectroscopic studies on the hematoporphyrin-lipoprotein complex. *Biochemistry* **26**: 6852-6858

Benz, E.J. Jr, Murnane, M.J., Tonkonow, B.L., Berman, B.W., Mazur, E.M., Cavallesco, C., Jenko, T., Snyder, E.L., Forget, B.G., Hoffman, R. (1980) Embryonic-fetal erythroid characteristics of a human leukemic cell line. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 3509-3513

Berggård, T., Cohen, A., Persson, P., Linqvist, A., Cedervall, T., Silow, M., Thøgersen, I.B., Jönsson, J.A., Enghild, J.J., Åkerström, B. (1999b). α_1 -microglobulin chromophores are located to the three lysine residues semiburied in the lipocalin pocket and associated with a novel lipophilic compound. *Protein. Sci.* **8**: 2611-2620

Berggård, T., Enghild, J.J., Badve, S., Salafia C.M., Lögdberg, L., Åkerström, B. (1999a) Histologic distribution and biochemical properties of α_1 -microglobulin in human placenta. *Am. J. Reprod. Immunol.* **41**: 52-60

Berggård, T., Oury, T.D., Thogersen, J.B., Åkerström, B., Enghild, J.J. (1998). α_1 -Microglobulin is found both in blood and in most tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **46**: 887-893

Berggård, T., Thelin, N., Falkenberg, C., Enghild, J.J., Åkerström, B. (1997) Prothrombin, albumin and immunoglobulin A form covalent complexes with α_1 -microglobulin in human plasma. *Eur. J. Biochem.* **245**: 676-83

Beuckmann, C.T., Aoyagi, M., Okazaki, I., Hiroike, T., Toh, H., Hayaishi, O., Urade, Y. (1999) Binding of biliverdin, bilirubin, and thyroid hormones to lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Biochemistry* **38**: 8006-8013

Bhoite-Solomon, V., Kessler-Icekson, G., Shaklai, N. (1993) Myocyte injury by hemin. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* **29A**: 636-642

Bishop, R.E. (2000) The bacterial lipocalins. *Biochem. Biophys. Acta* **1482**: 73-83

Bratt, Y., Olsson, H., Sjöberg E. M., Jergil, B., Åkerström, B. (1993) Cleavage of the α_1 -microglobulin-bikunin precursor is localized to the Golgi apparatus of rat liver cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1157**: 147-154

Brill, A.S., Sandberg, H.E. (1968) Spectral studies of iron coordination in oxidized compounds of hemoproteins. Difference spectroscopy below 250 millimicrons. *Biochemistry* **7**: 4254-4260

Brown, S.B., Dean, T.C., Jones, P. (1970) Aggregation of ferrihaems. Dimerization and protolytic equilibria of protoferrihaem and deuteroferrihaem in aqueous solution. *Biochem. J.* **117**: 733-739

Brown, M.P., Royer, C. (1997) Fluorescence spectroscopy as a tool to investigate protein interactions. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 45-49

Brown, S.B., Shillcock, M., Jones, P. (1976) Equilibrium and kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem. J.* **153**: 279-285

Browne, P., Shalev, O., Hebbel, R.P. (1998) The molecular pathobiology of cell membrane iron: the sickle red cell as a model. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 1040-1048

Buehler, P.W, Abraham, B., Vallelian, F., Linnemayr, C., Pereira, C.P., Cipollo, J.F., Jia, Y., Mikolajczyk, M., Boretti, F.S., Schoedon, G., Alayash, A.I., Schaer, D.J. (2009) Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. *Blood* **113**: 2578-2586

Calero, M., Escribano, J., Grubb, A., Mendez, E. (1994). Location of a novel type of interpolypeptide chain linkage in the human protein HC-IgA complex (HC-IgA) and identification of a heterogeneous chromophore associated with the complex. *J. Biol. Chem.* **269**: 384-389

Camejo, G., Halberg, C., Manschik-Lundin, A., Hurt-Camejo, E., Rosengren, B., Olsson, H., Hansson, G.I., Forsberg, G.B., Ylhen, B. (1998) Hemin binding and oxidation of lipoproteins in serum: mechanisms and effect on the interaction of LDL with human

macrophages. *J. Lipid. Res.* **39**: 755-766

Caughey, W. S., Smythe, G. A., O'Keeffe, D. H., Maskasky, J. E., Smith, M. I. (1975) Heme A of cytochrome c oxidase. Structure and properties: comparisons with hemes B, C, and S and derivatives. *J. Biol. Chem.* **250**: 7602-7622

Cavaggioni, A., Sorbi, R.T., Keen, J.N., Pappin, D.J.C, Findlay, J.B.C. (1987) Homology between the pyrazine-binding protein from nasal mucosa and major urinary proteins. *FEBS Lett.* **212**: 225-228

Chen, J.J., London, I.M. (1981) Hemin enhances the differentiation of mouse 3T3 cells to adipocytes. *Cell* **26**: 117-122

Chou, A.C., Fitch, C.D. (1981) Mechanism of hemolysis induced by FP (IX). *J. Clin. Invest.* **68**: 672-677

Cogan, U., Kopelman, M., Mokady, S. and Shinitzky, M. (1976) Binding affinities of retinol and related compounds to retinol binding proteins. *Eur. J. Biochem.* **65**: 71-78

