

Uniwersytet Warszawski

Wydział Fizyki



mgr Karolina Stachurska – Korzeniowska

Dodecylosiarczan sodu w badaniach strukturalnych białek

Praca doktorska
wykonana w Zakładzie Biofizyki
Instytutu Fizyki Doświadczalnej
Wydziału Fizyki
Uniwersytetu Warszawskiego
pod opieką
prof. dr hab. Jana Antosiewicza

Warszawa, 2025

Składam serdecznie podziękowania za wspólną pracę, pomoc, przekazaną wiedzę oraz wszelkie rady i cenne wskazówki, moim Promotorom prof. dr. hab. Janowi Antosiewiczowi oraz dr hab. Beacie Wielgus – Kutrowskiej, prof. UW.

Pragnę również z całego serca podziękować mojej najukochańszej Mamie i najdroższemu Mężowi, za wiarę we mnie, miłość i ogromne, nieocenione wsparcie – bez Was nie dałabym rady!

Spis treści

Wykaz skrótów i symboli.....	6
Wykaz wykorzystanych programów komputerowych oraz zasobów internetowych.....	8
Wykaz publikacji uwzględnionych w rozprawie doktorskiej.....	9
Streszczenie.....	10
Abstract.....	12
1. Wstęp.....	14
1.1. Surfaktanty.....	15
1.1.1. Dodecylosiarczan sodu.....	18
1.2. Białka.....	20
1.3. Oddziaływanie promieniowania UV z materią.....	25
1.4. Układy białko–dodecylosiarczan sodu.....	28
2. Materiały i metodologia.....	32
2.1. Badane białka.....	32
2.1.1. Albumina.....	32
2.1.2. Lizozym	33
2.1.3. α –laktoalbumina.....	34
2.1.4. α –chymotrypsyna i α –chymotrypsynogen.....	35
2.2. Pozostałe odczynniki.....	36
2.3. Metody analityczne.....	37
2.3.1. Spektroskopia absorpcyjna UV.....	37
2.3.2. Spektroskopia fluorescencyjna UV.....	38

2.3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego.....	38
2.3.4. Spektrometria zatrzymanego przepływu.....	42
2.4. Metody obliczeniowe.....	43
2.4.1. BeStSel	43
2.4.2. CDPro	44
2.4.3. DynaFit	45
3. Badania własne	46
3.1. Przemiany strukturalne α -chymotrypsyny oraz α -chymotrypsynogenu indukowane przez dodecylosiarczan sodu.....	48
3.2. Wybrane układy białko–SDS.....	87
3.2.1. Wpływ dodecylosiarczanu sodu na strukturę lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy.....	87
3.2.1.1. Struktura II-rzędowa.....	88
3.2.1.2. Struktura III-rzędowa.....	96
3.2.2. Stabilność układu białko–SDS w czasie.....	103
3.2.3. Wpływ procedury przygotowania roztworów na widma dichroizmu kołowego · lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy.....	115
3.2.4. Wpływ siły jonowej roztworu na zmiany strukturalne lizozymu, albuminy i · laktoalbuminy indukowane przez SDS.....	127
3.2.5. Kinetyka przemian struktury II-rzędowej albuminy, indukowana przez dodecylosiarczan sodu.....	139
3.2.5.1. Wpływ stężenia SDS na kinetykę przemian strukturalnych.....	139
3.2.5.2. Wpływ siły jonowej na kinetykę przemian strukturalnych.....	145
3.2.6. Wpływ dodecylosiarczanu sodu na widma fluorescencji lizozymu i albuminy.....	150
3.2.7. Wpływ dodecylosiarczanu sodu na kinetykę zmian strukturalnych lizozymu, albuminy oraz α -laktoalbuminy.....	165

4. Podsumowanie.....	175
5. Konkluzje i perspektywy.....	178
6. Dodatek.....	180
7. Literatura.....	196

Wykaz skrótów i symboli

SDS – ang. sodium dodecyl sulfate, dodecylosiarczan sodu

SLS – ang. sodium lauryl sulfate, laurylosiarczan sodu

FUV – ang. Far UltraViolet, daleki ultrafiolet

NUV – ang. Near UltraViolet, bliski ultrafiolet

CD – ang. circular dichroism, dichroizm kołowy

UV – ang. UltraViolet, ultrafiolet

CMC – ang. critical micelle concentration, stężenie krytyczne micelizacji

Tyr – ang. tyrosine, tyrozyna

Phe – ang. phenylalanine, fenyloalanina

Trp – ang. tryptophan, tryptofan

Da – Dalton, jednostka masy

PDB – ang. Protein Data Bank, bank danych białek

BSA – ang. bovine serum albumin, albumina surowicy bydlęcej

4F5S – kod z bazy PDB struktury albuminy surowicy bydlęcej

HEWL – ang. hen egg white lysozyme, lizozymu białka jaja kurzego

132L – kod z bazy PDB struktury lizozym białka jaja kurzego

LALBA – ang. lacto – albumin alpha, α -laktoalbumina z mleka krowiego

1F6S – kod z bazy PDB struktury α -laktoalbuminy z mleka krowiego

CHA – ang. α -chymotrypsin, α -chymotrypsyna z trzustki bydlęcej

4CHA – kod z bazy PDB struktury α -chymotrypsyny z trzustki bydlęcej

CHG – ang. α -chymotrypsinogen, α -chymotrypsynogen z trzustki bydlęcej

1CHG – kod z bazy PDB struktury α -chymotrypsynogen z trzustki bydlęcej

E – energia kwantu fali elektromagnetycznej

J – jul, jednostka energii

h – stała Plancka

ν – częstotliwość fali elektromagnetycznej

Hz – herc, jednostka częstotliwości

c – prędkość światła w próżni

λ – długość fali elektromagnetycznej

nm – nanometr, jednostka długości

A – absorpcja

F – fluorescencja

t – czas

[j. u.] – jednostki umowne

ψ – eliptyczność

$[\psi]$ – eliptyczność molowa

IC – ang. internal conversion, konwersja wewnętrzna

S_0 – stan podstawowy cząsteczki

S_1, S_2, S_3 – stany wzbudzone cząsteczki

FRET – ang. Förster resonance energy transfer, rezonansowe przeniesienie energii Förstera

NaCl – chlorek sodu

λ_{wzb} – długość fali wzbudzenia

PEM – ang. photoelastic modulator, modulator fotoelastyczny

LAAPD – ang. large area avalanche photodiode detector, detektor fotodiodowy lawinowy o dużej powierzchni

π – liczba pi

I – siła jonowa

μM – mikromole

cm – centymetry

LSF – ang. least squares fitting, metoda najmniejszych kwadratów

REES – ang. red edge excitation Shift, przesunięcie wzbudzenia na czerwonym krańcu widma

RMSD – ang. root mean square deviation, średnie odchylenie kwadratowe

Wykaz wykorzystanych programów komputerowych oraz zasobów internetowych

1. BESTSEL – narzędzie służące do analizy struktury drugorzędowej białek na podstawie widm dichroizmu kołowego
2. CDPRO – narzędzie służące do analizy struktury drugorzędowej białek na podstawie widm dichroizmu kołowego
3. DYNAFIT – program służący do analizy krzywych kinetycznych otrzymanych z eksperymentów wykonanych metodą zatrzymanego przepływu
4. ORIGIN – program do analizy danych i tworzenia wykresów naukowych
5. MICROSOFT EXCEL – arkusz kalkulacyjny należący do pakietu Microsoft Office
6. XMGRACE – narzędzie do wizualizacji danych eksperymentalnych
7. RCSB PDB – baza danych zawierająca trójwymiarowe struktury biologicznych makromolekuł

Wykaz publikacji uwzględnionych w rozprawie doktorskiej

- K. Stachurska and Jan M. Antosiewicz, Contribution of Each Tryptophan to the Total Fluorescence Emitted by a Protein with Multiple Tryptophan Residues Depends on the Energy of the Excitation Radiation Quantum, ACS Omega 2024, 9, 43998–44004.
- K. Stachurska, U. Marcisz, M. Długosz, and J. M. Antosiewicz, Kinetics of Structural Transitions Induced by Sodium Dodecyl Sulfate in α -Chymotrypsin, ACS Omega 2023, 8, 49137–49149.
- K. Stachurska, U. Marcisz, M. Długosz, and J. M. Antosiewicz, Circular Dichroism Spectra of α -Chymotrypsin–SDS Solutions Depend on the Procedure of Their Preparation, ACS Omega 2022, 7, 23782–23789.
- K. Stachurska-Korzeniowska, Jan M. Antosiewicz, Dependence of the fluorescence quantum yield of individual tryptophan residues in a protein on the excitation wavelength, Curr. Top. Biophys. 2025, vol. 44, Suppl. A. 59-60.

Streszczenie

Zachodzące pod wpływem czynników środowiskowych zmiany konformacyjne w białkach, są ważnym zjawiskiem, które pozwala na poznanie i zrozumienie wielu podstawowych procesów molekularnych, zachodzących w organizmach żywych. Jednym z takich czynników są różnego rodzaju związki chemiczne czy makromolekuły, które dodane do roztworu zawierającego białko, wpływają na jego strukturę, zarówno II-, III- jak i IV-rzędową. Do takich związków należy dodecylosiarczan sodu (SDS, ang. sodium dodecyl sulfate) – anionowy surfaktant, który wywołuje w białkach zmiany konformacyjne.

Dodecylosiarczan sodu, wpływa zarówno na strukturę II- jak i III-rzędową wszystkich 5 badanych w ramach tej rozprawy doktorskiej białek: α -chymotrypsyny, α -chymotrypsynogenu, albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy. Nie ma natomiast jednej, uniwersalnej ścieżki tych zmian. Widać, że SDS wpływa na zmiany konformacyjne w białkach już w stężeniach milimolowych, ponadto zmiany te są widoczne zarówno poniżej jak i powyżej krytycznego stężenia micelizacji (CMC, ang. critical micelle concentration). W zależności od wartości stężenia, ścieżki tych zmian są różne, co pozwala stwierdzić, że badane białka wiążą i pojedyncze cząsteczki surfaktantu i micelle, a to z kolei może oznaczać, że istotną rolę w zmianach konformacyjnych białek odgrywają ich interakcje nie tylko z micelami, ale również z pojedynczymi cząsteczkami SDS.

Struktura, którą przyjmuje białko po zakończeniu wiązania z SDS może, ale nie musi być jego stabilną strukturą końcową. Zmiany wywoływane przez SDS w strukturze II- i III-rzędowej mogą zachodzić z różną szybkością, a rejestracja parametrów fizycznych, takich jak fluorescencja czy dichroizm kołowy pokazuje różne aspekty tych zmian, które są związane z różnymi cechami struktury białka.

Duże znaczenie w badaniach układu białko-SDS, ma procedura przygotowywania próbek do badań, a dokładnie fakt, czy przed osiągnięciem końcowego stężenia SDS, wyjściowy roztwór białka, zawierał już pewną ilość surfaktantu czy też nie. Co ciekawe, w przypadku zmian w strukturze II- i III-rzędowej lizozymu oraz albuminy, zmiany te nie zależą od procedury prowadzącej do osiągnięcia końcowego stężenia SDS w roztworze, natomiast zupełnie inaczej jest w przypadku α -chymotrypsyny oraz α -laktoalbuminy. Dla α -chymotrypsyny, procedura ma wpływ zarówno na zmiany zachodzące w strukturze II- i III-rzędowej, a dla α -laktoalbuminy ma wpływ tylko na zmiany w strukturze III-rzędowej.

Kolejnym niezwykle ważnym czynnikiem wpływającym na zmiany strukturalne w białkach pod wpływem dodecylosiarczanu sodu jest siła jonowa roztworu. Widać to zarówno w pomiarach stacjonarnych jak i kinetycznych z rejestracją zarówno sygnału dichroizmu kołowego jak i fluorescencji. Nie ma jednak jednej uniwersalnej ścieżki zachodzących zmian. Siła jonowa wpływa ponadto na szybkość procesu zmian konformacyjnych zachodzących w biomolekułach oraz na jego etapowość.

Następnym niezwykle ciekawym zjawiskiem, które zostało zarejestrowane w trakcie badań układu α -chymotrypsyna-SDS, jest fakt, że wkład fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji białka, zależy od długości fali wzbudzenia – nie dlatego, że sama fluorescencja tryptofanów zależy od energii wzbudzenia, lecz dlatego, że ścieżki bezpromienistej utraty energii przez tryptofany, zachodzą z różnym prawdopodobieństwem.

Podsumowując, zmiany strukturalne zachodzące w białkach pod wpływem dodecylosiarczanu sodu, są zjawiskiem niezwykle ciekawym i dającym często nieprzewidywalne wyniki. Ilość czynników mogących wpływać na zachodzące zmiany, zarówno w strukturze II- jak i III-rzędowej jest bardzo duża a ich skutek w znacznej mierze zależy od badanego białka.

Abstract

The conformational changes occurring in proteins under the influence of various environmental factors are an important phenomenon, allowing for the exploration and understanding of many fundamental molecular processes taking place in living organisms. One such factor is the presence of various chemical compounds or macromolecules, which, when added to a solution containing a protein, affect its structure — including its secondary, tertiary, and even quaternary structure. An example of such a compound is the anionic surfactant sodium dodecyl sulfate (SDS), which induces conformational changes in proteins.

Sodium dodecyl sulfate influences both the secondary and tertiary structures of all five tested proteins: α -chymotrypsin, α -chymotrypsinogen, albumin, lysozyme, and α -lactalbumin. However, there is no single, universal pathway for these changes. It is evident that SDS affects protein conformational changes at millimolar concentrations, and these changes are visible both below and above the critical micelle concentration (CMC). Nevertheless, depending on the concentration value, the pathways of these changes differ, indicating that the proteins tested interact with both individual surfactant molecules and micelles. This, in turn, suggests that interactions with both micelles and monomeric SDS molecules play a significant role in protein conformational transitions.

The structure a protein adopts after binding to SDS may, but does not necessarily, represent its final stable conformation. The changes induced by SDS in the secondary and tertiary structures can proceed at different rates, and the measurement of various physical parameters — such as fluorescence or circular dichroism — reveals different aspects of these transitions, each linked to specific structural characteristics of the protein.

An important factor in studies of the protein–SDS system is the sample preparation procedure — specifically, whether the initial protein solution contained a certain amount of surfactant before reaching the final SDS concentration. It turns out that in the case of structural changes in the secondary and tertiary structures of lysozyme and albumin, these changes are independent of the procedure used to achieve the final SDS concentration in the solution. However, this is not the case for α -chymotrypsin and α -lactalbumin. For α -chymotrypsin, the procedure affects both secondary and tertiary structure changes, while for α -lactalbumin, it influences only the tertiary structure alterations.

Another crucial factor influencing structural changes in proteins exposed to SDS is the ionic strength of the solution. This is evident in both steady-state and kinetic measurements

involving circular dichroism and fluorescence. However, there is no single, universal pathway for these changes. Additionally, ionic strength affects the rate of this process as well as its sequential progression.

A particularly interesting phenomenon observed during studies of the α -chymotrypsin–SDS system is the fact that the contribution of fluorescence emitted by individual tryptophan residues to the total recorded protein fluorescence depends on the excitation wavelength. This is not because the fluorescence of tryptophans themselves depends on this excitation energy, but rather because the non-radiative energy dissipation pathways of the tryptophans occur with different probabilities.

In summary, the structural changes occurring in proteins under the influence of sodium dodecyl sulfate are an exceptionally interesting phenomenon, often yielding unpredictable results. The number of factors that can influence conformational changes in both secondary and tertiary structures is undoubtedly large and, to a great extent, depends on the specific protein being studied.

1. Wstęp

Poznanie i zrozumienie mechanizmów zmian strukturalnych zachodzących w białkach, pod wpływem różnych czynników zewnętrznych jest niezwykle istotnym elementem zrozumienia podstaw procesów molekularnych zachodzących w organizmach żywych. Białka są podstawowym składnikiem komórek. Pełnią w nich szereg różnych funkcji, m. in. uczestniczą w przemianach metabolicznych, odpowiedzi immunologicznej, w syntezie hormonów a także są katalizatorami wielu reakcji chemicznych. Przedmiotem badań, które stanowią podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej są zmiany strukturalne zachodzące w kilku wybranych białkach pod wpływem anionowego surfaktantu, dodecylosiarczanu sodu. Ten organiczny związek chemiczny powoduje zmiany strukturalne w białkach, zarówno w strukturze II– jak i III–rzędowej, już w stężeniach mili a nawet mikromolowych. W związku z tym, możliwe jest śledzenie takich zmian poprzez pomiary stacjonarne widm wybranych wielkości fizycznych, takich jak absorpcja, fluorescencja czy dichroizm kołowy w różnych zakresach promieniowania elektromagnetycznego, co dostarcza informacji na temat ilościowych i jakościowych zmian strukturalnych w białkach. Zmianom tym towarzyszą zmiany mierzonych wielkości fizycznych. W widmach absorpcji i fluorescencji – obserwuje się wzrost lub spadek sygnału czy przesunięcie maksimum w kierunku krótszych bądź dłuższych fal, natomiast widma dichroizmu kołowego zmieniają swój kształt. Ponadto, przemiany konformacyjne pod wpływem SDS charakteryzują się różnymi skalami czasowymi, w zależności od wybranego białka. Wprowadzenie SDS do środowiska, w którym znajduje się biomolekuła, prowadzi do zaburzenia równowagi termodynamicznej układu, co w konsekwencji powoduje konieczność zajścia w cząsteczkach białka pewnych zmian strukturalnych, które pozwolą na osiągnięcie nowego stanu równowagi. Poprzez pomiary wybranej wielkości fizycznej w czasie, możliwe jest badanie kinetyki (przede wszystkim wyznaczenie stałych szybkości reakcji) zachodzących w makromolekułach biologicznych zmian konformacyjnych. Wykorzystanie surfaktantów do obserwacji zmian strukturalnych w białkach jest popularnym podejściem, natomiast jednym z wyzwań są skale czasowe tych przemian, które w przypadku wielu białek są bardzo szybkie (rzędu milisekund^[1]), co powoduje duże trudności w ich rejestracji w funkcji czasu. Przede wszystkim, gdy czas zachodzenia zmian strukturalnych jest krótki, większość lub cała przemiana strukturalna może zajść w czasie martwym układu pomiarowego, ponadto często rejestrowane krzywe postępu reakcji, mimo wielokrotnego powtórzenia pomiaru (nawet 300 razy), są zaszumione, co utrudnia ich ilościową analizę.

Badania oddziaływań białek z surfaktantami, w tym z dodecylosiarczanem sodu, mają już ponad 100 letnią historię^[1], ale w dalszym ciągu są bardzo interesującym i wciąż nie do końca zbadanym zagadnieniem, dlatego też, w wielu laboratoriach na świecie prowadzone są intensywnie prace w tej dziedzinie.

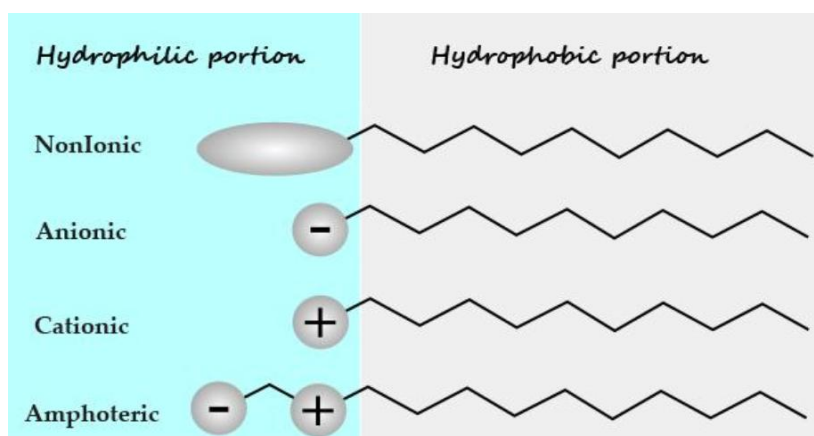
Zainteresowanie powyższym zagadnieniem, narodziło się po lekturze publikacji K. Takedy i Y. Moriyamy z 2015^[2], w której autorzy przedstawili podsumowanie wcześniejszych badań kinetycznych Takedy, głównie z wykorzystaniem metod spektroskopii zatrzymanego przepływu, mających na celu porównanie szybkości zmian struktury drugo- i trzeciorzędowej białek zachodzących po zmieszaniu roztworów białek z roztworami SDS. Niestety, nie udało się im wykazać różnicy w szybkości przemian kinetycznych zachodzących w strukturze II- i III-rzędowej białek. Dysponując odpowiednią aparaturą – spektrometrem dichroizmu kołowego Chirascan Plus z przystawką zatrzymanego przepływu, firmy Applied Photophysics Ltd., który jest bardziej dokładny niż aparatura wykorzystywana przez Takedę, została podjęta decyzja o przeprowadzeniu kinetycznych pomiarów oddziaływania białek z dodecylosiarczanem sodu. W niniejszej rozprawie doktorskiej, zostały opisane przeprowadzone badania układów białko–SDS oraz próba zrozumienia zachodzących w wybranych białkach (α -chymotrypsynie, α -chymotrypsynogenie, albuminie, lizozymie oraz α -laktoalbuminie) zmian strukturalnych pod wpływem dodecylosiarczanu sodu, z wyraźnym podziałem na zmiany struktury II- i III-rzędowej.

1.1. Surfaktanty

Surfaktanty, stanowią dużą grupę związków chemicznych, dobrze zbadaną między innymi pod kątem ich specyficznych właściwości chemicznych czy fizycznych, a także posiadające szeroki, również dogłębnie poznany zakres zastosowań. Nazwa surfaktant, pochodzi od angielskiego terminu *surface active agent*, co w tłumaczeniu na język polski brzmi – środek powierzchniowo czynny. Z definicji, środki powierzchniowo czynne, to związki zdolne do obniżania napięcia powierzchniowego na granicy dwóch faz, które posiadają zdolność adsorbowania się na powierzchni układu i tym samym zmieniają w pewnym stopniu jego energii swobodnej^[3,4]. Należy tutaj jednak zaznaczyć, że nie każdy środek powierzchniowo czynny jest jednocześnie sufraktantem, w języku polskim te dwa pojęcia nie są tożsame – charakterystyczną cechą surfaktantów, odróżniającą je od substancji powierzchniowo czynnych, jest zdolność tworzenia przez nie miceli. Surfaktanty, można

również znaleźć w literaturze pod hasłem „detergenty”, jednak ten termin odnosi się konkretnie do surfaktantów, które są stosowane w produktach czyszczących.

Każda cząsteczka surfaktantu, składa się z dwóch specyficznych elementów, pierwszy z nich, stanowi hydrofilowa/lifilowa, polarna „głowa”, która wykazuje duże powinowactwo do wody i rozpuszczalników polarnych, drugi element stanowi hydrofobowy/lifobowy, niepolarny „ogon”, odpychający wodę, nazywany również łańcuchem alkilowym. Cząsteczki posiadające w swojej budowie obie części: hydrofobową oraz hydrofilową, nazywane są cząsteczkami amfifilowymi (amfipatycznymi). „Ogon” najczęściej stanowi łańcuch węglowodorowy, o długości od 8 do 22 atomów węgla, posiadający wiązania podwójne (nienasycony) lub bez wiązań podwójnych (nasycony). W przypadku „głowy”, może ona stanowić jedną z czterech grup (Rysunek 1): anionową – posiadającą ładunek ujemny, kationową – posiadającą ładunek dodatni, niejonową – nieposiadającą żadnego ładunku lub amfoteryczną – której ładunek zależy od pH^[3].

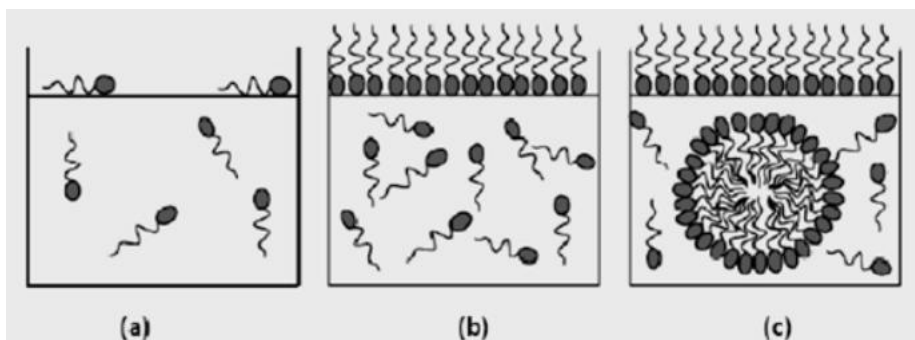


Rysunek 1. Klasyfikacja surfaktantów, ze względu na rodzaj części hydrofilowej^[3].

W zależności od wybranego kryterium, surfaktanty można podzielić na wiele grup, jedną z nich stanowi podział, ze względu na rodzaj posiadanej grupy hydrofilowej. W związku z tym, można zdefiniować surfaktanty jonowe: anionowe, kationowe, amfoteryczne oraz niejonowe. Surfaktant wykorzystywany w tej pracy – dodecylosiarczan sodu należy do grupy surfaktantów anionowych. Jest to najstarsza grupa surfaktantów wykorzystywanych w szeroko rozumianym przemyśle. Związki należące do tej grupy wykazują wysokie właściwości pianotwórcze oraz czyszczące, dlatego też bardzo często można je znaleźć w detergentach domowych i przemysłowych, szamponach oraz żelach pod prysznic. Cząsteczka takiego

surfaktantu, jest zbudowana z części hydrofilowej naładowanej ujemnie, która jest bezpośrednio przyłączona do części hydrofobowej, którą najczęściej stanowi łańcuch, posiadający średnio od 12 do 16 atomów węgla, o charakterze kwasowym, dzięki czemu taki surfaktant jest lepiej rozpuszczalny w rozpuszczalnikach polarnych. Liniowe łańcuchy węglowodorowe są preferowane bardziej, gdyż są bardziej skuteczne w czyszczeniu i łatwiej ulegają biodegradacji niż łańcuchy rozgałęzione^[4,5]. Dodatkowo, cząsteczka takiego surfaktantu zawiera kation (najczęściej sodu), zwany przeciwjonem, który powoduje neutralizację ładunku ujemnego, zapewniając tym samym większą stabilizację i rozpuszczalność. Jest on pomocny w obniżaniu napięcia powierzchniowego czy usuwaniu zabrudzeń. Najczęściej stosowane grupy hydrofilowe w surfaktantach anionowych to karboksylany, siarczany, sulfoniany i fosforany^[6].

Wspomnianą wcześniej charakterystyczną cechą odróżniającą środki powierzchniowo czynne od surfaktantów jest zdolność tworzenia przez cząsteczki surfaktantów charakterystycznych agregatów, zwanych micelami^[7]. Części hydrofobowe cząsteczek surfaktantu gromadzą się w wnętrzu agregatu natomiast hydrofilowe skierowane na zewnątrz, pozostając w bezpośrednim kontakcie z rozpuszczalnikiem^[8]. Wymieniony wyżej kation sodu, jako składnik naładowany dodatnio, pomaga w stabilizacji miceli, wpływając na równowagę elektrostatyczną w roztworze. Tworzenie miceli zachodzi w momencie, gdy stężenie surfaktantu przekracza pewną wartość progową, zwaną krytycznym stężeniem micelizacji (*ang. critical micelle concentration, CMC*)^[9]. Wzrost stężenia surfaktantu, powoduje zwiększenie pokrycia powierzchni między fazami, a po nasyceniu warstwy granicznej rozpoczyna się tworzenie miceli w rozpuszczalniku. Co ciekawe, w momencie tworzenia się miceli w roztworze, ustaje zdolność surfaktantu do obniżania napięcia powierzchniowego na powierzchni. Wynika to z faktu, że istnieje granica obniżenia napięcia powierzchniowego rozpuszczalnika, określana przez gęstość powierzchniową cząsteczek surfaktantu, która decyduje o maksymalnym stopniu redukcji napięcia powierzchniowego wody^[9]. Rysunek 2 przedstawia schemat tworzenia się miceli w roztworze w zależności od stężenia surfaktantu^[8].



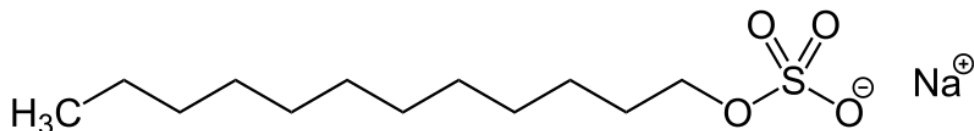
Rysunek 2. Schemat tworzenia się miceli w roztworze w zależności od stężenia surfaktantu: a) $<CMC$, b) onset CMC, c) $>CMC$, "onset CMC" (ang. *onset of critical micelle concentration*) to moment, w którym cząsteczki surfaktantu zaczynają łączyć się w struktury micelarne, zanim zostanie osiągnięte CMC^[8].

Co istotne, powyżej CMC, dodawanie kolejnych cząsteczek surfaktantu, zasila pulę miceli, a nie pulę pojedynczych cząsteczek, w związku z tym, ilość monomerów nie rośnie^[1]. Micele zwykle przedstawiane są schematycznie, jako symetryczne kule, natomiast należy pamiętać, że w rzeczywistości są one dynamicznymi grudkami, nieregularnie połączonych cząsteczek surfaktantu^[1]. Wartość CMC, jest wielkością charakterystyczną dla danego surfaktantu, a jej wartość zależy od wielu czynników, takich jak temperatura czy ciśnienie. Ponadto, CMC maleje wraz ze wzrostem długości hydrofobowego łańcucha węglowodorowego. W przypadku surfaktantów jonowych, CMC zależy również od rodzaju i stężenia przeciwjonów w roztworze. Dodanie elektrolitów do roztworu, również obniża wartość CMC, a efekt ten wzrasta wraz ze zmniejszającą się gęstością ładunku przeciwjonu^[10]. CMC (szczególnie dla surfaktantów jonowych) jest bardzo wrażliwe na siłę jonową, ponieważ wzrost siły jonowej zmniejsza odpychanie elektrostatyczne między grupami hydrofilowymi, dlatego CMC należy określać dla konkretnych warunków eksperymentalnych^[1].

1.1.1. Dodecylosiarczan sodu

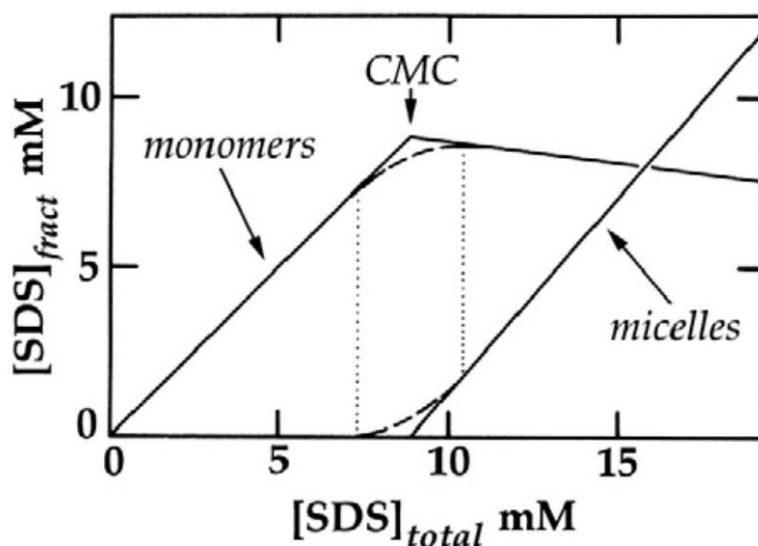
Dodecylosiarczan sodu (ang. *sodium dodecyl sulfate*, *SDS*), spotykany również pod nazwą laurylosiarczan sodu (ang. *sodium lauryl sulfate*, *SLS*) to organiczny związek chemiczny, sól sodowa kwasu dodecylosiarkowego, środek powierzchniowo czynny, flagowy przedstawiciel surfaktantów anionowych, który znajduje szereg zastosowań w badaniach naukowych w dziedzinie biofizyki i biologii molekularnej. Wzór chemiczny SDS to $C_{12}H_{25}SO_4Na$, gdzie $C_{12}H_{25}$ to grupa dodecyłowa (12-węglowy łańcuch alkilowy), który stanowi hydrofobowy „ogon” cząsteczki, SO_4^- to grupa siarczanowa, która stanowi hydrofilową

„głowę” oraz Na^+ , czyli jon sodu, przeciwjon, który neutralizuje ładunek na grupie siarczanowej (Rysunek 3)^[11].



Rysunek 3. Wzór strukturalny cząsteczki SDS^[11].

Krytyczne stężenie micelizacji dla SDS w wodzie, w temperaturze 25°C, wynosi 8,2 mM (przy czym średnia liczba cząsteczek w miceli w tych warunkach to 62^[11]), ale w buforze PBS CMC spada do około 0,8–1 mM^[1], co potwierdza fakt silnej zależności CMC od warunków środowiska, w jakich znajduje się surfaktant. Jak wyżej wspomniano, (Rysunek 4) powyżej CMC dodawanie kolejnych cząsteczek surfaktantu, zasila pulę miceli, a nie pulę pojedynczych cząsteczek. Co więcej, proces tworzenia miceli, zachodzi stopniowo, a nie w ostrej granicy. Zjawisko to można badać przy pomocy kalorymetrii izotermicznej czy z użyciem różnych technik, umożliwiających pomiary takich wielkości fizycznych jak napięcie powierzchniowe, przewodność, ciśnienie osmotyczne czy zdolność zwiększania rozpuszczalności^[1].



Rysunek 4. Zmiana stężenia frakcji monomerów i frakcji miceli, w zależności od całkowitego stężenia SDS^[12].

SDS jest używany w detergentach do prania i innych środkach czystości, jest również wykorzystywany w produkcji kosmetyków. Stwierdzono, że SDS działa drażniąco na skórę i

może powodować przewlekłe problemy skórne. Badania wykazały, że SDS wchodzi i utrzymuje się sercu, wątrobie, płucach i mózgu w wyniku kontaktu ze skórą. Stanowi to poważne zagrożenie zdrowotne w przypadku stosowania go w szamponach, środkach czystości czy pastach do zębów. Ponadto, w procesie produkcji SDS mogą powstawać rakotwórcze azotany^[11]. Powoduje on również podrażnienia układu oddechowego, oczu i twarzy, zwłaszcza, gdy występuje w postaci proszku,. Aby temu zapobiec, dostępna jest forma "pellet" SDS, która praktycznie eliminuje wdychanie pyłu SDS.

1.2. Białka

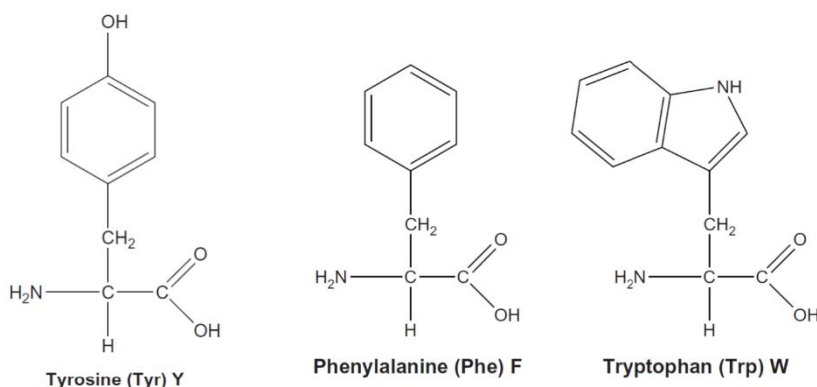
Białka, są to związki wielkocząsteczkowe, o masie od 10 000 Da do kilku milionów Da, jedne z najbardziej różnorodnych ze względu na strukturę czy pełnione funkcje, stanowiące podstawowy składnik komórek organizmów żywych. Są to liniowe polimery (biopolimery), zbudowane z pojedynczych lub kilku nierozgałęzionych łańcuchów polipeptydowych^[13].

Białka mają charakterystyczną budowę, można w niej wyróżnić cztery poziomy organizacji, nazywane strukturami białka, każda z nich jest stabilizowana przez inne wiązania chemiczne^[12].

Pierwszy poziom organizacji stanowi I-rzędowa struktura białka (ang. *primary structure*), tak zwana struktura pierwotna, stanowiąca liniową sekwencję aminokwasów, połączonych ze sobą wiązaniem peptydowym^[14]. Istnieje 20 rodzajów aminokwasów białkowych, budujących wszystkie białka. Każdy aminokwas, zbudowany jest w charakterystyczny sposób, posiada on centralny atom węgla, z którym kowalencyjnie związana są: grupa aminowa $-NH_2$, grupa karboksylowa $-COOH$, atom wodoru i łańcuch boczny, inny dla każdego z 20 aminokwasów^[14].

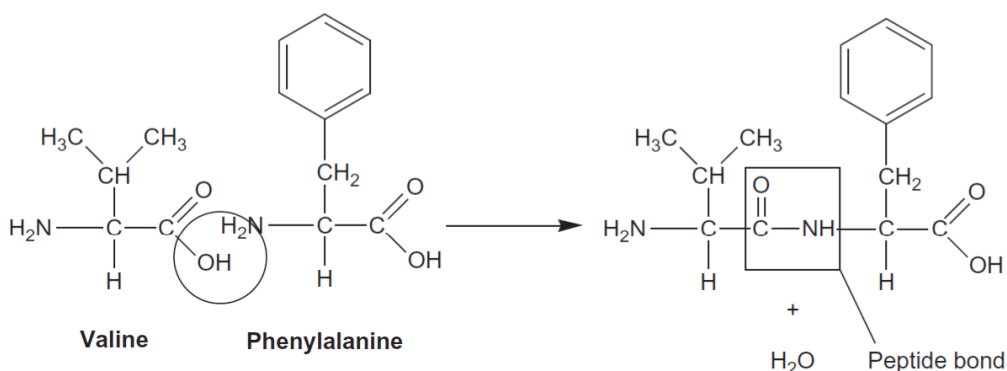
W zależności od wybranego kryterium, aminokwasy można podzielić na kilka grup, zdefiniowanych przez charakter łańcucha bocznego. Z punktu widzenia prowadzonych r ramach rozprawy badań, najistotniejszy jest podział na aminokwasy alifatyczne i aromatyczne. Aromatyczne, czyli takie, które posiadają w łańcuchu bocznym pierścień aromatyczny benzeny. Do tej grupy należą trzy spośród wszystkich 20 aminokwasów białkowych: tryptofan (ang. *tryptophan*, *TRP*), tyrozyna (ang. *tyrosine*, *TYR*) i fenyloalanina (ang. *phenylalanine*, *PHE*) (Rysunek 5). Pozostałe aminokwasy, należą do grupy alifatycznych. Posiadanie przez aminokwasy pierścienia aromatycznego sprawia, że odgrywają one kluczową rolę w

oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego z białkami. Temat ten, będzie szerzej opisany w podrozdziale – 1.3.



Rysunek 5. Wzory strukturalne aminokwasów aromatycznych^[14].

Łańcuchy polipeptydowe są tworzone, poprzez łączenie się aminokwasów białkowych wspomnianym wcześniej wiązaniem peptydowym (*ang. peptide bond*) pomiędzy grupą aminową pierwszego aminokwasu a grupą karboksylową drugiego aminokwasu. Tworzenie wiązania peptydowego jest reakcją dehydratacji (Rysunek 6)^[14] – z grupy aminowej odłącza się atom wodoru, a z grupy karboksylowej atom tlenu tworząc cząsteczką wody. W tak utworzonym łańcuchu białkowym wyróżnia się N–koniec, który stanowi początek łańcuch polipeptydowego i posiada wolną grupę aminową oraz C–koniec, który stanowi koniec łańcucha i posiada wolną grupę karboksylową.

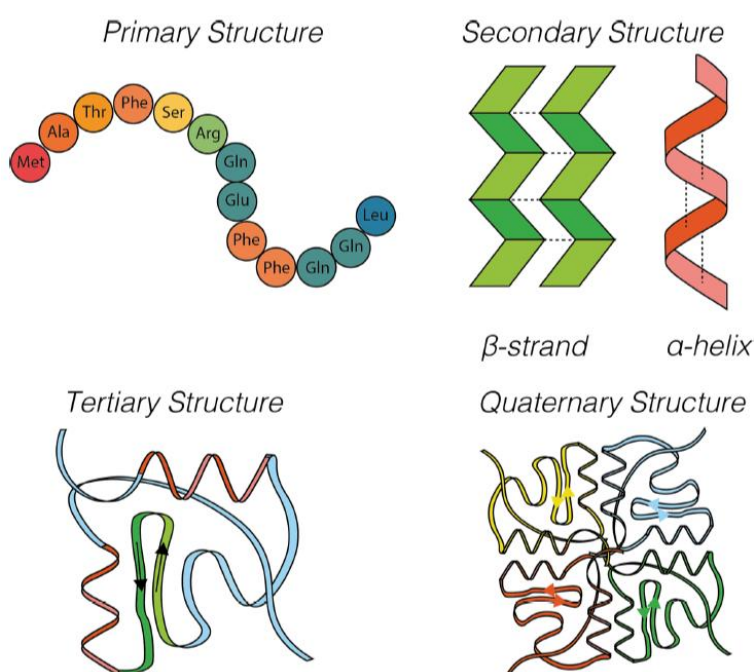


Rysunek 6. Schemat tworzenia wiązania peptydowego pomiędzy dwoma aminokwasami waliną (*ang. valine*) oraz fenyloalaniną^[14].

Białka posiadają niezwykłą zdolność spontanicznego formowania się w precyzyjnie określone, stabilne struktury trójwymiarowe^[15] – nazywane konformacjami natywnymi, które są zdeterminowane przez sekwencje aminokwasów w łańcuchu białkowym^[13]. Co ważne, tylko

poprawnie uformowane przestrzennie białko może pełnić swoją funkcję. Forma natywna białka obejmuje kolejne 3 poziomy organizacje: strukturę II-, III- i IV-rzędową (Rysunek 7)^[16].

Struktura II-rzędowa (ang. *secondary structure*) białka to przestrzenne, regularne ułożenie łańcucha polipeptydowego (struktury I-rzędowej) stabilizowane przez wiązania wodorowe tworzące się między atomem wodoru grupy aminowej a atomem tlenu grupy karboksylowej. Struktura ta ściśle określa właściwości białka, a mianowicie jego sztywność, elastyczność czy możliwość tworzenia wiązań z innymi cząsteczkami. Wyróżnia się 4 główne typy struktury II-rzędowej: α -helisę, β -kartkę, pętle i fragmenty nieustrukturyzowane^[16].



Rysunek 7. Poziomy organizacji struktury białek^[16].

α -helisa (ang. *α -helix*) to typ struktury o charakterystycznym wyglądzie spirali, stabilizowany wiązaniami wodorowymi, tworzącymi się między grupą aminową jednego aminokwasu (z wiązania peptydowego) a grupą karboksylową aminokwasu znajdującego się cztery kolejne aminokwasy dalej. Co ważne wszystkie wiązania peptydowe, biorą udział w tworzeniu tych wiązań wodorowych. Grupy boczne aminokwasów (reszty aminokwasowe) wystawione są na zewnątrz α -helisy, co pozwala na ich oddziaływanie z innymi cząsteczkami (np. z wodą) a płaszczyzny wiązań peptydowych układają się spiralnie. Na jeden skręt spirali przypada 3,6 reszt aminokwasowych, a odległość między dwoma resztami wynosi 0,15 nm^[13].

β -karta (ang. *β -strand*) to typ struktury, która powstaje w wyniku tworzenia się wiązań wodorowych między grupą aminową jednego aminokwasu (z wiązania peptydowego) a grupą karboksylową aminokwasu z innego łańcucha polipeptydowego lub tego samego, ale z odległej jego części. Łańcuchy takie nazywane są niciami β . Wyróżnia się dwa typy nici: bardziej stabilne, antyrównoległe – nici biegną w przeciwnych kierunkach do siebie (jedna od N-końca do C-końca, druga od C-końca do N-końca) i mniej stabilne – równoległe, gdzie wszystkie nici biegną w tym samym kierunku (od N-końca do C-końca). Mogą również występować struktury mieszane zawierające równoległe i antyrównoległe nici. W β -karcie grupy boczne aminokwasów wystają raz poniżej a raz powyżej płaszczyzny kartki^[13].

Pętle, zazwyczaj łączą ze sobą α -helisy i β -karki, ale nie posiadają charakterystycznych wiązań wodorowych, choć są przez niestabilizowane. Zazwyczaj znajdują się na powierzchni białka, mają różną długość, od kilku do kilkunastu aminokwasów. Mogą przyjmować bardziej uporządkowane struktury, np. β -zwrot^[13].