Cox, T.M., O'Donnell, M.W., Aisen, P., London, I.M. (1985) Hemin inhibits internalization of transferrin by reticulocytes and promotes phosphorylation of the membrane transferrin receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 5170-5174

Cross, A.J., Pollock, J.R., Bingham, S.A. (2003) Haem, not protein or inorganic iron, is responsible for endogenous intestinal N-nitrosation arising from red meat. *Cancer Res.* **63**: 2358-2360

Cruse, I., Maines, M.D. (1988) Evidence suggesting that the two forms of heme oxygenase are products of different genes. *J. Biol. Chem.* **263**: 3348-3353

Dailey, H. A. (1997) Enzymes of heme biosynthesis. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2**: 411-417

Daltrop, O., Stevens, J.M., Higham, C.W., Ferguson, S.J. (2002) The CcmE protein of the c-type cytochrome biogenesis system: unusual in vitro heme incorporation into apo-CcmE

and transfer from holo-CcmE to apocytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 9703-9708

Daveau, M., Jean, L., Soury, E., Olivier, E., Masson, S., Lyoumi, S., Chan, P., Hiron, M., Lebreton, J.P., Husson, A., Jegou, S., Vaudry, H., Salier, J.P. (1998) Hepatic and extra-hepatic transcription of inter- α -inhibitor family genes under normal or acute inflammatory conditions in rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **350**: 315-323

Daveau, M., Rouet, P., Scotte, M., Faye, L., Hiron, M., Lebreton, J.P., Salier, J.P. (1993) Human inter- α -inhibitor family in inflammation: simultaneous synthesis of positive and negative acute-phase proteins. *Biochem. J.* **292**: 485-492

Davis, B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427

Day, R.M., Suzuki, Y.J. (2006) Cell proliferation, reactive oxygen and cellular glutathione. *Dose Response* **3**: 425-442

Dickerson, R.E., Takano, T., Eisenberg, D., Kallai, O.B., Samson, L., Cooper, A., Margoliash, E. (1971) Ferricytochrome c : I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution. *J. Biol. Chem.* **246**: 1511-1535

Dufour, E., Marden, M.C., Haertlé, T. (1990) β -lactoglobulin binds retinol and protoporphyrin IX at two different binding sites. *FEBS Lett.* **277**: 223-226

Ekström, B., Berggård, I. (1977) Human α_1 -microglobulin. Purification procedure, chemical and physicochemical properties. *J. Biol. Chem.* **252**: 8048-8057

Ekström, B., Peterson, P.A., Berggård, I. (1975). A urinary and plasma α_1 -glycoprotein of low molecular weight; isolation and some properties. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **65**: 1427-1433

Escribano, J., Grubb, A., Calero, M., Mendez, E. (1991). The protein HC chromophore is

linked to the cysteine residue at position 34 of the polypeptide chain by a reduction-resistant bond and causes the charge heterogeneity of protein HC. *J. Biol. Chem.* **266**: 15758-15763

Escribano, J., Lopez-Otin, C., Hjerpe, A., Grubb, A., Mendez, E. (1990). Location and characterisation of the three carbohydrate prosthetic groups of human protein HC. *FEBS Lett.* **266**: 167-170

Fagard, R., London, I.M. (1981) Relationship between phosphorylation and activity of heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 866-870

Falkenberg, C., Enghild, J.J., Thøgersen, I.B., Salvesen, G., Åkerström, B. (1994). Isolation and characterization of fibronectin- α_1 -microglobulin complex in rat plasma. *Biochem. J.* **301**: 745-51

Falkenberg, C., Grubb, A., Åkerström, B. (1990). Isolation of rat serum α_1 -microglobulin. Identification of a complex with α_1 -inhibitor-3, a rat α_2 -macroglobulin homologue. *J. Biol. Chem.* **265**: 16150-16157

Flower, D.R. (1994) The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Lett.* 1994 **354**: 7-11

Flower, D.R. (1996). The lipocalin protein family: structure and function. *Biochem. J.* **318**: 1-14

Flower, D.R., North, A.C., Attwood, T.K. (1993) Structure and sequence relationships in the lipocalins and related proteins. *Protein Sci.* **2**: 753-761

Flower, D.R., North, A.C., Sansom, C.E. (2000) The lipocalin protein family: structural and sequence overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**: 9-24

Fruk, L., Kuhlmann, J., Niemeyer, C.M. (2008) Analysis of heme-reconstitution of apoenzymes by means of surface plasmon resonance. *Chem. Commun. (Camb).* **8**: 230-232

Garcia de la Torre, J., Huertas, M.L., Carrasco, B. (2000) Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. *Biophys. J.* **78**: 719-730

Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M.R., Appel, R.D., Bairoch, A. (2005) Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. J.M. Walker (Ed.), *The Proteomics Protocols Handbook*, Humana Press: 571–607

Gatta, L.B., Vitali, M., Verardi, R., Arosio, P., Finazzi, D. (2009) Inhibition of heme synthesis alters Amyloid Precursor Protein processing. *J. Neural Transm.* **116**: 79-88

Gibson, Q.H., Antonini, E. (1960) Kinetic studies on the reaction between native globin and haem derivatives. *Biochem. J.* **77**: 328-341

Goldstein, L., Teng, Z.P., Zeserson, E., Patel, M., Regan, R.F. (2003) Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J. Neurosci. Res.* **73**: 113-121

Gotoh, S., Ohgari, Y., Nakamura, T., Osumi, T., Taketani, S. (2008) Heme-binding to the nuclear receptor retinoid X receptor α (RXR α) leads to the inhibition of the transcriptional activity. *Gene* **423**: 207-214

Graça-Souza, A.V., Arruda, M.A., de Freitas, M.S., Barja-Fidalgo, C., Oliveira, P.L. (2002) Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. *Blood* **99**: 4160-4165

Granick, J.L., Sassa, S. (1978) Hemin control of heme biosynthesis in mouse Friend virus-transformed erythroleukemia cells in culture. *J. Biol. Chem.* **253**: 5402-5406

Grinberg, L.N., O'Brien, P.J., Hrkal, Z. (1999) The effects of heme-binding proteins on the peroxidative and catalytic activities of hemin. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 214-219

Grubb, A.O., Lopez, C., Tejler, L., Mendez, E. (1983). Isolation of human complex-forming glycoprotein, heterogeneous in charge (protein HC), and its IgA complex from plasma. Physicochemical and immunochemical properties, normal plasma concentration. *J. Biol. Chem.* **258**: 14698-707

Gutteridge, J.M.C., Smith, A. (1988) Antioxidant protection by haemopexin of heme stimulated lipid peroxidation. *Biochem. J.* **256**: 861-865

Hamilton, J.W., Bement, W.J., Sinclair, P.R., Sinclair, J.F., Alcedo, J.A., Wetterhahn, K.E. (1991) Heme regulates hepatic 5-aminolevulinate synthase mRNA expression by decreasing mRNA half-life and not by altering its rate of transcription. *Arch. Biochem. Biophys.* **289**: 387-392

Henzel, W.J., Rodriguez, H., Singer, A.G., Stults, J.T., Macrides, F., Agosta, W.C., Niall, H. (1988) The primary structure of aphrodisin. *J. Biol. Chem.* **263**: 16682-16687

Herz, J., Strickland, D.K. (2001) LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J. Clin. Invest.* **108**: 779-784

Hirai, K., Martinkova, M., Igarashi, J., Saiful, I., Yamauchi, S., El-Mashtoly, S., Kitagawa, T., Shimizu, T. (2007) Identification of Cys385 in the isolated kinase insertion domain of heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) as the heme axial ligand by site-directed mutagenesis and spectral characterization. *J. Inorg. Biochem.* **101**: 1172-1179

Hoffman, R., Ibrahim, N., Murnane, M.J., Diamond, A., Forget, B.G., Levere, R.D. (1980) Hemin control of heme biosynthesis and catabolism in a human leukemia cell line. *Blood* **56**: 567-570

Hoffman, R., Murnane, M.J., Benz, E.J. Jr, Prohaska, R., Floyd, V., Dainiak, N., Forget, B.G., Furthmayr, H. (1979) Induction of erythropoietic colonies in a human chronic myelogenous leukemia cell line. *Blood* **54**: 1182-1187

Holden, H.M., Rypniewski, W.R., Law, J.H., Rayment, I. (1987) The molecular structure of insecticyanin from the tobacco hornworm *Manduca sexta* L. at 2.6 Å resolution. *EMBO J.* **6**: 1565-1570

Howlett, D., Cutler, P., Heales, S., Camilleri, P. (1997) Hemin and related porphyrins inhibit β -amyloid aggregation. *FEBS Lett.* **417**: 249-251

Hrkal, Z., Vodrázka, Z., Kalousek, I. (1974) Transfer of heme from ferrihemoglobin and ferrihemoglobin isolated chains to hemopexin. *Eur. J. Biochem.* **43**: 73-78

Huber, R., Schneider, M., Epp, O., Mayr, I., Messerschmidt, A., Pflugrath, J., Kayser, H. (1987) Crystallization, crystal structure analysis and preliminary molecular model of the bilin binding protein from the insect *Pieris brassicae*. *J. Mol. Biol.* **195**: 423-434

Hudson, E. N., Weber, G. (1973) Synthesis and characterization of two fluorescent sulfhydryl reagents. *Biochemistry* **12**: 4154-4161

Hvidberg, V., Maniecki, M.B., Jacobsen, C., Højrup, P., Møller, H.J., Moestrup, S.K. (2005) Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood* **106**: 2572-2579

Iwahara, S., Satoh, H., Song, D.X., Webb, J., Burlingame, A.L., Nagae, Y., Muller-Eberhard U. (1995) Purification, characterization, and cloning of a heme-binding protein (23 kDa) in rat liver cytosol. *Biochemistry* **34**: 13398-13406

Iwasaki, K., Mackenzie, E.L., Hailemariam, K., Sakamoto, K., Tsuji, Y. (2006) Hemin-mediated regulation of an antioxidant-responsive element of the human ferritin H gene and role of Ref-1 during erythroid differentiation of K562 cells. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 2845-2856

Jeney, V., Balla, J., Yachie, A., Varga, Z., Vercellotti, G.M., Eaton, J.W., Balla, G. (2002) Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* **100**: 879-887

Jia, Y., Buehler, P.W., Boykins, R.A., Venable, R.M., Alayash, A.I. (2007) Structural basis of peroxide-mediated changes in human hemoglobin: a novel oxidative pathway. *J. Biol. Chem.* **282**: 4894-4907

Johnson, K.A. (1992) Transient-state kinetic analysis of enzyme reaction pathways. *Enzymes* **20**: 1-61