Fragmenty nieustrukturyzowane, jak sama nazwa wskazuje, to takie elementy w strukturze II-rzędowej, które nie przybierają żadnej stabilnej i uporządkowanej formy przestrzennej. Mogą przyjmować różne kształty, zależnie od środowiska, w którym się znajdują bądź interakcji, w które wchodzi. Zdarza się, że takie nieustrukturyzowane fragmenty są linkerami, czyli krótkimi sekwencjami aminokwasowymi, pomagającymi w organizacji przestrzennej białka^[17].

Struktura III-rzędowa (ang. *tertiary structure*) białka to przestrzenne ułożenie fragmentów struktury II-rzędowej. Dzięki temu, białka osiągają charakterystyczną, unikalną natywną przestrzenną strukturę trójwymiarową. Stabilizowana jest ona poprzez wiązania wodorowe, mostki disiarczkowe, oddziaływania jonowe czy wiązania van der Waalsa. W przypadku białek, które są rozpuszczalne w wodzie, na kształt struktury III-rzędowej ma wpływ obecność rozpuszczalnika, ponieważ woda powoduje, że niepolarne łańcuchy boczne aminokwasów zamknięte są we wnętrzu białka, a polarne łańcuchy są wystawione na powierzchni białka^[13].

Struktura IV-rzędowa (ang. *quaternary structure*) to najwyższy poziom organizacji białka, ale w przeciwieństwie do struktur I-, II- i III-rzędowych, posiada ją tylko część białek. Dotyczy ona białek, które składają się z wielu łańcuchów polipeptydowych, które mogą być różne (heterooligomery) lub jednakowe (homooligomery). Struktura ta to wzajemne ułożenie pojedynczych łańcuchów białkowych i oddziaływania, które je stabilizują. Oprócz wiązań

wodorowych, mostków disiarczkowych, oddziaływań jonowym oraz wiązań van der Waalsa, mogą również występować oddziaływania hydrofobowe, estrowe czy tioestrowe^[13].

Funkcjonalna aktywność białek w dużej mierze zależy od integralności ich struktury trójwymiarowej. Istotnym zjawiskiem związanym ze strukturą przestrzenną białek jest denaturacja. Jest to proces polegający na zniszczeniu struktury II-, III- lub IV-rzędowej (utrata pierwotnej struktury przestrzennej), nie naruszając przy tym struktury I-rzędowej białka, pod wpływem czynników chemicznych czy fizycznych, prowadzący do utraty przez białko jego specyficznych właściwości i możliwości pełnienia swoich funkcji. Proces ten jest nieodwracalny, gdy zniszczeniu ulegną wiązania kowalencyjne w białku (np. mostki disiarczkowe), jeżeli nie – możliwe jest przywrócenie pierwotnej struktury białka i taki proces nosi nazwę renaturacji. Dla większości białek, denaturacja jest złożonym procesem obejmującym przejściowe produkty pośrednie i przebiega w kilku odwracalnych lub nieodwracalnych etapach^[18]. Najbardziej popularnymi denaturantami są mocznik i chlorowodorek guanidyny.

Białka pełnią szereg funkcji, między innymi są podstawowym elementem budulcowym komórek i tkanek, umożliwiają transport cząsteczek, regulują i kontrolują procesy biochemiczne, biorą udział w odpowiedzi immunologicznej czy są też receptorami sygnałów^[19]. Specyficzną grupę białek stanowią enzymy. Enzymy są katalizatorami większości zachodzących w organizmach żywych procesów i reakcji. Katalizatory, są substancjami przyspieszającymi reakcje chemiczne poprzez obniżanie energii aktywacji, które jednak same, nie zużywają się w trakcie reakcji. Każda reakcja chemiczna, ma określoną energię aktywacji, im jest niższa tym reakcja zachodzi szybciej^[20].

1.3. Oddziaływanie promieniowania UV z materią

Promieniowanie elektromagnetyczne jest rozchodzącym się w ośrodku zaburzeniem pola elektromagnetycznego w postaci drgań wektorów natężenia pola elektrycznego $\vec{E}$ i magnetycznego $\vec{B}$. Oba wektory są względem siebie prostopadłe, a także są prostopadłe do kierunku rozchodzenia się fali, ten drugi warunek powoduje, że fale elektromagnetyczne są falami poprzecznymi^[21]. Dodatkowo, gdy oscylacje zachodzą w jednej określonej płaszczyźnie (zwanej płaszczyzną polaryzacji) to takie fale są falami spolaryzowanymi. Wyróżnia się kilka rodzajów polaryzacji:

- polaryzację liniową – gdzie wektor $\vec{E}$ (a tym samym i $\vec{B}$) ma zmienną wartość i tylko jeden wyróżniony kierunek;
- polaryzację kołową – gdzie wektor ma stałą wartość, ale jego kierunek zmienia się tak, że w ustalonym punkcie przestrzeni koniec tego wektora zatacza okrąg w czasie jednego okresu fali elektromagnetycznej (okres fali, to czas jednego pełnego drgania); jeżeli zatacza ten okrąg zgodnie z ruchem wskazówek zegara, czyli w prawo, to mówi się o polaryzacji kołowej prawoskrętnej, a gdy w lewo, to o lewoskrętnej;
- polaryzację eliptyczną – gdzie wartość wektora nie ma stałej wartości i jego kierunek zmienia się w taki sposób, że w ustalonym punkcie przestrzeni koniec tego wektora zatacza elipsę^[22].

Fala elektromagnetyczna charakteryzuje się dualizmem korpuskularno – falowym, oznacza to, że jest jednocześnie falą i strumieniem cząsteczek. Z jednej strony można ją zatem opisywać podając cechy charakterystyczne dla fali, takie jak okres (czas jednego pełnego drgania cząsteczki ośrodka), długość fali (najmniejsza odległość między dwoma powtarzającymi się fragmentami fali) czy częstotliwość (liczba drgań w ciągu jednej sekundy). Z drugiej strony jest to zbiór cząsteczek – fotonów, czyli kwantów promieniowania elektromagnetycznego, (które biegą w kierunku rozchodzenia się fali elektromagnetycznej), o ściśle określonej energii (Równanie 1), zależnej wprost proporcjonalnie od częstotliwości fali elektromagnetycznej oraz odwrotnie proporcjonalnie do długości fali^[23]:

$$E = h \cdot \nu = h \cdot \frac{c}{\lambda} \quad (1)$$

gdzie E – energia kwantu fali elektromagnetycznej [J], h – stała Plancka $6,62607015 \cdot 10^{-34}$ [J·s], ν – częstotliwość fali elektromagnetycznej [Hz], c – prędkość światła w próżni $2,99792458 \cdot 10^8$ [$\frac{m}{s}$], λ – długość fali elektromagnetycznej [nm].

Wyróżnia się siedem umownych rodzajów promieniowania elektromagnetycznego, ze względu na ich częstotliwość, długość fali lub energię. Badania będące podstawą niniejszej pracy zostały wykonane w zakresie promieniowania ultrafioletowego (ang. *ultraviolet UV*).

Promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu ultrafioletu, można podzielić na 3 grupy:

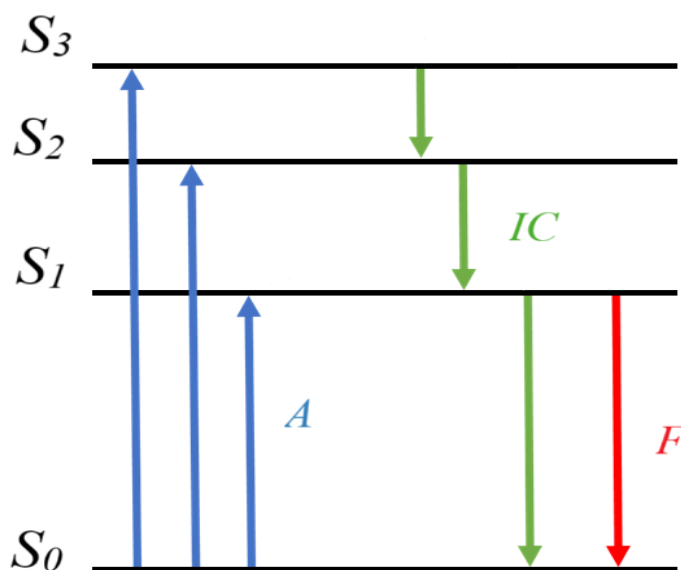
- UV – A: zakres ok. 315 – 400 nm i energia ok. 4.97×10^{-19} J – 6.25×10^{-19} J;

- UV – B: zakres ok. 280 – 315 nm i energia ok. $6.25 \times 10^{-19} \text{ J}$ – $7.05 \times 10^{-19} \text{ J}$;
- UV – C: zakres ok. 100 – 280 nm i energia ok. $7.05 \times 10^{-19} \text{ J}$ – $1.99 \times 10^{-18} \text{ J}$.

Każda cząsteczka posiada określoną energię, która jest sumą pięciu rodzajów energii:

- energii translacyjnej, która wynika z ruchu translacyjnego;
- rotacyjnej, która wynika z ruchów obrotowych;
- oscylacyjnej, która wynika z ruchu oscylacyjnych jąder;
- elektronowej, która wynika z energii potencjalnej interakcji elektronów z jądrami i innymi elektronami i energii kinetycznej elektronów oraz
- energii wewnątrzjądrowej, stanowiącej potencjalną i kinetyczną energię nukleonów tworzących jądra molekuly^[78].

W związku z tym, każda cząsteczka posiada swój własny, charakterystyczny układ poziomów energetycznych. Promieniowanie elektromagnetyczne, może wywoływać zmiany energii cząsteczki, czyli powodować przejścia między poziomami energetycznymi: ze stanu podstawowego (o najniższej energii) do poziomów wzbudzonych (o wyższych energiach). Promieniowanie z zakresu UV może wywoływać zmianę energii elektronowej cząsteczki. Żeby było to możliwe, różnica energii między stanem podstawowym a wzbudzonym cząsteczki musi być, co do wartości, równa energii promieniowania elektromagnetycznego oddziałującego z cząsteczką. Przy przejściu cząsteczki z poziomu podstawowego na poziom wzbudzony, mówi się o zjawisku absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, czyli o pochłonięciu przez cząsteczkę kwantu promieniowania elektromagnetycznego. Diagram Jabłońskiego (Rysunek 8), w sposób schematyczny przedstawia, jakie procesy zachodzą w cząsteczce po absorpcji tego kwantu.



Rysunek 8. Ograniczony do przejść między stanami singletowymi diagram Jabłońskiego przedstawiający schematyczny układ poziomów elektronowych w cząsteczce. Strzałka niebieska przedstawia przejścia związane z absorpcją (A), strzałka czerwona promieniste związane z fluorescencją (F), strzałki zielone przedstawiają przejście bezpromieniste, tj. konwersję wewnętrzną (*ang. internal conversion, IC*). S_0 oznacza stan podstawowy, S_1 , S_2 i S_3 kolejne poziomy wzbudzone.

Aby cząsteczka była zdolna do absorpcji promieniowania z zakresu UV, musi posiadać charakterystyczną budowę, np. musi posiadać sprzężony układ wiązań elektronowych lub pierścienie aromatyczne ze sprzężonym układem węglowych wiązań podwójnych, umożliwiające absorpcję promieniowania w zakresie około 200 nm – 300 nm. Każda cząsteczka po absorpcji, dąży do jak najszybszego powrotu do stanu podstawowego, pozbywając się nadmiarowej energii, najczęściej poprzez zderzenia z innymi cząsteczkami. Nadmiaru energii z wyższych stanów wzbudzonych cząsteczki mogą pozbywać się między innymi poprzez konwersję wewnętrzną (ruchy wewnętrzne cząsteczki związane z drganiem i rotacją wiązań chemicznych). Niektóre cząsteczki są zdolne do pozbywania się energii w sposób promienisty, poprzez emisję kwantu promieniowania elektromagnetycznego w postaci fotonu. Jednym z takich procesów jest fluorescencja, która zawsze zachodzi z pierwszego poziomu wzbudzonego S_1 ^[24], jedyny wyjątek stanowi azulen, który fluoryzuje z poziomu S_2 .

Białka, ze względu na fakt, iż posiadają w swojej budowie aminokwasy aromatyczne, które z kolei posiadają pierścienie aromatyczne, są zdolne do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego z zakresu UV, dla tryptofanu maksimum absorpcji przypada dla długości fali 278 nm, dla tyrozyny 274 nm a dla fenyloalaniny 260 nm. Najwyższą absorpcję wykazuje tryptofan, ze względu na najwyższy współczynnik ekstynkcji molowej, natomiast

fenyloalanina ma ten współczynnik najniższy, przez co i jej absorpcja jest najmniejsza. Dodatkowo, w białkach za absorpcję odpowiedzialne są wiązania peptydowe, przy 190 nm oraz 210 nm, co jest związane ze sprzężonymi układami elektronów^[25].

Aminokwasy aromatyczne są również zdolne do emisji promieniowania elektromagnetycznego poprzez fluorescencję. Maksimum emisji dla tryptofanu nie jest wartością stałą, silnie zależy od polarności rozpuszczalnika, dla roztworów wodnych wynosi około 355 nm, w rozpuszczalnikach niepolarnych przesuwają się w kierunku krótszych fal. Dla tyrozyny maksimum emisji przypada dla 303 nm a dla fenyloalaniny przypada dla 280 nm. Tryptofan i tyrozyna wykazują znacznie większą wydajność kwantową (Równanie 2) niż fenyloalanina, natomiast emisja tyrozyny i dodatkowo fenyloalaniny, jest często wygaszana poprzez rezonansowe przeniesienie energii FRET (ang. *Förster resonance energy transfer*), dlatego też fluorescencję fenyloalaniny można obserwować w istocie tylko w przypadku, gdy białko nie posiada pozostałych dwóch aminokwasów aromatycznych^[26]. Widmo absorpcji tryptofanu jest przesunięte w stosunku do Phe i Tyr w kierunku niższych energii, w związku z tym można go selektywnie wzbudzać długością fali 295 nm (patrz Rysunek D1 w rozdziale 6)^[25].

Wydajność kwantowa fluorescencji, to stosunek liczby fotonów wyemitowanych (n_E) do liczby fotonów zaabsorbowanych (n_A):

$$\Phi = \frac{n_E}{n_A} \quad (2)$$

1.4. Układy białko–dodecylsulfat sodu

Naukowe badania oddziaływań białek z surfaktantami, w tym z SDS, mają już ponad 100 letnią historię. Aby dokładnie poznać i zrozumieć interakcje między białkami a surfaktantami, warto posiadać pełny obraz zmian strukturalnych, stechiometrycznych czy kalorymetrycznych^[1]. W tej pracy skupiono uwagę na zmianach strukturalnych, jakie SDS wywołuje w strukturze II– i III–rzędowej białek. Nie jest do końca jasne, czy w kontekście SDS można mówić o denaturacji, (jeśli tak, to w którym momencie?) czy jedynie o zmianach strukturalnych. Tradycyjne chemiczne i najsilniejsze jednocześnie denaturanty, mocznik czy chlorowodorek guanidyny, denaturują białka w stężeniach molowych, natomiast SDS wywołuje zmiany strukturalne w stężeniach mili- a nawet mikromolowych.

Istnieje wiele metod pozwalających na badanie oddziaływań pomiędzy białkami a SDS^[1]. Metodami, które zostały wybrane w ramach tej pracy doktorskiej były: (1) dichroizm

kołowy w dalekim oraz bliskim ultrafiolecie (oznaczane odpowiednio jako FUV, ang. *Far UltraViolet* oraz NUV, ang. *Near UltraViolet*) oraz (2) fluorescencja naturalnie występujących w białkach fluoroforów. Zarówno dichroizm kołowy jak i fluorescencję można mierzyć w formie widm stacjonarnych, jak również w postaci kinetycznych krzywych postępu reakcji w czasie, z wykorzystaniem techniki zatrzymanego przepływu. Pomiar dichroizmu kołowego dostarcza informacji dotyczących zmian ilościowych w strukturze II-rzędowej oraz jakościowych w strukturze III-rzędowej. Kinetyka zmian strukturalnych, to zespół czasów relaksacji charakteryzujących te zmiany, w czasie dochodzenia do równowagi po zadziałaniu czynnika zaburzającego, jakim w tym przypadku jest SDS. Analiza krzywych postępu reakcji pozwala na uzyskanie dopasowania najlepszego modelu opisującego zachodzące zmiany oraz oszacować wielkości, które je charakteryzują, np. stałe szybkości reakcji.

Najlepszym podejściem, do dokładnego śledzenia zmian strukturalnych w białkach pod wpływem SDS, jest łączenie obu rodzajów pomiarów: stacjonarnych i kinetycznych, czego potwierdzenie można znaleźć w literaturze. Takeda^[2] analizował mechanizm zmian konformacyjnych w białku na podstawie danych kinetycznych, uzyskanych z wykorzystaniem metody zatrzymanego przepływu oraz zmian zawartości α -helisy w strukturze II-rzędowej, interpretując widma dichroizmu kołowego w dalekim ultrafiolecie.

Jak już zostało wspomniane, ogromne znaczenie w badaniach białek z surfaktantami ma silna zależność CMC od siły jonowej używanego rozpuszczalnika. Im wyższa siła jonowa tym niższe CMC. Dlatego, aby móc prowadzić badania w szerokim zakresie stężeń SDS, zarówno poniżej jak i powyżej CMC, należy mieć możliwie wysokie CMC, co można uzyskać poprzez stosowanie buforów o niskich stężeniach. Siła jonowa wpływa zmianę struktury miceli^[27], a także bezpośrednio na oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe^[28]. Ponadto wiązanie pojedynczych cząsteczek SDS (poniżej CMC) może mieć wpływ na rozpuszczalność białka^[1]. Rozważając oddziaływania białko-SDS w roztworach wodnych, należy je podzielić na dwie grupy: poniżej i powyżej CMC. Według Bhuyana^[29], globalne zmiany struktury III-rzędowej następują zarówno poniżej jak i powyżej CMC, natomiast struktury II-rzędowej następują dopiero przy bardzo wysokich stężeniach SDS (~100 mM).

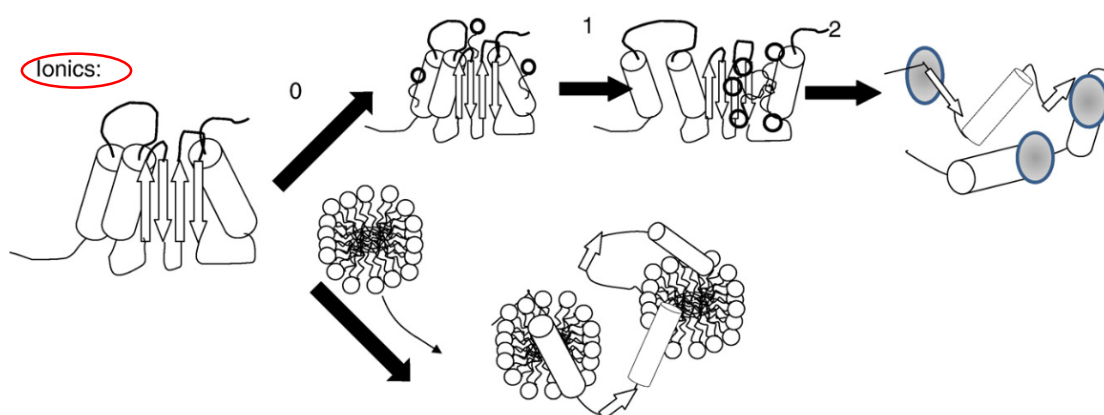
Równie istotną kwestią jest pH rozpuszczalnika. Im niższe pH tym większe powinowactwo SDS do białek i zmiany strukturalne mogą zachodzić szybciej. Wpływ temperatury nie jest aż tak duży jak pH, czy siły jonowej, ale tylko pod warunkiem, że eksperymenty są wykonywane powyżej temperatury Krafta (tj. minimalnej temperatury, w

której mogą efektywnie tworzyć się micelle), gdyż poniżej tej temperatury rozpuszczalność SDS spada i zaczyna się on wytrącać. Temperatura Kraфта dla SDS wynosi około 15°C^[30].

Istotną kwestią jest, czy surfaktanty oddziałują z białkami w inny sposób niż chemiczne denaturanty. Należy tutaj zwrócić uwagę, że w tej kwestii bardzo duże znaczenie ma stężenie surfaktantu. Można znaleźć prace, w których autorzy^[28] sugerują, że SDS może działać jak konwencjonalny denaturant, lub takie, w których, dla niektórych białek, ścieżki działania surfaktantów mogą być zupełnie inne niż dla denaturantów^[29]. Ważne jest to, że surfaktanty jonowe wiążą się kooperatywnie z białkami i są zdolne wywoływać w nich zmiany strukturalne. Wiązanie to, może odbywać się zarówno w jednym^[2], jak w kilku etapach, ponieważ istnieją badania, w których wykazane jest większe powinowactwo do stanu rozwiniętego niż zwiniętego białka^[1], a wszystko zależy od warunków prowadzenia eksperymentów, w tym stężenia surfaktantu. Najłatwiej jest analizować oddziaływania białko–surfaktant poniżej CMC. Według Takedy^[2], gdy pewna ilość pojedynczych cząsteczek surfaktantu wiąże się z białkami, ich natywne struktury przekształcają się bezpośrednio w określone zmienione struktury, bez przechodzenia przez etapy pośrednie (które mogłyby być indukowane z powodu wiązania małej ilości jonów surfaktantu) oraz że zmiany strukturalne białek należy omawiać, zakładając jednokierunkowe modele reakcji bez procesów wstecznych, zamiast odwracalnych modeli reakcji dwu- i wielostanowych. W pracy Otzena^[1], można znaleźć stwierdzenie, że wiązanie jonowych surfaktantów jest procesem bardzo złożonym i wieloetapowym. Zdarza się jednak, że przy bardzo niskich stężeniach (poniżej ~0.1 mM), surfaktanty wiążą się bez wywoływania zmian konformacyjnych^[28]. Cząsteczki surfaktantu w tych warunkach przyjmują rolę konwencjonalnego ligandu, który stabilizuje białka przed denaturacją. Pierwsze etapy wiązania obejmują wiązanie pojedynczych monomerów poprzez oddziaływania elektrostatyczne i hydrofobowe^[31]. SDS łączy się z kationowymi łańcuchami bocznymi aminokwasów. Przy stężeniach SDS poniżej CMC, gdy miejsca wiązania są nasycone, wiązanie większej liczby surfaktantów może prowadzić do tworzenia się struktur, które zaczynają rozwijać białko. Istotną kwestią na tym etapie, jest nie tyle stężenie surfaktantu, co stosunek liczby cząsteczek surfaktantu do liczby cząsteczek białka. Zwykle logarytm stałej szybkości denaturacji rośnie liniowo ze stężeniem surfaktantu, podobnie jak w przypadku chemicznych denaturantów. Tak więc na tym etapie surfaktant zachowuje się jak klasyczny denaturant, przy czym jest wielokrotnie silniejszy od chemicznych denaturantów. W pobliżu lub powyżej CMC kooperatywne wiązanie cząsteczek surfaktantu zakłóca natywną strukturę II- i III-rzędowej białka i osłabia jego aktywność^[1].

Analizując oddziaływania białko–surfaktant, należy pamiętać, aby zachodzące zmiany konformacyjne w białkach pod wpływem SDS, badać zarówno poniżej jak i powyżej CMC. Metodą, która pozwala na uzyskanie informacji o kinetycznych zmianach w układzie białko–SDS, jest wspomniana wcześniej kinetyka, czyli pomiary szybkości, z jaką zachodzą zmiany strukturalne, gdy białka są mieszane z surfaktantami. Dzięki tej technice, można śledzić proces tworzenia kompleksu białko–SDS. Należy pamiętać, że ścieżka tworzenia się takiego kompleksu silnie zależy od stężenia SDS oraz od innych warunków eksperymentu, np. siły jonowej roztworu. Przy bardzo wysokich stężeniach surfaktantu, znacznie powyżej CMC (kilkaset mM) szybkość zmian konformacyjnych w niektórych białkach, może gwałtownie rosnąć^[27].

Podsumowując, nie ma jednoznacznej i uniwersalnej ścieżki, zgodnie z którą zmienia się struktura białka pod wpływem SDS. Na rysunku 9^[31] przedstawiono schemat podsumowujący prawdopodobne strategie ataku cząsteczek surfaktantów jonowych na cząsteczkę białka, na przykładzie oddziaływania α -laktoalbuminy z SDS.



Rysunek 9. Schemat podsumowujący różne strategie ataku cząsteczek surfaktantów jonowych na cząsteczkę białka. Strzałka do góry: stężenie SDS poniżej CMC, strzałka w dół: stężenie powyżej CMC^[31].

Poniżej CMC: w fazie oznaczonej na rysunku jako 0, przy bardzo niskich stężeniach SDS, poszczególne cząsteczki surfaktantu wiążą z białkiem nie powodując żadnych większych zmian konformacyjnych, w fazach 1 i 2 widać zwiększony wychwyt cząsteczek surfaktantu oraz zmiany w strukturze zarówno II– i III–rzędowej, jednak zachodzą one z różną szybkością (prawdopodobnie wynika to z faktu, że początkowe wiązanie surfaktantu następuje na powierzchni białka i jest związane z destabilizacją struktury III–rzędowej, natomiast zmiany w strukturze II–rzędowej są wolniejsze, ponieważ częściowo schowane we wnętrzu białka

elementy tej struktury takie jak α -helisy i β -kartki są bardziej odporne na działanie SDS). Powyżej CMC micelle wiążą się w kilku etapach (niepokazanych na rysunku), co prowadzi do stanu o strukturze podobnej do tej na końcu fazy 2 dla stężenia poniżej CMC.

Ze względu na fakt, że oddziaływanie surfaktantów jonowych z białkami może przebiegać wieloma ścieżkami mogą one pełnić inne role, niż tylko potencjalnych denaturantów lub substancji wpływających na zmianę struktury natywnej białek. SDS jest w stanie aktywować białka, lub działać, jako inhibitor enzymów^[32,33]. Efekty te występują w stężeniach znacznie niższych od tych, w których zachodzą zmiany konformacyjne i utrata natywnej struktury białka^[1].

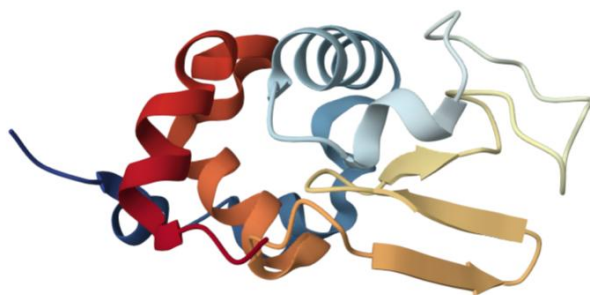
Okazuje się również, że niektóre białka są odporne na działanie SDS. Przykładami białek, które nie wchodzi w interakcję z SDS są papaina i pepsyna^[34].

2. Materiały i metodologia

2.1. Badane białka

2.1.1. Albumina

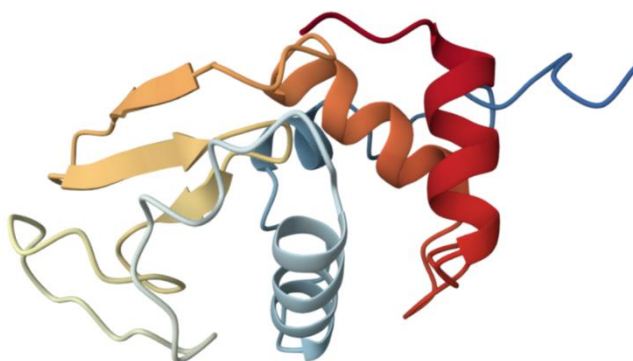
Albumina surowicy bydlęcej, BSA (ang. *bovine serum albumin*) to białko pochodzące z surowicy krwi bydlęcej^[35], składające się z 583 aminokwasów, rozpoczynające się kwasem asparaginowy na N – końcu i zakończone alaniną na C-końcu^[36]. BSA ma masę cząsteczkową wynoszącą 66 000 Da. W sekwencji zawiera 4 tryptofany, 40 tyrozyn i 54 fenyloalaniny^[36]. W strukturze natywnej (Rysunek 10) posiada 17 mostków disiarczkowych, α -helisy stanowią 69,8%, nie posiada żadnych struktur β -kartkowych^[36]. Molowy współczynnik ekstynkcji, na podstawie, którego spektrofotometrycznie wyznaczano stężenie białka wynosi $\epsilon_{280\text{ nm}} = 43\,824\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[38]. Główną rolą BSA jest transport różnych cząsteczek, przede wszystkim kwasów tłuszczowych i hormonów, ale także leków, co jest niezwykle ważne i szeroko wykorzystywane w farmakologii^[39]. Białko będące obiektem naszych badań eksperymentalnych zostało zakupione z firmy ROTH (nr. artykułu T844.2).



Rysunek 10. Model cząsteczki albuminy (4F5S.pdb)^[36].

2.1.2. Lizozym

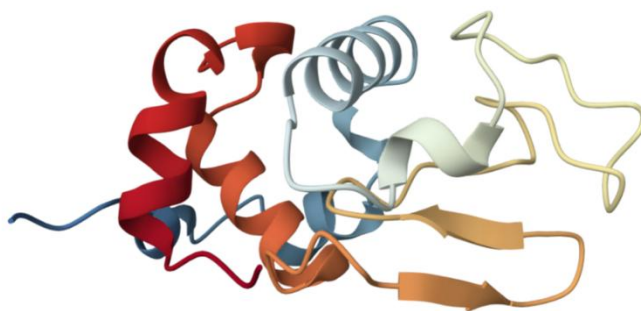
Lizozym, HEWL (ang. *hen egg white lysozyme*) to białko pochodzące z białka jaja kurzego składające się z 129 aminokwasów, rozpoczynające się waliną na N – końcu i zakończone leucyną na C-końcu^[39]. W sekwencji zawiera 6 tryptofanów, 3 tyrozyny i 3 fenyloalaniny. W strukturze natywnej (Rysunek 11) α -helisy stanowią 31% a β -kartki 6,1%^[36]. HEWL ma masę cząsteczkową wynoszącą 14 300 Da, posiada 4 mostki disiarczkowe, a jego punkt izoelektryczny wynosi 10,7^[40]. Molowy współczynnik ekstynkcji, na podstawie, którego spektrofotometrycznie wyznaczano stężenie białka wynosi $\epsilon_{280\text{ nm}} = 37\,970\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[41]. Lizozym jest enzymem hydrolitycznym, który wykazuje działanie przeciwbakteryjne, poprzez destrukcyjny wpływ na ścianę komórkową bakterii, rozrywając wiązania β –(1–4)–glikozydowe w peptydoglikanie (pomiędzy kwasem N–acetylmuraminowym a N–acetyloglukozaminą)^[42]. Białko będące obiektem naszych badań eksperymentalnych zostało zakupione z firmy SIGMA (nr. artykułu L6876-1G) oraz z firmy ROTH (nr. Artykułu 8258.1).



Rysunek 11. Model cząsteczki lizozymu (132L.pdb)^[36].

2.1.3. α -laktoalbumina

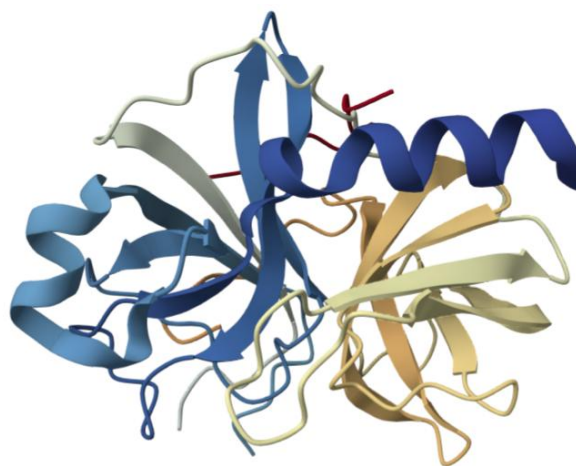
α -laktoalbumina, LALBA (ang. *lacto – albumin alpha*) to białko pochodzące z mleka krowiego, składające się z 123 aminokwasów, rozpoczynające się kwasem glutaminowym na N – końcu i zakończone leucyną na C-końcu^[36]. Ma masę cząsteczkową wynoszącą 14 170 Da. W sekwencji zawiera 4 tryptofany, 4 tyrozyny i 4 fenyloalaniny. W strukturze natywnej (Rysunek 12) posiada 4 mostki disiarczkowe, α -helisy stanowią 31,3% a β -kartki 7%^[36]. Molowy współczynnik ekstynkcji, na podstawie, którego spektrofotometrycznie wyznaczano stężenie białka wynosi $\epsilon_{280\text{ nm}} = 28\,540\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[43]. Główną funkcją α -laktoalbuminy, jako białka znajdującego się w mleku, jest udział w syntezie laktozy, ponadto wspomaga ona trawienie i absorpcję składników odżywczych^[44]. Białko będące obiektem naszych badań eksperymentalnych zostało zakupione z firmy SIGMA (nr. artykułu L6010-1G).



Rysunek 12. Model cząsteczki α -laktoalbuminy (1F6S.pdb)^[36].

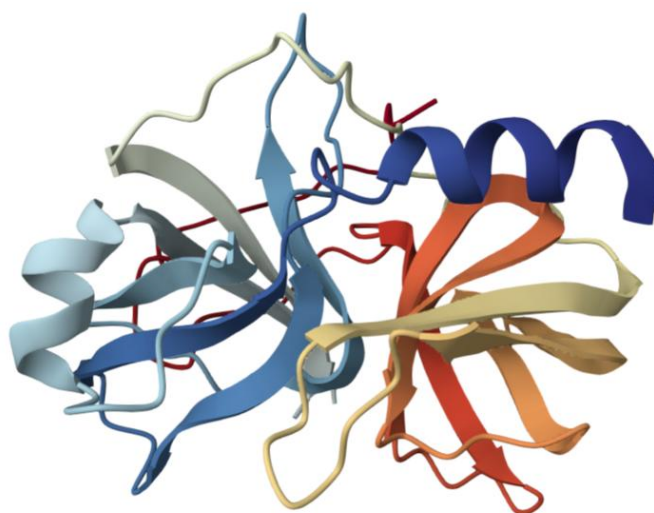
2.1.4. α -chymotrypsyna i α -chymotrypsynogen

α -chymotrypsyna, CHA (ang. *α -chymotrypsin*) to białko pochodzące z trzustki bydłowej składające się z 245 aminokwasów, rozpoczynające się cysteiną na N – końcu i zakończone asparaginą na C-końcu^[36]. Ma masę cząsteczkową wynoszącą 25 265 Da. W sekwencji zawiera 8 tryptofanów, 4 tyrozyny i 6 fenyloalanin. W strukturze natywnej (Rysunek 13) posiada 5 mostków disiarczkowych, α -helisy stanowią 8,3% a β -kartki 6,8%^[36]. Molowy współczynnik ekstynkcji, na podstawie, którego spektrofotometrycznie wyznaczano stężenie białka wynosi $\epsilon_{280\text{ nm}} = 51\,000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[45]. Białko będące obiektem naszych badań eksperymentalnych zostało zakupione z firmy SIGMA (nr. artykułu C4129-1G) oraz z firmy ROTH (nr. artykułu 0238.3).



Rysunek 13. Model cząsteczki α -chymotrypsyny (4CHA.pdb)^[36].

α -chymotrypsynogen, CHG (ang. *α -chymotrypsinogen*), to białko pochodzące z trzustki bydlęcej, składające się z 245 aminokwasów, rozpoczynające się cysteiną na N-końcu i zakończone asparaginą na C-końcu^[36]. Ma masę cząsteczkową wynoszącą 25 690 Da. W sekwencji zawiera 8 tryptofanów, 4 tyrozyny i 6 fenyloalanin. W strukturze natywnej (Rysunek 14) posiada 5 mostków disiarczkowych^[36], α -helisy stanowią 4,5% a β -kartki 31%^[36]. Molowy współczynnik ekstynkcji, na podstawie, którego spektrofotometrycznie wyznaczano stężenie białka wynosi $\epsilon_{280\text{ nm}} = 51\,840\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ^[46]. Białko będące obiektem naszych badań eksperymentalnych zostało zakupione z firmy SIGMA (nr. artykułu C4879-1G).



Rysunek 14. Model cząsteczki α -chymotrypsynogenu (1CHG.pdb)^[36].

Oba białka: α -chymotrypsyna i α -chymotrypsynogen są ściśle ze sobą powiązane. α -chymotrypsynogen jest proenzymem (zymogenem), czyli nieaktywną formą α -chymotrypsyny. Zawiera on wewnętrzny 15 aminokwasowy łańcuch polipeptydowy, zwany pętlą inhibitorową, który blokuje aktywność enzymatyczną. Aktywacja α -chymotrypsynogenu odbywa się głównie w wyniku reakcji proteolitycznego cięcia tej pętli przez enzymy, między innymi trypsynę. Następnie struktura łańcucha polipeptydowego ulega rearanżacji, aktywując centrum katalityczne enzymu (miejsce w strukturze białka, w którym dochodzi do reakcji chemicznej katalizowanej przez dany enzym) w wyniku czego powstaje aktywny enzym proteolityczny α -chymotrypsyna, gotowa do katalizowania reakcji trawienia białek, polegającej na niszczeniu wiązań peptydowych sąsiadujących z aminokwasami aromatycznymi^[47].

2.2. Pozostałe odczynniki

Wszystkie pozostałe odczynniki wykorzystywane podczas eksperymentów, pochodziły z firmy ROTH. Roztwory białek oraz SDS (nr. artykułu 2326.1) były rozpuszczone w buforze fosforanowym, do przygotowania którego wykorzystano monowodorofosforan sodu jednowodny NaH_2PO_4 (nr. artykułu K300.1), wodorofosforan disodu dwuwodny Na_2HPO_4 (nr. artykułu 4984.2) oraz ultraczystą wodę miliporowaną Milli-Q (rezystywność $18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Pożądana siła jonowa roztworu była uzyskiwana przy użyciu chlorku sodu NaCl (nr. artykułu 3957.1). Stężenia białek były ustalane spektrofotometrycznie z wykorzystaniem spektrofotometru UV-2401-PC Shimadzu, natomiast buforu fosforanowego, SDS i chlorku sodu z wykorzystaniem wag analitycznych firmy RADWAG z dokładnością $0,0001 \text{ g}$ oraz $0,01 \text{ g}$.

2.3. Metody analityczne

2.3.1. Spektroskopia absorpcyjna UV

Wielkością fizyczną opisującą zjawisko absorpcji, jest absorbancja, oznaczana symbolem A (Równanie 3). Przyrządem służącym do jej pomiaru jest spektrofotometr. Wielkością fizyczną, którą bezpośrednio jest mierzona w spektrofotetrze jest natężenie promieniowania elektromagnetycznego, oznaczane symbolem I , które następnie jest przeliczane na absorbancję, według wzoru^[48]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (3)$$

gdzie I_0 – to natężenie promieniowania padającego na próbkę a I – natężenie promieniowania po przejściu przez próbkę.

Wiązka promieniowanie elektromagnetycznego, która pada na próbkę, zawierającą substancję zdolną do absorpcji, może dodatkowo ulec innym zjawiskom (Równanie 4): odbiciu, rozproszeniu lub przejść przez roztwór. dlatego też, sumarycznie, można zapisać, że natężenie promieniowania padającego (I_0) na próbkę to suma: natężenia promieniowania zaabsorbowanego (I_A), odbitego (I_{Od}), rozproszonego (I_R) i przechodzącego (I_T)^[48]:

$$I_0 = I_A + I_{Od} + I_R + (I_T) \quad (4)$$

Dwuwiązkowy spektrofotometr UV-2401-PC Shimadzu używany we wszystkich eksperymentach jest wyposażony w: dwie lampy generujące promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane liniowo z zakresu ultrafioletu (lampa deuterową D₂) i światła widzialnego (lampa halogenową 50W); monochromator, który pozwala na wybieranie promieniowania o określonej długości fali z całego dostępnego zakresu (190 nm – 900 nm); detektor, służący do przetwarzania energii promieniowania elektromagnetycznego na energię elektryczną. Badaną próbkę umieszcza się w kwarcowej kuwecie, o ściśle określonej długości, zwanej drogą optyczną. Dzięki pomiarowi wykonywanemu względem kuwety odniesienia, można wyeliminować wpływ odbicia i pochłaniania światła przez materiał kuwety i składniki roztworu niebędące celem badań, a stosując klarowne roztwory, rozproszenie jest w zasadzie pomijalne. Detektor mierzący natężenie promieniowania przechodzącego przez próbkę jest umieszczony w linii prostej względem źródła światła (pod kątem 180°)^[49].

Wyznaczanie stężenia badanej próbki z wykorzystaniem pomiaru widma absorpcji, odbywa się to zgodnie z prawem absorpcji Lamberta-Beera, które ma postać:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot l \quad (5)$$

gdzie $A(\lambda)$ – to wartość absorbancji odczytana z widma absorpcji dla konkretnej długości fali, $\varepsilon(\lambda)$ – to molowy współczynnik absorpcji, charakterystyczny dla danej substancji i określany dla konkretnej długości fali (tej samej co wartość absorbancji) [$M^{-1} \cdot cm^{-1}$], C – stężenie molowe badanej próbki [$\frac{mol}{dm^3} = M$], l – długość drogi optycznej [cm].

Zależność absorbancji od stężenia jest zależnością liniową (Równanie 5) tylko w pewnym zakresie stężeń, dlatego też do wyznaczania stężeń z wykorzystaniem

spektrofotometrów i prawa absorpcji Lamberta-Beera, należy używać roztworów rozcieńczonych, tak aby wartość mierzonej absorpcji nie przekraczała wartości 1,5^[48].

2.3.2. Spektroskopia fluorescencyjna UV

Spektrofluorymetr Cary Eclipse firmy Agilent Technologies wykorzystywany do pomiaru widm fluorescencji we wszystkich eksperymentach jest wyposażony w: lampę ksenonową emitującą promieniowanie elektromagnetyczne spolaryzowane liniowo w zakresie (200 nm – 900 nm); dwa monochromatory, jeden służący do wyboru długości fali wzbudzenia λ_{wzb} i drugi służący odczytu intensywności promieniowania wyemitowanego przez próbkę (równanie 6); detektor, który mierzy natężenie promieniowania wyemitowanego (umieszczony jest pod kątem 90° względem wiązki promieniowania padającego na próbkę, aby wyeliminować promieniowanie wzbudzające)^[50]. Intensywność światła emitowanego przez próbkę, często oznaczana symbolem F , jest wielkością bezwymiarową:

$$F = \phi \cdot I_p(\lambda_{wzb}) \cdot (1 - 10^{-A(\lambda_{wzb})}) \quad (6)$$

gdzie F – to natężenie fluorescencji przy zadanej długości fali wzbudzenia, ϕ - to wydajność kwantowa fluorescencji, $I_p(\lambda_{wzb})$ – to intensywność światła padającego przy zadanej długości fali wzbudzenia, $A(\lambda_{wzb})$ – to absorbanca próbki przy zadanej długości fali wzbudzenia^[51].

2.3.3. Spektroskopia dichroizmu kołowego

Zjawisko dichroizmu kołowego (ang. *circular dichroism*, CD), polega na różnej absorpcji fali elektromagnetycznej spolaryzowanego kołowo prawo i lewoskrętnie przez cząsteczki chiralne. Falę spolaryzowaną liniowo, można traktować, jako superpozycję fali spolaryzowanej kołowo prawoskrętnie i lewoskrętnie o takich samych amplitudach i zgodnych fazach, ale o przeciwnych kierunkach rotacji. Gdy taka fala pada na próbkę aktywną optycznie obserwuje się dwa efekty. Pierwszy wynika z różnych współczynników załamania światła obu składowych w ośrodku aktywnym optycznie, co prowadzi do ich przesunięcia w fazie względem siebie, a to z kolei powoduje skręcenie płaszczyzny polaryzacji światła o pewien kąt. Drugi efekt wynika z różnych współczynników absorpcji obu składowych, co prowadzi do różnic w ich amplitudach, a to z kolei powoduje pojawienie się polaryzacji eliptycznej^[52].

Spektrometr do pomiaru dichroizmu kołowego Chirascan Plus, firmy Applied Photophysics Ltd naprzemiennie oświetla próbkę światłem spolaryzowanym kołowo lewoskrętnie i prawoskrętnie o wysokiej częstotliwości (zwykle 50 kHz). Urządzenie jest wyposażone w modulator fotoelastyczny (ang. *photoelastic modulator*, PEM), który konwertuje

generowane przez lampę światło spolaryzowane liniowo na światło spolaryzowane kołowo. Składa się on z elementu optycznego (płytki ćwierćfalowej), którym jest blok krzemionkowy oraz elementu piezoelektrycznego, który jest przymocowany i dostrojony do częstotliwości rezonansowej elementu optycznego. W bloku krzemionkowym modulowana jest dwójłomność (światło spolaryzowane rozszczepia się na dwa promienie o różnych prędkościach), a element piezoelektryczny odpowiada za generowanie okresowych naprężeń mechanicznych wywołujących tę modulację. Ponadto urządzenie jest wyposażone w półprzewodnikowy detektor promieniowania LAAPD (ang. *large area avalanche photodiode detector*) o dużej powierzchni zbierania światła, który ma znacznie większą czułość niż detektory w innych urządzeniach do pomiaru CD oraz charakteryzuje się szybkim czasem reakcji. Źródłem promieniowania elektromagnetycznego w spektrometrze Chirascan Plus jest lampa ksenonowa^[53].

W spektrometrze CD dokonuje się pomiaru widma dichroizmu kołowego, czyli zależności eliptyczności od długości fali. Standardowo wielkością fizyczną mierzoną w spektrofotometrze jest natężenie światła, które następnie przeliczane jest na eliptyczność. Eliptyczność mierzona w spektrometrze Chirascan Plus jest definiowana, jako:

$$\tan \psi = \frac{E_R - E_L}{E_R + E_L} \quad (7)$$

gdzie E_R – to amplituda składowej elektrycznej fali pola elektromagnetycznego spolaryzowanej kołowo prawoskrętnie a E_L – to amplituda składowej elektrycznej fali spolaryzowanej kołowo lewoskrętnie,

Stosując odpowiednie obliczenia i biorąc pod uwagę, że różnica w absorbancji światła spolaryzowanego kołowo prawo i lewoskrętnie jest zazwyczaj bardzo mała, więc $\tan \psi$ (Równanie 7) można przybliżyć jako ψ (Równanie 8). Biorąc pod uwagę, że natężenie światła jest proporcjonalne do kwadratu wektora pola elektrycznego, wykorzystując prawo absorpcji Beera-Lamberta i zamieniając radiany na stopnie, otrzymuje się eliptyczność wyrażoną w stopniach $[deg]$ ^[53]:

$$\psi = \Delta A \cdot \left(\frac{\ln 10}{4} \right) \cdot \left(\frac{180}{\pi} \right) \approx \Delta A \cdot 32,982 \quad (8)$$

gdzie ΔA – to różnica a absorpcji światła spolaryzowanego kołowo prawo i lewoskrętnie.

W literaturze, można znaleźć widma CD, wyrażane nie tylko, jako zależność eliptyczności od długości fali, ale również, jako zależność eliptyczności molowej od długości

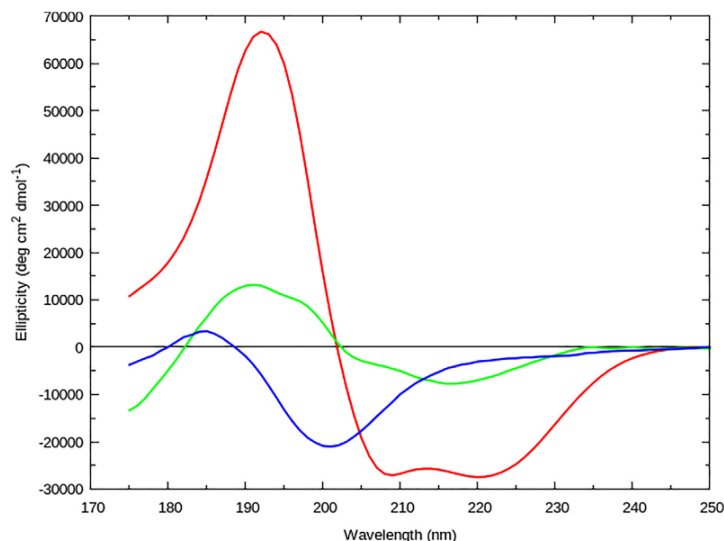
fali (Równanie 9), która normalizuje eliptyczność w oparciu o długość drogi optycznej i stężenie, wyrażana w $[cm^2 \cdot dmol^{-1}]$ ^[53]:

$$[\psi] = 100 \cdot \frac{\psi}{(l \cdot C)} \quad (9)$$

gdzie ψ – to eliptyczność wyrażona w $[deg]$, C – stężenie molowe badanej próbki $[\frac{mol}{dm^3} = M]$, l – długość drogi optycznej $[cm]$.

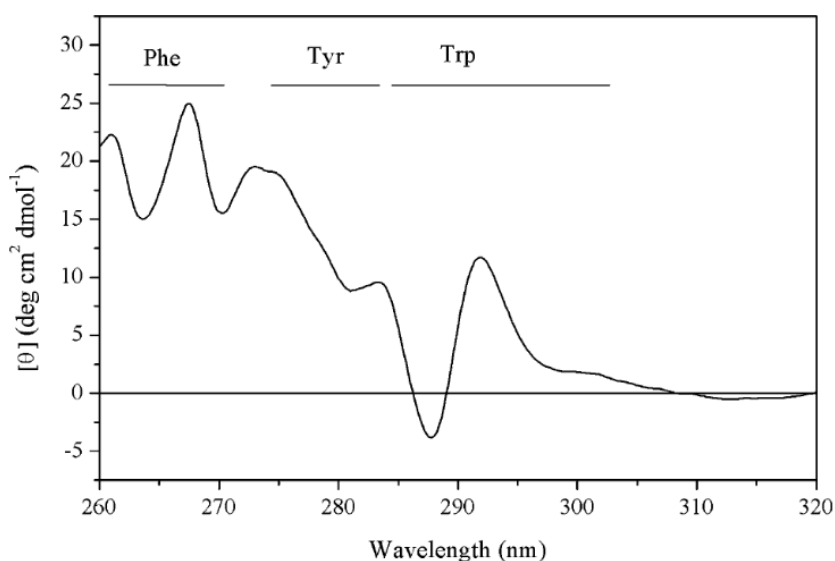
Wiele programów służących do analizy struktury II-rzędowej na podstawie widm dichroizmu kołowego, przelicza zmierzoną eliptyczność na eliptyczność molową i na jej podstawie dokonuje analizy.

Widma dichroizmu kołowego w zakresie 160 nm – 240 nm, czyli w tzw. dalekim ultrafiolecie dostarczają informacji o strukturze II-rzędowej białek (Rysunek 15)^[54]. Źródłem widma CD w FUV są elementy struktury II-rzędowej: głównie α -helisy (minimum ~ 208 nm oraz ~ 222 nm, maksimum ~ 190 nm) oraz β -kartki (maksimum ~ 195 nm, minimum ~ 215 – 218 nm)^[54].



Rysunek 15. Widma dichroizmu kołowego w FUV, związane z różnymi typami struktury II-rzędowej białek: linia czerwona α -helisa, linia zielona β -kartka, linia niebieska fragmenty nieustrukturyzowane^[54].

Widma dichroizmu kołowego w zakresie 260 – 320 nm, czyli tzw. bliskim ultrafiolecie dostarczają informacji na temat struktury III-rzędowej białek (Rysunek 16), w tym zakresie absorbują przede wszystkim aminokwasy aromatyczne: tryptofan, tyrozyna i fenyloalanina, a także niektóre mostki disiarczkowe^[52,55].



Rysunek 16. Widmo dichroizmu kołowego w NUV dehydrogenazy typu II^[52].

2.3.4. Spektrometria zatrzymanego przepływu

Spektrometr zatrzymanego przepływu (ang. *stopped-flow*) służy do badania kinetyki procesów molekularnych takich jak tworzenie lub rozpad kompleksów molekularnych czy reakcje chemiczne zachodzące w roztworach w czasie. Z uwagi na fakt, że urządzenie to pozwala na rejestrację sygnałów w skali czasowej od 1 milisekundy, można śledzić kinetykę bardzo szybkich procesów chemicznych. W badaniach wykorzystywano spektrometry Stopped-flow SX20 oraz SX20 LED firmy Applied Photophysics Ltd^[53]. Najczęściej spektrometr taki służy do badania reakcji zachodzących pomiędzy dwoma reagentami (niektóre są wyposażone w dodatkowy układ, pozwalający na jednoczesne mieszanie do 4 roztworów, przy czym jednym z nich zawsze musi być bufor). Typowy spektrometr posiada dwie strzykawki, które za pomocą tłoka działającego pod wysokim ciśnieniem, wtłaczają roztwory obu reagentów w stosunku 1:1, w pierwszej kolejności do miksera, w którym następuje szybkie mieszanie obu reagentów, a następnie do komory pomiarowej. W spektrometrze obserwuje się najczęściej zmieniające się w czasie sygnały pochodzące od fluorescencji lub absorpcji promieniowania elektromagnetycznego, przy określonej długości fali wzbudzenia, w postaci krzywych postępu reakcji, do momentu osiągnięcia stanu równowagi w roztworze^[56]. Spektrofotometr Chirascan Plus wspomniany w poprzednim podrozdziale, jest wyposażony w przystawkę stopped-flow, dlatego też oprócz absorpcji i fluorescencji, można go wykorzystać do rejestracji zmieniającego się w czasie sygnału dichroizmu kołowego^[53].

Źródłem promieniowania elektromagnetycznego w spektrometrze Stopped-flow SX20 jest lampa ksenonowa natomiast w spektrometrze Stopped-flow SX20 LED są stabilne diody LED o ściśle określonej długości fali. Intensywność promieniowania jest zwykle 10 razy większa niż tradycyjnej lampy, co niestety dla niektórych próbek biologicznych może być szkodliwe, dlatego też często stosuje się specjalne nakładki, osłabiające światło diody^[53].

Istotnym parametrem określanym dla tego typu urządzenia jest tzw. czas martwy, czyli czas przepływu pomiędzy mikserem a komorą reakcyjną, na który wpływa odległość pomiędzy tymi dwoma elementami układu oraz szybkość przelewu reagentów z komory miksera do komory pomiarowej^[56]. Dla spektrometru Stopped-flow SX20 oraz dla SX20 LED czas martwy wynosi 1,1 ms a dla spektrometru Chirascan Plus 1,3 ms.

2.4. Metody obliczeniowe

2.4.1. BeStSel

BeStSel (ang. Beta Structure Selection) to ogólnodostępny serwer internetowy służący analizie struktur II-rzędowych białek, na podstawie widm dichroizmu kołowego białek w zakresie dalekiego ultrafioletu^[59].

Program pozwala na analizę widm CD, w kilku wybranych zakresach:

- 175 – 250 nm,
- 180 – 250 nm,
- 185 – 250 nm,
- 190 – 250 nm,
- 195 – 250 nm,
- 200 – 250 nm.

Do zainicjowania działania programu, niezbędne jest określenie, w jakich jednostkach rejestrowane były widma CD. W wykonanych eksperymentach, widma CD rejestrowane były, jako eliptyczność, wyrażona w $[mdeg]$. W przypadku danych rejestrowanych w $[mdeg]$, aby móc przeprowadzić analizę z wykorzystaniem programu BeStSel, niezbędne jest zainicjalizowanie parametrów początkowych dopasowania, takich jak: stężenie białka wyrażone w μM , liczba aminokwasów aromatycznych w sekwencji białka oraz długość drogi optycznej wyrażona w cm. Na podstawie widma CD oraz wymienionych parametrów,

następuje przeliczenie eliptyczności na eliptyczność molową, dopasowania krzywej do danych eksperymentalnych oraz procentowe oszacowanie zawartości elementów struktury II-rzędowej^[59].

BeStSel działa na podstawie dopasowywania znanych widm CD do widm CD uzyskanych z eksperymentów, poprzez łączenie metod statystycznych i bibliotek widm^[59].

Bazą danych, z której korzysta program jest przede wszystkim PDB (ang. Protein Data Bank), a główną metodą statyczną jest metodę LSF (ang. Least Squares Fitting), czyli metoda najmniejszych kwadratów, która poprzez minimalizację różnic pomiędzy widmami: eksperymentalnym a teoretycznym znajduje optymalne wartości procentowe, udziału danego elementu struktury II-rzędowej w białku, ponieważ widmo CD uzyskane z eksperymentów, można traktować, jako sumę widm poszczególnych elementów struktury II-rzędowej (Rysunek 15)^[59].

Jednym z parametrów, które uzyskuje się podczas analizy widm CD z użyciem BeStSel jest RMSD (ang. Root Mean Square Deviation), czyli średnie kwadratowe odchylenie. Mierzy on różnicę między widmem uzyskanym w eksperymencie a widmem dopasowanym w programie, zgodnie ze wzorem 10 jest to pierwiastek ze średniej wartości kwadratu różnic pomiędzy punktami widma eksperymentalnego i dopasowanego.

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (Y_i^{exp} - Y_i^{dop})^2} \quad (10)$$

gdzie N – liczba punktów widmowych, Y_i^{exp} – wartość eksperymentalna, Y_i^{dop} – wartość dopasowana^[76].

Wartości RMSD (Równanie 10) poniżej 0,1 – 0,2 świadczą o bardzo dobrym dopasowaniu modelu do danych eksperymentalnych, natomiast im wyższa jego wartość tym dopasowanie gorsze.

2.4.2. CDPro

CDPro, jest to pakiet oprogramowania, zawierający między innymi trzy programy: SELCON3, CDSSTR oraz CONTIN, służące podobnie jak BeStSel do analizy widm dichroizmu kołowego, z zakresu dalekiego ultrafioletu, w celu określenia procentowej zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej. Wymienione programy najczęściej analizują widma CD w zakresie 190 – 250 nm^[60].

Program SELCON3, szacuje zawartość struktur drugorzędowych na podstawie referencyjnych widm białek, stosując metodę samouzgodnioną, która polega na iteracyjnym dopasowywaniu eksperymentalnych widm CD do liniowej kombinacji widm wzorcowych, aż do uzyskania najlepszego rozwiązania, CDSSTR dopasowuje widmo próbki do kombinacji widm referencyjnych z wykorzystaniem metod analizy składowych, natomiast CONTIN wykorzystuje procedurę regresji grzbietowej, która polega na dopasowaniu eksperymentalnych widm CD do kombinacji widm referencyjnych z wykorzystaniem regularyzacji (polegającej na wygładzaniu wyników, żeby były stabilne, sensowne i odporne na szum w danych). Wprowadzane do wszystkich programów dane, muszą być wyrażone w jednostkach eliptyczności molowej, programy same nie konwertują jednostek, tak jak robi to program BeStSel. Aby móc przeprowadzić analizę z wykorzystaniem wyżej wymienionych programów należy zainicjalizować parametry początkowe, takie jak: stężenie białka wyrażone w μM oraz długość drogi optycznej w cm ^[60].

2.4.3. DynaFit

Program DynaFit, jest to program służący między innymi do analizy krzywych postępu reakcji chemicznych (postęp ten jest mierzony poprzez zmiany sygnału fluorescencji, absorpcji lub dichroizmu kołowego w funkcji czasu) uzyskanych metodą zatrzymanego przepływu. Dzięki takiej analizie, można uzyskać opis procesu molekularnego, w postaci równań reakcji wraz z odpowiadającymi im stałymi szybkości^[61].

Rozważany jest przykład dwóch reagentów w roztworze: A i B, które tworzą razem kompleks molekularny C (Równanie 11). Można przyjąć, że w najprostszym przypadku, tworzenie takiego kompleksu to proces jednoetapowy i odwracalny (gdyż w rzeczywistym roztworze zachodzą zarówno procesy tworzenia jak i rozpadu kompleksów molekularnych, zgodnie z postulatem mikroskopowej odwracalności^[62]), więc można go opisać za pomocą jednego równania reakcji:



Każdy proces, opisany równaniem reakcji charakteryzuje się stałymi szybkości, które ten proces opisują: stałą szybkości tworzenia kompleksu k_a oraz stałą szybkości rozpadu kompleksu k_d . Szybkość tworzenia (Równanie 12) jak i rozpadu (Równanie 13) kompleksu są zdefiniowane, jako pochodne stężenia cząsteczek względem czasu:

$$v_a \equiv \frac{\partial c_C}{\partial t} = k_a \cdot c_A \cdot c_B \quad (12)$$

gdzie v_a – to szybkość tworzenia się kompleksu, c_C – stężenia cząsteczek C, k_a – to stała szybkości tworzenia się kompleksu, c_A – to stężenie cząsteczek A, c_B – to stężenie cząsteczek B.

$$v_d \equiv \frac{\partial c_A}{\partial t} \cdot \frac{\partial c_B}{\partial t} = k_d \cdot c_C \quad (13)$$

gdzie v_d – to szybkość rozpadu kompleksu c_A – to stężenie cząsteczek A, c_B – to stężenie cząsteczek B, k_d – to stała szybkości rozpadu kompleksu, c_C – to stężenie cząsteczek C.

Może być jednak tak, że zanim cząsteczki reagentów A i B utworzą stabilny kompleks C, tworzy się forma wstępna kompleksu D (Równanie 14), która następnie przekształca się w kompleks C (Równanie 15):



Dla takiego zestawu, należy zdefiniować odpowiednio stałą szybkości tworzenia kompleksu D – k_{a1} oraz stałą szybkości rozpadu kompleksu D – k_{d1} dla pierwszej reakcji oraz stałą szybkości tworzenia kompleksu C – k_{a2} oraz stałą szybkości rozpadu kompleksu C – k_{d2} .

Program DynaFit, opracowany przez Petra Kuzmiča, oparty jest na metodzie nieliniowej regresji najmniejszych kwadratów opracowanej przez Levenberga-Marquardta (połączenie dwóch algorytmów: metody największego spadku i metody Newtona). Program wymaga napisania skryptu, który steruje programem i uruchamia obliczenia. W skrypcie należy zawrzeć potencjalne modele procesów molekularnych zachodzących pomiędzy badanymi reagentami, a także w każdym z tych modeli zdefiniować równania elementarnych reakcji chemicznych, prowadzących do stworzenia kompleksu oraz określić, jakie stałe szybkości opisują każdą z tych reakcji chemicznych. Program zamienia układ zdefiniowanych za pomocą notacji chemicznej równań chemicznych na układ równań różniczkowych a następnie na podstawie wybranego kryterium (np. kryterium informacyjne Akaike’a lub Bayesa), dyskryminuje określone modele reakcji, wskazując, który z nich najlepiej opisuje tworzenie badanego kompleksu^[61].

Najczęściej korzysta się z tzw. dopasowania globalnego, co oznacza, że eksperymenty prowadzi się z rejestracją kilku krzywych postępu reakcji, gdzie jest stałe, ściśle określone stężenie reagentu A, a kilka różnych, ale również ściśle określonych stężeń reagentu B.

3. Badania własne

Badania układów białko–SDS, zostały podjęte w roku 2018, podczas gdy gotowy był już manuskrypt pracy opisującej kinetykę tworzenia kompleksów spotkaniowych ksantonu z kwasem naftalenowym, badaną metodami laserowej fotolizy błyskowej. Praca została opublikowana w roku 2019^[65]. Temat zawarty w publikacji, miał być pierwotnym tematem bieżącej rozprawy doktorskiej, w ramach, której badania prowadzone były już przez 2 lata. Niestety, układ pomiarowy wykorzystywany w tych badaniach: spektrometr fotolizy błyskowej LKS80 firmy Applied Photophysics Ltd. (APL) uległ awarii w trakcie przeprowadzki Zakładu Biofizyki z Gmachu Geologii UW do nowej siedziby Wydziału Fizyki przy ul Pasteura 5. Firma APL, która jest producentem tego spektrometru, wskutek przemian reorganizacyjnych wynikających ze zmian w kierownictwie firmy, całkowicie zaniechała produkcji spektrometrów fotolizy błyskowej i oznajmiła, że nie jest w stanie pomóc w naprawie układu pomiarowego, gdyż inżynierowie odpowiedzialni za tę aparaturę zostali zwolnieni z pracy i nie ma z nimi kontaktu. Stworzyło to ogromny problem dla całej grupy badawczej, ale przede wszystkim uniemożliwiło prowadzenie dalszych badań i kontynuację pomiarów w ramach rozprawy doktorskiej. W całej Polsce, dostępne są tylko dwa tego typu spektrometry, z czego jeden to właśnie ten w Zakładzie Biofizyki UW. W związku z tym, zostały podjęte dwie decyzje, pierwsza: aby mimo odmówienia pomocy od firmy APL, nie wchodzić z nią w konflikt, gdyż w laboratorium są jeszcze cztery inne spektrometry tej firmy oraz druga o całkowitej zmianie tematyki w ramach projektu doktorskiego i rozpoczęciu zupełnie nowych badań z wykorzystaniem innych metod badawczych i urządzeń.

Rozdział 3 – „Badania własne” został podzielony na dwie części. Pierwsza z nich – podrozdział 3.1 dotyczy badań nad dwoma białkami: α -chymotrypsyną oraz α -chymotrypsynogenem, których wyniki zostały opublikowane w czasopismach naukowych^[68,70,72] i stanowiły podstawę oraz swoisty wzór do dalszych badań układów białko–SDS, z wykorzystaniem innych białek. W tej części znajdują się badania na temat wpływu SDS na strukturę II- i III-rzędową α -chymotrypsyny; stabilności układu α -chymotrypsyna–SDS w czasie; wpływu procedury przygotowania próbek do pomiarów zarówno stacjonarnych jak i kinetycznych na widma dichroizmu kołowego i absorpcji α -chymotrypsyny; kinetyki zmian struktury II- i III-rzędowej α -chymotrypsyny oraz α -chymotrypsynogenu pod wpływem SDS, obserwowaną zarówno w pomiarach kinetycznych dichroizmu kołowego jak i fluorescencji.

Druga część – podrozdział 3.2 dotyczy badań nad trzema innymi białkami: albuminą, lizozymem oraz α -laktoalbuminą, których wyniki nie zostały jeszcze opublikowane. W tej części, w poszczególnych podrozdziałach znajdują się badania na temat:

- wpływu SDS na strukturę II- i III-rzędową albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy – 3.2.1;
- stabilności układu białko-SDS w czasie dla albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy – 3.2.2;
- wpływu procedury przygotowania roztworów białko-SDS do pomiarów dichroizmu kołowego i absorpcji albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy – 3.2.3;
- wpływu siły jonowej roztworu na zmiany strukturalne albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy indukowane przez SDS – 3.2.4;
- kinetyki przemian struktury II-rzędowej albuminy, indukowanej przez SDS – 3.2.5;
- wpływu SDS na fluorescencję albuminy oraz lizozymu – 3.2.6;
- wpływu SDS na kinetykę zmian struktury III-rzędowej albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy – 3.2.7.

Wszystkie wykonane w ramach tej rozprawy eksperymenty zostały wykonane przez jej autora. Fitowania z wykorzystaniem programu Origin w podrozdziale 3.2.5. zostały wykonane z pomocą dr Joanny Krasowskiej.

Wszystkie pomiary prowadzone były w temperaturze 20°C. Zarówno białka jak i SDS rozpuszczane były zawsze w buforze fosforanowym, nie wykonywano eksperymentów w żadnym innym rozpuszczalniku. W zależności od danego typu eksperymentu zmieniano się jego stężenie lub pH – wartości te, ustalane były na podstawie danych literaturowych oraz eksperymentalnych i zostały umieszczone na początku każdego podrozdziału. Siła jonowa buforu (I_{roztworu}) uzyskiwana była poprzez dodanie odpowiedniej objętości roztworu NaCl w stężeniu 400 mM. Przed wykonaniem pomiarów kinetycznych, wszystkie próbki były odgazowywane próżniowo przez 60 minut. Pojęcie „czyste białko” wykorzystywane w rozprawie, odnosi się do białka rozpuszczone w odpowiednim buforze, bez dodatku SDS.

3.1. Przemiany strukturalne α -chymotrypsyny oraz α -chymotrypsynogenu indukowane przez dodecylosiarczan sodu

Pierwszym białkiem, wybranym do wykonania eksperymentów w celu zbadania zmian strukturalnych zachodzących pod wpływem dodecylosiarczanu sodu, była α -chymotrypsyna. Wykonano serię pomiarów widm dichroizmu kołowego z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus – w dalekim i bliskim ultrafiolecie, celem zbadania zmian zachodzących w strukturze II– jak i III–rzędowej białka. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. W 10 mM buforze fosforanowym o pH 7 i w temperaturze 25°C CMC SDS wynosi $4,61 \pm 0,01$ mM^[66]. W związku z tym, w eksperymentach wykorzystywano różne stężenia SDS, zarówno poniżej (3 mM) jak i powyżej (40 mM) CMC. Końcowe stężenie α -chymotrypsyny dla pomiarów FUV wynosiło 10 μ M, a dla NUV 20 μ M. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 1.

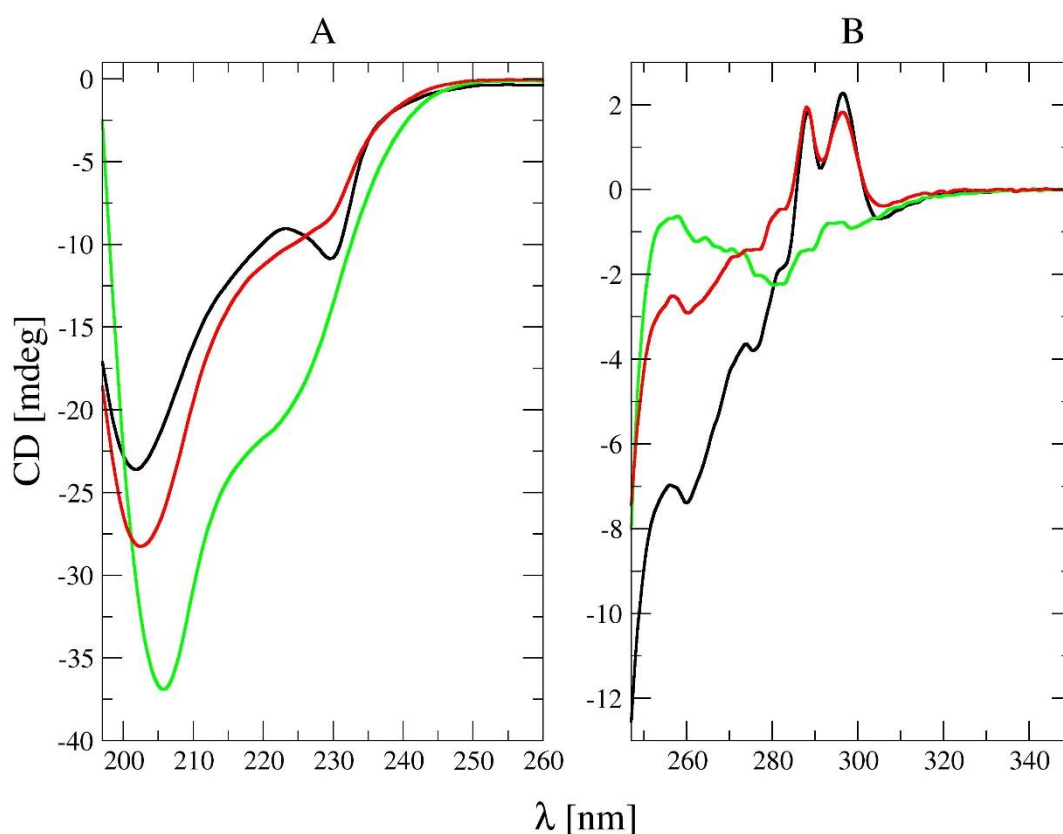
Tabela 1. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego przygotowanych zgodnie z procedurą podstawową (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M CHA	bufor
2	20 μ M CHA	6 mM SDS
3	20 μ M CHA	80 mM SDS
4	40 μ M CHA	Bufor
5	40 μ M CHA	6 mM SDS
6	40 μ M CHA	80 mM SDS

Rejestrowane były widma dichroizmu kołowego w dalekim ultrafiolecie: zakres 190–260 nm z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm oraz w bliskim ultrafiolecie: zakres 250–350 nm użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Obniżenie stężenia białka w przypadku pomiarów FUV w porównaniu do pomiarów NUV, oraz skrócenie drogi optycznej prowadzi do zmniejszenia absorpcji. Jest to ważne, gdyż absorpcja nie może być zbyt wysoka (powyżej 1,5), aby wystarczająca ilość światła docierała

do detektora. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów. Uzyskane widma dichroizmu kołowego zostały przedstawione na Rysunku 17.

Wszystkie widma dichroizmu kołowego i absorpcji, zarówno w dalekim jak i bliskim ultrafiolecie zostały skorygowane o widmo buforu. Absorpcja samego buforu w zakresie dalekiego ultrafioletu w okolicy 190 nm jest bardzo wysoka, co oznacza, że absorbancja i dichroizm kołowy nie są mierzone z taką samą dokładnością dla FUV, w porównaniu do NUV, gdzie nie ma aż tak dużego udziału absorpcji samego buforu, w związku z czym pomiary charakteryzują się większą czułością.



Rysunek 17. Widma dichroizmu kołowego α -chymotrypsyny w zakresie (A) dalekiego ultrafioletu: 20 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 20 μ M CHA + 6 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor czerwony oraz (B) bliskiego ultrafioletu: 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 20 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor czerwony.

Interpretując uzyskane widma dichroizmu kołowego przedstawione na Rysunku 17, można stwierdzić, że dodanie SDS do roztworu białka powoduje zmianę widma, zarówno w dalekim jak w bliskim ultrafiolecie, co oznacza, że surfaktant wywołuje zmiany w strukturze II- i III- rzędowej białka. Zmiany te można zauważyć zarówno przy stężeniu SDS poniżej jak

i powyżej CMC, i widać, że zmiany te są różne. W przypadku widm FUV poniżej i powyżej CMC wzrasta populacja α -helis, z tym, że poniżej CMC wzrost jest znacznie większy. Dodatkowo poniżej CMC widać wzrost populacji β -krotek, czego nie widać powyżej CMC. W przypadku widm NUV widać, że stężenie SDS poniżej CMC wywołuje znacznie większą różnicę w wyglądzie widm CD. Różnice zarówno w NUV jak i FUV mogą oznaczać, że białko wiąże zarówno pojedyncze cząsteczki surfaktantu jak i micelle. Zatem można przypuszczać, że w próbkach, gdzie stężenie SDS było poniżej CMC, istotną rolę w zachodzących zmianach strukturalnych mogą odgrywać oddziaływania białka z pojedynczymi cząsteczkami SDS, co z kolei jest zgodne z wynikami innych badaczy^[30].

W pracy Takedy^[2], można przeczytać, że w roztworze zawierającym białko oraz SDS, nie ma wolnego białka (gdzie stężenie białka jest mikromolowe a stężenie SDS milimolowe), i że denaturacja białek przez surfaktanty nie jest łatwo odwracalna żadnymi metodami. Zwrócono również uwagę, na skokowe zmiany mobilności kompleksów białko–surfaktant, obserwowane w eksperymentach elektroforezy kapilarnej układu BSA–SDS, przy zwiększającym się stężeniu surfaktantu, poprzez rejestrację liczby, pozycji i intensywności pików odpowiadających poszczególnym kompleksom. Autorzy interpretowali to, jako wskaźnik współistnienia różnych form kompleksu BSA–SDS. Zaobserwowali oni kilka wyraźnych pików zamiast pojedynczego, co świadczy o istnieniu różnych kompleksów SDS–BSA równocześnie w roztworze, co z kolei oznacza, że nie tworzy się jeden jednorodny kompleks, lecz zestaw kilku frakcji, które wraz z rosnącym stężeniem SDS zmieniały się: niektóre zanikały a pojawiały się nowe. Każda frakcja charakteryzowała się inną mobilnością, co świadczy o zróżnicowanej liczbie cząsteczek SDS związanych z BSA. Praca ta, skłoniła do wykonania serii pomiarów widm dichroizmu kołowego oraz absorpcji z wykorzystaniem innej niż klasyczna i podstawowa metoda sporządzania roztworów do pomiarów.

W związku z powyższym, wyróżniono dwie procedury przygotowania próbek do pomiarów widm stacjonarnych dichroizmu kołowego i absorpcji:

- *metoda podstawowa, jednoetapowa* – gdzie roztwór czystego białka był mieszany w stosunku objętościowym 1:1 z roztworem zawierającym bufor lub roztwór SDS;
- *metoda alternatywna, dwuetapowa* – gdzie wyjściowy roztwór białka zawierał już pewną ilość SDS, a następnie w stosunku objętościowym 1:1 roztwór ten mieszany był z roztworem zawierającym bufor lub SDS.

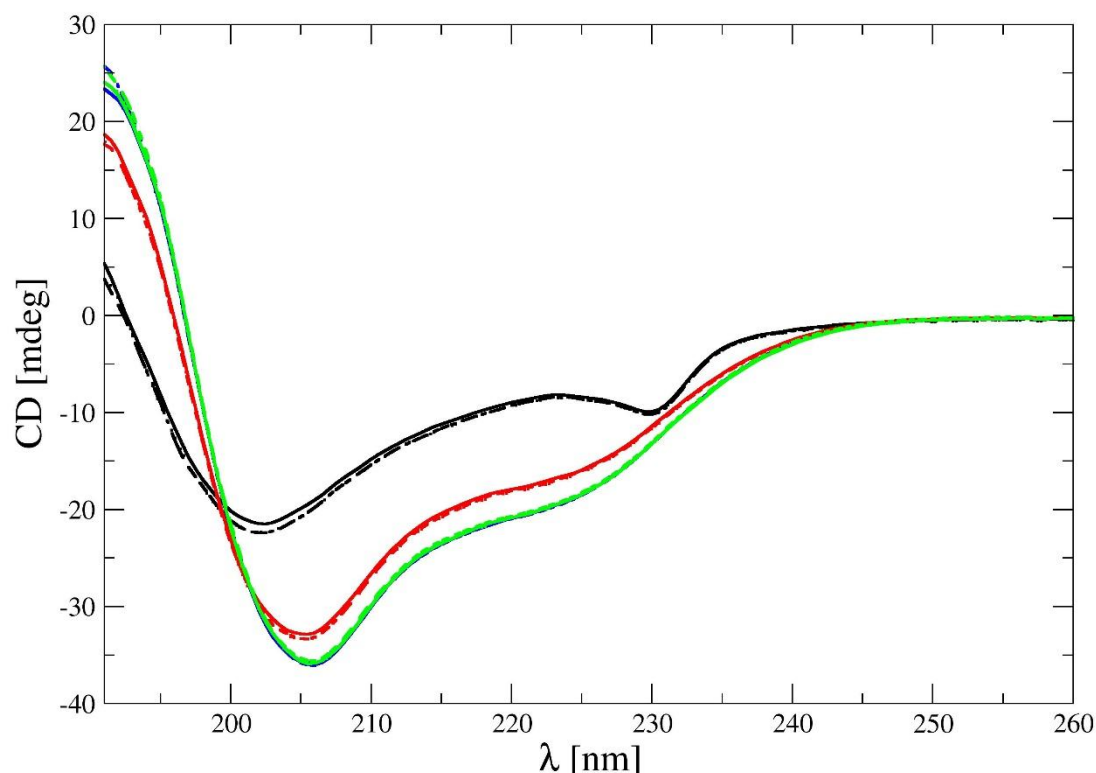
W zależności od próbki, roztwór wyjściowy A stanowiła czysta α -chymotrypsyna (metoda podstawowa) bądź α -chymotrypsyna z dodatkiem SDS (metoda alternatywna), natomiast roztwór wyjściowy B stanowił bufor lub SDS (dla obu metod). Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Mieszanie roztworów A i B w stosunku objętościowym 1:1 zapewniało, że końcowe stężenie SDS w każdej próbce (przygotowanej zarówno procedurą podstawową jak i alternatywną) było takie samo i wynosiło 40 mM. Końcowe stężenie α -chymotrypsyny dla pomiarów FUV wynosiło 10 μ M, a dla NUV 20 μ M. Schemat przygotowania próbek do eksperymentów z wykorzystaniem metody podstawowej oraz metody alternatywnej został przedstawiony w Tabeli 2.

Tabela 2. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego przygotowanych zgodnie z procedurą podstawową oraz alternatywną (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M CHA	bufor
2	20 μ M CHA	80 mM SDS
3	20 μ M CHA – 6 mM SDS	74 mM SDS
4	20 μ M CHA – 20 mM SDS	60 mM SDS
5	40 μ M CHA	bufor
6	40 μ M CHA	80 mM SDS
7	40 μ M CHA – 6 mM SDS	74 mM SDS
8	40 μ M CHA – 20 mM SDS	60 mM SDS

Rejestrowane były jednocześnie widma dichroizmu kołowego oraz absorpcji w dalekim ultrafiolecie: zakres 190–260 nm z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm oraz w bliskim ultrafiolecie: zakres 250–350 nm użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów. Wszystkie widma, zostały skorygowane o widmo buforu.

Widma dichroizmu kołowego w dalekim ultrafiolecie, uzyskane z pomiarów próbek 1, 2, 3 i 4 zostały przedstawione na Rysunku 18. Widma rejestrowane były bezpośrednio po wymieszaniu odpowiednich roztworów wyjściowych – I seria, po 160 minutach – II seria oraz po 320 minutach – III seria. Wykonanie 20 pojedynczych skanów trwało około 40 minut, co łącznie daje 160 minut na pełną serię 4 próbek, stąd powyższe odstępy czasowe pomiędzy poszczególnymi seriami. Z pomiarów wynika, że dodanie SDS do roztworu białka, powoduje zmianę kształtu widma dichroizmu kołowego (Rysunek 17), co z kolei oznacza, że struktura II-rzędowa białka pod wpływem surfaktantu ulega zmianie. Jest to zgodne z rozważaniami teoretycznymi na temat oddziaływań białko–surfaktant. Ponadto, porównując widma uzyskane w poszczególnych seriach dla tych samych próbek widać, że pokrywają się, co świadczy o tym, że zmiany struktury II-rzędowej białka uzyskane w wyniku interakcji z SDS są stabilne przez co najmniej 320 minut – w tym czasie nie zachodzą żadne zmiany w strukturze białka. To, na co należy zwrócić szczególną uwagę to porównanie widm próbek 2, 3 i 4, w których końcowe stężenie SDS było takie samo, czyli wynosiło 40 mM, lecz zostało osiągnięte w procedurze podstawowej, jednoetapowej dla próbki 2 i procedurze alternatywnej, dwuetapowej dla próbek 3 i 4. Widmo roztworu uzyskanego po zmieszaniu 20 μ M białka zawierającego 20 mM SDS z roztworem 60 mM SDS (próbka 4) jest takie samo, jak widmo roztworu uzyskanego przez zmieszanie 20 μ M białka z 80 mM SDS (próbka 3). Jednak, gdy 20 μ M białka zawierającego 6 mM SDS jest mieszane z roztworem 74 mM SDS (próbka 3), zarejestrowane widmo jest już inne niż dwa poprzednie. Jest to niezwykle ważna obserwacja, która do tej pory nie została opisana przez innych badaczy.



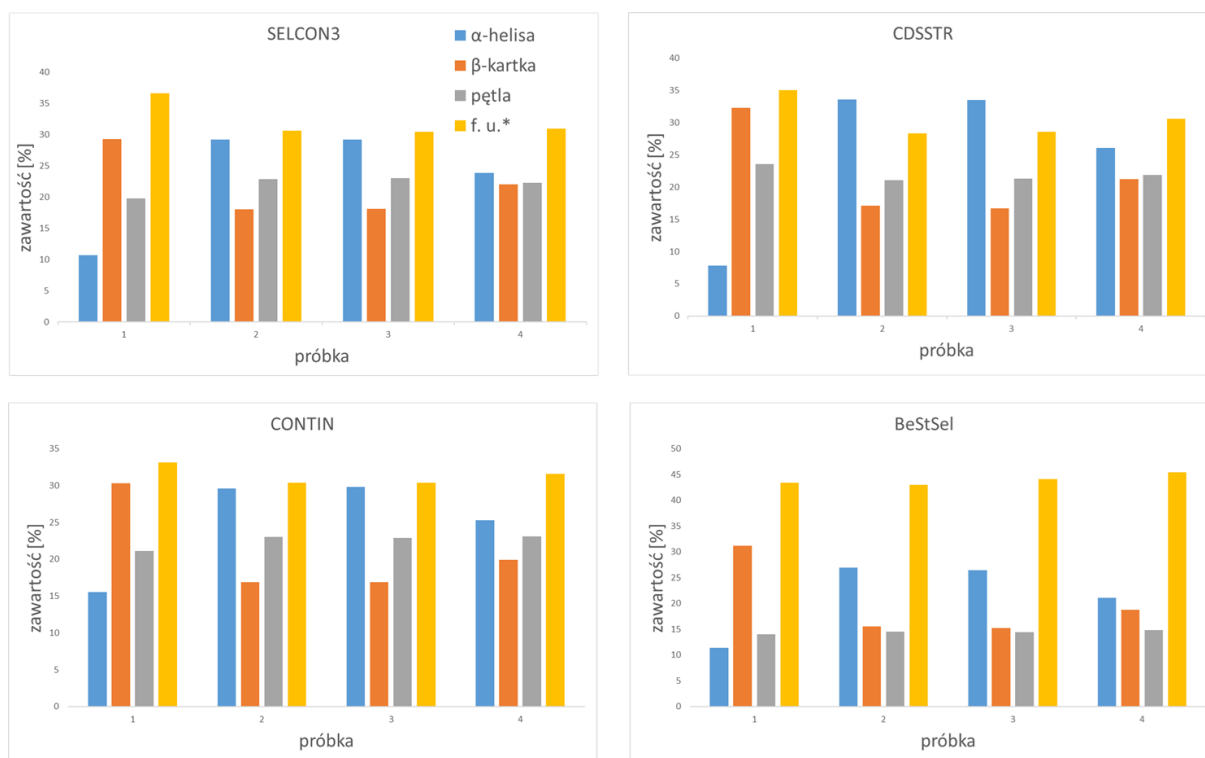
Rysunek 18. Widma dichroizmu kołowego α -chymotrypsyny w zakresie dalekiego ultrafioletu. 20 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 20 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M CHA-6mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M CHA-20mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane, III seria – linie kropkowane.

Widma dichroizmu kołowego w zakresie dalekiego ultrafioletu, dostarczają informacji na temat zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej białka, dlatego też zostały one poddane analizie za pomocą programu BeStSel oraz programów z pakietu oprogramowania CDPro: SELCON3, CDSSTR, oraz CONTIN. Uzyskane wyniki zostały zestawione w Tabeli 3 oraz przedstawione graficznie na Rysunku 19. Do uśrednienia użyto widma pochodzące z dwóch niezależnych, identycznych eksperymentów. Aby porównać wyniki analizy struktur za pomocą 4 programów, zredukowano liczbę wyróżnianych przez programy elementów struktury II-rzędowej do czterech jej głównych typów: α -helis, β -kartek pętli oraz fragmentów nieustrukturyzowanych, ze względu na fakt, że każdy program wyróżnia kilka innych dodatkowych elementów struktury II-rzędowej, poza wymienionymi wyżej czterema.

Tabela 3. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -chymotrypsyny (CHA), uzyskane różnymi programami do analizy widm CD dla próbek: 20 μ M CHA + bufor, 20 μ M CHA + 80 mM SDS, 20 μ M CHA-6mM SDS + 74 mM SDS oraz 20 μ M CHA-20mM SDS + 60 mM SDS.