Kamal, J.K., Behere, D.V. (2002) Spectroscopic studies on human serum albumin and methemalbumin: optical, steady-state, and picosecond time-resolved fluorescence studies,

- and kinetics of substrate oxidation by methemalbumin. *J. Biol. Inorg. Chem.* **7**: 273-283
- Karthikeyan, V.J., Lip, G.Y. (2006) White blood cell count and hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **20**: 310-312
- Kaumeyer, J.F., Polazzi, J.O., Kotick, M.P. (1986) The mRNA for a proteinase inhibitor related to the HI-30 domain of inter- α -trypsin inhibitor also encodes α_1 -microglobulin (protein HC). *Nucleic Acids Res.* **14**: 7839-7850
- Keen, J.N., Caceres, I., Eliopoulos, E.E., Zagalsky, P.F., Findlay, J.B. (1991) Complete sequence and model for the C1 subunit of the carotenoprotein, crustacyanin, and model for the dimer, β -crustacyanin, formed from the C1 and A2 subunits with astaxanthin. *Eur. J. Biochem.* **202**: 31-40
- Kim, E.Y., Kim, J.S., Kim, M.Y., Koh, W.S., Guengerich, F.P., Yun, C.H. (2004) Non-specific inhibition of human cytochrome P450-catalyzed reactions by hemin. *Toxicol. Lett.* **153**: 239-246
- Kirschner-Zilber, I., Rabizadeh, E., Shaklai, N. (1982) The interaction of hemin and bilirubin with the human red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **690**: 20-30
- Kłapyta, A. (2001) Studies on the chromophore of α_1 -microglobulin. *Praca magisterska*, Biblioteka Wydziału Chemii UJ, Kraków
- Knopf, J.L., Gallagher, J.F., Held W.A. (1983) Differential, multihormonal regulation of the mouse major urinary protein gene family in the liver. *Mol. Cell. Biol.* **3**: 2232-2240
- Kozak, M., Grubb, A. (2007) SAXS studies of human protein HC (α_1 -microglobulin). *Protein Pept. Lett.* **14**: 425-429
- Kristiansen, M., Graversen, J.H., Jacobsen, C., Sonne, O., Hoffman, H.J., Law, S.K., Moestrup, S.K. (2001) Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**: 198-201

Kumar, S., Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* **157**: 175-188

Kurtz, D.T., Sippel, A.E., Ansah-Yiadom, R., Feigelson, P. (1976) Effects of sex hormones on the level of the messenger RNA for the rat hepatic protein α_{2u} -globulin. *J. Biol. Chem.* **251**: 3594-3598

Kusano, E., Suzuki, M., Asano, Y., Itoh, Y., Takagi, K., Kawai, T. (1985) Human α_1 -microglobulin and its relationship to renal function. *Nephron* **41**: 320-324

Kuszaj, S., Kaszycki, P., Wasylewski, Z. (1996) A fluorescence quenching study on protoporphyrin IX in a model membrane system. *Chem. Phys. Lipids.* **83**: 153-160

Kuželová, K., Mrhalová, M., Hrkal, Z. (1997) Kinetics of heme interaction with heme-binding proteins: The effect of heme aggregation state. *Biochim. Biophys. Acta.* **1336**: 497-501

Kuzmič, P. (1996) Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* **237**: 260-273

Kwasek, A., Osmark, P., Allhorn, M., Lindqvist, A., Åkerström, B., Wasylewski, Z. (2007) Production of recombinant human α_1 -microglobulin and mutant forms involved in chromophore formation. *Protein Expr Purif.* **53**:145-152

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Lamola, A.A., Asher, I., Muller-Eberhard, U., Poh-Fitzpatrick, M. (1981) Fluorimetric study of the binding of protoporphyrin to haemopexin and albumin. *Biochem. J.* **196**: 693-698

Lange, D.C., Kothari, R., Patel, R.C., Patel, S.C. (1998) Retinol and retinoic acid bind to a surface cleft in bovine β -lactoglobulin: a method of binding site determination using

fluorescence resonance energy transfer. *Biophys Chem.* **74**: 45-51

Larsson, J., Allhorn, M., Åkerström, B. (2004) The lipocalin α_1 -microglobulin binds heme in different species. *Arch. Bioch. Bioph.* **432**: 196–204

Lemberg, R., Legge, J. W. (1949) Hematin compounds and bile pigments. *New York: Interscience Publishers Inc.*

Li, X., Clark, J.D. (2000) Chronic morphine exposure and the expression of heme oxygenase type 2. *Brain Res. Mol. Brain. Res.* **75**: 179-184

Lindqvist, A., Åkerström, B. (1999) Isolation of plaice (*Pleuronectes platessa*) α_1 -microglobulin: conservation of structure and chromophore. *Biochim. Biophys. Acta.* **1430**: 222-233.