Próbka	Program	Element struktury II-rzędowej			
		α -helisa	β -kartka	pętla	f. n.*
20 μ M CHA + bufor	SELCON3	10,7	29,3	19,8	36,6
	CDSSTR	7,8	32,3	23,6	35,0
	CONTIN	15,5	30,3	21,1	33,1
	BeStSel	11,4	31,2	14,0	43,4
20 μ M CHA + 80 mM SDS	SELCON3	29,2	18,0	22,9	30,6
	CDSSTR	33,6	17,1	21,1	28,3
	CONTIN	29,6	16,9	23,0	30,4
	BeStSel	26,9	15,5	14,5	43,0
20 μ M CHA– 6 mM SDS + 74 mM SDS	SELCON3	23,9	22,0	22,3	31,0
	CDSSTR	26,1	21,2	21,9	30,6
	CONTIN	25,3	19,9	23,1	31,6
	BeStSel	21,1	18,8	14,8	45,4
20 μ M CHA– 20mM SDS + 60 mM SDS	SELCON3	29,2	18,1	23,0	30,5
	CDSSTR	33,5	16,7	21,3	28,6
	CONTIN	29,8	16,9	22,9	30,4
	BeStSel	26,4	15,2	14,4	44,1

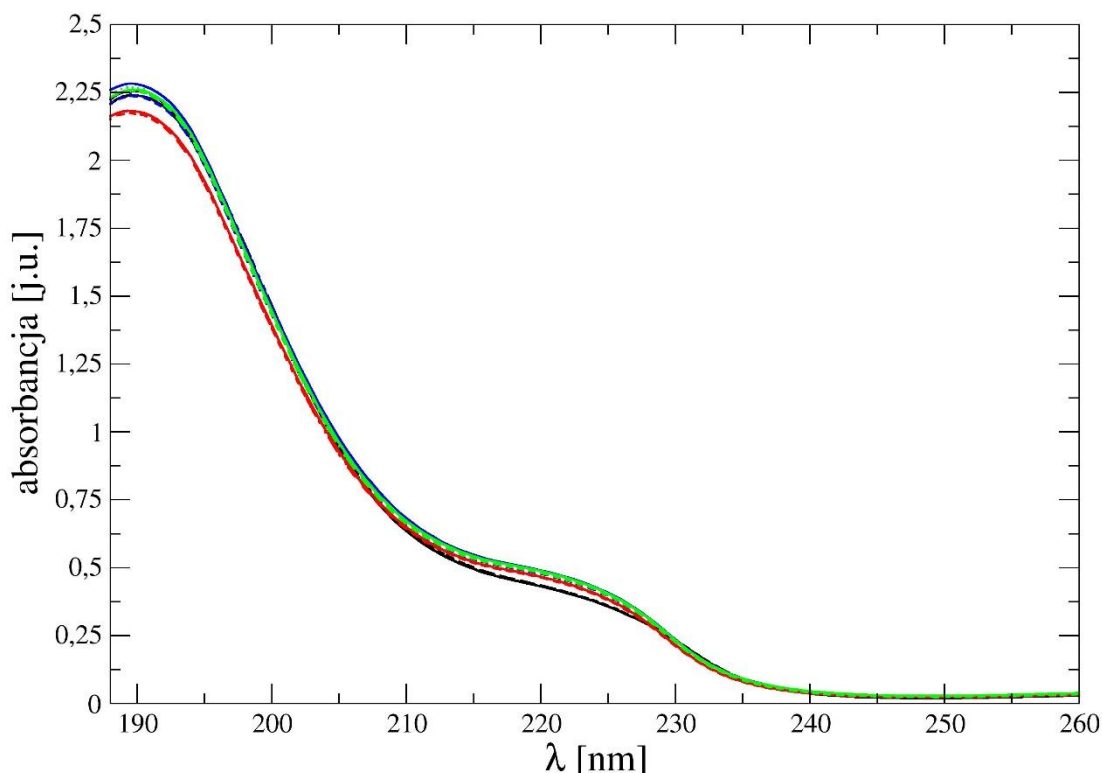
*fragmenty nieustrukturyzowane



Rysunek 19. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -chymotrypsyny (CHA), uzyskane różnymi programami do analizy widm CD dla próbek: 20 μ M CHA + bufor, 20 μ M CHA + 80 mM SDS, 20 μ M CHA-6mM SDS + 74 mM SDS oraz 20 μ M CHA-20mM SDS + 60 mM SDS.

Na podstawie uzyskanych danych, można zauważyć, że α -chymotrypsyna w obecności nasycającej ilości SDS, przyjmuje strukturę, która posiada więcej α -helis niż struktura natywna białka – podobne wnioski można odnaleźć w literaturze^[68]. Ponadto, można również zauważyć, że wszystkie użyte programy zgodnie wskazują, że wzrost populacji α -helis w obecności surfaktantu, silnie zależy od sposobu, w jaki osiągnięto jego końcowe stężenie. Frakcja α -helis i β -kartek jest taka sama w przypadku próbek 2 i 4 (największa różnica wynosi 0,5%), natomiast w przypadku próbki 3 widać spadek frakcji α -helis o 4,3–7,5%, a wzrost populacji β -kartek o 3,0–4,5%, mimo że końcowe stężenie surfaktantu jest takie samo.

Interpretując widma absorpcyjne próbek 1, 2, 3 i 4, które zostały przedstawione na Rysunku 20, widać, że widmo absorpcyjne czystego białka różni się od widm białka z SDS, głównie w zakresie 210 – 230 nm. W tym samym zakresie można zauważyć, że wszystkie 3 widma białka w obecności SDS, nakładają się na siebie, bez względu na to, jaką metodą uzyskano końcowe stężenie SDS. Jedyną różnicę dla wszystkich widm, można zauważyć w okolicy 190 nm, gdzie de facto żadne próbki nie pokrywają się, może to wynikać z faktu, że ilość światła dla tej długości fali, która dociera do detektora jest niewielka, co może zmniejszać dokładność pomiarów. Najmocniej w tej okolicy od pozostałych, odbiega próbka 3, co może w pewnym stopniu potwierdzać wnioski uzyskane na podstawie analizy widm CD.

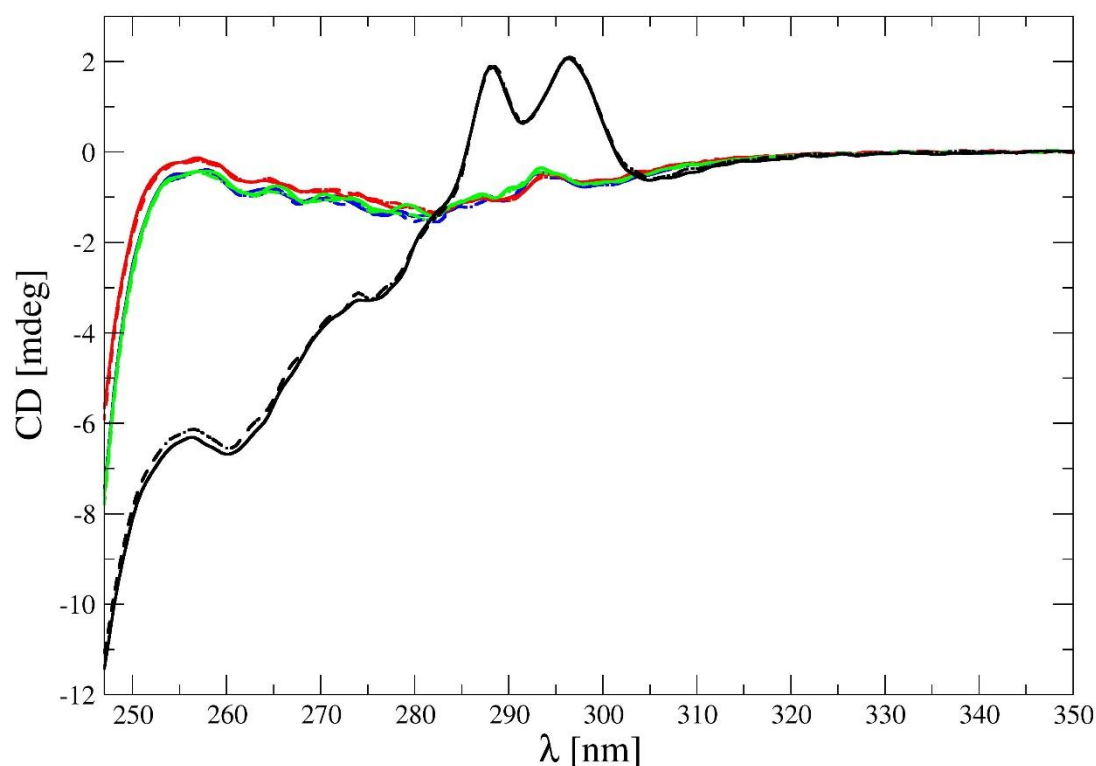


Rysunek 20. Widma absorpcji α -chymotrypsyny w zakresie dalekiego ultrafioletu. 20 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 20 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M CHA-6mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M CHA-20mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane, III seria – linie kropkowane.

Widma dichroizmu kołowego w bliskim ultrafiolecie, uzyskane z pomiarów próbek 5, 6, 7 oraz 8 zostały przedstawione na Rysunku 21. Widma rejestrowane były bezpośrednio po wymieszaniu odpowiednich roztworów wyjściowych – I seria oraz po 200 minutach – II seria. Wykonanie 20 pojedynczych skanów trwało około 50 minut, co łącznie daje 200 minut na pełną serię 4 próbek, stąd powyższe odstępy czasowe pomiędzy poszczególnymi seriami.

Podobnie jak w przypadku widm dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu, w widmach z zakresu bliskiego ultrafioletu widać, że dodanie SDS do roztworu białka, powoduje zmianę kształtu widma, co oznacza, że struktura III-rzędowa białka pod wpływem surfaktantu również ulega zmianie. Dodanie surfaktantu do roztworu białka, zmienia jego formę natywną. Ponadto, porównując widma uzyskane w I i II serii, widać, że pokrywają się one, co również świadczy o tym, że zmiany, które zachodzą w strukturze III-rzędowej białka

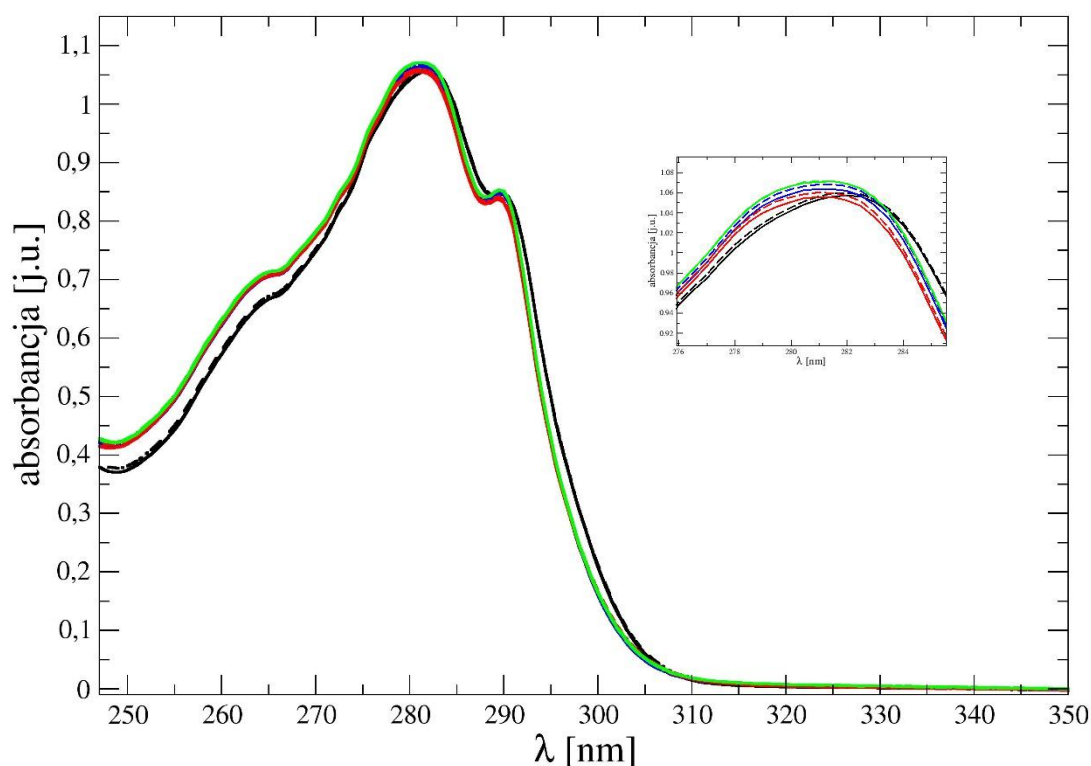
pod wpływem SDS, są stabilne, przez co najmniej 200 minut, i w tym czasie struktura białka nie ulega żadnej zmianie.



Rysunek 21. Widma dichroizmu kołowego α -chymotrypsyny w zakresie bliskiego ultrafioletu. 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M CHA-6mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA-20mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.

Porównując widma dichroizmu kołowego, uzyskane za pomocą jednoetapowej procedury z tymi otrzymanymi metodą dwuetapową, można zauważyć wyraźny podział widma na 2 zakresy. W pierwszym zakresie między 280 a 350 nm generalnie nie widać żadnych różnic między widmami, niezależnie którą metodą uzyskano końcowe stężenie SDS. W tym zakresie, wpływ na widmo CD mają głównie reszty tryptofanu, w związku z tym, można wnioskować, że struktura III-rzędowa α -chymotrypsyny w sąsiedztwie reszt tryptofanu zmienia się pod wpływem SDS, w ten sam sposób, niezależnie od tego jak osiągnięto końcowe stężenie surfaktantu. Natomiast w zakresie 250 – 280 nm, można zauważyć różnice między widmem próbki 7 a widmami próbek 6 i 8, czyli podobnie do tego, co widzieliśmy w widmach CD w zakresie FUV. W tym zakresie wpływ na widmo CD mają głównie reszty fenyloalaniny i

tyrozyny, ale również mostki disiarczkowe, zatem można wnioskować, że zmiana struktury III-rzędowej α -chymotrypsyny w sąsiedztwie tych reszt zależy od sposobu przygotowania próbek.



Rysunek 22. Widma absorpcji α -chymotrypsyny w zakresie bliskiego ultrafioletu. 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M CHA + 6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA + 20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.

Interpretując widma absorpcji uzyskane dla próbek 5, 6, 7 i 8 w zakresie bliskiego ultrafioletu, które zostały przedstawione na Rysunku 22, widać znaczną różnicę między widmem próbki czystego białka a widmami próbek zawierającymi SDS – przesunięcie widma w kierunku krótszych fal, co po raz kolejny potwierdza wpływ SDS na białko. Natomiast wszystkie widma próbek z SDS, niezależnie od tego, którą metodą zostało osiągnięte jego końcowe stężenie są niemalże identyczne - wnioski i obserwację są takie same jak w przypadku widm absorpcji w FUV. Dodatkowo można zauważyć, że przy długości fali 350 nm nie ma podniesienia tła widma, co świadczy o braku rozpraszania światła. To z kolei prowadzi do wniosku, że w badanych warunkach białko nie ulega agregacji.

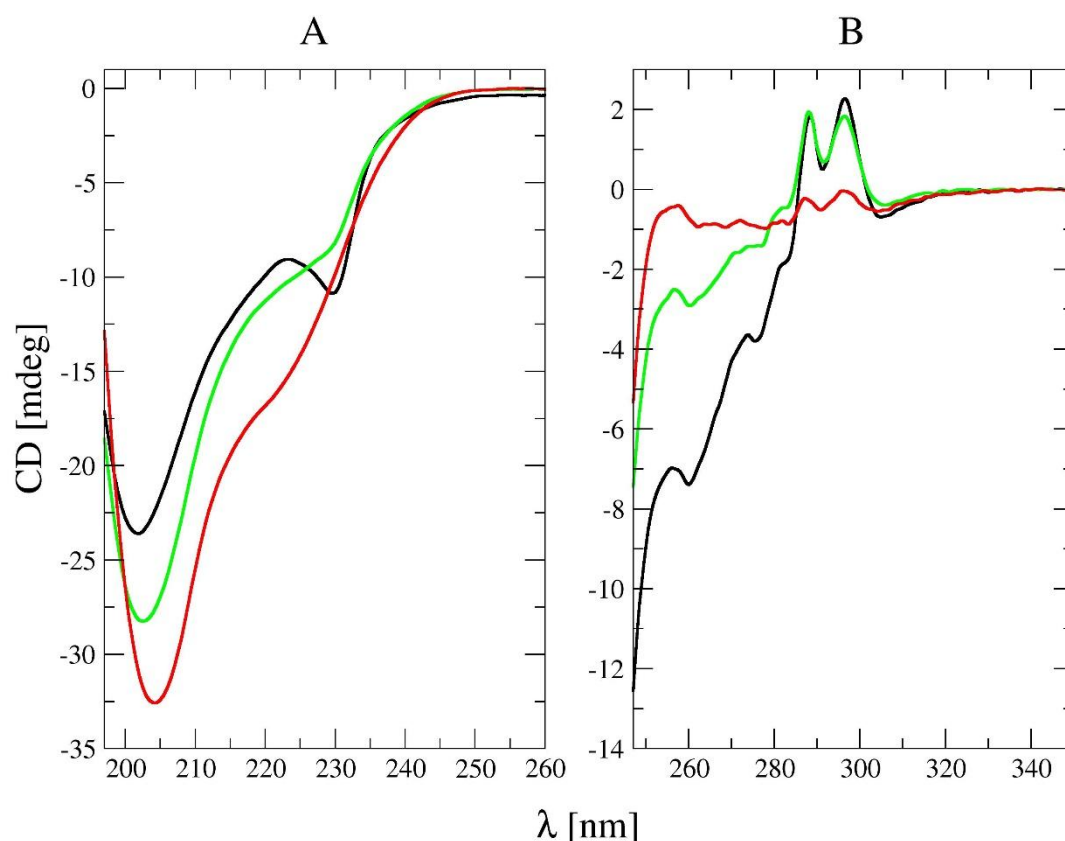
Wykonane zostały dodatkowe eksperymenty, z wykorzystaniem obu metod (podstawowej oraz alternatywnej), ale przy znacznie niższym niż 40 mM, końcowym stężeniu

surfaktantu. Wybrane końcowe stężenie SDS było bliskie CMC i wynosiło 3 mM. Końcowe stężenie białka wynosiło 10 μ M dla dalekiego ultrafioletu oraz 20 μ M dla bliskiego ultrafioletu. Roztwory reagentów były przygotowane w 10 mM buforze fosforanowym o pH 7. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 4.

Tabela 4. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego przygotowanych zgodnie z procedurą podstawową oraz alternatywną (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M CHA	bufor
2	20 μ M CHA	6 mM SDS
3	20 μ M CHA – 6 mM SDS	bufor
4	40 μ M CHA	bufor
5	40 μ M CHA	6 mM SDS
6	40 μ M CHA – 6 mM SDS	bufor

Zarejestrowane widma dichroizmu kołowego w FUV w zakresie 200 – 260 nm z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm oraz w NUV w zakresie 250 – 350 nm użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm, które zostały przedstawione na Rysunku 23. Wszystkie widma zostały skorygowane o widmo buforu.



Rysunek 23. Widma dichroizmu kołowego α -chymotrypsyny w zakresie (A) dalekiego ultrafioletu: 20 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 6 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M CHA-6mM SDS + bufor – kolor czerwony oraz (B) bliskiego ultrafioletu: 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 6 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M CHA-6 mM SDS + bufor – kolor czerwony.

Porównanie widm dichroizmu kołowego dla FUV i NUV, potwierdza wcześniejsze obserwacje, że widma próbek uzyskanych metodą podstawową i alternatywną, mimo takiego samego końcowego stężenia SDS różnią się od siebie. Wynika stąd, że zmiany strukturalne zachodzące w strukturze II– jak i III–rzędowej zależą od procedury przygotowania roztworu α -chymotrypsyny z SDS.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu zostały poddane analizie przy pomocy programu BeStSel a wyniki zebrano w Tabeli 5. Interpretując je, można wyciągnąć podobne wnioski jak wcześniej, a mianowicie: (1) dodatek SDS, do roztworu białka powoduje, że przyjmuje ono strukturę, która posiada więcej α -helis a mniej β -kartek niż struktura natywna białka, (2) wzrost jednej a spadek drugiej frakcji, silnie zależy od sposobu, w jaki osiągnięto końcowe stężenie surfaktantu.

Tabela 5. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -chymotrypsyny (CHA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M CHA + bufor, 40 μ M CHA + 6 mM SDS oraz 20 μ M CHA-6mM SDS + bufor.

Próbka	Element struktury II-rzędowej			
	α -helisa	β -kartka	pętla	f.n.*
20 μ M CHA + bufor	4,2	28,2	16,6	51
40 μ M CHA + 6 mM SDS	9,6	25,1	16,7	48,6
20 μ M CHA-6mM SDS + bufor	15,5	20,8	15,4	48,4

*fragmenty nieustrukturyzowane

Należy zwrócić uwagę na widma w NUV. W przypadku, gdy końcowe stężenie SDS było znacznie wyższe niż CMC (40 mM), różnice między widmami próbek przygotowanych dwoma różnymi metodami widać było tylko w zakresie 250 – 280 nm, powyżej 280 widma pokrywały się, tutaj widać, że pokrywają się dopiero powyżej 300 nm, czyli można przypuszczać, że w przypadku, gdzie stężenie końcowe SDS w roztworze z białkiem jest bliskie lub nieznacznie wyższe niż CMC, struktura III-rzędowa α -chymotrypsyny zmienia się w sąsiedztwie nie tylko reszt tyrozyny czy fenyloalaniny, ale również tryptofanu, czyli generalnie w sąsiedztwie wszystkich trzech aminokwasów aromatycznych, nie zależnie od sposobu przygotowania próbki. Fakt, że stężenie SDS było w okolicach CMC sugeruje, że w tych roztworach zachodzą zmiany wynikające głównie z oddziaływań α -chymotrypsyny z pojedynczymi cząsteczkami surfaktantu. Ponadto, rejestrowanie widm miało miejsce godzinę po przygotowaniu roztworów, co może sugerować, że struktury w roztworze są stabilne w czasie, co wskazuje na nieodwracalność wiązania pojedynczych cząsteczek SDS do białka.

Podsumowując, można stwierdzić, że zmiany zachodzące zarówno w strukturze II– jak i III-rzędowej α -chymotrypsyny pod wpływem SDS, mogą zależeć nie tylko od stężenia samego surfaktanta, ale również od procedury przygotowania próbek, prowadzącej do osiągnięcia jego końcowego stężenia w roztworze. Ponadto, należy pamiętać, że pojedyncze cząsteczki SDS odgrywają równie istotną rolę w zachodzących zmianach strukturalnych białka pod wpływem surfaktantu jak i micelle. Wszystkie uzyskane wyniki były powtarzalne w

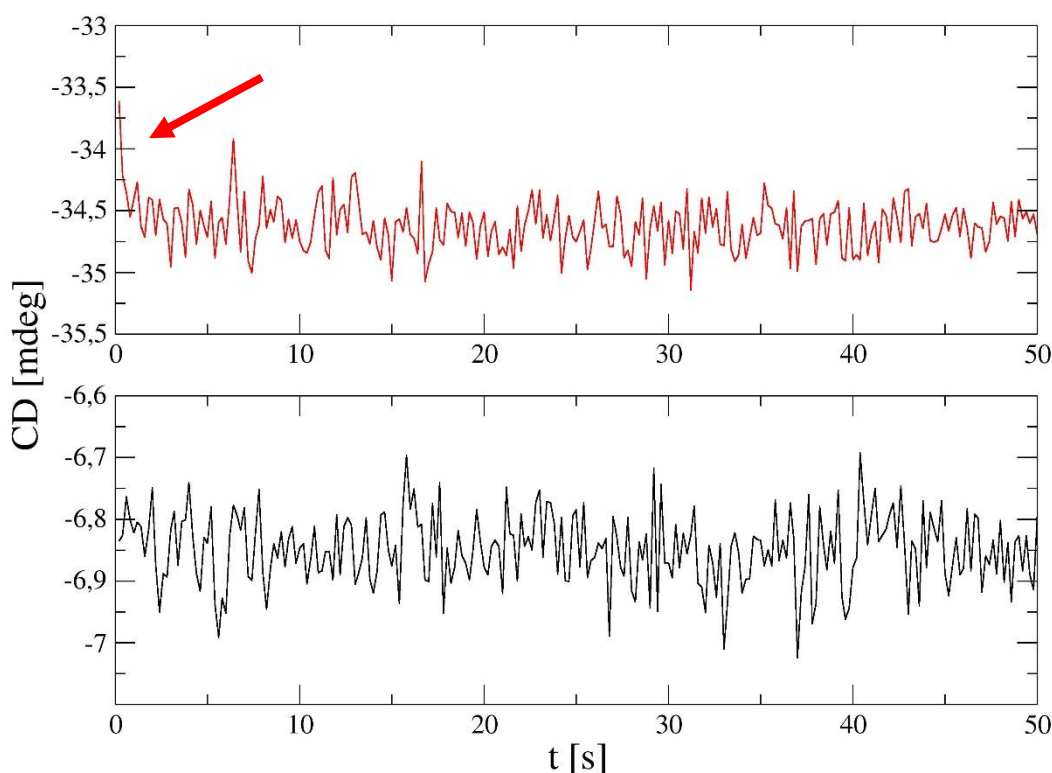
niezależnych eksperymentach, wykonywanych na innych roztworach wyjściowych i zostały opisane w publikacji^[68].

Posiadając już pewną wiedzę na temat zmian strukturalnych zachodzących w α -chymotrypsynie pod wpływem dodecylosiarczanu sodu, pozyskaną na podstawie analizy stacjonarnych widm dichroizmu kołowego i absorpcji, przeprowadzono eksperymenty kinetyczne z wykorzystaniem metody zatrzymanego przepływu z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus z przystawką stopped-flow. Głównym celem tych badań było porównanie kinetyki zmian struktury II-rzędowej z kinetyką zmian struktury III-rzędowej. Końcowe stężenie białka dla pomiarów FUV jak i NUV wynosiło 20 μ M. W pomiarach wykorzystywano 20 mM bufor fosforanowy o pH 6,4 z 5 mM NaCl. Niestety nie udało się odnaleźć w literaturze, ile wynosi CMC SDS dla takiego buforu, natomiast na podstawie opublikowanej pracy^[66], można wnioskować, że CMC nie przekracza 3 mM, w związku z tym, eksperymenty były prowadzone dla stężeń SDS powyżej CMC. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 6.

Tabela 6. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) do pomiarów kinetycznych z detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	40 μ M CHA	bufor
2	40 μ M CHA	16 mM SDS
3	40 μ M CHA	32 mM SDS
4	40 μ M CHA	48 mM SDS
5	40 μ M CHA	64 mM SDS
6	40 μ M CHA	80 mM SDS
7	10 μ M CHA	Bufor
8	10 μ M CHA	40 mM SDS

Na podstawie widm CD wybrano długości fali, przy której obserwowana była największa zmiana w sygnale pomiędzy próbką czystego białka a białka z SDS. Długości te zostały wykorzystane w pomiarach kinetycznych, jako długości fali pomiarowej, przy której rejestrowane były zmiany sygnału w czasie. W kontekście pomiarów kinetycznych z wykorzystaniem metody zatrzymanego przepływu, długości te nazywa się długościami fali wzbudzenia zarówno dla fluorescencji jak również dla dichroizmu kołowego. Dla dalekiego ultrafioletu została wybrana długość fali 222 nm a dla bliskiego ultrafioletu 260 nm, obie z szerokością pasma 7 nm. Długość drogi optycznej dla 222 nm wynosiła 2 mm (spektrofotometr nie posiada do wyboru długości 1 mm) a dla 260 nm – 10 mm. Rejestrowano jednocześnie krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego oraz fluorescencji. Końcowa krzywa postępu reakcji została uzyskana poprzez uśrednienie 12 skanów dla FUV oraz 25 dla NUV. W trakcie pomiarów wykorzystywano filtr odcinający 320 nm (Schott WG 320).

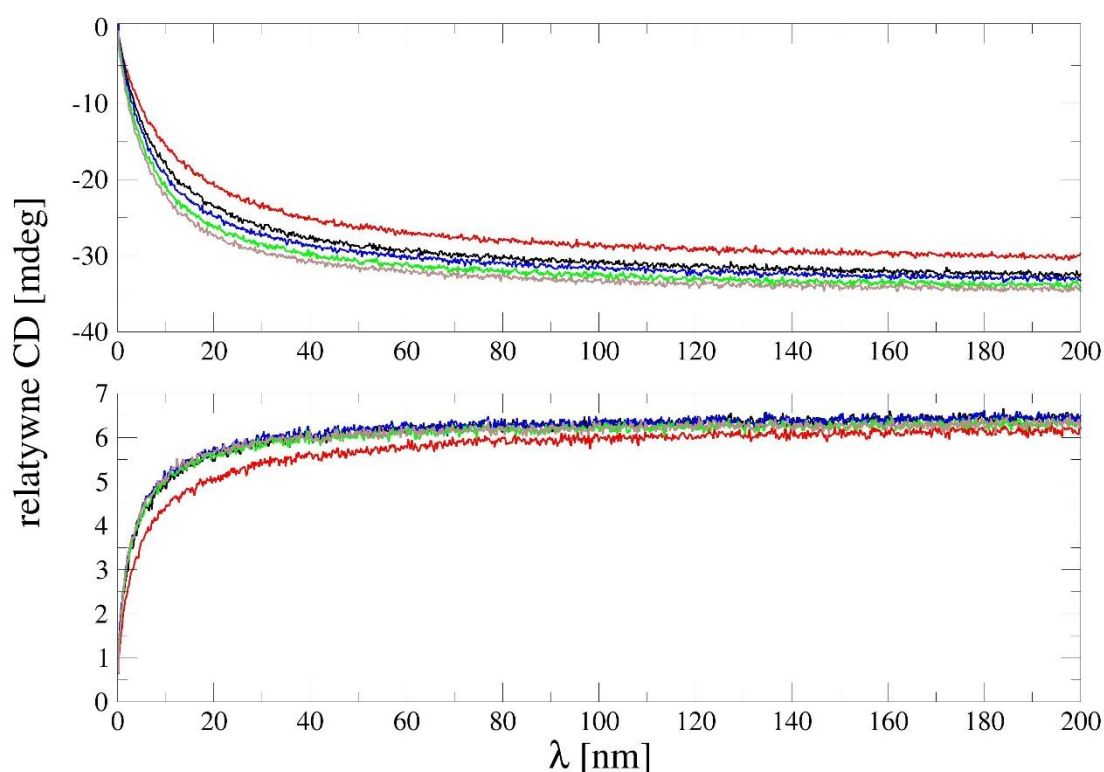


Rysunek 24. Krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny zarejestrowane z detekcją dichroizmu kołowego próbek: 40 μ M CHA + bufor. Górny panel: wzbudzenie 222 nm, dolny panel: wzbudzenie 260 nm.

Rejestrując krzywe postępu reakcji próbki 1, oczekuje się, że sygnał nie powinien zmieniać się w czasie, jednak, co można zobaczyć na Rysunku 24 (czerwona strzałka), mogą

się pojawić pewne fluktuacje czy zaburzenia o różnym pochodzeniu, np. wynikające z uderzeń cząsteczek białka o ściany naczynia pomiarowego, podczas wtłaczania reagentu pod wysokim ciśnieniem. W związku z tym, aby móc oceniać i analizować wpływ SDS na strukturę białka, należy analizować tzw. relatywne (różnicowe) krzywe postępu reakcji, które uzyskuje się poprzez odjęcie od krzywej białko–SDS krzywej białko – bufor.

Uzyskane relatywne krzywe postępu reakcji próbek 2 – 6 zostały przedstawione na Rysunku 25.



Rysunek 25. Relatywne krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny z detekcją dichroizmu kołowego: 40 μ M CHA + 16 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA + 32 mM SDS – kolor czarny, 40 μ M CHA + 48 mM SDS – kolor niebieski, 40 μ M CHA + 64 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor brązowy. Górny panel: wzbudzenie 222 nm, dolny panel: wzbudzenie 260 nm.

Interpretując uzyskane relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego próbek 2 – 6 widać, że dla obu wzbudzeń wraz ze wzrostem stężenia SDS, wzrasta szybkość zachodzących procesów, jakimi są zmiany strukturalne w białku, a także zwiększa się amplituda relaksacji. Dla wzbudzenia 260 nm, widać, że generalnie dla wszystkich krzywych, nasycenie występuje praktycznie przy takiej samej wartości relatywnego sygnału CD, a krzywe

(oprócz tej dla najmniejszego stężenia SDS) pokrywają się. Może to świadczyć, o tym, że powyżej pewnego stężenia SDS struktura III-rzędowa jaką osiąga białko w kontakcie z SDS jest taka sama, mimo zwiększania stężenia surfaktantu. Tymczasem dla wzbudzenia 222 nm nie widać nasycenia oraz krzywe zupełnie się nie pokrywają. To z kolei świadczy o tym, że wartość stężenia SDS ma duże znaczenie, jakie zmiany i jak szybko zachodzą w strukturze II-rzędowej białka. Można przypuszczać, że populacja α -helis zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia SDS w próbce z białkiem, co potwierdza wnioski uzyskane na podstawie widm stacjonarnych dichroizmu kołowego.

Wszystkie otrzymane relatywne krzywe postępu reakcji CD, zostały przeanalizowane za pomocą programu DynaFit. Zostały zastosowane dwie różne procedury do analizy danych eksperymentalnych: pierwsza z nich polegała na numerycznej integracji równań różniczkowych opisujących przejścia strukturalne a druga na dopasowaniu funkcji wieloeksponeńcjalnych. Wyniki z obu metod pokrywają się. Do wyboru najbardziej prawdopodobnego mechanizmu reakcji zastosowano algorytm dyskryminacji modeli, zaimplementowany w programie DynaFit^[57,58]. Algorytm ten opiera się na obliczaniu drugorzędowego kryterium informacyjnego Akaike'a oraz kryterium informacyjnego Bayesa dla wszystkich rozważanych modeli. Wybór pomiędzy proponowanymi modelami opierał się dodatkowo na analizie empirycznych przedziałów ufności przy 1% wzroście resztowej residualnej sumy kwadratów.

W porównaniu do obserwacji Takedy^[2], który widział tylko jeden proces relaksacji, zaobserwowano, że zmiany strukturalne zachodzące w α -chymotrypsynie, obejmują więcej niż jeden proces. Procedura dyskryminacyjna zaimplementowana w programie DynaFit pokazała, że najbardziej prawdopodobne dopasowanie odpowiada nieodwracalnemu, trzyetapowemu procesowi, który można opisać równaniem:

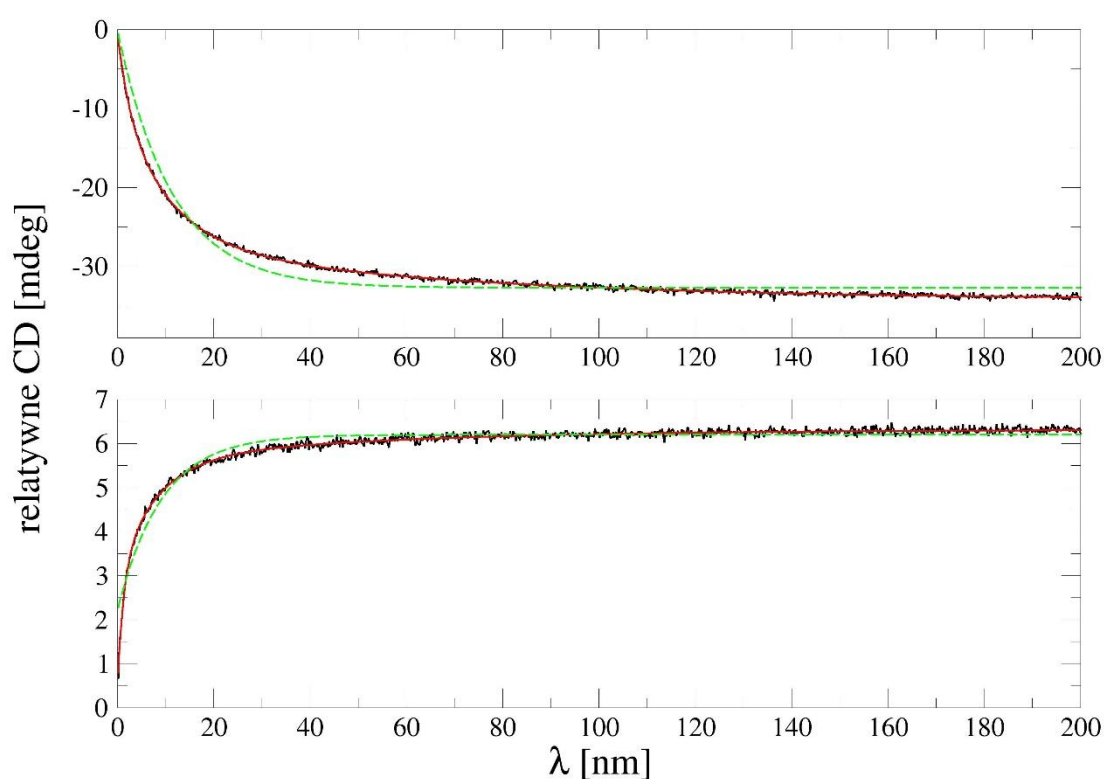
$$S(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-k_1 t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_2 t)) + A_3 \cdot (1 - \exp(-k_3 t)) \quad (16)$$

gdzie $S(t)$ – sygnał mierzony w czasie, A_0 – wartość początkowa sygnału, A_i - amplitudy, k_i – stałe szybkości, t – czas.

Każdy człon $A_n \cdot (1 - \exp(-k_n t))$ wykorzystany w równaniu 16, o określonej amplitudzie i stałej szybkości opisuje wkład danego etapu kinetycznego do całkowitej reakcji. Odpowiada on procesowi relaksacji wykładniczej w czasie i stabilizuje się na określonym

poziomie. Dopasowanie zgodne z równaniem 16 doprowadziło do uzyskania trzech zestawów stałych szybkości k_i i względnych amplitud A_i dla danej długości fali wzbudzenia.

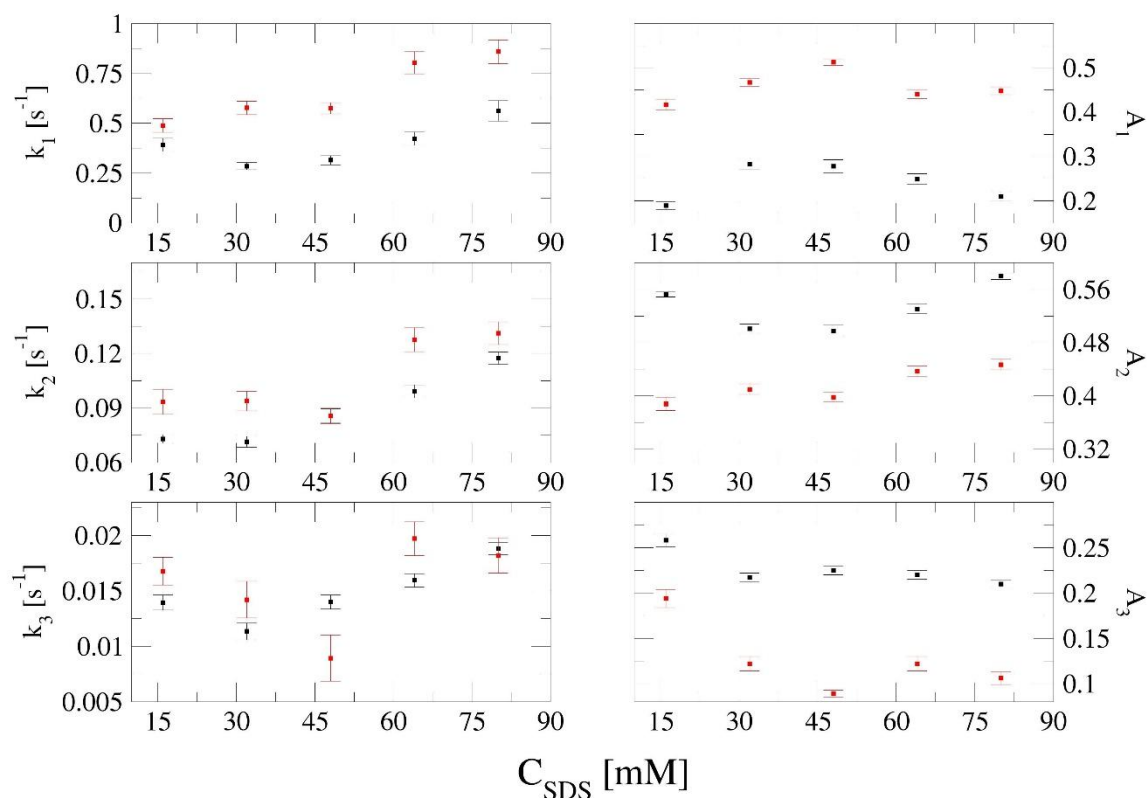
Na rysunku 26 zostały przedstawione przykładowe dopasowania modelu trzyetapowego do danych eksperymentalnych uzyskane za pomocą programu DynaFiT dla próbki 5, dla wzbudzenia 222 nm i 260 nm. Dodatkowo na rysunku przedstawiono, jak wygląda dopasowanie modelu jednoetapowego do uzyskanych danych eksperymentalnych. Widać, że dopasowanie trzyetapowe jest znacznie lepsze.



Rysunek 26. Dopasowania modelu trzyetapowego (kolor czerwony) oraz jednoetapowego (kolor zielony) do relatywnych krzywych postępu reakcji α -chymotrypsyny z detekcją dichroizmu kołowego (kolor czarny) uzyskane za pomocą programu DynaFiT dla próbki 40 μ M CHA + 64 mM SDS. Górny panel: wzbudzenia 222 nm, dolny panel: wzbudzenie 260 nm.

Uzyskane z dopasowania stałe szybkości oraz względne amplitudy, zostały przedstawione na Rysunku 27. Stałe szybkości i ich błędy standardowe uzyskane z integracji równań różniczkowych są takie same jak stałe szybkości i błędy standardowe wynikające z dopasowania funkcji wykładniczych. Porównując między sobą stałe szybkości oraz amplitudy, można stwierdzić, że kinetyka zmian zachodzących w strukturze II-rzędowej α -chymotrypsyny

pod wpływem SDS różni się od kinetyki w strukturze III-rzędowej, co odbiega to od danych opublikowanych przez Takede^[2].

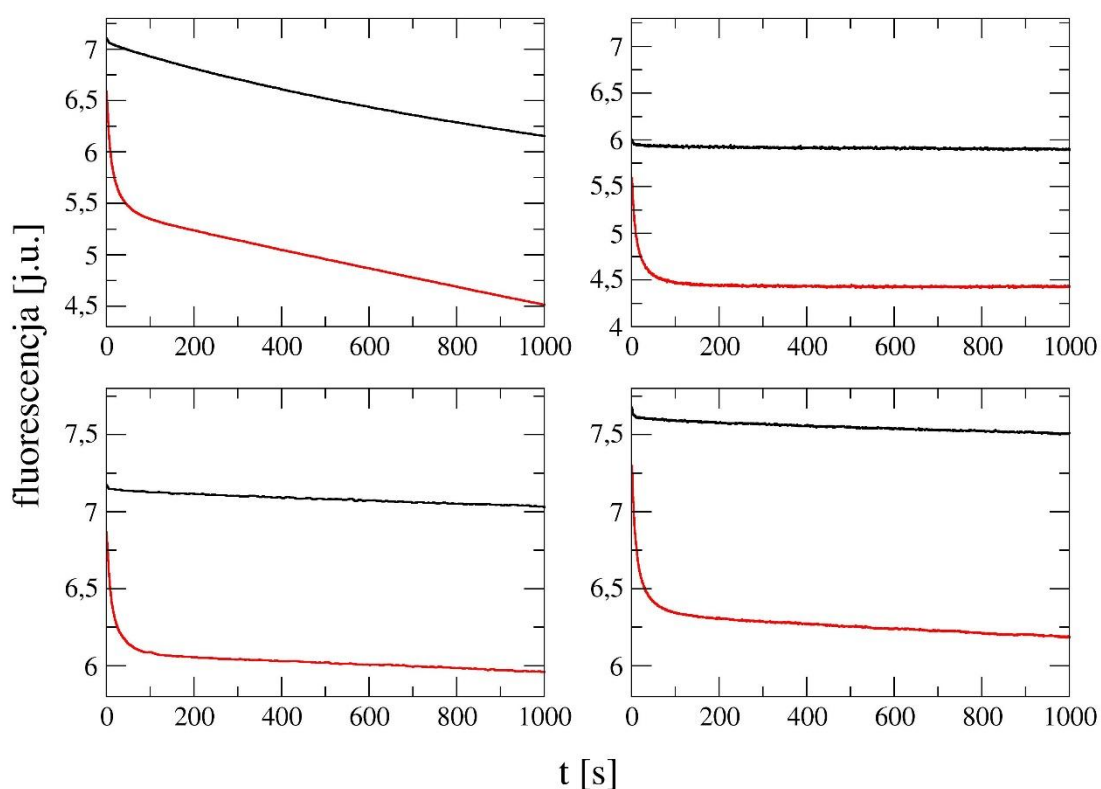


Rysunek 27. Stałe szybkości k (lewa kolumna) oraz względne amplitudy A (prawa kolumna) wraz z błędami zmian zachodzących w strukturze II-rzędowej α -chymotrypsyny (czarne symbole, wzbudzenie 222 nm) oraz III-rzędowej (czerwone symbole, wzbudzenie 260 nm) w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu DynaFit z dopasowania modelu trzyetapowego do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego, dla próbek 40 μ M CHA + 16 mM, 40 μ M CHA + 32 mM SDS, 40 μ M CHA + 48 mM SDS, 40 μ M CHA + 64 mM SDS, 40 μ M CHA + 80 mM SDS.

W trakcie rejestracji krzywych CD, rejestrowane były jednocześnie krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji. Długości fali wzbudzenia 222 nm oraz 260 nm, nie są typowymi długościami fali wzbudzenia do pomiaru fluorescencji białek, najczęściej wybierane długości to 280 lub 295 nm, jednak ze względu na pomiar krzywych CD, fluorescencja mierzona była przy takich samych długościach fali wzbudzenia. Natomiast dzięki zastosowaniu filtra odcinającego 320 nm (Schott WG 320), obserwowana fluorescencja pochodziła głównie od tryptofanów.