Lopez, C., Grubb, A., Mendez, E. (1982) Human protein HC displays variability in its carboxyl-terminal amino acid sequence. *FEBS Lett.* **144**: 349-353

Lögdberg, L., Åkerström, B. (1981) Immunosuppressive properties of α_1 -microglobulin. *Scand. J. Immunol.* **13**: 383-390

Lögdberg, L. E., Åkerström, B., Badve, S. (2000) Tissue distribution of the lipocalin α_1 -microglobulin in the developing human fetus. *J. Histochem. Cytochem.* **48**: 1-8

Lögdberg, L., Åkerström, B., Shevach, E.M. (1986) α_1 -Microglobulin is mitogenic for guinea pig lymphocytes. *Scand. J. Immunol.* **24**: 575-581

Lögdberg, L., Wester, L. (2000) Immunocalins: a lipocalin subfamily that modulates immune and inflammatory responses. *Biochim. Biophys. Acta.* **1482**: 284-297

Lyoumi, S., Puy, H., Tamion, F., Bogard, C., Leplingard, A., Scotté, M., Vranckx, R., Gauthier, F., Hiron, M., Daveau, M., Nordmann, Y., Deybach, J.C., Lebreton, J.P. (1999) Heme and acute inflammation role in vivo of heme in the hepatic expression of positive

acute-phase reactants in rats. *Eur. J. Biochem.* **26**: 190-196

Maines M.D. (1992) Heme oxygenase: Clinical applications and functions. *CRC Press, Boca Raton, FL*

Maines, M.D. (1988) Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* **2**: 2557-2568

Maines, M.D., Trakshel, G.M., Kutty, R.K. (1986) Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J. Biol. Chem.* **261**: 411-419

Marden, M.C., Dufour, E., Christova, P., Huang, Y., Leclerc-L'Hostis, E., Haertlé, T. (1994) Binding of heme-CO to bovine and porcine β -lactoglobulins. *Arch. Biochem. Biophys.* **311**: 258-262

McCoubrey, W.K. Jr, Huang, T.J., Maines, M.D. (1997a) Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur. J. Biochem.* **247**: 725-732

McCoubrey, W.K. Jr, Huang, T.J., Maines, M.D. (1997b) Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J. Biol. Chem.* **272**: 12568-12574

Méndez, E., Fernández-Luna, J.L., Grubb, A., Leyva-Cobián, F. (1986) Human protein HC and its IgA complex are inhibitors of neutrophil chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 1472-1475

Merrill, A.R., Cohen, F.S., Cramer W.A. (1990) On the nature of the structural change of the colicin E1 channel peptide necessary for its translocation-competent state. *Biochemistry* **29**: 5829-5836

Miller, Y.I., Smith, A., Morgan, W.T., Shaklai, N. (1996) Role of hemopexin in protection

of low-density lipoprotein against hemoglobin-induced oxidation. *Biochemistry* **35**: 13112-13117

Moestrup, S.K., Gliemann, J., Pallesen, G. (1992) Distribution of the α_2 -macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues. *Cell Tissue Res.* **269**: 375-382

Monaco, H.L., Zanotti, G., Spadon, P., Bolognesi, M., Sawyer, L., Eliopoulos, E.E. (1987) Crystal structure of the trigonal form of bovine β -lactoglobulin and of its complex with retinol at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **197**: 695-706

Montfort, W. R., Weichsel, A., Andersen, J. F. (2000) Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* **1482**: 110–118

Morgan, W.T., Liem, H.H., Sutor, R.P., Muller-Ebergard, U. (1976) Transfer of heme from heme-albumin to hemopexin. *Biochim. Biophys. Acta.* **444**: 435-445

Muller-Eberhard, U., Javid, J., Liem, H.H., Hanstein, A., Hanna, M. (1968) Plasma concentrations of hemopexin, haptoglobin and heme in patients with various hemolytic diseases. *Blood* **32**: 811-815

Muresan, S., van der Bent, A., de Wolf, F.A. (2001) Interaction of β -lactoglobulin with small hydrophobic ligands as monitored by fluorometry and equilibrium dialysis: nonlinear quenching effects related to protein-protein association. *J. Agric. Food Chem.* **49**: 2609-2618

Nagababu, E., Mohanty, J.G., Bhamidipaty, S., Ostera, G.R., Rifkind, J.M. (2010) Role of the membrane in the formation of heme degradation products in red blood cells. *Life Sci.* **86**: 133-138

Nagababu, E., Rifkind, J.M. (1998) Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res.*

Commun. **247**: 592–596

Nagababu, E., Rifkind, J.M. (2000) Heme degradation during autoxidation of oxyhemoglobin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 839–845

Nagata, A., Suzuki, Y., Igarashi, M., Eguchi, N., Toh, H., Urade, Y., Hayaishi, O. (1991) Human brain prostaglandin D synthase has been evolutionarily differentiated from lipophilic-ligand carrier proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 4020-4024

Nanzyo, N., Sano, S. (1968) Type c ferri- and ferrohemochrome formation between heme c, amino acids, and peptides. *J. Biol. Chem.* **243**: 3431-3440

Nath, K.A., Balla, J., Croatt, A.J., Vercellotti, G.M. (1995) Heme protein-mediated renal injury: a protective role for 21-aminosteroids in vitro and in vivo. *Kidney Int.* **47**: 592-602.