Niestety, rejestrowana fluorescencja białka, jest zakłócana przez fotowysielanie (zjawisko polegające na utracie przez fluorofory zdolności do fluorescencji, wskutek długiej

ekspozycji na promieniowanie elektromagnetyczne) zwłaszcza przy długości fali wzbudzenia 222 nm. W celu weryfikacji tego zjawiska, wykonano kilka eksperymentów zatrzymanego przepływu, w których rejestrowano krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji próbek 7 i 8, przez 1000 s, przy dwóch długościach fali: 222 nm oraz 260 nm. Pomiar wykonano z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus z przystawką stopped-flow oraz spektrometru Stopped-flow SX20. W pierwszym urządzeniu emisja światła o długości fali 222 nm jest dużo intensywniejsza niż w drugim. W przypadku długości fali 260 nm te intensywności są porównywalne. Wyniki przedstawiono na Rysunku 28. Kinetyka fotowysielania w buforze i w obecności SDS jest różna, więc efektów fotowysielania, nie da się odjąć od zarejestrowanych krzywych.

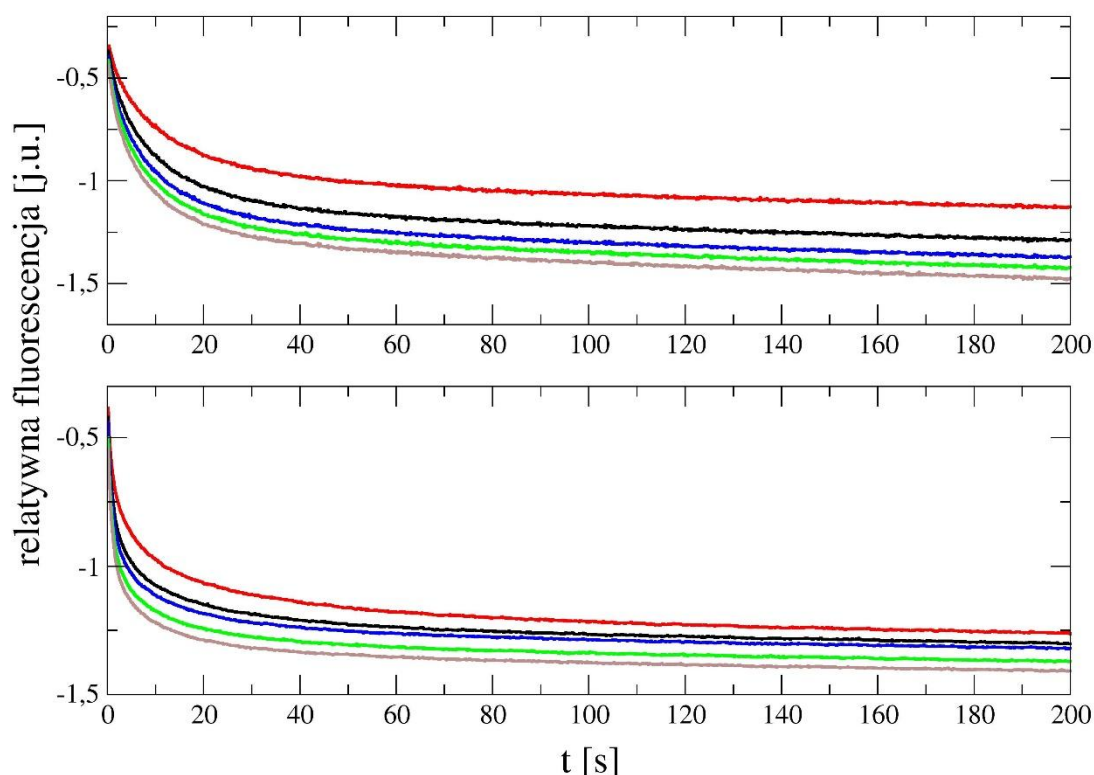


Rysunek 28. Krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny zarejestrowane z detekcją fluorescencji za pomocą spektrometru Chirascan Plus (lewa kolumna) oraz spektrometru Stopped-flow SX20 (prawa kolumna) próbek: 10 μ M CHA + bufor – kolor czarny oraz 10 μ M CHA + 40 mM SDS – kolor czerwony. Górny panel – wzbudzenie 222 nm, dolny panel – wzbudzenie 260 nm.

Interpretując wyniki przedstawione na Rysunku 28, widać, że dla wzbudzenia 260 nm wyniki z obu spektrofotometrów są praktycznie takie same, jednak dla wzbudzenia 222 nm,

krzywe zarejestrowane spektrometru Stopped-flow SX20 osiągają prawie idealne plateau, czego nie obserwuje się dla krzywych ze spektrometru Chirascan Plus.

Uzyskane krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji próbek 2 – 6, zostały umieszczone na Rysunku 29



Rysunek 29. Relatywne krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny z detekcją fluorescencji: 40 μ M CHA + 16 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA + 32 mM SDS – kolor czarny, 40 μ M CHA + 48 mM SDS – kolor niebieski, 40 μ M CHA + 64 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor brązowy. Górny panel: wzbudzenie 222 nm, dolny panel: wzbudzenie 260 nm.

Interpretując uzyskane relatywne krzywe fluorescencji próbek 2 – 6 dla obu długości fali wzbudzenia 222 nm i 260 nm, widać spadek fluorescencji pod wpływem SDS, który wskazuje, że zachodzą zmiany w strukturze III-rzędowej białka. Ponadto krzywe nie pokrywają się, co oznacza, że wraz ze wzrostem stężenia SDS, fluorescencja w białku jest mocniej wygaszana. Co ważne, relatywne krzywe nie zaczynają się od 0, co sugeruje, że spadek sygnału fluorescencji zachodzi już w czasie martwym urządzenia. Można przyjąć, że dla wzbudzenia 260 nm, relatywne krzywe postępu CD pokrywały się w większości stężeń SDS, czyli zupełnie odwrotnie, niż w przypadku fluorescencji, Prawdopodobnie wynika to z faktu,

że dichroizm kołowy i fluorescencja pozwala na obserwację różnych aspektów zmiany struktury III-rzędowej. Dla wzbudzenia 222 nm, krzywe postępu reakcji nie pokrywają się, niezależnie od rejestrowanej wielkości: dichroizmu kołowego czy fluorescencji. Należy pamiętać, że w przypadku dichroizmu kołowego krzywe rejestrowane przy wzbudzeniu 222 nm dostarczają informacji na temat struktury II-rzędowej a 260 nm III-rzędowej, natomiast w przypadku fluorescencji, dla obu wzbudzeń, obserwuje się zmiany w strukturze III-rzędowej^[25,52,54].

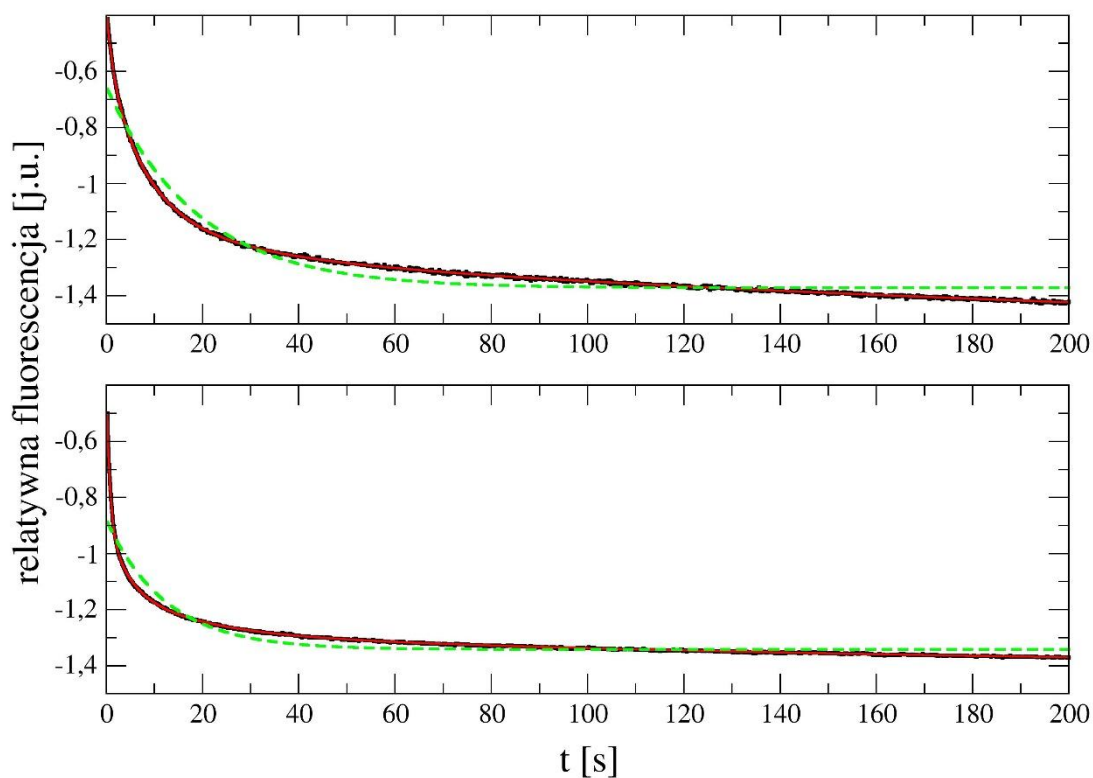
Relatywne krzywe fluorescencyjne próbek 2 – 6, zostały przeanalizowane za pomocą programu DynaFit, w ten sposób, co krzywe CD: poprzez numeryczną integrację równań różniczkowych oraz poprzez dopasowanie funkcji wieloeksponencjalnych. Obie metody dały te same wyniki, natomiast w przeciwieństwie do analizy danych CD, wskazały jako najbardziej prawdopodobne dopasowanie odpowiadające nieodwracalnemu, czteroetapowemu procesowi, zgodnie z równaniem:

$$S(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-k_1 t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_2 t)) + A_3 \cdot (1 - \exp(-k_3 t)) + A_4 \cdot (1 - \exp(-k_4 t)) \quad (17)$$

gdzie $S(t)$ – sygnał mierzony w czasie, A_0 – wartość początkowa sygnału, A_i - amplitudy, k_i – stałe szybkości, t – czas.

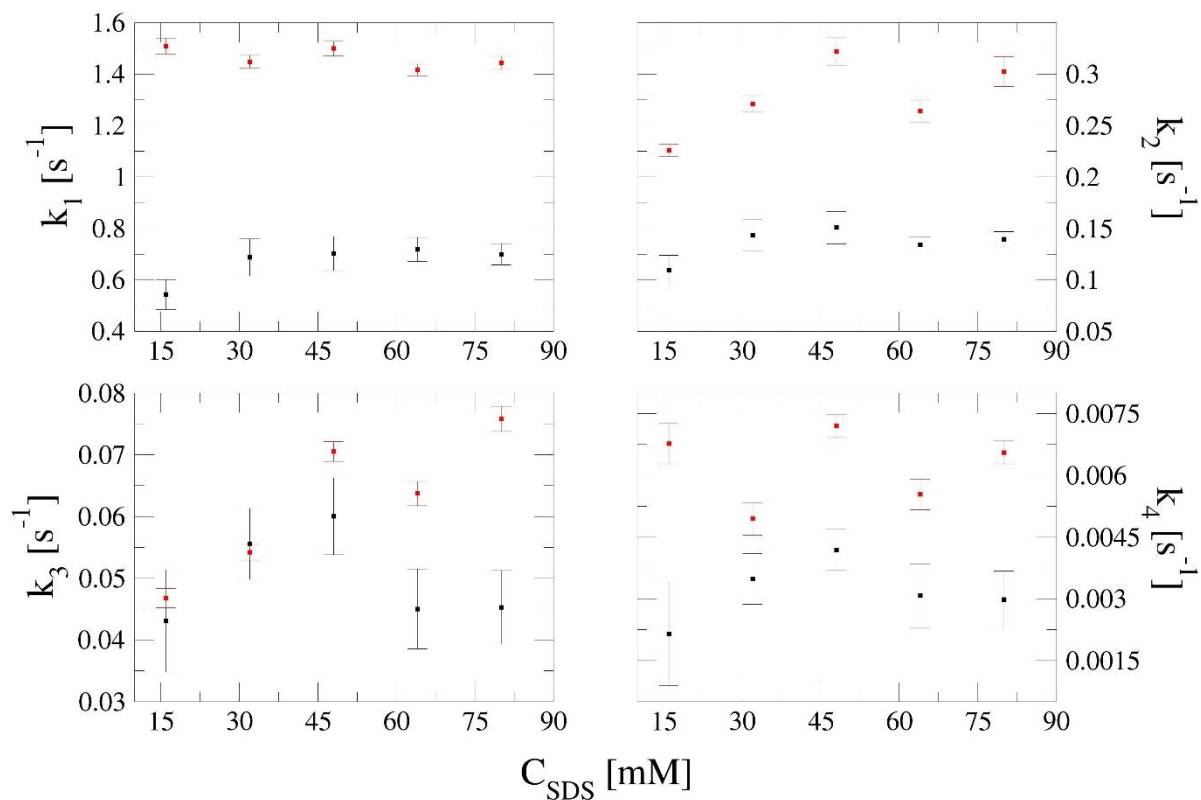
Czwarty proces występujący w równaniu 17, może wskazywać, że poprzez detekcję fluorescencji, która jest znacznie czulsza niż dichroizm kołowy, widać dodatkowy etap reakcji.

Na Rysunku 30 przedstawiono przykładowe dopasowania modelu czteroetapowego oraz jednoetapowego do danych eksperymentalnych uzyskane za pomocą programu DynaFit dla wzbudzenia 222 nm oraz 260 nm. Widać że model czteroetapowy znacznie lepiej opisuje obserwowany proces.

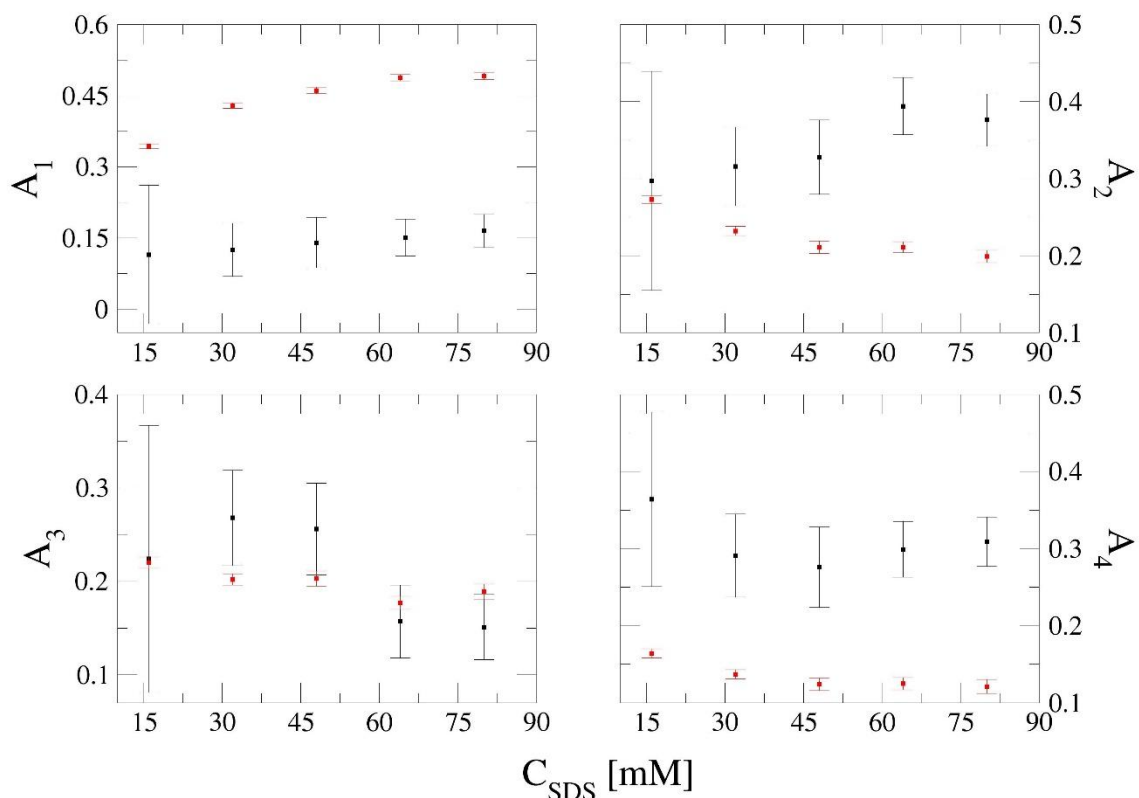


Rysunek 30. Dopasowania modelu czteroetapowego (kolor czerwony) oraz jednoetapowego (kolor zielony) do relatywnych krzywych postępu reakcji α -chymotrypsyny z detekcją fluorescencji (kolor czarny) uzyskane za pomocą programu DynaFit dla próbki 40 μ M CHA + 64 mM SDS. Górny panel: wzbudzenia 222 nm, dolny panel: wzbudzenie 260 nm.

Z analizy programem DynaFit, otrzymano cztery zestawy stałych szybkości k_i i względnych amplitud A_i na daną długość fali wzbudzenia. Uzyskane stałe szybkości zostały przedstawione na Rysunku 31 a względne amplitudy na Rysunku 32.



Rysunek 31. Stałe szybkości k wraz z błędami, zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny: czarne symbole – wzbudzenie 222 nm, czerwone symbole – wzbudzenie 260 nm w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu DynaFit, z dopasowania modelu czteroetapowego do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją fluorescencji, dla próbek 40 μM CHA + 16 mM, 40 μM CHA + 32 mM SDS, 40 μM CHA + 48 mM SDS, 40 μM CHA + 64 mM SDS, 40 μM CHA + 80 mM SDS.



Rysunek 32. Względne amplitudy A wraz z błędami, zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny: czarne symbole – wzbudzenie 222 nm, czerwone symbole – wzbudzenie 260 nm, w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu DynaFit, z dopasowania modelu czteroetapowego do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją fluorescencji dla próbek 40 μ M CHA + 16 mM, 40 μ M CHA + 32 mM SDS, 40 μ M CHA + 48 mM SDS, 40 μ M CHA + 64 mM SDS, 40 μ M CHA + 80 mM SDS.

Interpretując stałe szybkości reakcji oraz względne amplitudy w funkcji stężenia SDS, widać, że oba te parametry zależą od długości fali wzbudzenia. Można zatem wnioskować, że kinetyka zmian w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny, analizowana na podstawie pomiarów fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia. Pojawiło się zatem pytanie, czy obserwowane różnice wynikają wyłącznie z procesu fotowysielania czy też istnieje inna przyczyna.

Aby móc porównywać otrzymane stałe szybkości oraz względne amplitudy otrzymane w wyniku dwóch eksperymentów: (1) z detekcją dichroizmu kołowego i (3) z detekcją fluorescencji. relatywne krzywe fluorescencyjne próbek 2 – 6, dla wzbudzenia 260 nm, zostały ponownie przeanalizowane za pomocą programu DynaFit poprzez dopasowanie sum do trzech funkcji wykładniczych natomiast z uwzględnieniem lub bez składnika liniowego

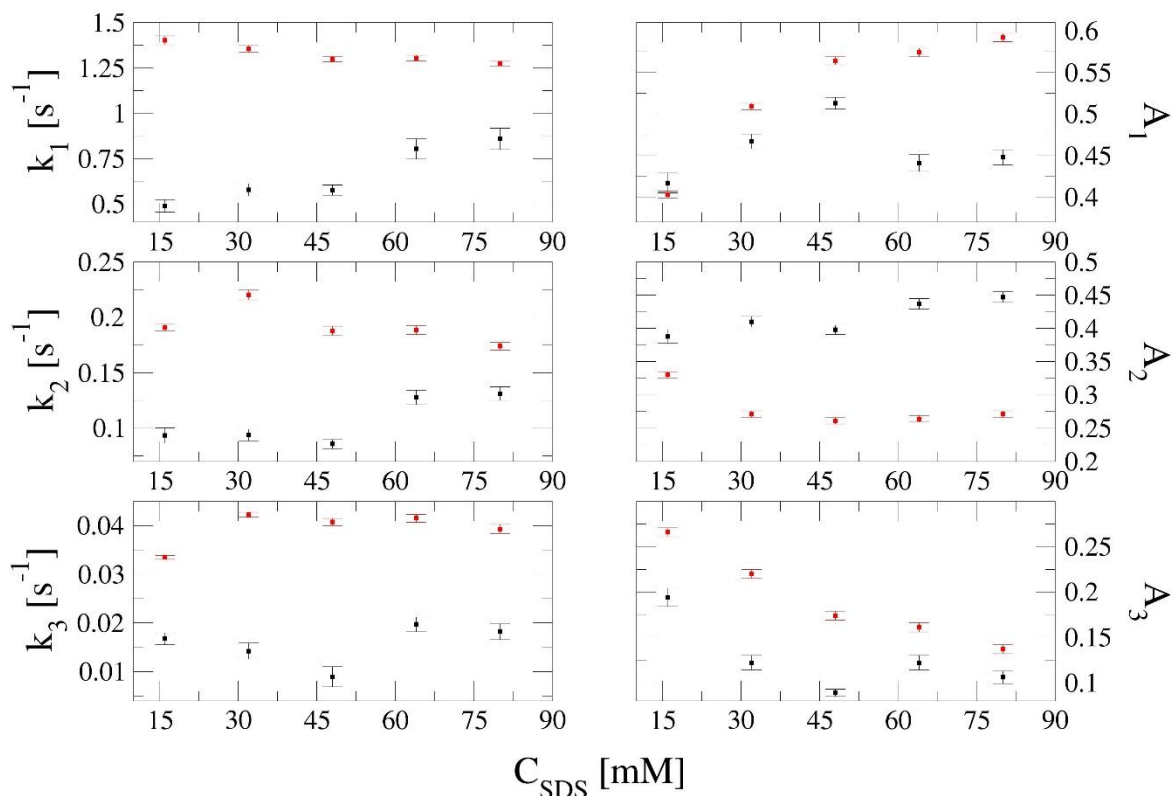
odpowiadającego fotowysbieleniu. Najbardziej prawdopodobny model wybrany przez program (również z wykorzystaniem algorytmu opartego na obliczaniu drugorzędowego kryterium informacyjnego Akaike’a oraz kryterium informacyjnego Bayesa), był następujący:

$$S(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-k_1 t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_2 t)) + A_3 \cdot (1 - \exp(-k_3 t)) - b \cdot t \quad (18)$$

gdzie $S(t)$ – sygnał mierzony w czasie, A_0 – wartość początkowa sygnału, A_i – amplitudy, k_i – stałe szybkości, t – czas, b – współczynnik nachylenia.

Wykorzystany w równaniu 18 człon $-b \cdot t$ to składnik liniowy odpowiadający fotowysbieleniu. Człon ten oznacza, że sygnał zmniejsza się proporcjonalnie do upływającego czasu, niezależnie od procesów opisanych wyrazami wykładniczymi.

Podjęcie z wykorzystaniem składnika liniowego zostało zastosowane również przez innych badaczy^[63,64]. W eksperymentach kinetycznych taki człon często dodaje się, aby uwzględnić dodatkowo zachodzące w próbce procesy. Uzyskane na podstawie pomiarów fluorescencji i z dopasowania modelu zgodnego z równaniem 18, stałe szybkości oraz względne amplitudy, zostały porównane z danymi uzyskanymi z pomiarów CD, co zostało przedstawione na Rysunku 33. Uzyskane stałe szybkości, k_2, k_3 mają ten sam rząd wielkości, więc może to sugerować, że opisują te same zjawiska. W przypadku stałej k_1 jest ona o rząd wielkości większa dla fluorescencji, co wskazuje, że może ona opisywać inne procesy.



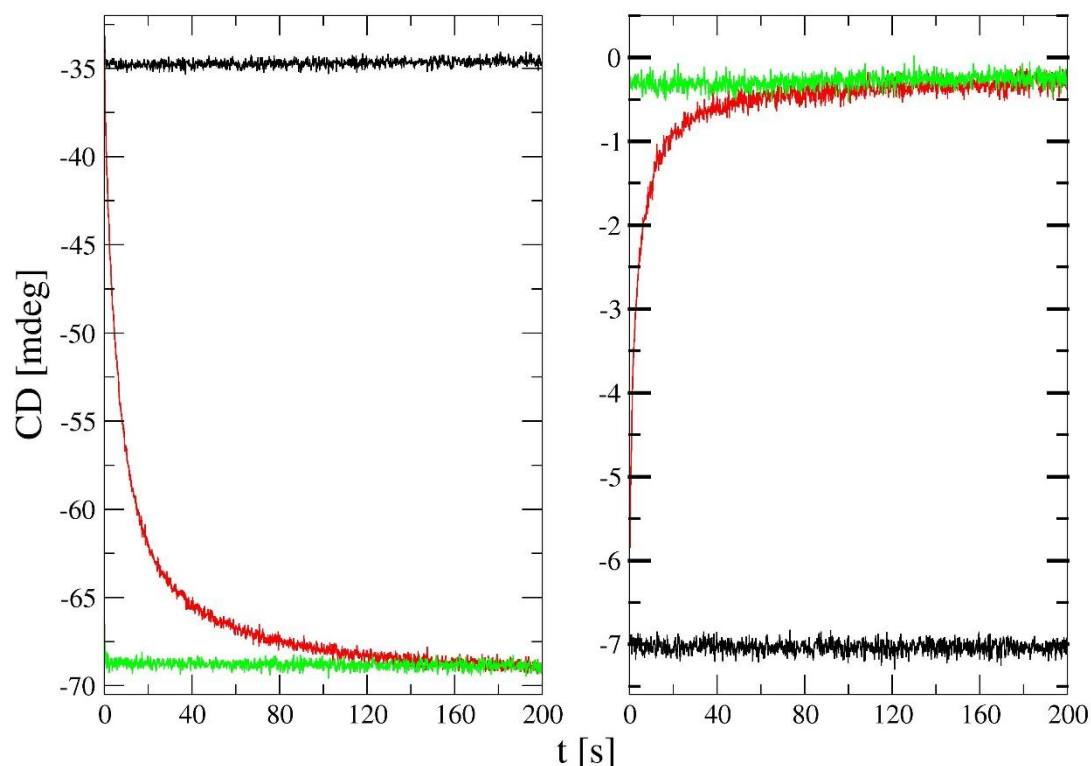
Rysunek 33. Stałe szybkości k (lewy panel) oraz względne amplitudy A (prawy panel) wraz z błędami, zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny (wzbudzenie 260 nm) w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu DynaFit, z dopasowania modelu trzypiętowego do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją fluorescencji – kolor czerwony oraz dichroizmu kołowego – kolor czarny, dla próbek: 40 μ M CHA + 16 mM, 40 μ M CHA + 32 mM SDS, 40 μ M CHA + 48 mM SDS, 40 μ M CHA + 64 mM SDS, 40 μ M CHA + 80 mM SDS.

Wykonane zostały również pomiary dla α -chymotrypsyny z wykorzystaniem metody stopped-flow, gdzie próbki zostały przygotowane zarówno za pomocą procedury podstawowej jak i procedury alternatywnej, która została opisana w rozdziale 3.1. Celem tego eksperymentu, było sprawdzenie, czy istnieje próg stężenia surfaktantu, powyżej którego w roztworze białko-SDS nie ma wolnych cząsteczek białka (czyli nie związanych z SDS). Część naukowców badających interakcje białko-SDS uważa, że w roztworach, w których stężenie SDS jest niewystarczające do wysycenia wszystkich miejsc wiążących w białku (gdzie stężenie białka jest mikromolowe a stężenie SDS milimolowe), nie występuje żadna frakcja wolnego białka^[2], podczas, gdy w inni dopuszczają, że takie frakcje mogą się pojawiać^[69]. Końcowe stężenie białka dla pomiarów FUV jak i NUV wynosiło 20 μ M. W pomiarach wykorzystywano 20 mM bufor fosforanowy o pH 6,4 z 5 mM NaCl. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 7.

Tabela 7. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) do pomiarów kinetycznych z detekcją dichroizmu kołowego (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	40 μ M CHA	bufor
2	40 μ M CHA	80 mM SDS
3	40 μ M CHA – 16 mM SDS	64 mM SDS
4	40 μ M CHA	8 mM SDS
5	40 μ M CHA – 4 mM SDS	76 mM SDS
6	40 μ M CHA – 5 mM SDS	75 mM SDS
7	40 μ M CHA – 6 mM SDS	74 mM SDS
8	40 μ M CHA – 8 mM SDS	72 mM SDS

Jako pierwszy, wykonano eksperyment zatrzymanego przepływu z rejestracją dichroizmu kołowego tylko dla trzech próbek (1, 2 i 3), przy wzbudzeniu 222 nm (FUV) oraz 260 nm (NUV). Rejestrowano przebieg reakcji przez 200s. Końcowa krzywa postępu reakcji, została uzyskana poprzez uśrednienie 5 skanów. Uzyskane krzywe przebiegu reakcji, zostały przedstawione na Rysunku 34, są to krzywe eksperymentalne, skorygowane o bufor.

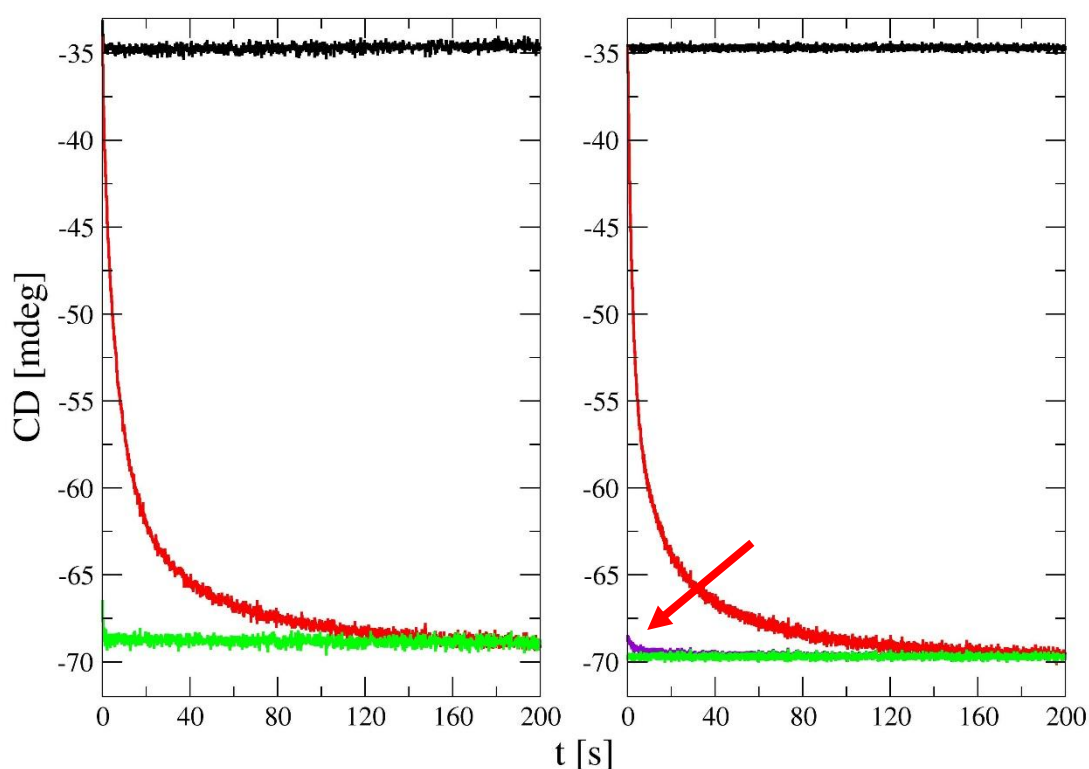


Rysunek 34. Krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny zarejestrowane z detekcją dichroizmu kołowego: 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS – kolor zielony. Lewy panel: wzbudzenie 222 nm, prawy panel: wzbudzenie 260 nm.

To, co można zauważyć jako pierwsze, to że zarówno krzywe uzyskane dla próbek 1 jak i 3, nie wykazują zachowania relaksacyjnego. W przypadku próbki 1 jest to całkowicie normalne, gdyż podczas mieszania białka z buforem dochodzi jedynie do jego rozcieńczenia, i nie ma żadnych czynników, które mogłyby wpływać na strukturę białka. W przypadku próbki 3, nie jest to już takie oczywiste, tym bardziej, że przy porównaniu krzywej próbki 2 do krzywej próbki 3, gdzie końcowe stężenie SDS było takie samo i wynosiło 40 mM, próbka 2 wykazuje silną relaksację i osiąga plateau. Można wnioskować, że stężenie SDS 16 mM wysyca α -chymotrypsynę w stężeniu 40 μ M, gdyż nie obserwuje się relaksacji, ale obserwuje się znaczną zmianę sygnału. Co ciekawe, krzywe te zbiegają się w tym samym miejscu. Te same obserwacje notuje się zarówno dla wzbudzenia 222 nm jak i 260 nm. Gdyby w próbce zawierającej białko i SDS, znajdowały się frakcje wolnego białka jak sugerują niektórzy badacze, obserwowano by relaksację w roztworach SDS (gdy stężenie białka wynosiło 40 μ M)

o stężeniu 64 mM – czego nie obserwuje się, co skłania do wniosku, że autorzy^[67] sugerujący, że nie ma wolnej frakcji białka mają rację.

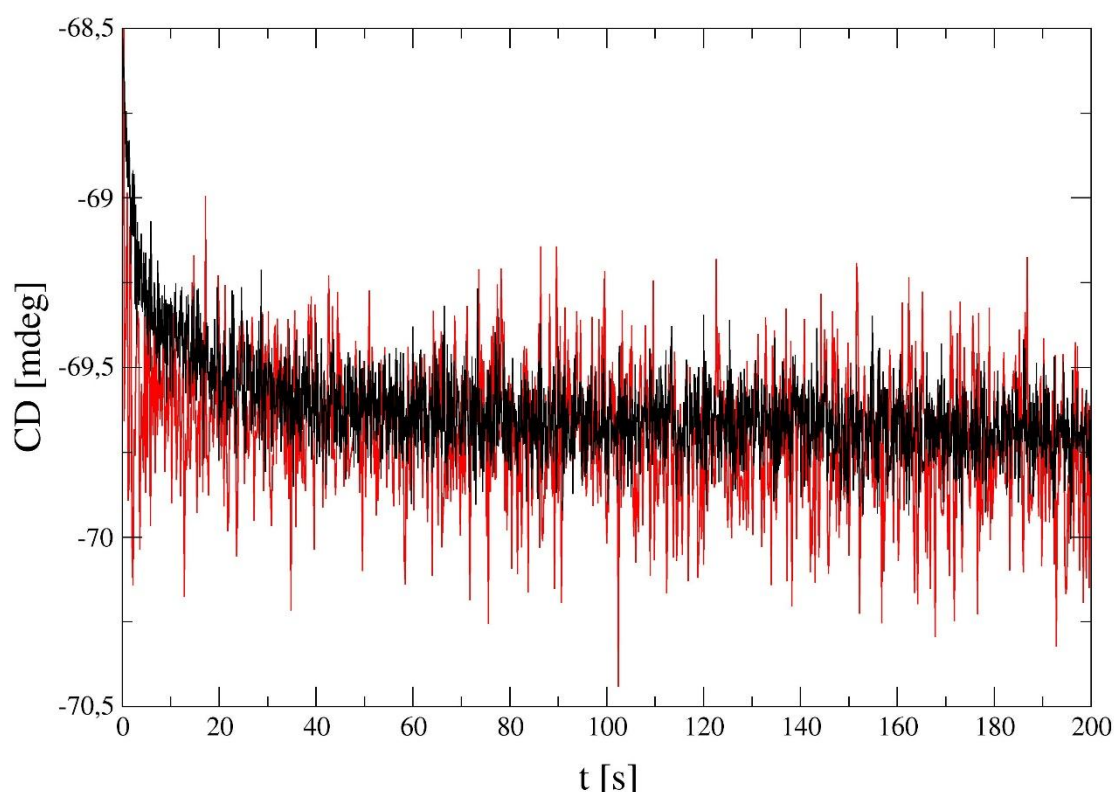
Przeprowadzono symulacje eksperymentu stopped-flow z detekcją CD przy wzbudzeniu 222 nm za pomocą programu DynaFit, z wykorzystaniem próbek 1, 2 oraz 3 w celu uzyskania symulowanych krzywych postępu reakcji. Próbkę 3, została zasymulowana z dwoma założeniami, pierwsze założenie zakładało, że w pierwotnym roztworze nie było wolnego białka (próbka 3a), a drugie założenie zakładało, że 5% roztworu białka, czyli 2 μM to frakcja wolna (próbka 3b). Otrzymane z symulacji krzywe postępu reakcji zostały przedstawione na Rysunku 35.



Rysunek 35. Porównanie krzywych postępu reakcji α -chymotrypsyny zarejestrowanych z detekcją dichroizmu kołowego otrzymanych w wyniku eksperymentu (lewy panel) z krzywymi otrzymanymi w wyniku symulacji programem DynaFit (prawy panel): 40 μM CHA + bufor – kolor czarny, 40 μM CHA + 80 mM SDS – kolor czerwony, 40 μM CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS (bez wolnej frakcji białka) – kolor zielony, 40 μM CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS (z wolną frakcją białka) – kolor fioletowy. Wzbudzenie 222 nm.

Porównując ze sobą wyniki eksperymentalne i otrzymane w wyniku symulacji, widać, że są one prawie takie same, jedyną różnicę jaką widać, to że krzywe próbki bez oraz z wolną

frakcją białka nie pokrywają się w całości, różnią się na początkowym etapie reakcji (Rysunek 35, czerwona strzałka). Rysunek 36 przedstawia krzywe postępu reakcji pochodzące z eksperymentu próbki 3 oraz z symulacji próbki 3b. Widać, że próbka 3b z symulacji nie odpowiada próbce 3 z eksperymentu, obie mają inny przebieg, wskazuje to na fakt, że w roztworze prawdopodobnie nie ma wolnej frakcji białka.

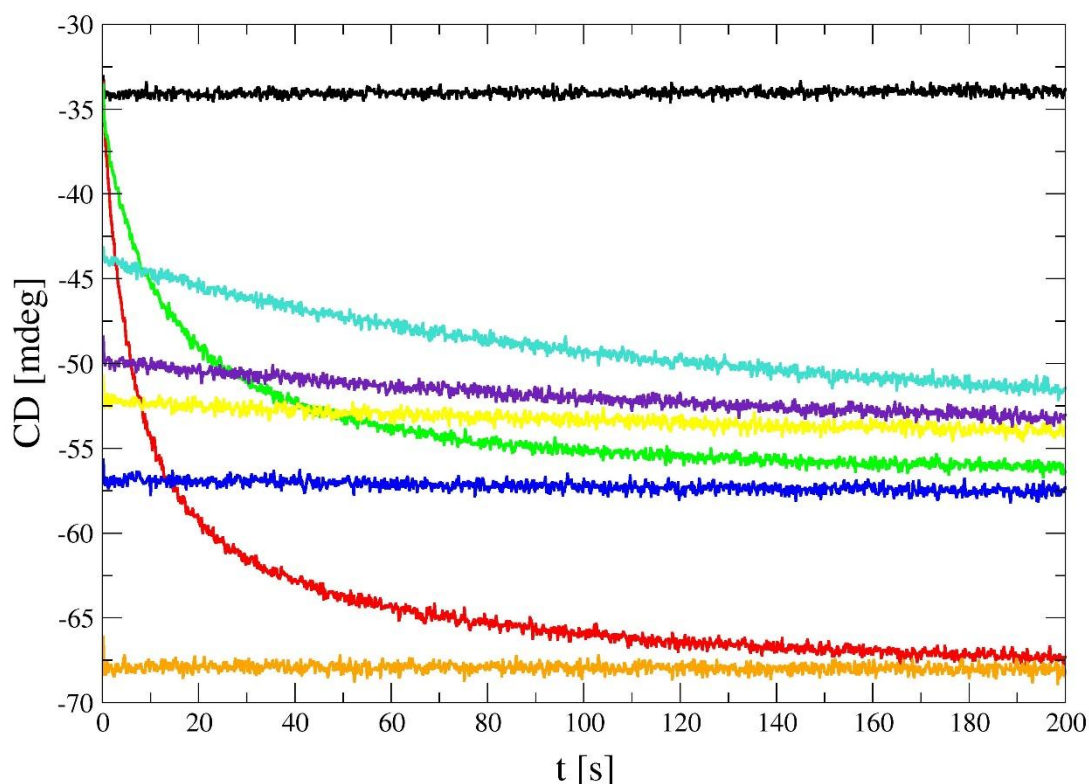


Rysunek 36. Otrzymane w wyniku symulacji programem DynaFit krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny z detekcją dichroizmu kołowego próbki 40 μM CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS – kolor czerwony oraz otrzymane eksperymentalnie, dla próbki 40 μM CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS (wolna frakcja) – kolor czarny. Wzbudzenie 222 nm.

W związku z powyższym można stwierdzić, że potwierdzono wersję badaczy, którzy sugerują, że w mieszaninach, gdzie stężenie białka jest mikromolowe a stężenie SDS milimolowe, nie występują frakcje wolnego białka.

W celu dalszej weryfikacji danych uzyskanych na Rysunku 34, wykonano serię pomiarów kinetycznych α -chymotrypsyny z detekcją dichroizmu kołowego, przy wzbudzeniu 222 nm wszystkich ośmiu próbek (Tabela 7), w celu określenia progowego stężenia SDS, dla którego już nie obserwuje się relaksacji. Na Rysunku 37 przedstawione są krzywe

eksperymentalne, skorygowane o bufor. Z rysunku 34 wynika, że przy mieszaniu roztworu zawierającego 40 μ M α -chymotrypsyny oraz 16 mM SDS z roztworem zawierającym 64 mM SDS relaksacji nie obserwuje się, dlatego stężenie 16 mM było naszym maksymalnym stężeniem progowym.



Rysunek 37. Krzywe postępu reakcji α -chymotrypsyny zarejestrowane z detekcją dichroizmu kołowego: 40 μ M CHA + bufor – kolor czarny, 40 μ M CHA + 80 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M CHA-16 mM SDS + 64 mM SDS – kolor pomarańczowy, 40 μ M CHA-8 mM SDS + 72 mM SDS – kolor niebieski, 40 μ M CHA-4 mM SDS + 76 mM SDS – kolor turkusowy, 40 μ M CHA-5 mM SDS + 75 mM SDS – kolor fioletowy, 40 μ M CHA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor żółty, 40 μ M CHA-8 mM SDS + 72 mM SDS – kolor zielony. Wzbudzenie 222 nm.

Wyniki dla próbek 1, 2 oraz 3 pokrywają się z poprzednimi eksperymentami pokazanymi na Rysunku 34. Krzywe zarejestrowane dla próbek 5, 6 oraz 7 wykazują relaksację, jednak wartości końcowe sygnałów przy 200 s, są znacznie wyższe niż dla próbki 2, mimo, że końcowe stężenie SDS w każdej z tych próbek było takie samo – 40 mM. Próbkę 2 i 3 zbiegają się niemalże do tej samej wartości, podobnie jak próbki 4 i 8, przy czym próbki 2 i 4 (przygotowane zgodnie z procedurą podstawową) wykazują relaksację a próbki 3 i 8 (przygotowane zgodnie z procedurą alternatywną) relaksacji nie wykazują, co wskazuje, że

końcowy stan białka zależy nie tylko od końcowego stężenia SDS, ale również od procedury przygotowania próbki do badań, co potwierdza wcześniejsze wnioski. Krzywe postępu reakcji, dowodzą, że istnieje próg stężenia SDS (w tym przypadku 6 mM), przy którym widać jeszcze relaksację, a co za tym idzie próg, powyżej którego w roztworze białko–SDS, nie występują wolne frakcje białka.

Krzywe postępu reakcji, przedstawione na rysunkach 34 – 37 nie zostały przedstawione w formie krzywych relatywnych, a jedynie jako skorygowane o bufor krzywe eksperymentalne, ponieważ w przypadku tych eksperymentów nie było istotne określenie kinetyki zachodzącej reakcji a analiza jakościowa krzywych.

Podsumowując, zmiany zachodzące w strukturze α -chymotrypsyny pod wpływem SDS charakteryzują się trzema (zgodnie z wynikami CD) lub czterema (zgodnie z wynikami fluorescencji), nieodwracalnymi etapami, a szybkość tych zmian, zależy od stężenia surfaktantu. W literaturze można znaleźć prace na temat odwracalności etapów zmian strukturalnych: (1) Otzen i współpracownicy^[83,84,85] w swoich badaniach definiowali nieodwracalną, jednoetapową zmianę strukturalną kompleksu białko–SDS, jednak w nowszych pracach dotyczących rozwijania białek indukowanego przez SDS, nie definiowali oni tego procesu jako nieodwracalnego; (2) z kolei Bhuyan^[86], który badał działanie SDS na ferrocytochrom c, zauważył minima w zależności obserwowanych stałych szybkości przejść konformacyjnych białka od stężenia SDS, co zinterpretował jako wskazówkę, że przejścia te są odwracalne. Zmiany strukturalne badane z wykorzystaniem zjawiska dichroizmu kołowego zachodzące w strukturze II-rzędowej α -chymotrypsyny znacznie różnią się od zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej, różni się kinetyka tych zmian oraz zachodzą one z innymi stałymi szybkości – co do tej pory nie zostało potwierdzone przez innych autorów, którzy twierdzili, że obie struktury zmieniają się jednocześnie, skale czasowe tych zmian są podobne i zachodzą w jednym nieodwracalnym etapie^[79,80,81]. Kinetyka zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej różni się, w zależności od rejestrowanej wielkości: dichroizmu kołowego czy fluorescencji, co prawdopodobnie wynika z faktu, iż fluorescencja jest metodą znacznie czulszą niż CD i może uwidaczniać procesy, których poprzez detekcję dichroizmu kołowego nie widać. Kinetyka zmian w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny wywoływana SDS, analizowana na podstawie pomiarów fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia, co można tylko jedynie częściowo wytłumaczyć przez zjawisko fotowysielania. Ponadto, istnieje próg stężenia SDS, powyżej którego w roztworze zawierającym białko i SDS, nie ma wolnych frakcji białka. Wszystkie uzyskane wyniki są powtarzalne w niezależnych

eksperymentach, wykonywanych na innych roztworach wyjściowych i zostały opisane w publikacji^[70].

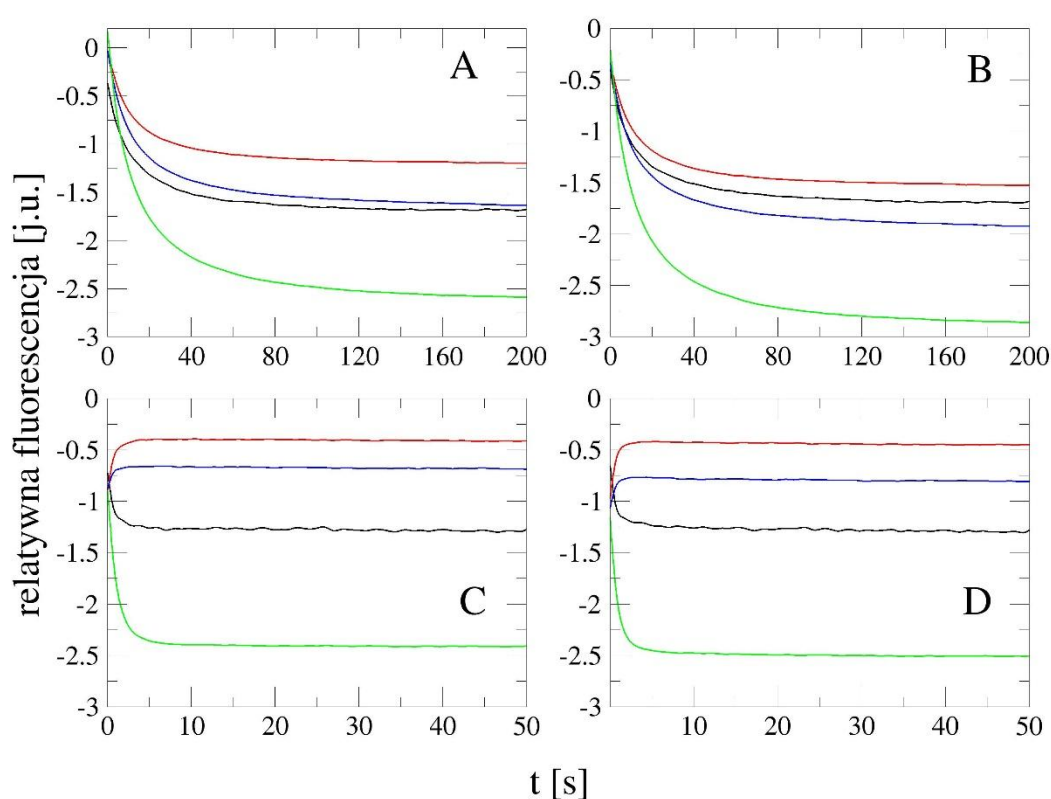
Ze względu na fakt, iż kinetyka zmian w strukturze III-rzędowej α -chymotrypsyny wywoływana przez SDS, analizowana na podstawie pomiarów fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia, wykonano serie eksperymentów, w celu dogłębniejszego zbadania tego zjawiska oraz zanalizowania przyczyn tej zależności. Wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem metody stopped-flow, z wykorzystaniem spektrometru Stopped-flow SX20 z detekcją fluorescencji, gdzie oprócz α -chymotrypsyny badany był również α -chymotrypsynogen. Roztwory wszystkich reagentów zostały rozpuszczone w 10 mM buforze fosforanowym o pH 7. Końcowe stężenie obu białek wynosiło 5 μ M. Schemat przygotowania próbek do eksperymentów, został przedstawiony w Tabeli 8.

Tabela 8. Lista próbek α -chymotrypsyny (CHA) oraz α -chymotrypsynogenu (CHG) do pomiarów kinetycznych z detekcją fluorescencji oraz do pomiarów widm fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	10 μ M CHA	bufor
2	10 μ M CHA	40 mM SDS
3	10 μ M CHA	80 mM SDS
4	10 μ M CHG	Bufor
5	10 μ M CHG	40 mM SDS
6	10 μ M CHG	80 mM SDS

Wykonano pomiar fluorescencji metodą zatrzymanego przepływu próbek 1 – 6. We wszystkich pomiarach był wykorzystywany filtr odcięcia 320 nm (Schott WG 320), a wybrane wcześniej dwie długości fali wzbudzenia oprócz 222 nm i 260 nm zostały uzupełnione o 280 nm oraz 295 nm. Przy pomiarach zatrzymanego przepływu długość drogi optycznej dla wzbudzenia 222 nm wynosiła 2 mm a dla 260, 280 i 295 nm – 10 mm, pomiar rejestrowany był przez 200s a końcowa krzywa postępu reakcji została uzyskana poprzez uśrednienie 5 skanów dla każdej z wybranych do badań długości fali wzbudzenia.

Wyniki w formie relatywnych krzywych postępu reakcji przedstawiono na Rysunku 38. Tym razem, reprezentują one różnicę między sumą krzywych zarejestrowanych dla mieszanin białko–SDS i bufor–bufor a sumą krzywych zarejestrowanych dla mieszanin białko–bufor i SDS–bufor, dlatego też, krzywe te pokazują tylko zmiany zachodzące w białku. Relatywne krzywe postępu reakcji, które uzyskuje się poprzez odjęcie od krzywej białko–SDS krzywej białko – bufor, wyglądają bardzo podobnie, ale zawierają niewielkie wkłady pochodzące od SDS.



Rysunek 38. Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji α -chymotrypsyny: (A) 10 μ M CHA + 40 mM SDS, (B) 10 μ M CHA + 80 mM SDS) oraz α -chymotrypsynogenu: (C) 10 μ M CHG + 40 mM SDS, (D) 10 μ M CHG + 80 mM SDS. Wzbudzenie 222 nm – kolor czarny, 260 nm – kolor czerwony, 280 nm – kolor niebieski, 295 – kolor zielony.

Interpretując uzyskane relatywne krzywe z Rysunku 39, widać, że w przypadku α -chymotrypsyny, niezależnie od długości fali wzbudzenia dla obu stężeń SDS dodanie surfaktantu, powoduje wygaszanie fluorescencji białka w czasie. W przypadku α -chymotrypsynogenu, widać istotną różnicę. A mianowicie dla wzbudzeń 222 nm i 295 nm

obserwuje się wygaszanie fluorescencji w czasie, natomiast w dla 260 nm i 280 nm widać wzrost fluorescencji w czasie.

Wszystkie relatywne krzywe postępu reakcji uzyskane dla α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu zostały przeanalizowane programem DynaFit, poprzez dopasowanie funkcji wieloeksponencjalnych. Wyniki uzyskane z programu, poprzez dyskryminację modeli, nie były tak jednoznaczne jak w przypadku wyników zawartych w rozdziale 3.2. (program nie wskazywał jednoznacznie najlepszego modelu dopasowania). Prawdopodobnie jest to związane z tym, że w tych eksperymentach zastosowaliśmy czterokrotnie niższe stężenie białka, co pogorszyło stosunek sygnału do szumu przy rejestracji krzywych. Najczęściej wybieranym modelem była suma dwóch składników eksponencjalnych oraz składnika liniowego, opisującego wspomniany już wcześniej liniowy spadek sygnału w czasie, prawdopodobnie spowodowany fotowysbieleniem:

$$S(t) = A_0 + A_1 \cdot (1 - \exp(-k_1 t)) + A_2 \cdot (1 - \exp(-k_2 t)) - b \cdot t \quad (19)$$

Dla każdej długości fali wzbudzenia, otrzymano dwa zestawy stałych szybkości oraz względnych amplitud, zgodnie z dopasowaniem modelu z równania 19. Uzyskane stałe szybkości zostały przedstawione w Tabeli 9.

Tabela 9. Stałe szybkości, charakteryzujące zmiany struktury III-rzędowej α -chymotrypsyny (CHA) oraz α -chymotrypsynogenu (CHG) wywołane przez SDS, uzyskane na podstawie pomiarów fluorescencji za pomocą programu DynaFit próbek: 10 μ M CHA + 40 mM SDS, 10 μ M CHA + 80 mM SDS, 10 μ M CHG + 40 mM SDS oraz 10 μ M CHG + 80 mM SDS.

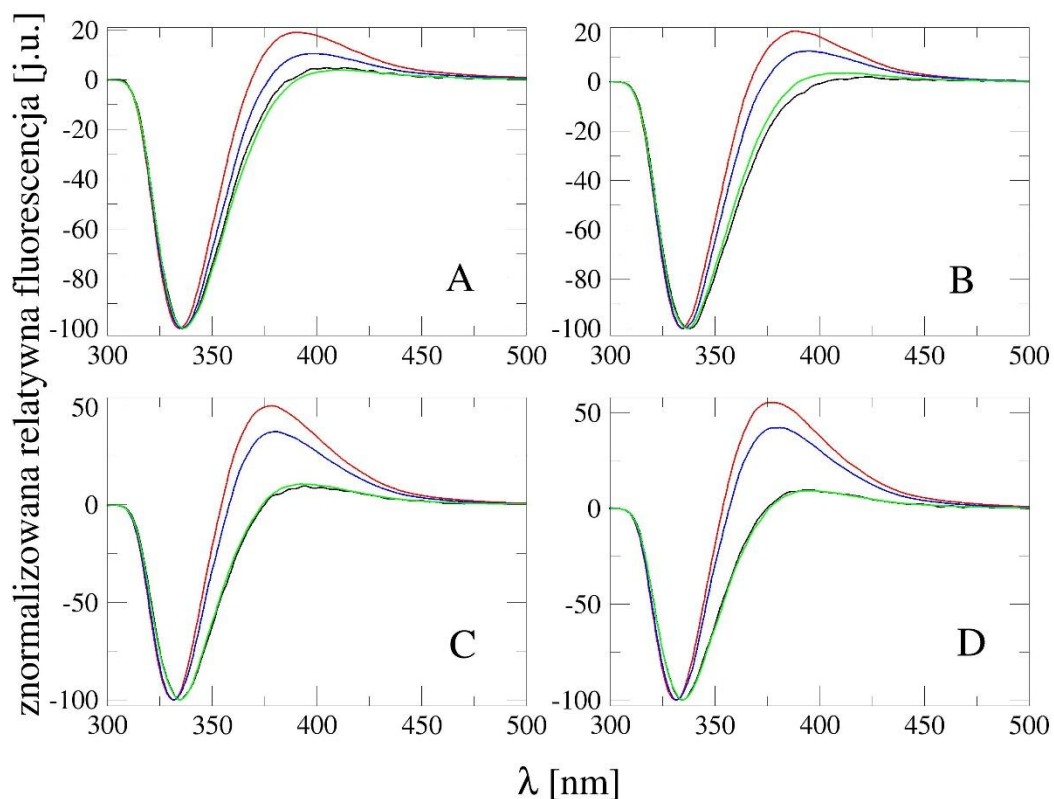
Parametr	Długość fali wzbudzenia [nm]	10 μ M CHA + 40 mM SDS	10 μ M CHA + 80 mM SDS	10 μ M CHG + 40 mM SDS	10 μ M CHG + 80 mM SDS
k1	222	0.158 $\pm$ 0.002	0.157 $\pm$ 0.002	2.04 $\pm$ 0.04	2.16 $\pm$ 0.17
	260	0.151 $\pm$ 0.001	0.141 $\pm$ 0.001	1.59 $\pm$ 0.01	1.81 $\pm$ 0.04
	280	0.146 $\pm$ 0.001	0.147 $\pm$ 0.001	1.63 $\pm$ 0.02	2.15 $\pm$ 0.24
	295	0.147 $\pm$ 0.001	0.100 $\pm$ 0.002	0.181 $\pm$ 0.004	0.979 $\pm$ 0.004
k2	222	0.0325 $\pm$ 0.0004	0.0365 $\pm$ 0.0005	0.322 $\pm$ 0.017	0.716 $\pm$ 0.064

	260	0.0399 ± 0.0002	0.0357 ± 0.0003	0.0236 ± 0.0019	0.562 ± 0.025
	280	0.0359 ± 0.0002	0.0372 ± 0.0002	0.171 ± 0.015	0.956 ± 0.217
	295	0.0347 ± 0.0001	0.0242 ± 0.0013	0.141 ± 0.007	0.262 ± 0.009

Przedstawione wyniki pokazują, że kinetyka zmian struktur III-rzędowych obserwowanych poprzez fluorescencję α -chymotrypsyny i α -chymotrypsynogenu zależy od długości fali wzbudzenia. Stałe szybkości α -chymotrypsynogenu przy wzbudzeniu 222 nm różnią się od tych przy wzbudzeniu 295 nm, i to samo dotyczy wzbudzeń 260 nm i 280 nm.

W związku z uzyskanymi wynikami, została postawiona hipoteza o wkładzie poszczególnych tryptofanów w całkowitą emitowaną fluorescencję – wkład fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia. Interpretując literaturę, można odnaleźć pracę^[71], w której opisano zmianę wyglądu widma fluorescencji lizozymu, w zależności od użytego w eksperymencie buforu – narastanie bądź wygaszanie fluorescencji. Może to sugerować, że postawiona hipoteza jest prawdziwa, i w przypadku przytoczonej ptacy, wkład może zależeć od rodzaju rozpuszczalnika. W tym celu wykonano serię pomiarów widm fluorescencji z wykorzystaniem spektrofluorymetr Cary Eclipse firmy Agilent Technologies, próbek 1 – 6 (Tabela 8). Roztwory wszystkich reagentów zostały rozpuszczone w 10 mM buforze fosforanowym o pH 7. Końcowe stężenie obu białek wynosiło 5 μ M. Wykorzystywano kuwetę fluorescencyjną o długości drogi optycznej 10 mm, filtr odcinający 320 nm (Schott WG 320), te same cztery długości fali wzbudzenia, które wykorzystywane były przy pomiarach kinetycznych: 222, 260, 280 oraz 295 nm a widma rejestrowano z szybkością 30 nm/min.

Widma fluorescencji dla próbek 1 – 6 przedstawiono na Rysunku 39, w formie relatywnych widm znormalizowanych. Uzyskano je poprzez odjęcie od krzywej białko-SDS krzywej białko – bufor a następnie znormalizowano do –100 jednostek w maksimum. Widma przygotowano według metody opisanej w literaturze^[71].



Rysunek 39. Znnormalizowane relatywne widma fluorescencji α -chymotrypsyny: (A) 10 μ M CHA + 40 mM SDS, (B) 10 μ M CHA + 80 mM SDS) oraz α -chymotrypsynogenu: (C) 10 μ M CHG + 40 mM SDS, (D) 10 μ M CHG + 80 mM SDS. Wzbudzenie 222 nm – kolor czarny, 260 nm – kolor czerwony, 280 nm – kolor niebieski, 295 – kolor zielony.

Widma przedstawione na Rysunku 39, to widma w stanie równowagi osiągniętej przez układ. Pole powierzchni pod znormalizowanym relatywnym widmem fluorescencji, dostarcza informacji na temat całkowitej zmiany sygnału mierzonego w spektrometrze w porównaniu z wartością początkową. Jeśli co do pola powierzchni, dominuje obszar pod dodatnim ramieniem widma (powyżej wartości 0), to mierząc krzywa postępu reakcji zaobserwuje się wzrost fluorescencji w czasie, a jeżeli dominuje obszar nad ujemnym ramieniem widma (poniżej wartości 0), to w krzywej postępu reakcji nastąpi spadek fluorescencji. Dla α -chymotrypsyny, wielkość dodatniego ramienia jest największa przy wzbudzeniu 260 nm i nieco mniejsza przy 280 nm, najmniejsza dla wzbudzeń 222 nm i 295 nm jednak dla wszystkich wzbudzeń dominuje ramię ujemne. W związku z tym, w eksperymencie stopped-flow, powinien być widoczny spadek fluorescencji dla wszystkich czterech wzbudzeń – i tak też jest.

W przypadku jak α -chymotrypsynogenu, mimo, że ramię dodatnie nie jest większe niż ramię ujemne, to dla wzbudzeń 260 nm i 280 nm jest ono znacznie większe niż dla 222 nm i 295 nm. Ta różnica jest wystarczająca, że dla wzbudzeń 260 nm i 280 nm w pomiarach kinetycznych obserwuje się wzrost a dla wzbudzeń 222 nm i 295 nm spadek sygnału fluorescencji w czasie. Różnica w przypadku wzbudzeń 260 nm i 280 nm jest też znacząca, szczególnie w porównaniu z α -chymotrypsyną.

Podsumowując, wnioskuje się, że wkład fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia, i nie dlatego że sama fluorescencja tryptofanów zależy od tej energii, lecz dlatego, że ścieżki bezpromienistej utraty energii przez tryptofany, podczas przejść do najniższego wzbudzonego stanu singletowego (S1), z którego możliwa jest emisja promieniowania na sposób fluorescencji, zachodzą z różnym prawdopodobieństwem. Wszystkie uzyskane wyniki są powtarzalne w niezależnych eksperymentach, wykonywanych na innych roztworach wyjściowych i zostały opisane w publikacji^[72]. Należy tu podkreślić, że nie ma to nic wspólnego ze zjawiskiem REES (ang. red edge excitation shift, zjawiskiem fluorescencyjnym, polegającym na przesunięciu maksimum emisji w stronę dłuższych fal, podczas wzbudzania dłuższymi falami promieniowania elektromagnetycznego^[73,82]) a jest to zupełnie nowe zjawisko. Ponadto, wiadomo, że istnieją metody pozwalające na określenie, które reszty tryptofanu są odpowiedzialne za wzrost fluorescencji, a które za jej spadek, poprzez mutację wybranych reszt tryptofanu na inne aminokwasy^[74], co można wykorzystać w dalszych badaniach układów białko-SDS.

3.2. Wybrane układy białko-SDS

3.2.1. Wpływ dodecylosiarczanu sodu na strukturę lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy

Wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus, których celem było sprawdzenie wpływu dodecylosiarczanu sodu na strukturę II- i III-rzędową trzech wybranych białek: albuminy, lizozymu oraz α -laktoalbuminy. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Rejestrowane były widma dichroizmu kołowego oraz absorpcji. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów. Wszystkie widma zarówno dichroizmu kołowego jak i absorpcji zostały skorygowane o widmo buforu.

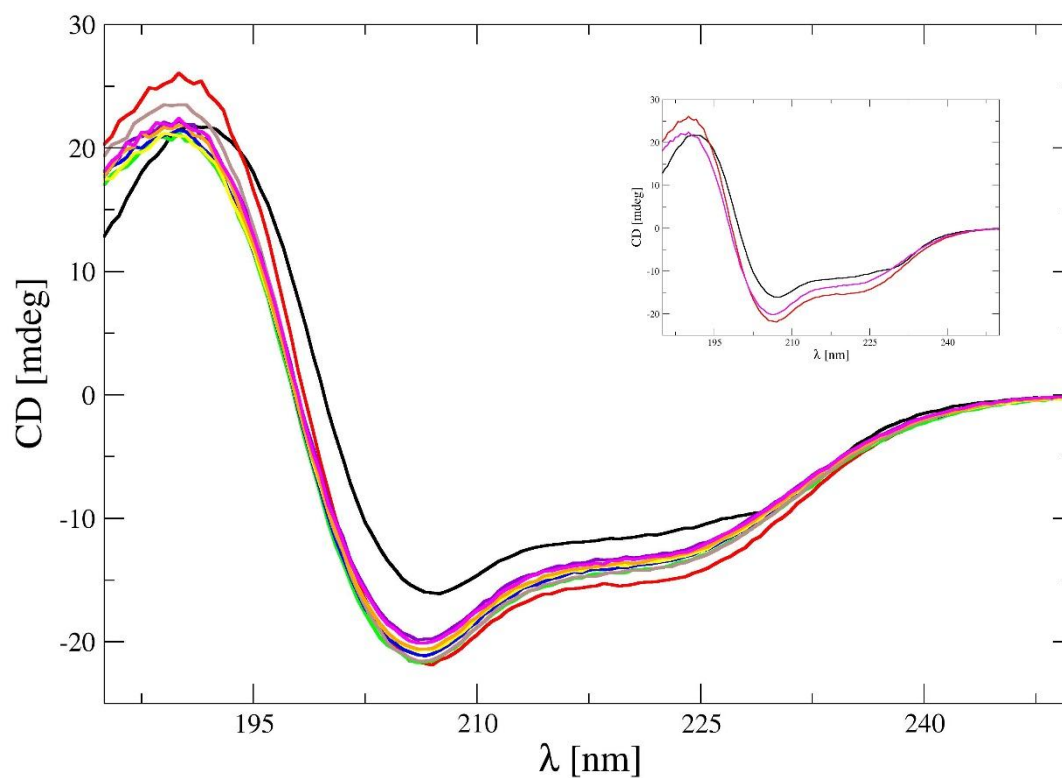
3.2.1.1. Struktura II-rzędowa

Widma w dalekim ultrafiolecie rejestrowane były w zakresie 185 nm – 250 nm (analizowane 190 nm – 250 nm) dla α -laktoalbuminy i lizozymu oraz 195 nm – 250 nm (analizowane 200 nm – 250 nm) dla albuminy z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm. Końcowe stężenie wszystkich białek wynosiło 10 μ M. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 10.

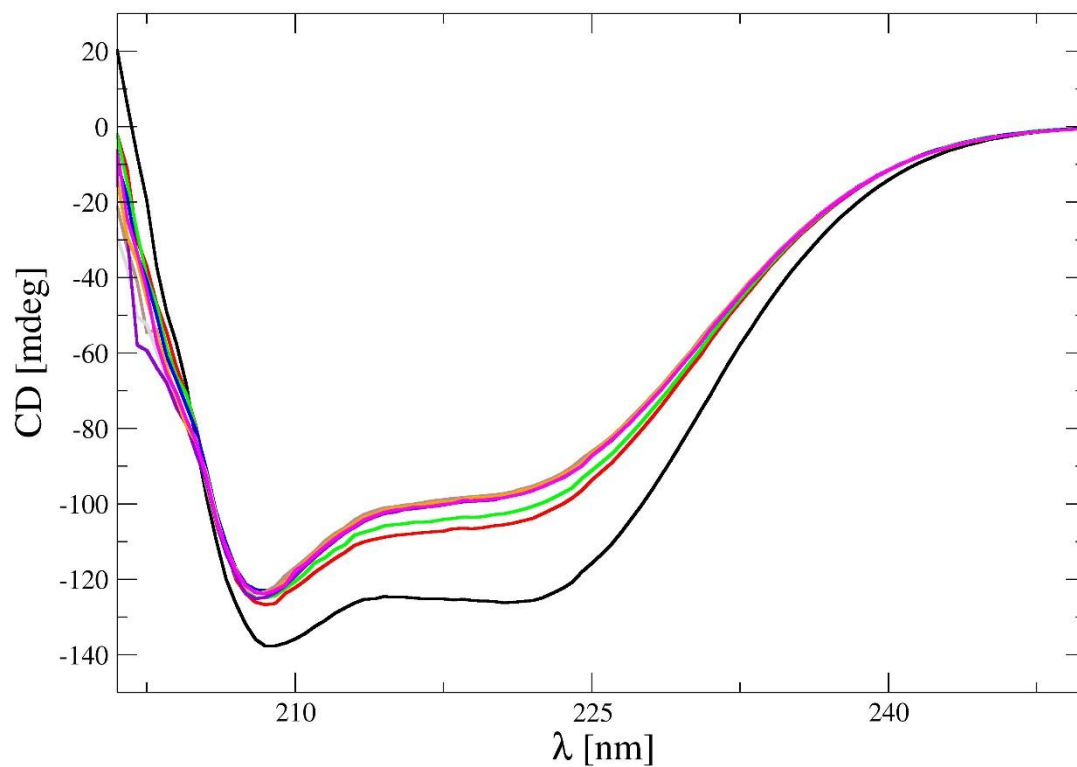
Tabela 10. Lista α -laktoalbuminy (LALBA) i lizozymu (HEWL) oraz albuminy (BSA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego przygotowanych zgodnie z procedurą podstawową (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M białka	bufor
2	20 μ M białka	4 mM SDS
3	20 μ M białka	8 mM SDS
4	20 μ M białka	12 mM SDS
5	20 μ M białka	16 mM SDS
6	20 μ M białka	20 mM SDS
7	20 μ M białka	40 mM SDS
8	20 μ M białka	60 mM SDS
9	20 μ M białka	80 mM SDS
10	20 μ M białka	100 mM SDS

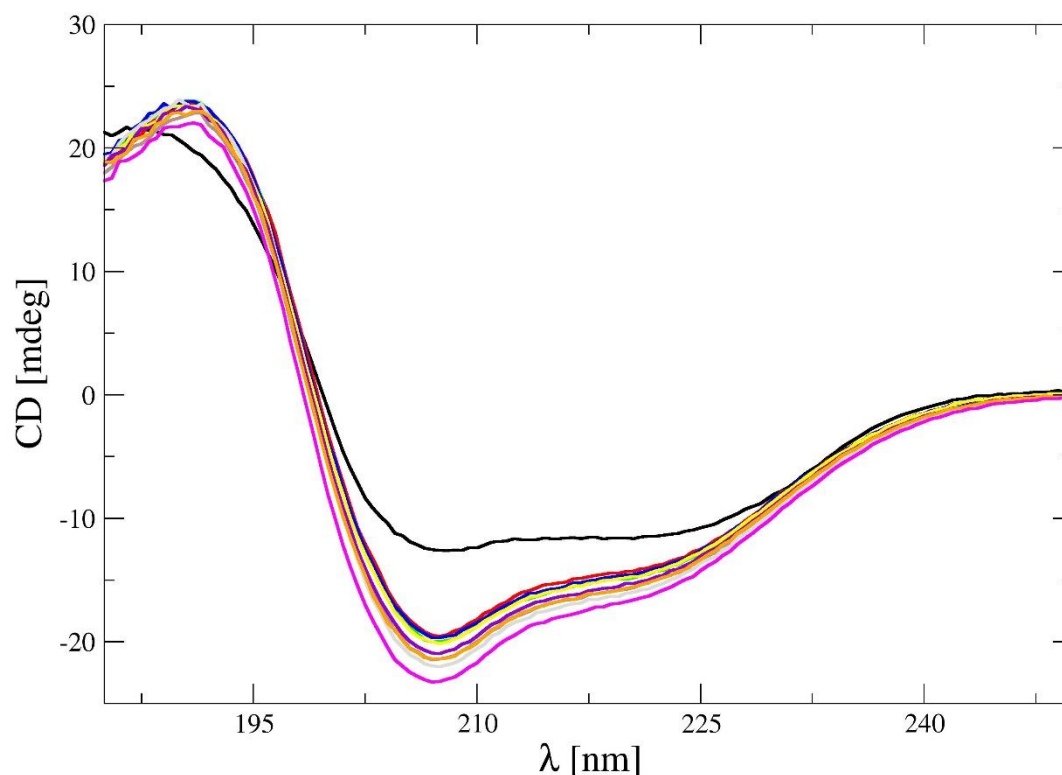
Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu dla lizozymu przedstawiono na Rysunku 40, dla albuminy na Rysunku 41 a dla α -laktoalbuminy przedstawiono na Rysunku 42.



Rysunek 40. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μM HEWL + bufor – kolor czarny, 20 μM HEWL + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM HEWL + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM HEWL + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM HEWL + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μM HEWL + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM HEWL + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μM HEWL + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM HEWL + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM HEWL + 100 mM SDS – kolor różowy.



Rysunek 41. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μ M BSA + bufor – kolor czarny, 20 μ M BSA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M BSA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M BSA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M BSA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M BSA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M BSA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M BSA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M BSA + 100 mM SDS – kolor różowy.



Rysunek 42. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 20 μ M LALBA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M LALBA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M LALBA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M LALBA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M LALBA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M LALBA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M LALBA + 100 mM SDS – kolor różowy.

Interpretując widma wszystkich trzech białek, można stwierdzić, że SDS powoduje zmiany w widmie dichroizmu kołowego w FUV a to oznacza, że wpływa na strukturę II-rzędową białek. Zmiany te są obecne już w stężeniach milimolowych SDS (2 mM) – zarówno powyżej jak i poniżej CMC, co sugeruje, że białka wiążą zarówno pojedyncze cząsteczki SDS, jak i micelle.

Widma z Rysunków 40 – 42, zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej w powyższych białkach. Wyniki znajdują się w Tabeli 11 dla lizozymu, w Tabeli 12 dla albuminy oraz w Tabeli 13 dla α -laktoalbuminy. Przykładowe wyniki uzyskane w programie w formie graficznej, zostały umieszczone w rozdziale 6 na Rysunkach D2 – D4.

Tabela 11. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej lizozymu (HEWL), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M HEWL + bufor, 20 μ M HEWL + 4 mM SDS, 20 μ M HEWL + 8 mM SDS, 20 μ M HEWL + 12 mM SDS, 20 μ M HEWL + 16 mM SDS, 20 μ M HEWL + 20 mM SDS, 20 μ M HEWL + 40 mM SDS, 20 μ M HEWL + 60 mM SDS, 20 μ M HEWL + 80 mM SDS oraz 20 μ M HEWL + 100 mM SDS.

Próbka	Element struktury II-rzędowej			
	α -helisa	β -kartka	pętla	f.n.*
20 μ M HEWL + bufor	26,7	10,3	14,6	48,3
20 μ M HEWL + 4 mM SDS	32,7	9,5	13,9	44,0
20 μ M HEWL + 8 mM SDS	29,0	11,9	14,4	44,9
20 μ M HEWL + 12 mM SDS	29,1	11,8	14,0	45,1
20 μ M HEWL + 16 mM SDS	28,8	11,7	14,2	45,3
20 μ M HEWL + 20 mM SDS	29,7	11,6	13,9	44,8
20 μ M HEWL + 40 mM SDS	21,1	21,2	14,1	43,6
20 μ M HEWL + 60 mM SDS	26,8	14,5	14,2	44,6
20 μ M HEWL + 80 mM SDS	27,8	13,2	13,9	45,1
20 μ M HEWL + 100 mM SDS	27,6	14,5	14,3	44,7

*fragmenty nieustrukturyzowane

Tabela 12. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej albuminy (BSA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M BSA + bufor, 20 μ M BSA + 4 mM SDS, 20 μ M BSA + 8 mM SDS, 20 μ M BSA + 12 mM SDS, 20 μ M BSA + 16 mM SDS, 20 μ M BSA + 20 mM SDS, 20 μ M BSA + 40 mM SDS, 20 μ M BSA + 60 mM SDS, 20 μ M BSA + 80 mM SDS oraz 20 μ M BSA + 100 mM SDS.

Próbka	Element struktury II-rzędowej			
	α -helisa	β -kartka	pętla	f.n.*
20 μ M BSA + bufor	59,3	0	6,6	34
20 μ M BSA + 4 mM SDS	46,1	0,5	6,1	47,3
20 μ M BSA + 8 mM SDS	49,4	7,3	9,0	34,4
20 μ M BSA + 12 mM SDS	44,8	6,5	8,6	40,1
20 μ M BSA + 16 mM SDS	45,9	0	4,7	49,4
20 μ M BSA + 20 mM SDS	43,7	9,1	9,7	37,5
20 μ M BSA + 40 mM SDS	33,0	52,5	14,1	0
20 μ M BSA + 60 mM SDS	41,1	0	5,7	53,1
20 μ M BSA + 80 mM SDS	48,5	9,9	10,4	31,2
20 μ M BSA + 100 mM SDS	50,7	2,6	4,4	42,3

*fragmenty nieustrukturyzowane

Tabela 13. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -laktoalbuminy (LALBA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M LALBA + bufor, 20 μ M LALBA + 4 mM SDS, 20 μ M LALBA + 8 mM SDS, 20 μ M LALBA + 12 mM SDS, 20 μ M LALBA + 16 mM SDS, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS, 20 μ M LALBA + 40 mM SDS, 20 μ M LALBA + 60 mM SDS, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS oraz 20 μ M LALBA + 100 mM SDS.

Próbka	Element struktury II-rzędowej			
	α -helisa	β -kartka	pętla	f.n.*
20 μ M LALBA + bufor	21,3	22,8	13,3	42,6
20 μ M LALBA + 4 mM SDS	32,9	12,2	13,5	41,4
20 μ M LALBA + 8 mM SDS	32,8	12,6	13,5	41,2
20 μ M LALBA + 12 mM SDS	32,7	13,3	13,5	40,6
20 μ M LALBA + 16 mM SDS	32,6	12,9	13,4	41,1
20 μ M LALBA + 20 mM SDS	34,7	9,7	12,8	42,8
20 μ M LALBA + 40 mM SDS	35,5	8,9	12,5	43,1
20 μ M LALBA + 60 mM SDS	33,3	11,2	13,0	42,7
20 μ M LALBA + 80 mM SDS	34,6	9,7	12,8	42,8
20 μ M LALBA + 100 mM SDS	35,2	10,5	12,0	42,3

*fragmenty nieustrukturyzowane

W przypadku lizozymu (Rysunek 40) największą zmianę w widmie widać dla najniższego stężenia surfaktantu tj. 2 mM – poniżej CMC, gdzie występują tylko pojedyncze cząsteczki surfaktantu. Widoczna dla pozostałych widm tendencja – im wyższe stężenie SDS, tym sygnał CD jest niższy, może sugerować, że lizozym wiąże zarówno pojedyncze cząsteczki jak i micelle. Istotną różnicę pomiędzy widmem z najwyższym stężeniem a najniższym stężeniem SDS, widać na wstawce na Rysunku 40. Wyróżniające się odstępstwo od pozostałych próbek, dla próbki zawierającej SDS w stężeniu 10 mM (w okolicy CMC), sugeruje, że

pojedyncze cząsteczki odgrywają istotną rolę w interakcjach białko–SDS. Dane uzyskane z dekonwolucji widma za pomocą programu BestSel, umieszczone w Tabeli 11, potwierdzają obserwacje. Największą zmianę widać między próbką bez SDS a próbką z 2 mM – wzrost frakcji α -helis i spadek populacji β -kardtek, natomiast powyżej stężenia 4 mM tendencja jest odwrotna. Ponadto, w obecności nasycającej ilości SDS, lizozym przyjmuje strukturę, w której widać wzrost frakcji α -helis oraz β -kardtek, w porównaniu do struktury natywnej.

Dla albuminy (Rysunek 41) obserwacje są nieco inne. Największą zmianę w widmie widać przy najwyższym stężeniu SDS, tj. 40 mM. Widmo to różni się znacząco tylko od widm uzyskanych dla stężeń 2 mM oraz 4 mM, natomiast różnice pomiędzy pozostałymi widmami są bardzo niewielkie. Sugeruje to, że wzrost stężenia SDS powoduje coraz większe zmiany w strukturze II-rzędowej białka, jednak od stężenia SDS 6 mM, zmiany te stopniowo maleją i ulegają wysyceniu. Potwierdzają to również wartości procentowej zawartości frakcji α -helis (Tabela 12). Poniżej 200 nm widać, że widma nieznacznie się rozbiegają. Prawdopodobnie wynika to z dużej absorbancji albuminy w tej okolicy (znacznie powyżej wartości 2). Do podobnych wniosków można dojść interpretując wyniki umieszczone w Tabeli 12. Maksimum sygnału CD od β -kardki przypada na ~195 nm, czyli tam gdzie są największe zaburzenia sygnału, co doskonale widać w wynikach dekonwolucji – zawartość procentowa populacji β -kardtek zmienia się w nieregularny sposób. Ponadto RMSD (parametr służący do oceny fitowania do danych eksperymentalnych) sięgał nawet 2, co świadczy o niskiej jakości fitu. Przykładowy wynik uzyskany przy użyciu programu BeStSel z wysokim RMSD, został umieszczony w rozdziale 6 na Rysunku D5. Natomiast, mimo niedoskonałego dofitowania, można stwierdzić, że w obecności nasycającej ilości SDS, albumina przyjmuje strukturę, która posiada β -kardki. Tymczasem struktura natywna białka, nie zawiera żadnych β -kardkowych struktur^[37].

W przypadku α -laktoalbuminy (Rysunek 42), podobnie jak dla albuminy, największą zmianę w widmie widać dla najwyższego stężenia SDS, tj. 40 mM, wszystkie pozostałe widma nie pokrywają się – im wyższe stężenie SDS, tym sygnał jest niższy. Sugeruje to, że wraz ze wzrostem stężenia SDS następują stopniowe zmiany w strukturze II-rzędowej białka. Do podobnych wniosków można dojść interpretując wyniki umieszczone w Tabeli 13. Wraz ze wzrostem stężenia SDS rośnie zawartość frakcji α -helis oraz spada frakcji β -kardtek. Podobnie jak w przypadku lizozymu, w obecności nasycającego stężenia SDS, α -laktoalbumina przyjmuje strukturę, w której widać wzrost frakcji α -helis oraz β -kardtek, w porównaniu do struktury natywnej.

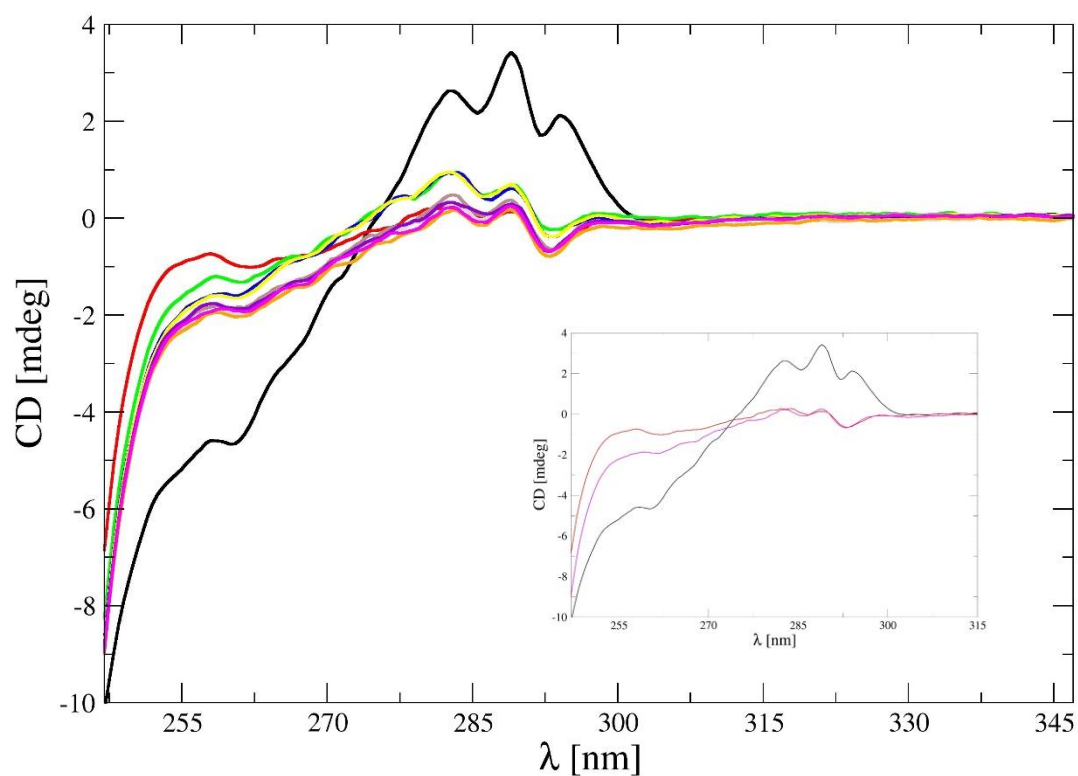
3.2.1.2. Struktura III-rzędowa

Widma w bliskim ultrafiolecie rejestrowane były w zakresie 247–347 nm dla wszystkich białek, z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Końcowe stężenie wszystkich białek wynosiło 10 μ M. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 14.

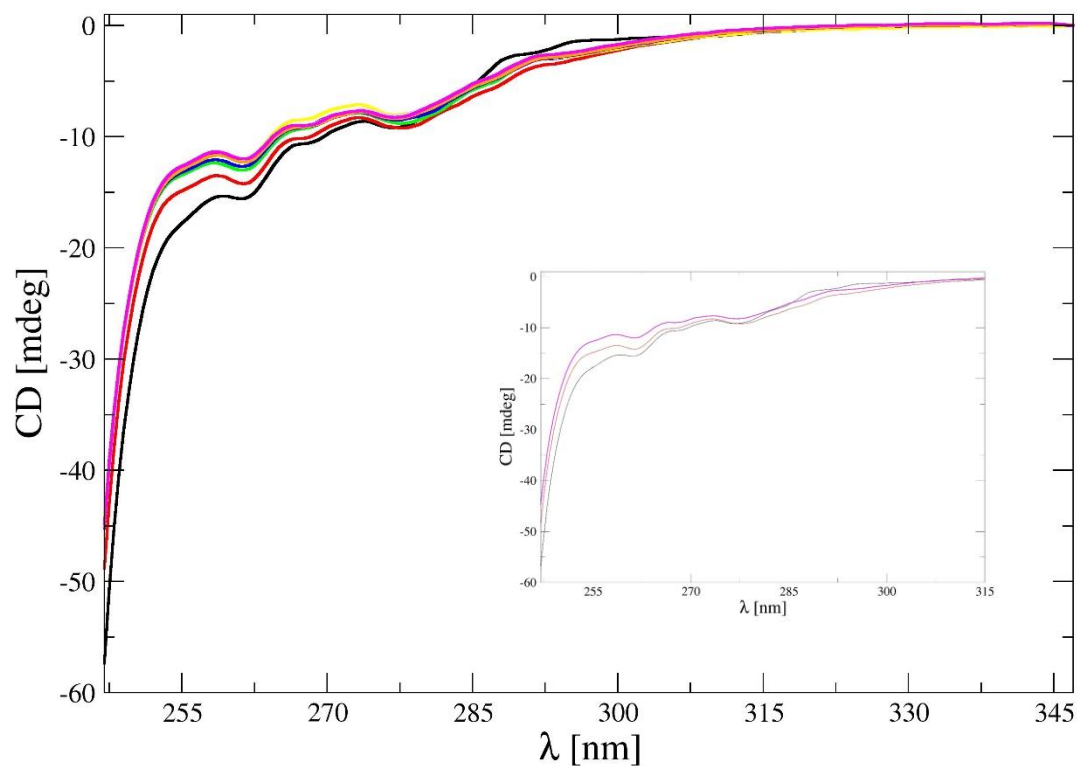
Tabela 14. Lista próbek lizozymu (HEWL), albuminy (BSA) i α -laktoalbuminy (LALBA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego i absorpcji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	40 μ M białka	bufor
2	40 μ M białka	4 mM SDS
3	40 μ M białka	8 mM SDS
4	40 μ M białka	12 mM SDS
5	40 μ M białka	16 mM SDS
6	40 μ M białka	20 mM SDS
7	40 μ M białka	40 mM SDS
8	40 μ M białka	60 mM SDS
9	40 μ M białka	80 mM SDS
10	40 μ M białka	100 mM SDS

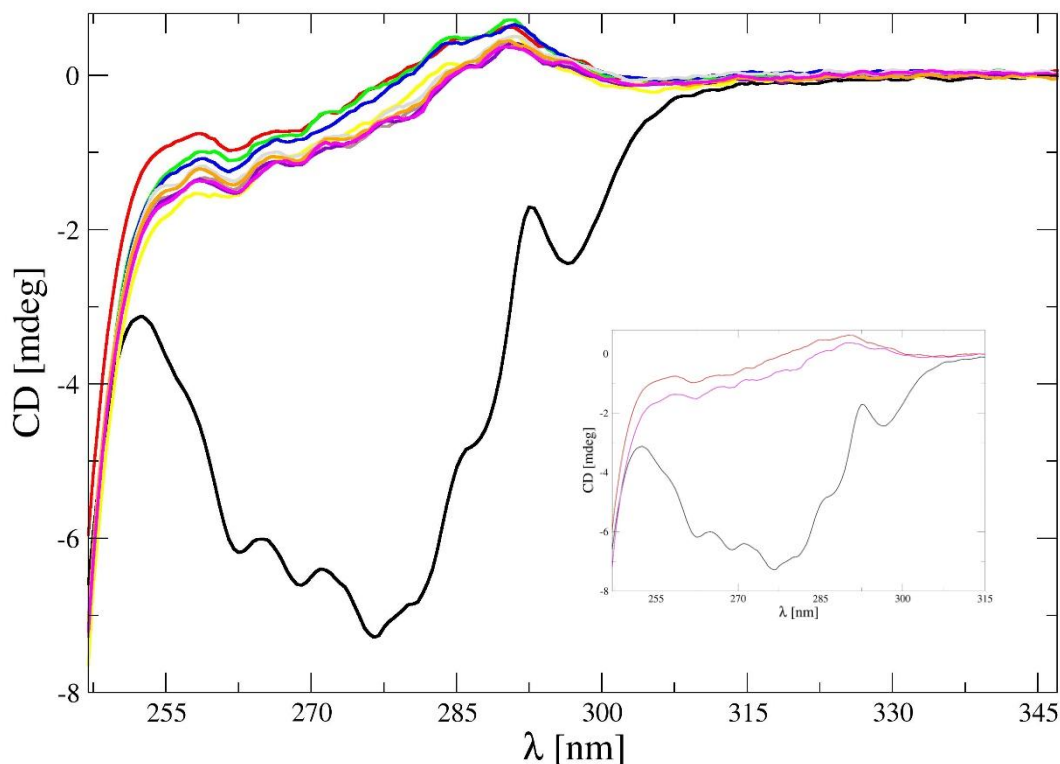
Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu dla lizozymu przedstawiono na Rysunku 43, albuminy na Rysunku 44 a dla α -laktoalbuminy na Rysunku 45.