Nath, K.A., Vercellotti, G.M., Grande, J.P., Miyoshi, H., Paya, C.V., Manivel, J.C., Haggard, J.J., Croatt, A.J., Payne, W.D., Alam, J. (2001) Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1. *Kidney Int.* **59**:106-117

Noy, N., Blaner, W.S. (1991) Interactions of retinol with binding proteins: studies with rat cellular retinol-binding protein and with rat retinol-binding protein. *Biochemistry* **30**: 6380-6386

Nozaki, Y., Tanford, C. (1972) The solubility of amino acids and two glycine peptides in aqueous ethanol and dioxane solutions. *J. Am. Chem. Soc.* **246**: 2211-2217

Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H., Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J.* **20**: 2835-2843

Olsson, M.G., Allhorn, M., Olofsson, T., Åkerström, B. (2007) Up-regulation of α_1 -

microglobulin by hemoglobin and reactive oxygen species in hepatoma and blood cell lines. *Free Radic. Biol. Med.* **42**: 842-851

Olsson, M.G., Centlow, M., Rutardóttir, S., Stenfors, I., Larsson, J., Hosseini-Maaf, B., Olsson, M.L., Hansson, S.R., Åkerström, B. (2010) Increased levels of cell-free hemoglobin, oxidation markers, and the antioxidative heme scavenger α_1 -microglobulin in preeclampsia. *Free Radic. Biol. Med.* **48**: 284-291

Olsson, M.G., Olofsson, T., Tapper, H., Åkerström, B. (2008) The lipocalin α_1 -microglobulin protects erythroid K562 cells against oxidative damage induced by heme and reactive oxygen species. *Free Radic. Res.* **42**: 725-736

Owens, J.W., O'Connor, C.J. (1988) Comparison of the electronic and vibrational spectra of complexes of protoporphyrin IX, hemoctapeptide, and heme proteins. *Coord. Chem. Rev.* **84**: 1-45

Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., Igarashi, K. (1996) Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 6083-6095

Ødum, L., Nielsen, H.W. (1994) Human protein HC (α_1 -microglobulin) and inter- α -trypsin inhibitor in connective tissue. *Histochem. J.* **26**: 799-803

Pasternack, R.F., Gibbs, E.J., Hoeflin, E., Kosar, W.P., Kubera, G., Skowronek, C.A., Wong, N.M., Muller-Eberhard, U. (1983) Hemin binding to serum proteins and the catalysis of interprotein transfer. *Biochemistry* **22**:1753-1758

Penders, J., Delanghe, J.R. (2004) α_1 -microglobulin: clinical laboratory aspects and applications. *Clin. Chim. Acta* **346**: 107-118

Pervaiz, S., Brew, K. (1985). Homology of β -lactoglobulin, serum retinol-binding protein and protein HC. *Science* **228**: 335-337

Phelps, C., Antonini, E. (1969) The combination of carbon monoxide-haem with apoperoxidase. *Biochem J.* 1969 **114**: 719-724

Pierzchalski, P., Rokita, H., Koj, A., Fries, E., Åkerström, B. (1992) Synthesis of α_1 -microglobulin in cultured rat hepatocytes is stimulated by interleukin-6, leukemia inhibitory factor, dexamethasone and retinoic acid. *FEBS Lett.* **298**: 165-168

Ponka, P. (1997) Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. *Blood* **89**: 1-25

Ponka, P., Neuwirt, J. (1969) Regulation of iron entry into reticulocytes. I. Feedback inhibitory effect of heme on iron entry into reticulocytes and on heme synthesis. *Blood* **33**: 690-707

Ponka, P., Schulman, H. M. (1985) Regulation of heme synthesis in erythroid cells: Hemin inhibits transferrin iron utilization but not protoporphyrin synthesis. *Blood* **65**: 850-857

Porto, B.N., Alves, L.S., Fernández, P.L., Dutra, T.P., Figueiredo, R.T., Graça-Souza, A.V., Bozza, M.T. (2007) Heme induces neutrophil migration and reactive oxygen species generation through signaling pathways characteristic of chemotactic receptors. *J. Biol. Chem.* **282**: 24430-24436

Postnikova, G.B., Yumakova, E.M. (1991) Fluorescence study of the conformational properties of myoglobin structure. 3. *Eur. J. Biochem.* **198**: 241-246

Potter, D., Chronos, Z.C., Baynes, J.W., Sinclair, P.R., Gorman, N., Liem, H.H., Muller-Eberhard, U., Thorpe, S.R. (1993) In vivo fate of hemopexin and heme-hemopexin complexes in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **300**: 98-104

Rafie-Kolpin, M., Chefalo, P.J., Hussain, Z., Hahn, J., Uma, S., Matts, R.L., Chen, J.J. (2000) Two heme-binding domains of heme-regulated eukaryotic initiation factor-2 α kinase. N terminus and kinase insertion. *J. Biol. Chem.* **2000**: 5171-5178

Raju, V.S., McCoubrey, W.K. Jr, Maines, M.D. (1997) Regulation of heme oxygenase-2

by glucocorticoids in neonatal rat brain: characterization of a functional glucocorticoid response element. *Biochim. Biophys. Acta.* **1351**: 89-104

Ranu, R.S., London, I.M. (1976) Regulation of protein synthesis in rabbit reticulocyte lysates: purification and initial characterization of the cyclic 3':5'-AMP independent protein kinase of the heme-regulated translational inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **73**: 4349-4353

Regan, R.F., Chen, J., Benvenisti-Zarom, L. (2004) Heme oxygenase-2 gene deletion attenuates oxidative stress in neurons exposed to extracellular heme. *BMC Neurosci.* **5**: 34

Richelli, F. (1995) Photophysical properties of porphyrins in biological membranes. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* **29**: 109-118

Riddle R.D., Yamamoto M., Engel J.D. (1989) Expression of δ -aminolevulinate synthase in avian cells: Separate genes encode erythroid-specific and non-specific isozymes. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **86**: 792-796