Rysunek 43. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μM HEWL + bufor – kolor czarny, 20 μM HEWL + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM HEWL + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM HEWL + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM HEWL + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μM HEWL + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM HEWL + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μM HEWL + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM HEWL + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM HEWL + 100 mM SDS – kolor różowy.



Rysunek 44. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μM BSA + bufor – kolor czarny, 20 μM BSA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM BSA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM BSA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μM BSA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM BSA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μM BSA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM BSA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM BSA + 100 mM SDS – kolor różowy.

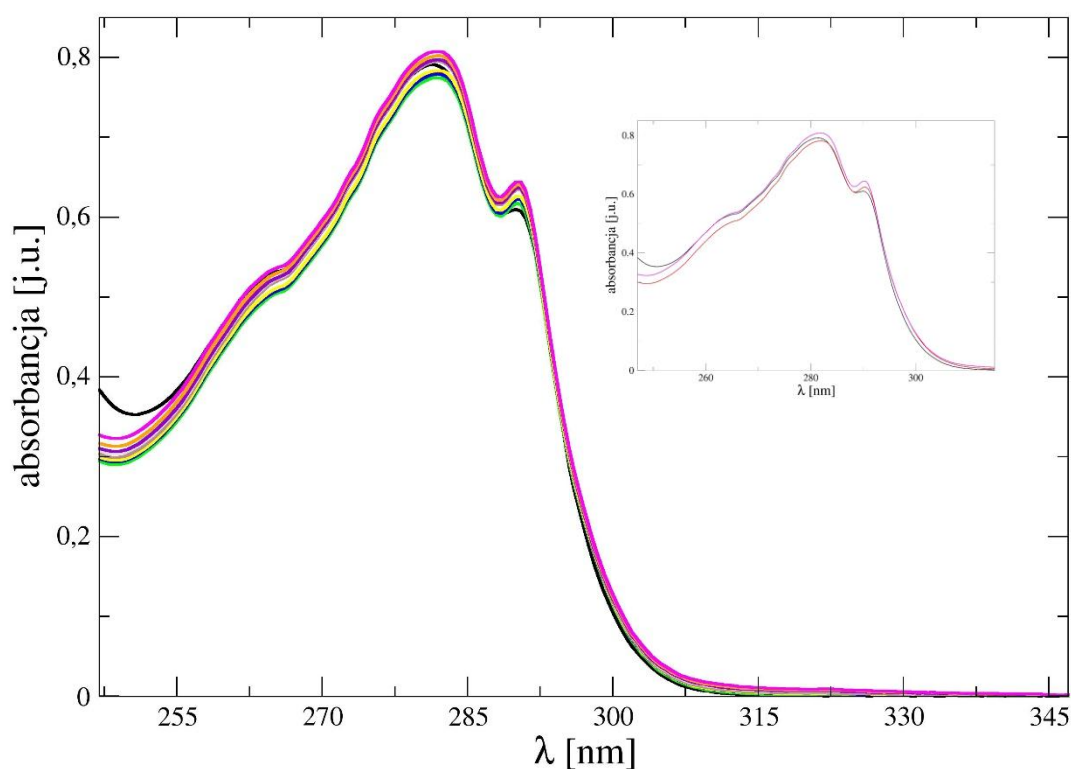


Rysunek 45. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 20 μ M LALBA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M LALBA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M LALBA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M LALBA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M LALBA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M LALBA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M LALBA + 100 mM SDS – kolor różowy.

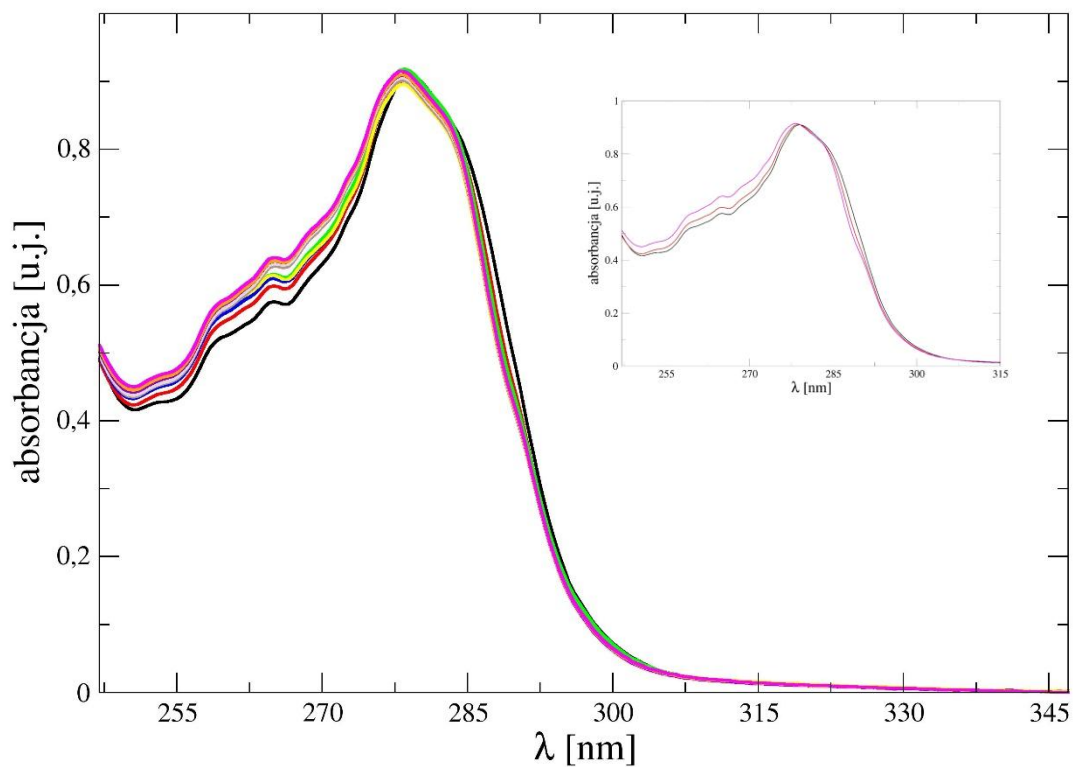
Interpretując widma dichroizmu kołowego lizozymu (Rysunek 43), albuminy (Rysunek 44) oraz α -laktoalbuminy (Rysunek 45) widać, że w przypadku wszystkich 3 białek, SDS wpływa na ich strukturę III-rzędową. Obszar widm można podzielić na dwie części – powyżej i poniżej 300 nm. Powyżej 300 nm, gdzie białka nie absorbują wszystkie widma pokrywają się. Poniżej 300 nm, można wyróżnić rejony, gdzie wpływ na widmo mają poszczególne aminokwasy aromatyczne. Dla wszystkich białek widać, że w zmianie w strukturze III-rzędowej zachodzi w sąsiedztwie wszystkich trzech reszt aminokwasów aromatycznych. Dla lizozymu największą zmianę w wyglądzie widma widać dla stężeń SDS 2, 4, 6 oraz 8 mM, czyli poniżej CMC SDS. W przypadku każdego z tych stężeń widmo wygląda nico inaczej, natomiast powyżej CMC, kształt widm dla wszystkich stężeń SDS, jest podobny. Dla albuminy, we wszystkich stężeniach SDS, niezależnie czy poniżej czy powyżej CMC widma niemalże pokrywają się. Jedynym odstępstwem jest próbka zawierająca SDS w stężeniu 2 mM. Można

tutaj dojść do podobnych wniosków jak w przypadku widm FUV – zmiany strukturalne wywoływane przez SDS w albuminie, w bardzo niewielkim stopniu zależą od jego stężenia w zakresie 4 mM – 40 mM. Największą zmianę, obserwuje się dla najwyższego stężenia SDS. Dla α -laktoalbuminy, w przeciwieństwie do widm w zakresie FUV największa zmianę w widmie, widać dla najniższego stężenia SDS. Wynika stąd, że zmiany strukturalne wywołane stężeniami SDS poniżej CMC wywołują większą zmianę w widmach niż powyżej CMC. Może to oznaczać, że pojedyncze cząsteczki surfaktantu odgrywają istotną rolę w zmianach struktury III-rzędowej.

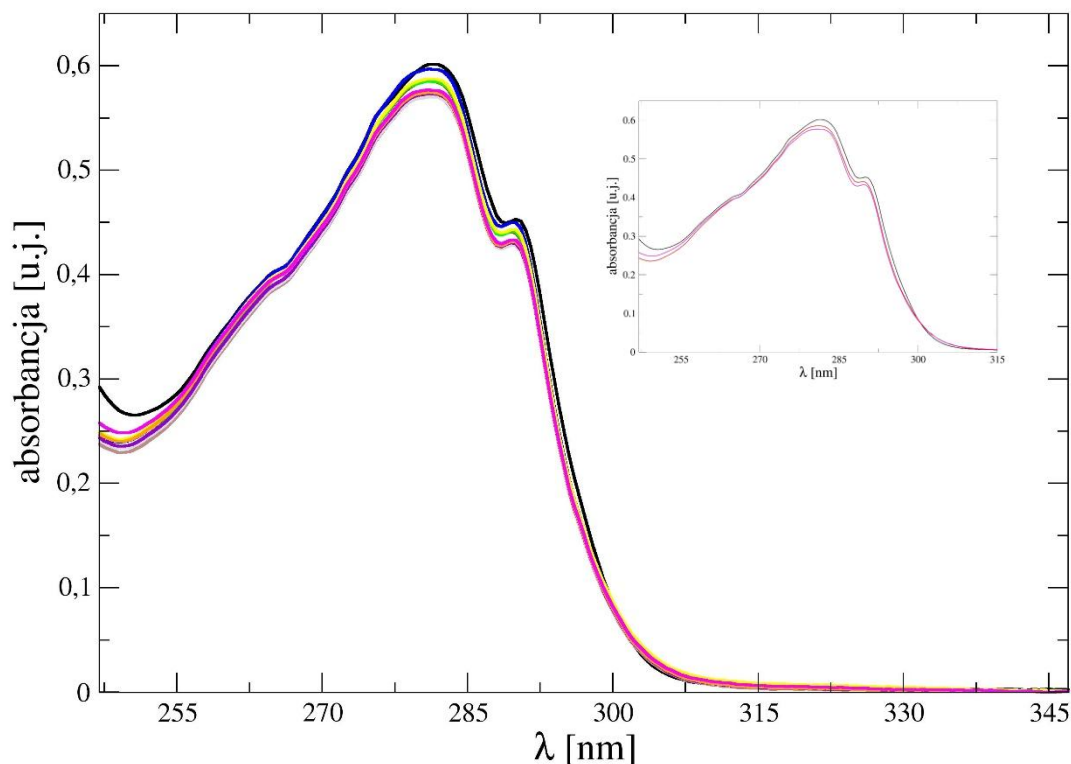
Widma absorpcji z zakresu bliskiego ultrafioletu dla lizozymu przedstawiono na Rysunku 46, albuminy na Rysunku 47 a dla α -laktoalbuminy na Rysunku 48.



Rysunek 46. Widma absorpcji lizozymu w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μ M HEWL + bufor – kolor czarny, 20 μ M HEWL + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M HEWL + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M HEWL + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M HEWL + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M HEWL + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M HEWL + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M HEWL + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M HEWL + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M HEWL + 100 mM SDS – kolor różowy.



Rysunek 47. Widma absorpcji albuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μM BSA + bufor – kolor czarny, (20 μM BSA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM BSA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM BSA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μM BSA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM BSA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μM BSA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM BSA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM BSA + 100 mM SDS – kolor różowy.



Rysunek 48. Widma absorpcji α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 20 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 20 μ M LALBA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M LALBA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M LALBA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M LALBA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M LALBA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M LALBA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M LALBA + 100 mM SDS – kolor różowy.

Interpretując widma absorpcji wszystkich trzech białek widać, że zmieniają się one pod wpływem SDS, co po raz kolejny potwierdza wpływ SDS na strukturę III-rzędową białek.

Podsumowując dwa powyższe podrozdziały (3.2.1.1 oraz 3.2.1.2) dotyczące zmian w strukturze II- jak i III-rzędowej badanych białek pod wpływem dodecylosiarczanu sodu, widać, że SDS wpływa na oba rodzaje struktur, wszystkich 3 badanych białek, ale w każdym przypadku w nieco inny sposób. Dla obu struktur widać zmiany kształtu widma czystego białka względem białka z SDS, zmiany są widoczne zarówno poniżej jak i powyżej CMC, co oznacza, że wszystkie białka wiążą i pojedyncze cząsteczki surfaktantu i micelle, a to z kolei może ponownie oznaczać, że istotną rolę w zmianach konformacyjnych białek, odgrywają ich oddziaływania z pojedynczymi cząsteczkami SDS.

3.2.2. Stabilność układu białko–SDS w czasie

Kolejną kwestią, która wymagała sprawdzenia, była wrażliwość, czy struktury, zarówno II– jak i III–rzędowe białek powstające pod wpływem SDS są stabilne w czasie czy wraz z jego upływem ulegają kolejnym zmianom, dążąc do osiągnięcia struktury końcowej. W celu wyjaśnienia tej wrażliwości wykonano serie eksperymentów z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus dla trzech białek: lizozymu, albuminy i α –laktoalbuminy. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Końcowe stężenie białka dla pomiarów FUV wynosiło 10 μ M, a dla NUV 20 μ M. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 15.

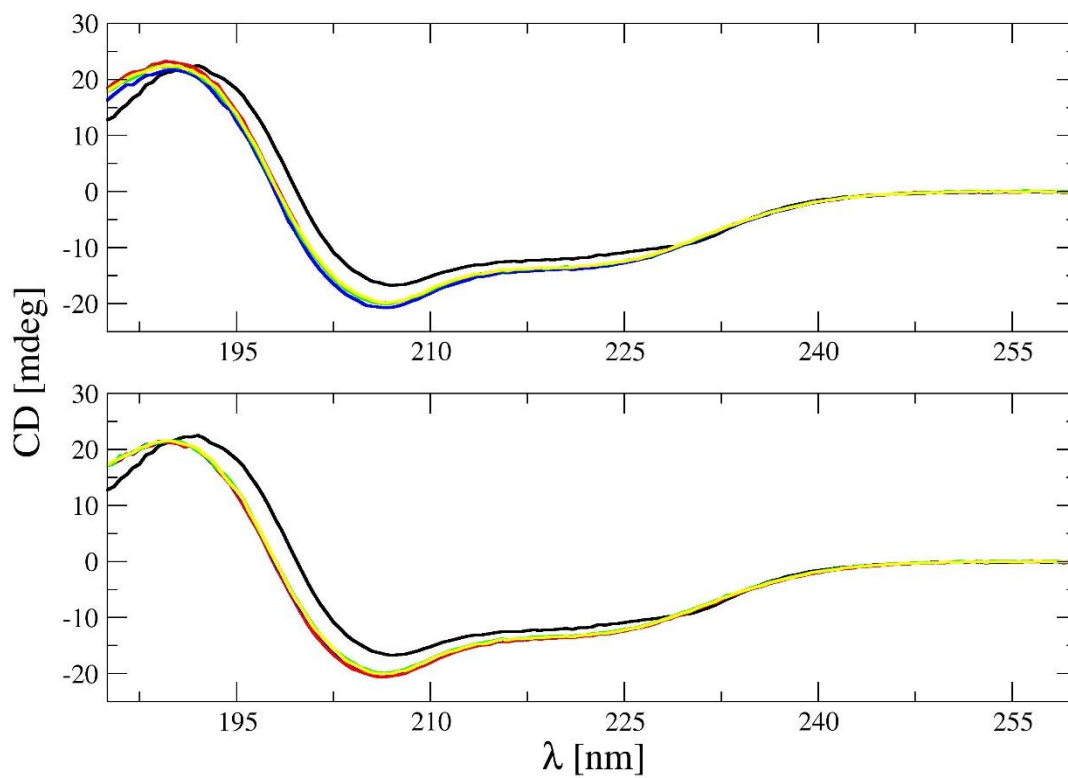
Tabela 15. Lista próbek lizozymu (HEWL), albuminy (BSA) i α –laktoalbuminy (LALBA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego i absorpcji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M białko	bufor
2	20 μ M białko	6 mM SDS
3	20 μ M białko	20 mM SDS
4	40 μ M białko	bufor
5	40 μ M białko	6 mM SDS
6	40 μ M białko	20 mM SDS

Rejestrowane były widma dichroizmu kołowego, dla FUV w zakresie 185 nm – 250 nm dla α –laktoalbuminy i lizozymu oraz 200 nm – 250 nm dla albuminy z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm a w NUV w zakresie 247 nm – 347 nm dla wszystkich białek, z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów, a następnie każde z nich zostało skorygowane o widmo buforu. Dla obu zakresów wykonano po 4 serie pomiarowe, dla FUV pomiar następował bezpośrednio po zmieszaniu reagentów, po 60, 180 oraz 270 minutach, a dla NUV po 90, 210 oraz 300 minutach.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu lizozymu, zostały przedstawione na Rysunku 49. Poddano je również dekonwolucji, za pomocą programu

BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej. Wyniki znajdują się w Tabeli 16.



Rysunek 49. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie dalekiego ultrafioletu 20 μM HEWL + bufor – kolor czarny. Górny panel: 20 μM HEWL + 6 mM SDS, dolny panel: 20 μM HEWL + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.

Tabela 16. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej lizozymu (HEWL), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M HEWL + bufor, 20 μ M HEWL + 6 mM SDS oraz 20 μ M HEWL + 20 mM SDS.

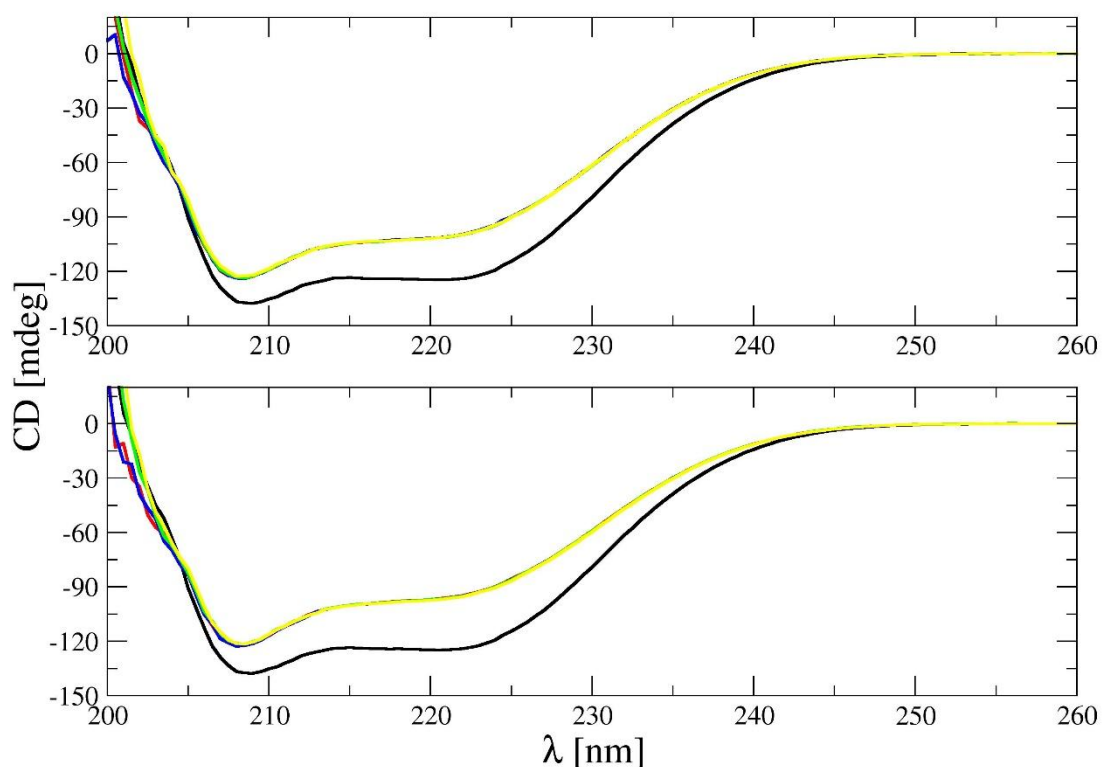
Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka		
		20 μ M HEWL + bufor	20 μ M HEWL + 6 mM SDS	20 μ M HEWL + 20 mM SDS
α -helisa	I	25,9	28,1	28,0
	II		29,3	27,7
	III		27,9	27,1
	IV		27,5	27,5
β -kartka	I	11,9	13,0	12,7
	II		12,1	13,6
	III		12,9	14,2
	IV		14,1	13,9
pętla	I	16,2	14,5	14,1
	II		14,0	14,3
	III		14,5	14,3
	IV		14,4	14,2
f.n.*	I	46,0	44,4	45,2
	II		44,6	44,5
	III		44,6	44,3

	IV		44,0	44,4
--	----	--	------	------

*fragmenty nieustrukturyzowane

Interpretując wyniki eksperymentu, można stwierdzić, że widma pokrywają się a zawartości procentowe składowych struktur drugorzędowych utrzymują się w czasie na podobnym poziomie. Można wnioskować, że struktura II-rzędowa, którą przyjmuje lizozym zaraz po zmieszaniu z SDS, o stężeniu zarówno poniżej jak i powyżej CMC, jest strukturą stabilną, która nie zmienia się w czasie co najmniej 270 minut.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla albuminy, zostały przedstawione na Rysunku 50. One również zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej w białku. Wyniki znajdują się w Tabeli 17.



Rysunek 50. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu 20 μM BSA + bufor – kolor czarny. Górny panel: 20 μM BSA + 6 mM SDS, dolny panel: 20 μM BSA + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.

Tabela 17. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej albuminy (BSA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M BSA + bufor, 20 μ M BSA + 6 mM SDS oraz 20 μ M BSA + 20 mM SDS.

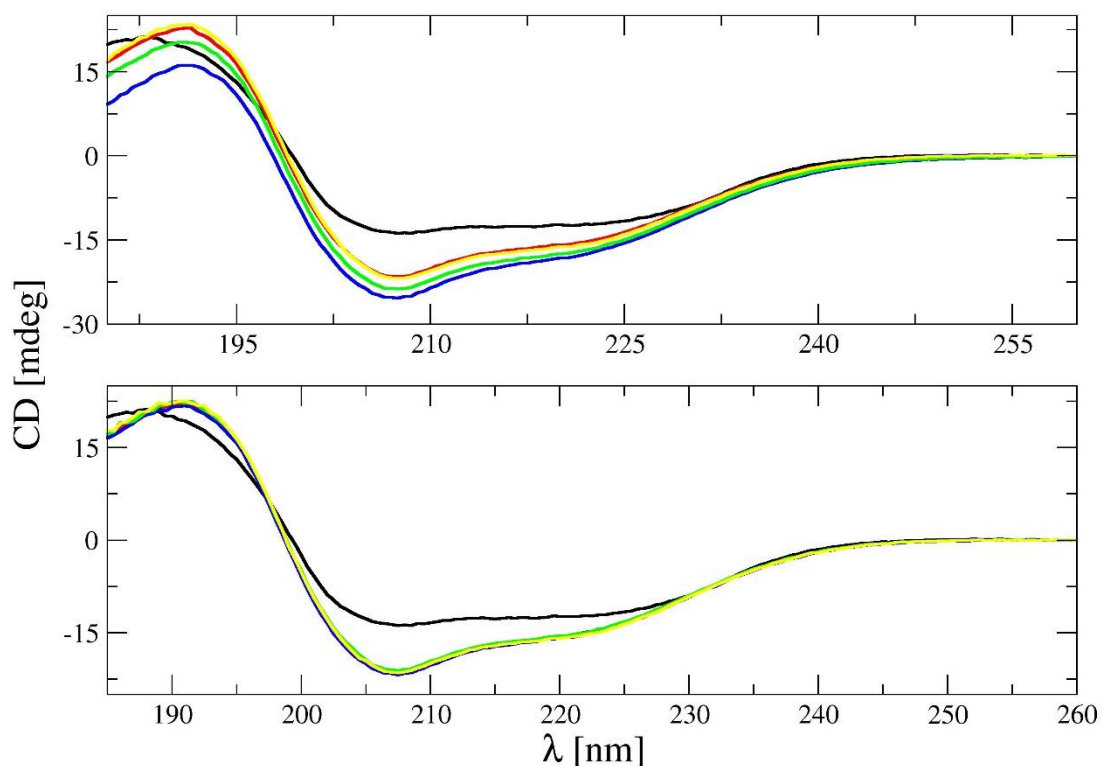
Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka		
		20 μ M BSA + bufor	20 μ M BSA + 6 mM SDS	20 μ M BSA + 20 mM SDS
α -helisa	I	57,1	43,7	43,6
	II		52,6	42,5
	III		51,4	53,6
	IV		56,3	63,9
β -kartka	I	0	0	2,6
	II		12,0	5,4
	III		2	2,0
	IV		2,1	10,6
pętla	I	7,3	5,7	7,3
	II		11,3	8,4
	III		7,5	4,2
	IV		3,8	2,6
f.n.*	I	35,6	50,6	46,5
	II		24,1	43,7
	III		39,1	40,1

	IV		37,8	22,9
--	----	--	------	------

*fragmenty nieustrukturyzowane

Podobnie jak w przypadku lizozymu widać, że widma dichroizmu kołowego albuminy ze wszystkich serii pokrywają się natomiast zawartości procentowe poszczególnych elementów struktury drugorzędowej, są mocno zróżnicowane. Pojawia się ten sam problem, który został opisany w poprzednim rozdziale dotyczącym analizy zmian struktury II-rzędowej albuminy – poniżej 200 nm widać, że widma się rozbiegają i są „poszarpane” a wartość absorbancji sięga wysoko ponad wartość 2. Ponadto wartość parametru RMSD podczas fitowania w programie BeStSel sięgała wartości 2. Mimo tego, na podstawie samych widm dichroizmu kołowego, można wnioskować, że struktura II-rzędowa, którą przyjmuje białko pod wpływem natychmiastowego kontaktu z SDS (poniżej jak i powyżej CMC) jest strukturą stabilną, która nie zmienia się w czasie co najmniej 270 minut.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla α -laktoalbuminy, zostały przedstawione na Rysunku 51. Podobnie jak w przypadku dwóch poprzednich białek, zostały one poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej w czasie. Wyniki znajdują się w Tabeli 18.



Rysunek 51. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu 20 μM LALBA + bufor – kolor czarny. Górny panel: 20 μM LALBA + 6 mM SDS, dolny panel: 20 μM LALBA + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony IV, seria – kolor żółty.

Tabela 18. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -laktoalbuminy (LALBA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μM LALBA + bufor, 20 μM LALBA + 6 mM SDS oraz 20 μM LALBA + 20 mM SDS.

Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka		
		20 μM LALBA + bufor	20 μM LALBA + 6 mM SDS	20 μM LALBA + 20 mM SDS
α -helisa	I	22,5	34,9	34,4
	II		32,5	34,4

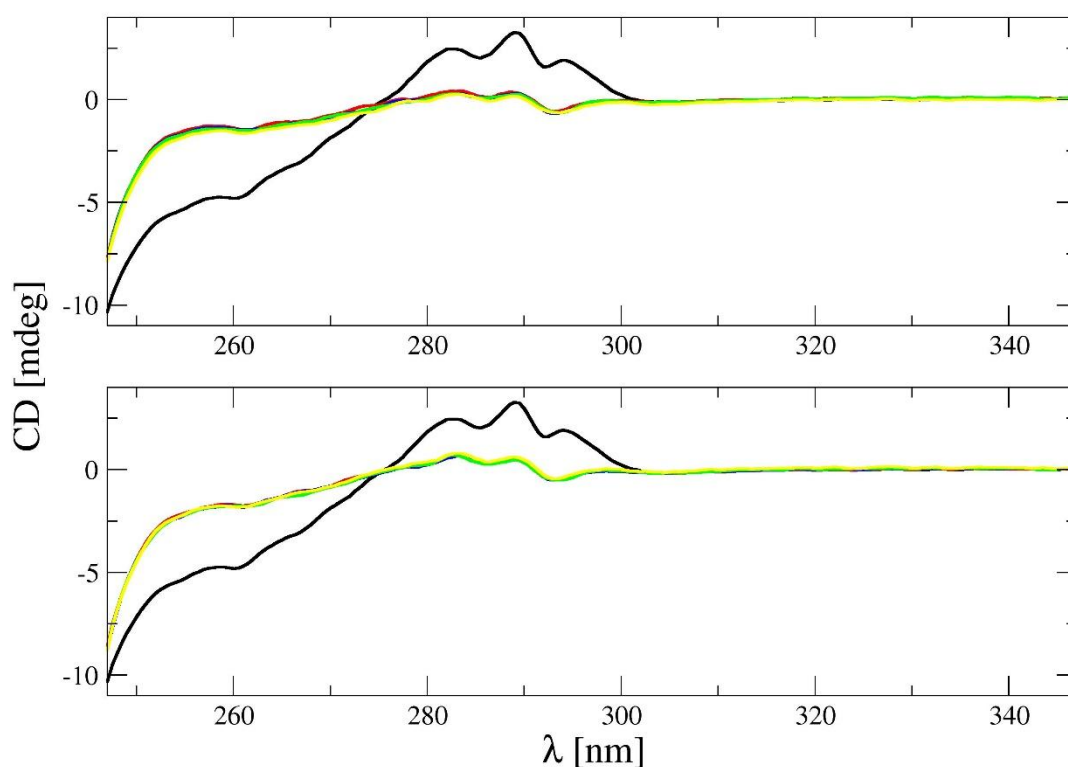
	III		34,7	34,2
	IV		35,7	34,6
β-kartka	I	20,5	9,8	9,7
	II		14,1	10,3
	III		11,7	10,0
	IV		9,3	9,9
pętla	I	12,6	12,7	12,7
	II		9,3	12,2
	III		11,3	12,7
	IV		12,5	12,6
f.n.*	I	44,4	42,6	43,2
	II		44,1	43,1
	III		42,3	43,1
	IV		42,6	43,0

*fragmenty nieustrukturyzowane

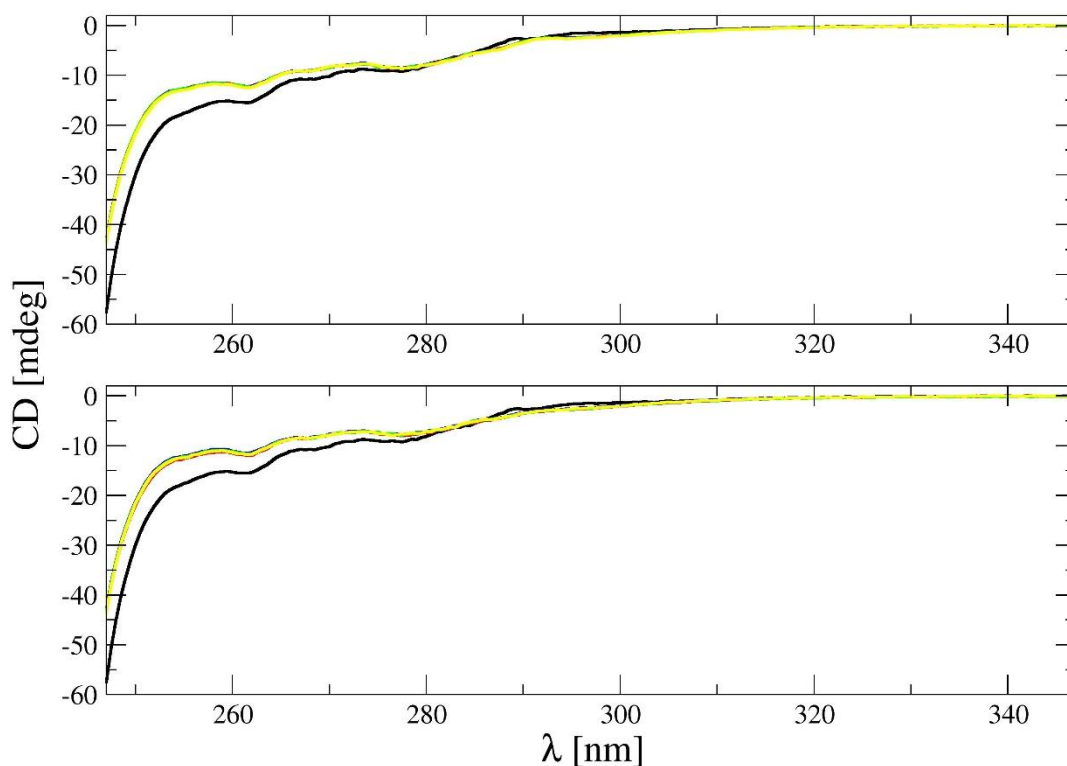
Interpretując uzyskane dla α -laktoalbuminy wyniki można stwierdzić, że widma dichroizmu kołowego dla stężenia SDS powyżej CMC (Rysunek 51, dolny panel) ze wszystkich serii pomiarowych pokrywają się, a wartości procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej dla wszystkich widm są porównywalne. Pozwala to wysunąć podobny wniosek jak w przypadku dwóch poprzednich białek, że struktura II-rzędowa, którą przyjmuje białko pod wpływem natychmiastowego kontaktu z SDS w stężeniu powyżej CMC, jest strukturą stabilną, która nie zmienia się w czasie, przez co najmniej 270 minut. Nieco inaczej sytuacja wygląda w przypadku eksperymentu, w który stężenie SDS, było poniżej CMC (Rysunku 59, górny panel). Widać, że nie wszystkie widma się pokrywają, widmo po 60 minutach ma niższy sygnał od widma zmierzonego bezpośrednio po zmieszaniu

reagentów, a to zmierzone po 180 minutach, ma sygnał jeszcze niższy niż dwa poprzednie. Co ciekawe, widmo uzyskane po 270 minutach, pokrywa się z widmem zmierzonym bezpośrednio po zmieszaniu obu reagentów. Można przypuszczać, że struktura II-rzędowa, którą przyjmuje białko pod wpływem natychmiastowego kontaktu z SDS, gdy jego stężenie jest poniżej CMC, jest strukturą niestabilną, która zmienia się w czasie i swoją stabilność uzyskuje dopiero po 270 minutach.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla lizozymu, zostały przedstawione na Rysunku 52 a dla albuminy na Rysunku 53.



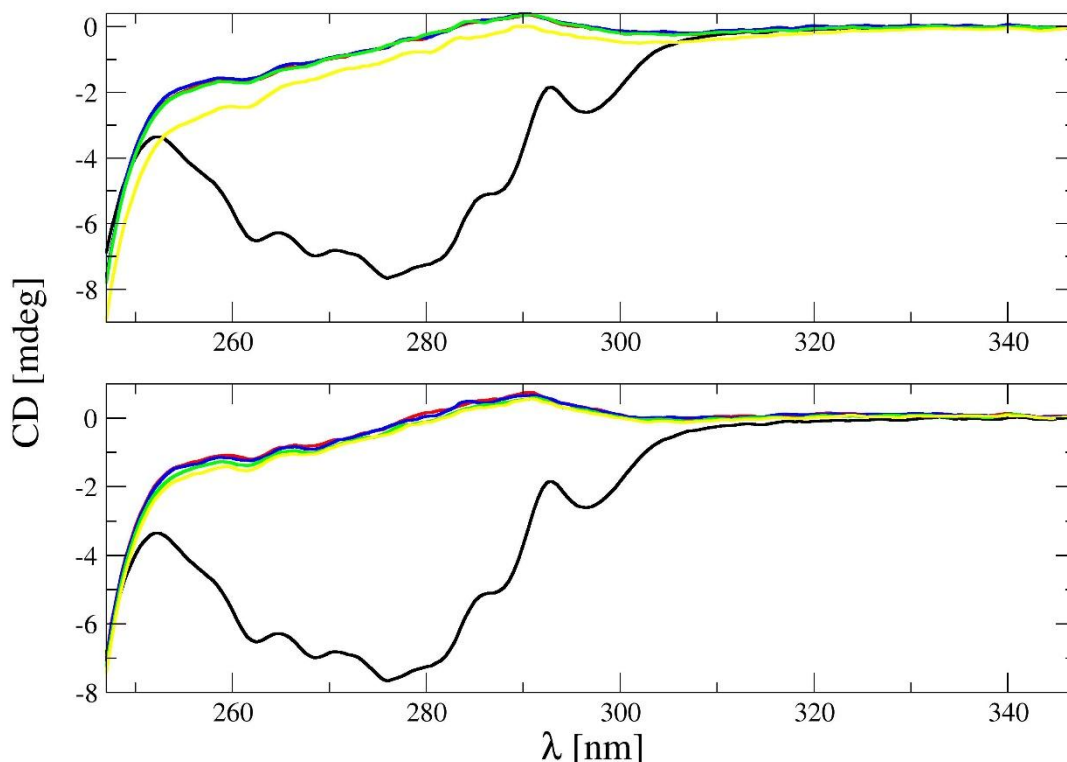
Rysunek 52. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie bliskiego ultrafioletu 20 μM HEWL + 6 mM SDS – kolor czarny. Górny panel: 20 μM HEWL + 6 mM SDS, dolny panel: 20 μM HEWL + 6 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.



Rysunek 53. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu 40 μ M BSA + bufor – kolor czarny. Górny panel: 40 μ M BSA + 6 mM SDS, dolny panel: 40 μ M BSA + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.

Widma dichroizmu kołowego NUV dla lizozymu (Rysunek 52) jak i albuminy (Rysunek 53) ze wszystkich serii pomiarowych pokrywają się, można, zatem wnioskować, że struktura III-rzędowa, podobnie jak struktura II-rzędowa tych białek, którą przyjmują one pod wpływem natychmiastowego kontaktu z SDS, w stężeniu poniżej i powyżej CMC, jest strukturą końcową, która nie zmienia się w czasie, przez co najmniej 300 minut.

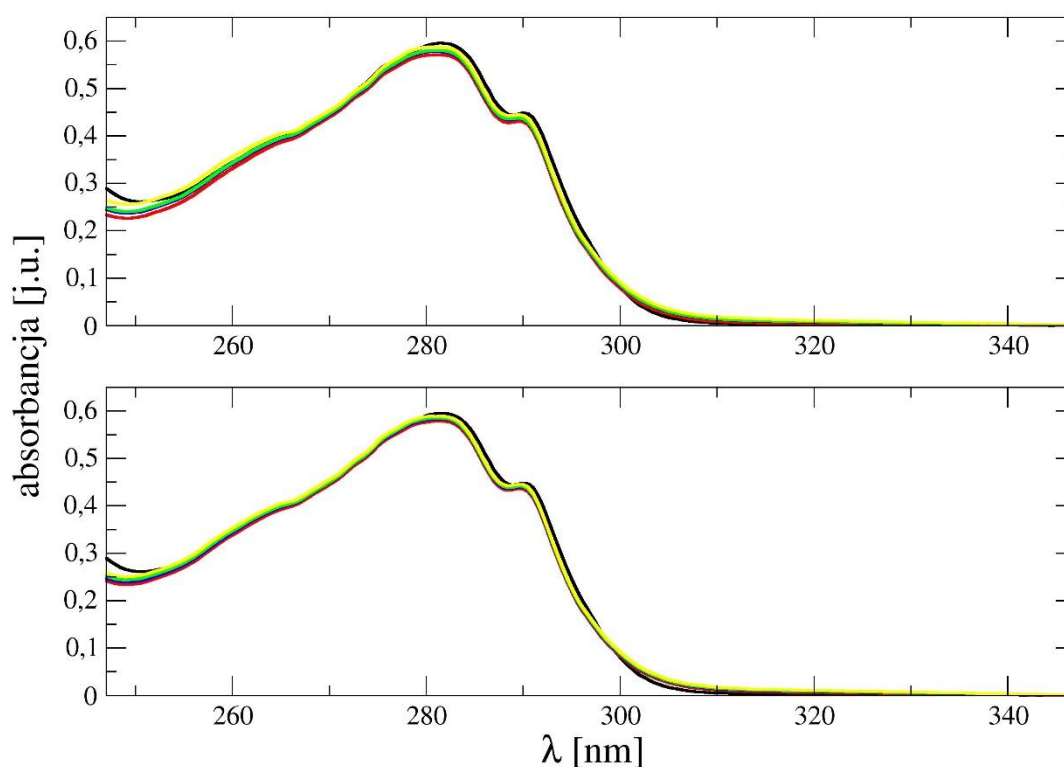
Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla α -laktoalbuminy, zostały przedstawione na Rysunku 54.



Rysunek 54. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu 40 μ M LALBA + bufor – kolor czarny. Górny panel: 40 μ M LALBA + 6 mM SDS, dolny panel: 40 μ M LALBA + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.

Dla α -laktoalbuminy, podobnie jak w przypadku widm dichroizmu kołowego z zakresu FUV, widać, że widma nie pokrywają się. Różnice są widoczne przy stężeniu SDS poniżej i powyżej CMC. W przypadku, gdy stężenie jest poniżej CMC (Rysunku 54, górny panel), widma uzyskane bezpośrednio po zmieszaniu obu reagentów, po 90 oraz 210 minutach pokrywają się, natomiast widmo uzyskane po 300 minutach odbiega od pozostałych. Pozwala to stwierdzić, że struktura III-rzędowa, którą przyjmuje białko pod wpływem natychmiastowego kontaktu z SDS w stężeniu powyżej CMC, nie jest stabilną strukturą końcową. Taką strukturę białko przyjmuje prawdopodobnie dopiero po 300 minutach po zmieszaniu z roztworem SDS. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, że ta struktura jest strukturą końcową i nie ulega kolejnym zmianom, gdyż nie wykonano widma po upływie kolejnych minut, natomiast można uznać, że struktura α -laktoalbuminy pod wpływem SDS zmienia się w czasie. Podobne wnioski można wysunąć w przypadku, gdy stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunku 54, dolny panel), co prawda różnice w wyglądzie widm nie są aż tak

duże jak w przypadku stężenia SDS poniżej CMC, ale widma nie pokrywają się. Zmian w wyglądzie widm dichroizmu kołowego, nie można wyjaśniać agregacją białka. Przy długości fali 350 nm nie widać podniesionego tła absorpcji (Rysunek 55), co świadczy o braku rozpraszania światła, a to prowadzi do wniosku, że w badanych próbkach nie pojawiają się agregaty.



Rysunek 55. Widma absorpcji α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu 40 μ M LALBA + bufor – kolor czarny. Górny panel: 40 μ M LALBA + 6 mM SDS, dolny panel: 40 μ M LALBA + 20 mM SDS. I seria – kolor czerwony, II seria – kolor niebieski, III seria – kolor zielony, IV seria – kolor żółty.

Podsumowując, nie można przyjąć, że dla wszystkich białek i stężeń SDS, struktura II– jak i III–rzędowa, którą przyjmuje dane białko w wyniku interakcji z SDS, jest stabilną strukturą końcową. Dla lizozymu i albuminy najprawdopodobniej tak, natomiast w przypadku α -laktoalbuminy, zarówno struktura II– jak i III–rzędowa zmienia się w czasie.