Rodriguez, F., Kemp, R., Balazy, M., Nasjletti, A. (2003) Effects of exogenous heme on renal function: role of heme oxygenase and cyclooxygenase. *Hypertension* **42**: 680-684

Rotenberg, M., Cohen, S., Margalit, R. (1987) Thermodynamics of porphyrin binding to serum albumin: effects of temperature, of porphyrin species and of albumin-carried fatty acids. *Photochem Photobiol.* **46**: 689-693

Ryter, S. W., Tyrrell, R. M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radic. Biol. Med.* **28**: 289-309

Sala, A., Campagnoli, M., Perani, E., Romano, A., Labò, S., Monzani, E., Minchiotti, L., Galliano, M. (2004) Human α_1 -microglobulin is covalently bound to kynurenine-derived chromophores. *J. Biol. Chem.* **279**: 51033-51041

Sassa, S., Nagai, T. (1996) The role of heme in gene expression. *Int. J. Hematol.* **63**: 167-

178

Salier, J.P., Rouet, P., Raguenez, G., Daveau, M. (1996) The inter- α -inhibitor family: from structure to regulation. *Biochem. J.* **315**: 1-9

Santin, M., Cannas, M. (1999) Collagen-bound α_1 -microglobulin in normal and healed tissues and its effect on immunocompetent cells. *Scand. J. Immunol.* **50**: 289–295

Sarafan, N., Martin, J.P., Bourguignon, J., Borghi, H., Callé, A., Sesboué, R., Diarra-Mehrpour, M. (1995) The human inter- α -trypsin inhibitor genes respond differently to interleukin-6 in HepG2 cells. *Eur. J. Biochem.* **227**: 808-815

Schaer, D. J., Schaer, C.A., Buehler, P.W., Boykins, R.A., Schoedon, G., Alayash, A. I., Schaffner, A. (2006) CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood* **107**: 373–380

Schmale, H., Holtgreve-Grez, H., Christiansen H. (1990) Possible role for salivary gland protein in taste reception indicated by homology to lipophilic-ligand carrier proteins. *Nature* **343**: 366-369

Schmidt, F.S., Skerra, A. (1994) The bilin-binding protein of *Pieris brassicae*. cDNA sequence and regulation of expression reveal distinct features of this insect pigment protein. *Eur. J. Biochem.* **219**: 855-863

Scolaro, L.M., Casriciano, M., Romeo, A., Patane, S., Cefali, E., Allegrini, M. (2002) Aggregation behavior of protoporphyrin IX in aqueous solutions: clear evidence of vesicle formation. *J. Phys. Chem. B* **106**: 2453-2459

Shaklai, N., Shviro, Y., Rabizadeh, E., Kirschner-Zilber, I. (1985) Accumulation and drainage of hemin in the red cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **821**: 355-366

Smith, A., Morgan, W.T. (1979) Haem transport to the liver by haemopexin. Receptor-mediated uptake with recycling of the protein. *Biochem. J.* **182**: 47-54

Smith, A., Morgan, W.T. (1981) Hemopexin-mediated transport of heme into isolated rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* **256**: 10902-10909

Snyder, S.H., Sklar, P.B., Pevsner, J. (1988) Molecular mechanisms of olfaction. *J. Biol. Chem.* **263**: 13971-13974

Solar, I., Muller-Eberhard, U., Shaklai, N. (1989) Serum proteins as mediators of hemin efflux from red cell membranes: specificity of hemopexin. *FEBS Lett.* **256**: 225-229

Solar, I., Muller-Eberhard, U., Shviro, Y., Shaklai, N. (1991) Long-term intercalation of residual hemin in erythrocyte membranes distorts the cell. *Biochim. Biophys. Acta* **1062**: 51-58

Sreerama, N., Venyaminov, S.Y., Woody, R.W. (2001) Analysis of Protein CD Spectra with A Reference Protein Set Based on Tertiary Structure Class. *Anal. Biochem.* **299**: 271-274

Sreerama, N., Woody, R.W. (2000) Estimation of protein secondary structure from CD spectra: Comparison of CONTIN, SELCON and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal. Biochem.* **282**: 252-260

Sreerama, N., Woody, R.W. (2004) Computation and analysis of protein circular dichroism spectra. *Methods Enzymol.* **383**: 318-351

Stevens, J.M., Daltrop, O., Higham, C.W., Ferguson, S.J. (2003) Interaction of heme with variants of the heme chaperone CcmE carrying active site mutations and a cleavable N-terminal His tag. *J. Biol. Chem.* **278**: 20500-20506

Sudhakar, K., Loe, S., Yonetani, T., Vanderkooi, J.M. (1994) Fluorescent derivatives of human hemoglobin. *J. Biol. Chem.* **269**: 23095-23101

Sun, J., Brand, M., Zenke, Y., Tashiro, S., Groudine, M., Igarashi, K. (2004) Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 1461-1466

Sun, J., Hoshino, H., Takaku, K., Nakajima, O., Muto, A., Suzuki, H., Tashiro, S., Takahashi, S., Shibahara, S., Alam, J., Taketo, M.M., Yamamoto, M., Igarashi, K. (2002) Hemoprotein Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J.* **21**: 5216-5224

Tahara, T., Sun, J., Igarashi, K., Taketani, S. (2004b) Heme-dependent up-regulation of the α -globin gene expression by transcriptional repressor Bach1 in erythroid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**: 77-85

Tahara, T., Sun, J., Nakanishi, K., Yamamoto, M., Mori, H., Saito, T., Fujita, H., Igarashi, K., Taketani, S. (2004a) Heme positively regulates the expression of β -globin at the locus control region via the transcriptional factor Bach1 in erythroid cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 5480-5487

Taketani, S., Kohno, H., Naitoh, Y., Tokunaga, R. (1987b) Isolation of the hemopexin receptor from human placenta. *J. Biol. Chem.* **262**: 8668-8671

Taketani, S., Kohno, H., Tokunaga, R. (1987a) Cell surface receptor for hemopexin in human leukemia HL60 cells. Specific binding, affinity labeling, and fate of heme. *J. Biol. Chem.* **262**: 4639-4643

Tappel, A.L. (1955) Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.* **217**: 721-733

Tenhunen, R., Marver, H., Schmid, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **61**: 748-755

Tenhunen, R., Marver, H., Schmid, R. (1969) Microsomal heme oxygenase, characterisation of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **244**: 6388-6394

Tsuji, A., Shinomiya, N., Hayakawa, M., Nakamura, H. (1996) An upregulation of interleukin-2 receptor, transferrin receptor expression and cytokine production mediated by hemin in human peripheral blood mononuclear cells. *Int. J. Urol.* **3**: 191-195

Tsuji, A., Wang, J., Stenzel, K.H., Novogrodsky, A. (1993) Immune stimulatory and anti-tumour properties of haemin. *Clin. Exp. Immunol.* **93**:308-312

Urade, Y., Nagata, A., Suzuki, Y., Fujii, Y., Hayaishi, O. (1989) Primary structure of rat brain prostaglandin D synthetase deduced from cDNA sequence. *J. Biol. Chem.* **264**:1041-1045

Vallelian, F., Pimenova, T., Pereira, C.P., Abraham, B., Mikolajczyk, M.G., Schoedon, G., Zenobi, R., Alayash, A.I., Buehler, P.W., Schaer, D.J. (2008) The reaction of hydrogen peroxide with hemoglobin induces extensive α -globin crosslinking and impairs the interaction of hemoglobin with endogenous scavenger pathways. *Free Radic. Biol. Med.* **45**: 1150-1158

Verger, C., Sassa, S., Kappas, A. (1983) Growth-promoting effects of iron- and cobalt-protoporphyrins on cultured embryonic cells. *J. Cell. Physiol.* **116**: 135-141

Villoutreix, B.O., Åkerström, B., Lindqvist, A. (2000) Structural model of human α_1 -microglobulin: proposed scheme for the interaction with the Gla domain of anticoagulant protein C. *Blood Coagul. Fibrin.* **11**: 261-275

Vincent, C., Marceau, M., Blangarin, P., Bouic, P., Madjar, J.J., Revillard, J.P. (1987) Purification of α_1 -microglobulin produced by human hepatoma cell lines. Biochemical characterization and comparison with α_1 -microglobulin synthesized by human hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **165**: 699-704

Vincent S.H., Grady, R.W., Shaklai, N., Snider, J.M., Muller-Eberhard, U. (1988) The influence of heme-binding proteins in heme-catalyzed oxidations. *Arch. Biochem. Biophys.* **265**: 539-550

Vitagliano, L., Bonomi, G., Riccio, A., di Prisco, G., Smulevich, G., Mazzarella, L. (2004) The oxidation process of antarctic fish hemoglobins *Eur. J. Biochem.* **271**: 1651-1659

Vyssoulis, G.P., Tousoulis, D., Antoniadis, C., Dimitrakopoulos, S., Zervoudaki, A., Stefanadis, C. (2007) α_1 -microglobulin as a new inflammatory marker in newly diagnosed

hypertensive patients. *Am. J. Hypertens.* **20**: 1016-1021

Wagener, F.A., Eggert, A., Boerman, O.C., Oyen, W.J., Verhofstad, A., Abraham, N.G., Adema, G., van Kooyk, Y., de Witte, T., Figdor, C.G. (2001) Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. *Blood* **98**: 1802-1811

Wagener, F.A., Feldman, E., de Witte, T., Abraham, N.G. (1997) Heme induces the expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, and E selectin in vascular endothelial cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **216**: 456-463

Wagener, F.A., Volk, H.D., Willis, D., Abraham, N.G., Soares, M.P., Adema, G.J., Figdor, C.G. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol. Rev.* **55**: 551-571

Wester, L., Michaëlsson, E., Holmdahl, R., Olofsson, T., Åkerström, B. (1998) Receptor for α_1 -microglobulin on T lymphocytes: inhibition of antigen-induced interleukin-2 production. *Scand. J. Immunol.* **48**: 1-7

Yamauchi, K., Hayashi, N., Kikuchi, G. (1980) Translocation of delta-aminolevulinate synthase from the cytosol to the mitochondria and its regulation by hemin in the rat liver. *J. Biol. Chem.* **255**: 1746-1751

Zhu, Y., Hon, T., Zhang, L. (1999) Heme initiates changes in the expression of a wide array of genes during the early erythroid differentiation stage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **258**: 87-93

Zucker, W.V., Schulman, H.M. (1968) Stimulation of globin-chain initiation by hemin in the reticulocyte cell-free system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **59**: 582-589