3.2.3. Wpływ procedury przygotowania roztworów na widma dichroizmu kołowego lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy

Wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus, analogicznych do tych opisanych w rozdziale 3.1., dla 3 białek: lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy, celem sprawdzenia, czy widma dichroizmu kołowego białek zależą od metody przygotowania roztworów. Przygotowano próbki do pomiarów zarówno jednoetapową metodą podstawową jak i dwuetapową metodą alternatywną. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Końcowe stężenie białka dla pomiarów FUV wynosiło 10 μ M, a dla NUV 20 μ M. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 19.

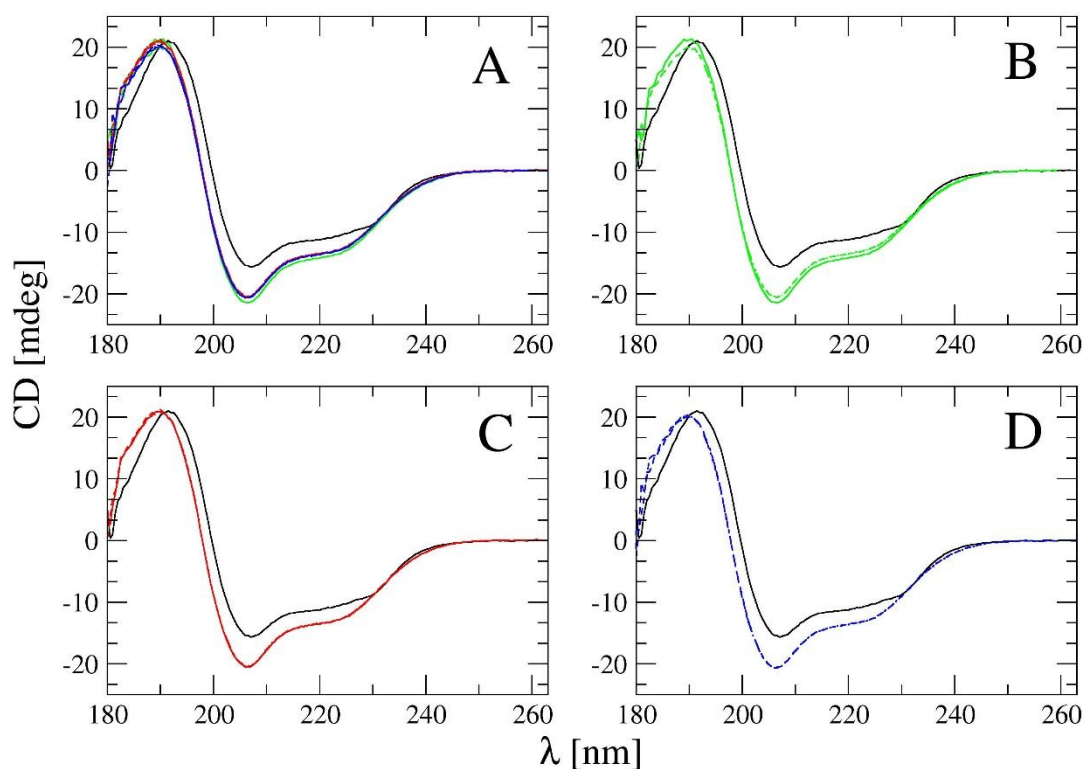
Tabela 19. Lista próbek lizozymu (HEWL), albuminy (BSA) i α -laktoalbuminy (LALBA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego i absorpcji przygotowanych zgodnie z procedurą podstawową oraz alternatywną (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M białko	bufor
2	20 μ M białko	80 mM SDS
3	20 μ M białko – 6 mM SDS	74 mM SDS
4	20 μ M białko – 20 mM SDS	60 mM SDS
5	40 μ M białko	bufor
6	40 μ M białko	80 mM SDS
7	40 μ M białko – 6 mM SDS	74 mM SDS
8	40 μ M białko – 20 mM SDS	60 mM SDS

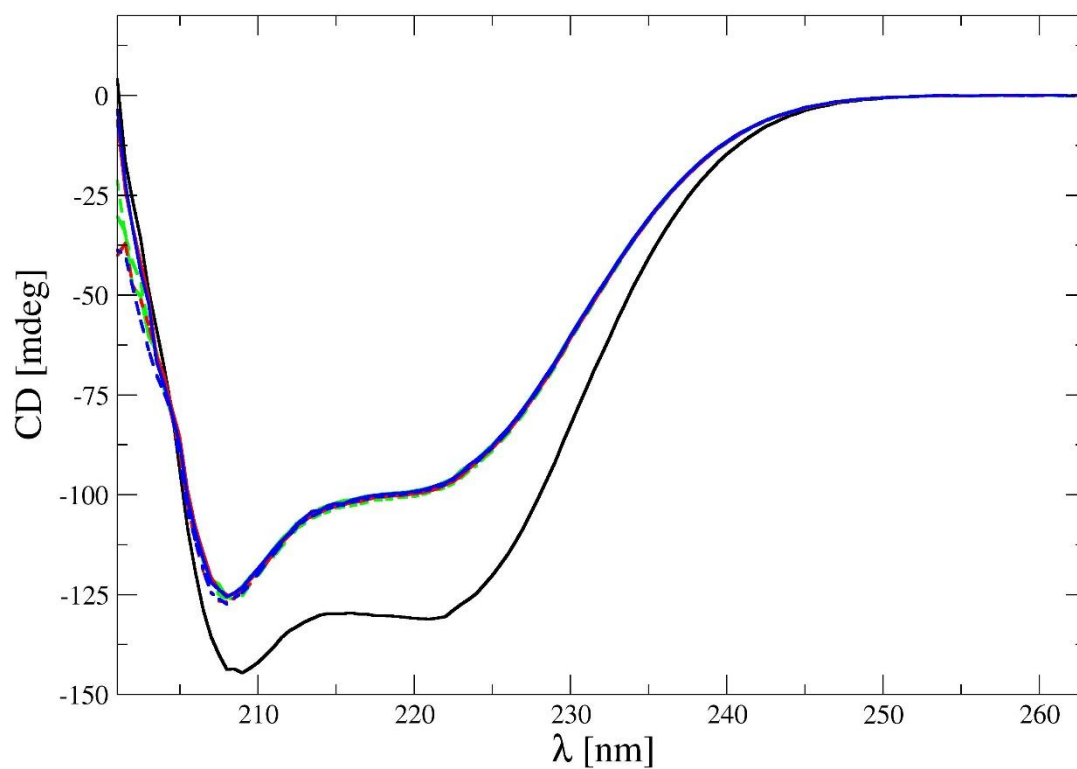
Rejestrowane były widma dichroizmu kołowego, dla FUV w zakresie 180 nm – 250 nm dla α -laktoalbuminy i lizozymu oraz 190 nm – 250 nm dla albuminy z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm a w NUV w zakresie 247 nm – 347 nm dla wszystkich białek z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów dla lizozymu i α -laktoalbuminy i po 6 dla albuminy. Dla obu zakresów wykonano po dwie serie pomiarowe,

czyli pomiar następował bezpośrednio po zmieszaniu reagentów (I seria) oraz po ok. 270 minutach (II seria). Wszystkie widma zarówno dichroizmu kołowego zostały skorygowane o widmo buforu.

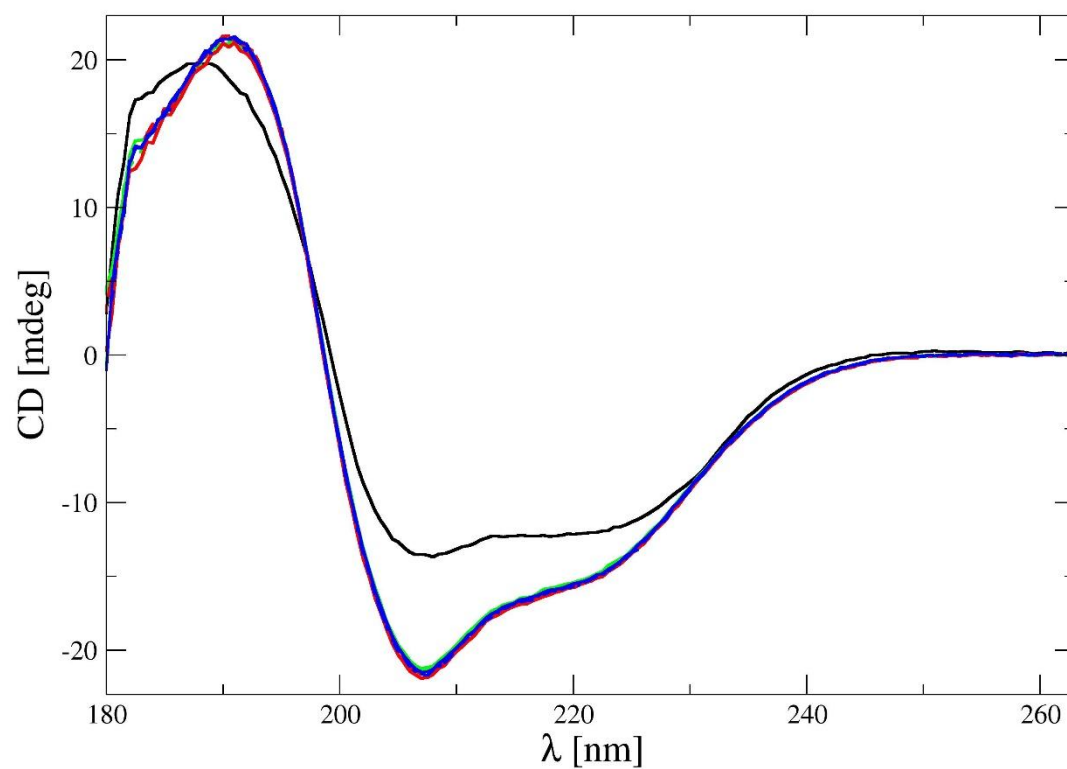
Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla lizozymu, zostały przedstawione na Rysunku 56, dla albuminy na Rysunku 57 a dla α -laktoalbuminy na Rysunku 58. Wszystkie widma zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej w białku. Wyniki znajdują się w tabelach kolejno: lizozym – Tabela 20, albumina – Tabela 21 oraz α -laktoalbumina – Tabela 22.



Rysunek 56. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μ M HEWL + bufor – kolor czarny, 20 μ M HEWL + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M HEWL-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M HEWL-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane. A – wszystkie próbki, B–D – poszczególne próbki.



Rysunek 57. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μ M BSA + bufor – kolor czarny, 20 μ M BSA + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M BSA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M BSA-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.



Rysunek 58. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: 20 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M LALBA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M LALBA-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.

Tabela 20. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej lizozymu (HEWL), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μM HEWL + bufor, 20 μM HEWL + 80 mM SDS, 20 μM HEWL-6 mM SDS + 74 mM SDS oraz 20 μM HEWL-20 mM SDS + 60 mM SDS.

Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka			
		20 μM HEWL + bufor	20 μM HEWL + 80 mM SDS	20 μM HEWL-6 mM SDS + 74 mM SDS	20 μM HEWL-20 mM SDS + 60 mM SDS
α -helisa	I	26,7	30,1	29,3	29,0
	II		28,4	28,9	29,0
β -kartka	I	10,2	10,8	12,7	11,9
	II		12,5	11,8	11,6
pętla	I	14,8	14,2	14,3	14,2
	II		14,4	14,2	14,4
f.n.*	I	48,4	44,9	44,7	44,9
	II		44,7	44,6	44,9

*fragmenty nieustrukturyzowane

Tabela 21. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej albuminy (BSA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M BSA + bufor, 20 μ M BSA + 80 mM SDS, 20 μ M BSA-6 mM SDS + 74 mM SDS oraz 20 μ M BSA-20 mM SDS + 60 mM SDS.

Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka			
		20 μ M BSA + bufor	20 μ M BSA + 80 mM SDS	20 μ M BSA-6 mM SDS + 74 mM SDS	20 μ M BSA-20 mM SDS + 60 mM SDS
α -helisa	I	58,3	46,2	45,8	48,4
	II		47,5	57,0	44,6
β -kartka	I	0	13,9	0	1,3
	II		10,7	26,9	13,3
pętla	I	7,1	11,7	6,4	4,7
	II		10,6	16,1	11,2
f.n.*	I	34,6	28,2	47,8	45,6
	II		31,2	0	30,9

*fragmenty nieustrukturyzowane

Tabela 22. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -laktoalbuminy (LALBA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M LALBA + bufor, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS, 20 μ M LALBA-6 mM SDS + 74 mM SDS oraz 20 μ M LALBA-20 mM SDS + 60 mM SDS.

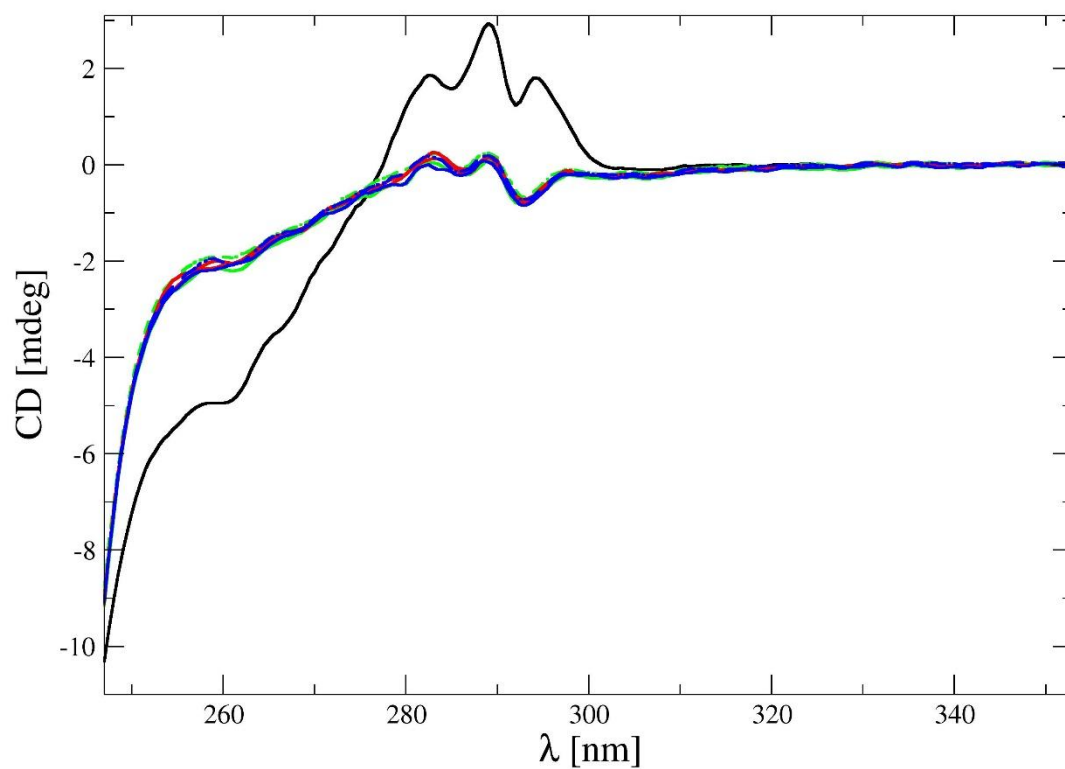
Element struktury II-rzędowej	Seria	Próbka			
		20 μ M LALBA + bufor	20 μ M LALBA + 80 mM SDS	20 μ M LALBA-6 mM SDS + 74 mM SDS	20 μ M LALBA-20 mM SDS + 60 mM SDS
α -helisa	I	23,7	33,6	34,4	34,3
	II		34,2	34,6	34,6
β -kartka	I	19,9	10,8	10,4	10,5
	II		10,3	10,0	10,3
pętla	I	13,0	12,8	12,8	12,4
	II		12,8	12,8	12,7
f.n.*	I	43,4	42,8	42,4	42,8
	II		42,7	42,6	42,4

*fragmenty nieustrukturyzowane

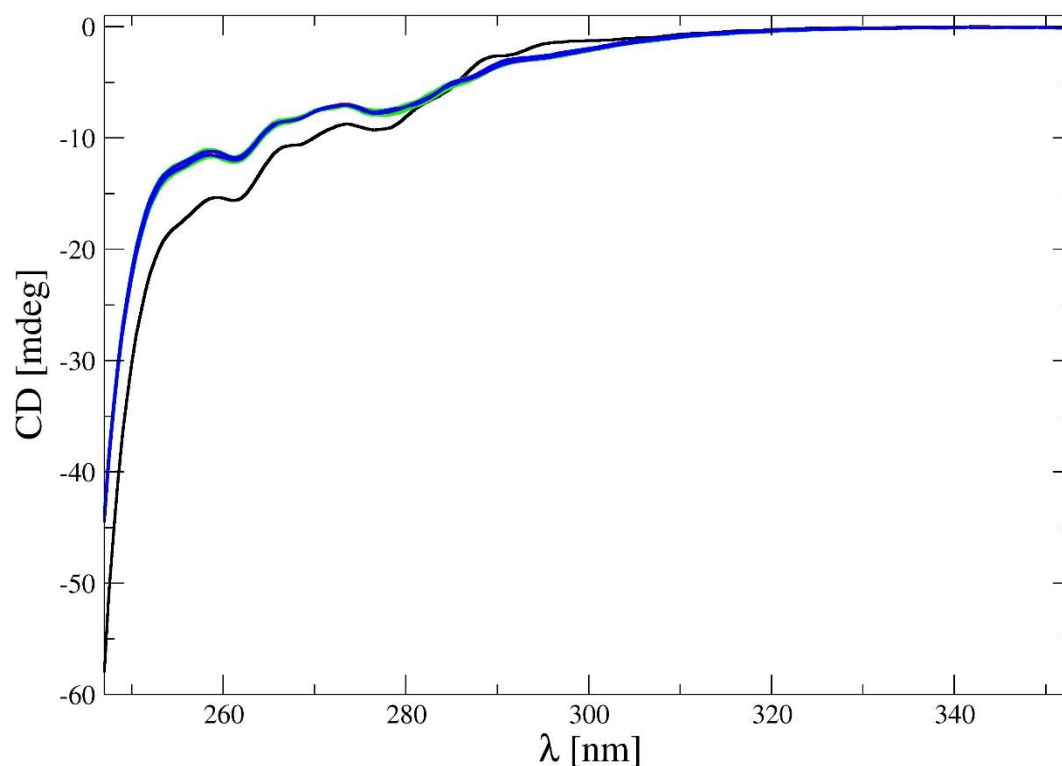
Interpretując uzyskane widma dichroizmu kołowego w zakresie FUV dla albuminy oraz α -laktoalbuminy, a także procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej można stwierdzić, że w przypadku obu białek, procedura przygotowania roztworów do pomiaru widm dichroizmu kołowego, czy to metoda podstawowa, jednoetapowa czy metoda alternatywna, dwuetapowa, w której roztwór białka zawierał już pewną ilość SDS, nie wpływa na widmo dichroizmu kołowego, a tym samym nie wpływa na to, jaką strukturę II-rzędową przyjmie białko po interakcji z SDS. Natomiast interpretując widma dichroizmu kołowego lizozymu przedstawione na Rysunku 56B (próbka przygotowana metodą podstawową) widać, że struktura osiągnięta przez to białko bezpośrednio po zmieszaniu obu reagentów jest inna niż struktura, którą przyjmuje białko po upływie 270 minut od zmieszania. W przypadku próbek,

których widma zostały umieszczone na Rysunku 56C i 56D (próbki przygotowane metodą alternatywną), widma zmierzone bezpośrednio po zmieszaniu, jak i te wykonane po 270 minutach – pokrywają się. W tych eksperymentach, stężenie końcowe SDS jest znacznie powyżej CMC i wynosi 40 mM, a w przypadku eksperymentów zawartych w rozdziale 3.4.2. opisującym badania stabilności układu białko–SDS w czasie, (z których wynikało, że struktura jaką przyjmuje lizozym bezpośrednio zmieszaniu z SDS jest taka sama jak po upływie 270 minut) zastosowane końcowe stężenie SDS wynosiło 10 mM. Może to oznaczać, że w przypadku lizozymu, struktura II-rzędowa, jaką przyjmuje białko bezpośrednio po interakcji z SDS, w stężeniu znacznie przekraczającym CMC, nie jest jego stabilną końcową strukturą, a zmienia się w czasie, w konsekwencji można wysunąć wniosek, że to, po jakim czasie białko osiągnęło końcową stabilną strukturę, zależy również od stężenia surfaktantu.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla lizozymu oraz albuminy zostały przedstawione kolejno na Rysunku 59 a dla albuminy na Rysunku 60.



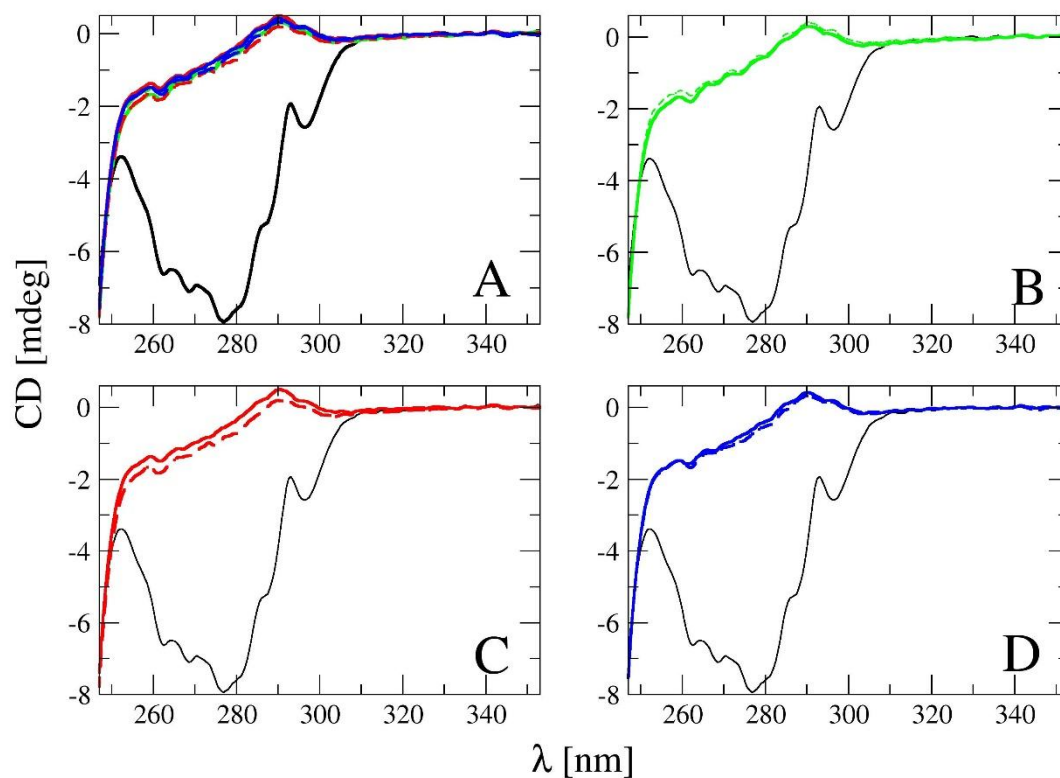
Rysunek 59. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie bliskiego ultrafioletu: 40 μM HEWL + bufor – kolor czarny, 40 μM HEWL + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μM HEWL-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μM HEWL-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.



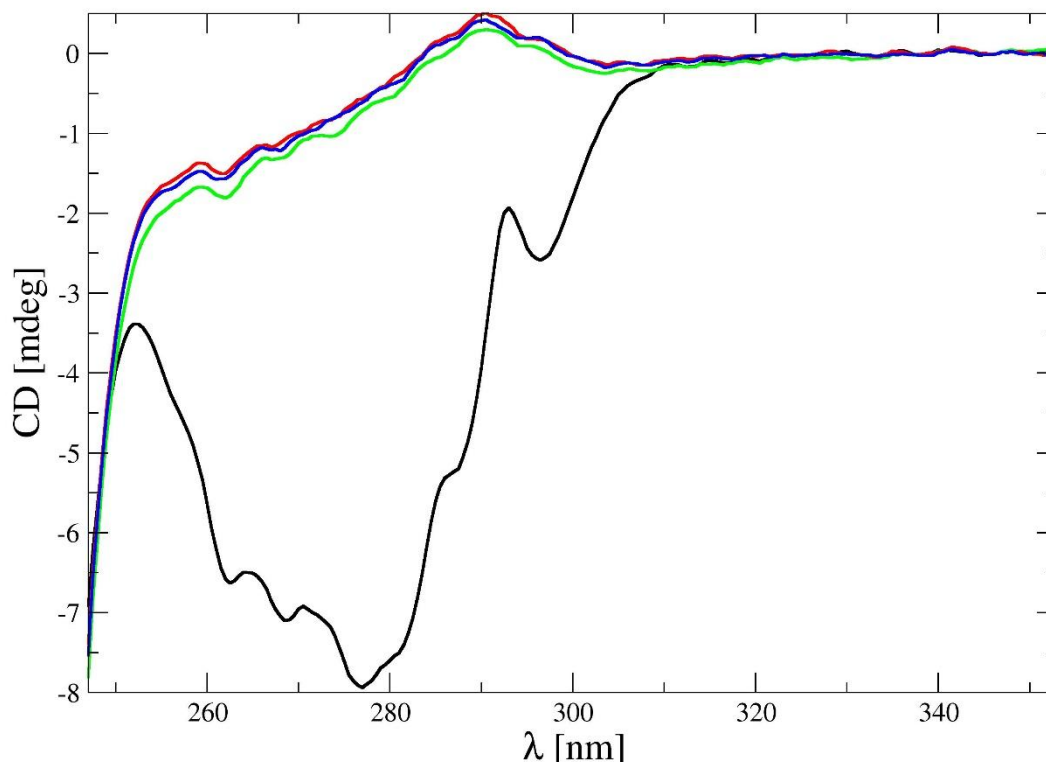
Rysunek 60. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 40 μ M BSA + bufor – kolor czarny, 40 μ M BSA + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M BSA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M BSA-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane.

Interpretując uzyskane widma dichroizmu kołowego w zakresie NUV dla lizozymu i albuminy widać, że w przypadku tych białek, procedura przygotowania próbek do pomiarów widm dichroizmu kołowego, czy to metodą podstawową, jednoetapową czy alternatywną, dwuetapową, nie wpływa na wygląd widma, a tym samym nie wpływa na to, jaką strukturę III-rzędową przyjmie białko po interakcji z SDS.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla α -laktoalbuminy zostały przedstawione na Rysunkach 61 oraz 62.



Rysunek 61. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: 40 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 40 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M LALBA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M LALBA-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski. I seria – linie ciągłe, II seria – linie przerywane. A – wszystkie próbki, B–D – poszczególne próbki.



Rysunek 62. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu w I serii (bezpośrednio po zmieszaniu): 40 μ M LALBA + bufor – kolor czarny, 40 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor zielony, 40 μ M LALBA-6 mM SDS + 74 mM SDS – kolor czerwony, 40 μ M LALBA-20 mM SDS + 60 mM SDS – kolor niebieski.

Porównując widma dichroizmu kołowego, które zostały przedstawione na Rysunku 61, widać, że widma uzyskane metodą podstawową, różnią się od widm uzyskanych metodą alternatywną. Można zatem wnioskować, że struktura III-rzędowa, jaką przyjmuje α -laktoalbumina pod wpływem interakcji z SDS zależy od sposobu osiągnięcia końcowego stężenia surfaktantu w roztworze. Ponadto, co widać na Rysunku 62 widma zmierzone bezpośrednio po zmieszaniu roztworu białka z roztworem SDS, niezależnie, którą z metod, oraz widma po upływie 270 minut nie pokrywają się, co oznacza, że struktura III-rzędowa α -laktoalbuminy pod wpływem SDS zmienia się w czasie – potwierdza to już wcześniejsze wnioski z rozdziału 3.4.2.

Podsumowując, zmiany zachodzące w strukturze II-rzędowej pod wpływem SDS, zbadane dla trzech białek: lizozymu, albuminy oraz α -laktoalbuminy nie zależą od procedury prowadzącej do osiągnięcia końcowego stężenia SDS w roztworze. W przypadku struktury III-

rzędowej lizozymu i albuminy również nie zależą od procedury prowadzącej do osiągnięcia końcowego stężenia surfaktantu w roztworze, natomiast w przypadku α -laktoalbuminy – tak. Widać, że zmiany wywoływane przez SDS w strukturze II- i III-rzędowej mogą zachodzić zupełnie niezależnie od siebie przy takich samych warunkach eksperymentu. Dodatkowo, wpływ procedury przygotowania próbek wpływa inaczej na różne białka – nie ma jednej uniwersalnej ścieżki.

3.2.4. Wpływ siły jonowej roztworu na zmiany strukturalne lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy indukowane przez SDS

Ja już zostało wspomniane, niezwykle istotnym elementem, wpływającym na zachodzące w białku pod wpływem dodecylsiarczanu sodu zmiany strukturalne, jest siła jonowa roztworu, która wpływając na wartość CMC danego surfaktantu warunkuje jego wiązanie do białka i wszystkie następne zjawiska z tym związane. Jony niskocząsteczkowej soli, ekranują oddziaływania elektrostatyczne w układzie. W celu sprawdzenia wpływu siły jonowej na interakcje białek z SDS wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem spektrometru Chirascan Plus, dla 3 białek: lizozymu, albuminy i α -laktoalbuminy. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Końcowe stężenie białka dla pomiarów FUV wynosiło 10 μ M, a dla NUV 20 μ M. Wykorzystano 6 różnych sił jonowych rozpuszczalnika: 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM oraz 250 mM. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 23.

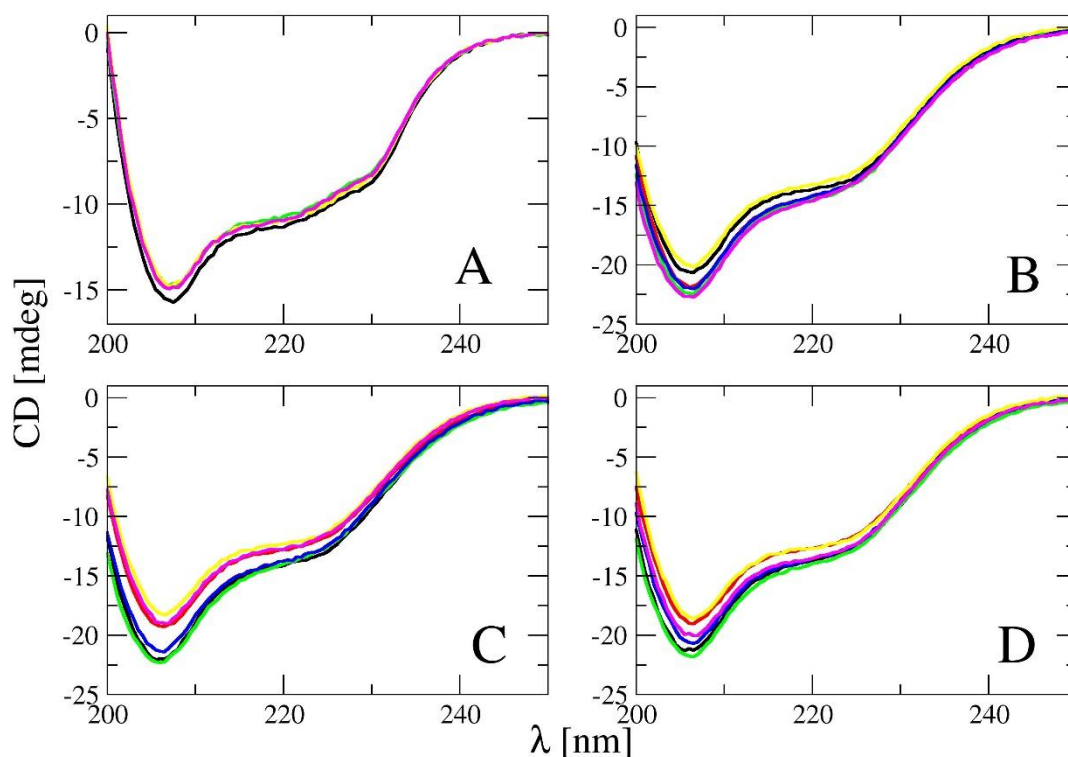
Tabela 23. Lista próbek lizozymu (HEWL), albuminy (BSA) i α -laktoalbuminy (LALBA) do pomiarów widm dichroizmu kołowego (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M białko	bufor
2	20 μ M białko	6 mM SDS
3	20 μ M białko	20 mM SDS
4	20 μ M białko	80 mM SDS
5	40 μ M białko	bufor
6	40 μ M białko	6 mM SDS

7	40 μ M białko	20 mM SDS
8	40 μ M białko	80 mM SDS

Rejestrowane były widma dichroizmu kołowego: dla FUV w zakresie 200 nm – 250 nm dla α -laktoalbuminy i lizozymu (analiza od 200 nm) oraz 205 nm – 250 nm dla albuminy z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 1 mm, dla NUV w zakresie 247 nm – 347 nm dla wszystkich białek z użyciem kuwety absorpcyjnej o długości drogi optycznej 10 mm. Każde widmo uzyskano poprzez uśrednienie 20 pojedynczych skanów dla lizozymu i α -laktoalbuminy i po 6 dla albuminy. Wszystkie widma zarówno dichroizmu kołowego zostały skorygowane o widmo buforu.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla lizozymu, zostały przedstawione na Rysunku 63, oraz zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II-rzędowej w białku. Wyniki zostały umieszczone w Tabeli 24.



Rysunek 63. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie dalekiego ultrafioletu. A – 20 μM HEWL + bufor, B – 20 μM HEWL + 6 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 20 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy.

Tabela 24. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej lizozymu (HEWL), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μM HEWL + bufor, 20 μM HEWL + 6 mM SDS, 20 μM HEWL + 20 mM SDS oraz 20 μM HEWL + 80 mM SDS.

Element struktury II-rzędowej	Wartość siły jonowej [mM]	Próbka			
		20 μM HEWL + bufor	20 μM HEWL + 6 mM SDS	20 μM HEWL + 20 mM SDS	20 μM HEWL + 80 mM SDS
α -helisa	0	26,6	26,6	27,9	27,2
	50	22,7	28,3	24,4	24,9

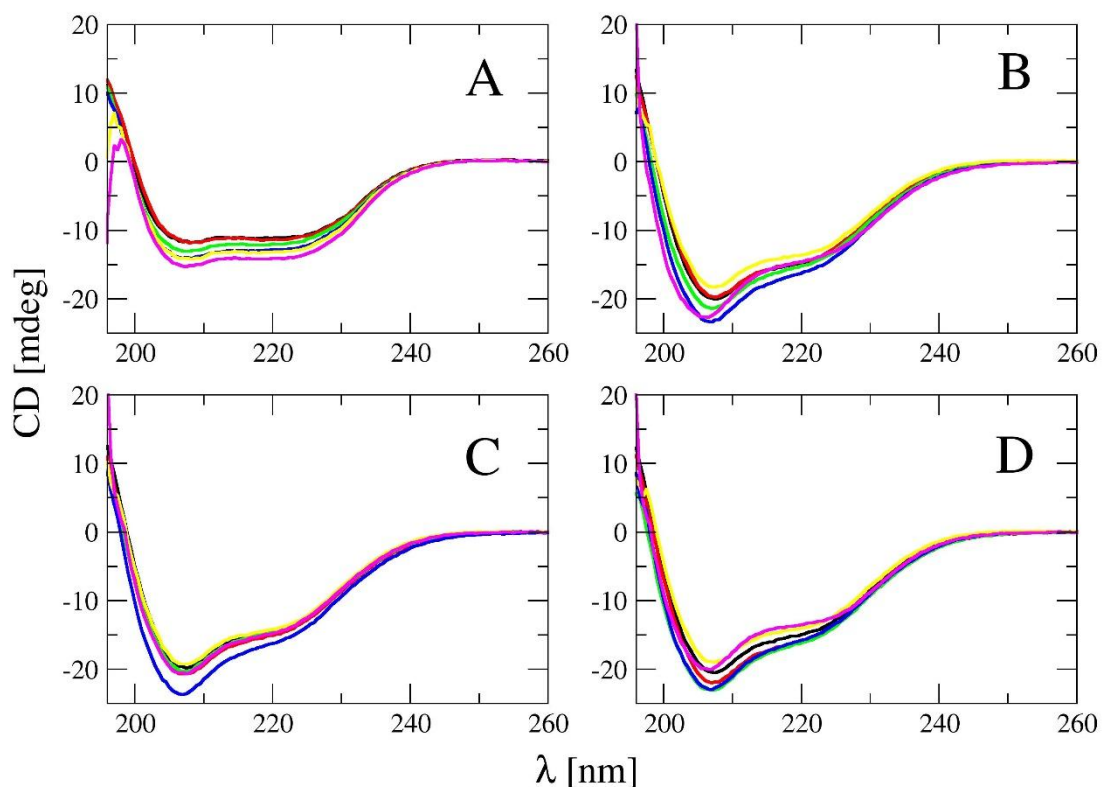
	100	24,3	28,1	25,9	26,7
	150	26,6	26,8	26,6	27,6
	200	24,4	26,9	28,9	28,9
	250	22,3	26,4	26,7	26,4
β-kartka	0	15,9	17,2	16,2	16,4
	50	18,6	14,4	17,6	17,3
	100	16,6	15,6	15,8	17,7
	150	16,9	16,6	16,9	15,8
	200	15,3	15,0	13,6	11,4
	250	15,4	16,0	13,2	17,0
pętla	0	13,6	13,1	13,4	13,4
	50	14,1	13,1	13,1	13,9
	100	14,5	13,2	12,8	13,1
	150	13,4	12,8	13,4	13,7
	200	14,4	14,0	13,7	14,6
	250	15,0	12,8	14,7	13,6
f.n.*	0	43,9	43,1	42,4	43,0
	50	44,6	44,2	44,9	43,9
	100	44,7	43,0	45,5	42,5
	150	43,2	43,8	43,2	42,8
	200	45,9	44,2	43,7	45,1

	250	47,3	44,7	45,4	43,0
--	-----	------	------	------	------

*fragmenty nieustrukturyzowane

Interpretując widma umieszczone na Rysunku 64A oraz wyniki w Tabeli 24, widać, że dla czystego białka, siła jonowa wpływa na strukturę II–rzędową białka. Jednak niezależnie od stężenia SDS w zakresie 50 mM – 250 mM wywołuje taką samą zmianę. Interpretując wyniki dla próbek zawierających 3 różne stężenia SDS (Rysunek 64B–D), można zauważyć, że dla wszystkich trzech stężeń największą zmianę w wyglądzie widma dichroizmu kołowego wywołuje siła jonowa 200 mM zaś najmniejszą 100 mM, co również widać po procentowych zawartościach poszczególnych elementów struktury II–rzędowej. W przypadku pozostałych wartości siły jonowej, brak jest regularnej zależności zmian struktury od tych parametrów.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla α –laktoalbuminy zostały przedstawione na Rysunku 64 oraz zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, w celu sprawdzenia, jak zmieniła się zawartość poszczególnych elementów struktury II–rzędowej w białku. Wyniki znajdują się w Tabeli 25.



Rysunek 64. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: A – 20 μ M LALBA + bufor, B – 20 μ M LALBA + 6 mM SDS, C – 20 μ M LALBA + 20 mM SDS, D – 20 μ M LALBA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy.

Tabela 25. Średnie procentowe zawartości poszczególnych elementów struktury II-rzędowej α -laktoalbuminy (LALBA), uzyskane za pomocą programu BeStSel dla próbek: 20 μ M LALBA + bufor, 20 μ M LALBA + 6 mM SDS, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS oraz 20 μ M LALBA + 80 mM SDS.

Element struktury II-rzędowej	Wartość siły jonowej [mM]	Próbka			
		20 μ M LALBA + bufor	20 μ M LALBA + 6 mM SDS	20 μ M LALBA + 20 mM SDS	20 μ M LALBA + 80 mM SDS
α -helisa	0	18,8	33,3	31,3	31,8
	50	19,6	31,3	32,1	33,9

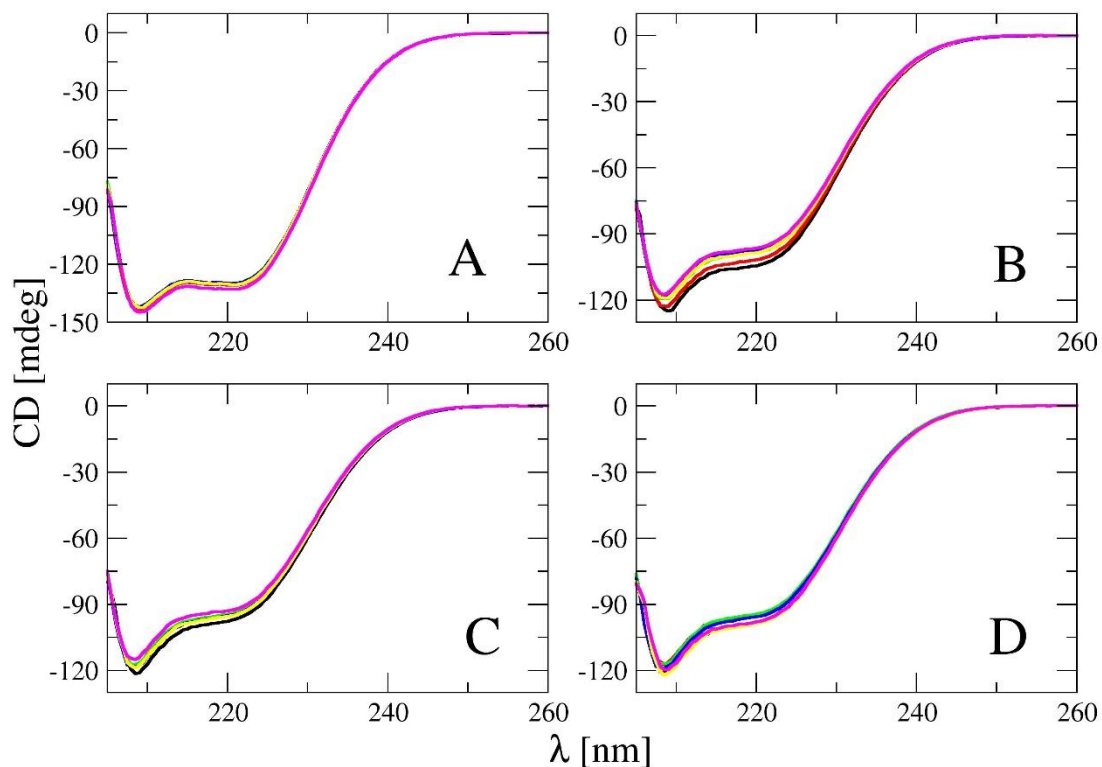
	100	21,1	31,6	31,6	32,3
	150	23,3	31,8	31,2	32,2
	200	22,6	34,2	33,0	32,8
	250	24,9	27,4	30,6	28,7
β-kartka	0	19,4	12,8	13,3	13,2
	50	17,5	14,9	12,2	12,0
	100	19,7	14,0	14,4	14,5
	150	16,2	13,3	11,9	12,9
	200	16,6	11,3	12,6	13,0
	250	14,1	15,1	14,8	15,6
pęta	0	13,6	11,7	12,7	11,5
	50	13,5	12,2	12,2	11,5
	100	13,3	11,8	12,7	11,5
	150	13,4	10,9	10,8	11,3
	200	14,4	12,7	12,7	12,4
	250	13,4	12,7	12,1	13,7
f.n.*	0	48,2	42,2	41,7	43,5
	50	49,4	41,5	43,5	42,6
	100	45,9	42,6	41,2	41,7
	150	47,1	44,0	46,0	43,5
	200	46,4	43,5	41,7	41,8

	250	47,7	44,9	42,5	42,0
--	-----	------	------	------	------

*fragmenty nieustrukturyzowane

Interpretując widma dichroizmu kołowego z zakresu FUV uzyskane dla czystej α -laktoalbuminy i umieszczone na Rysunku 65A widać, że w przypadku tego białka dopiero siła jonowa równa 100 mM wywołuje zmianę w strukturze II-rzędowej, powyżej tej wartości można zauważyć tendencję, że wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu zmiany w strukturze II-rzędowej są większe (patrz Tabela 26). W przypadku próbek zawierających SDS widać, że stężenia 3 mM oraz 40 mM (w sile jonowej 0 mM są to stężenia poniżej oraz znacznie powyżej CMC) największą zmianę w strukturze II-rzędowej wywołuje najwyższa siła jonowa – 250 mM. W przypadku próbki, gdzie stężenie SDS wynosiło 10 mM, największą zmianę wywołuje siła jonowa 150 mM, pozostałe zmiany są podobne – widma prawie się pokrywają a wartości procentowe są na bardzo zbliżonym poziomie.

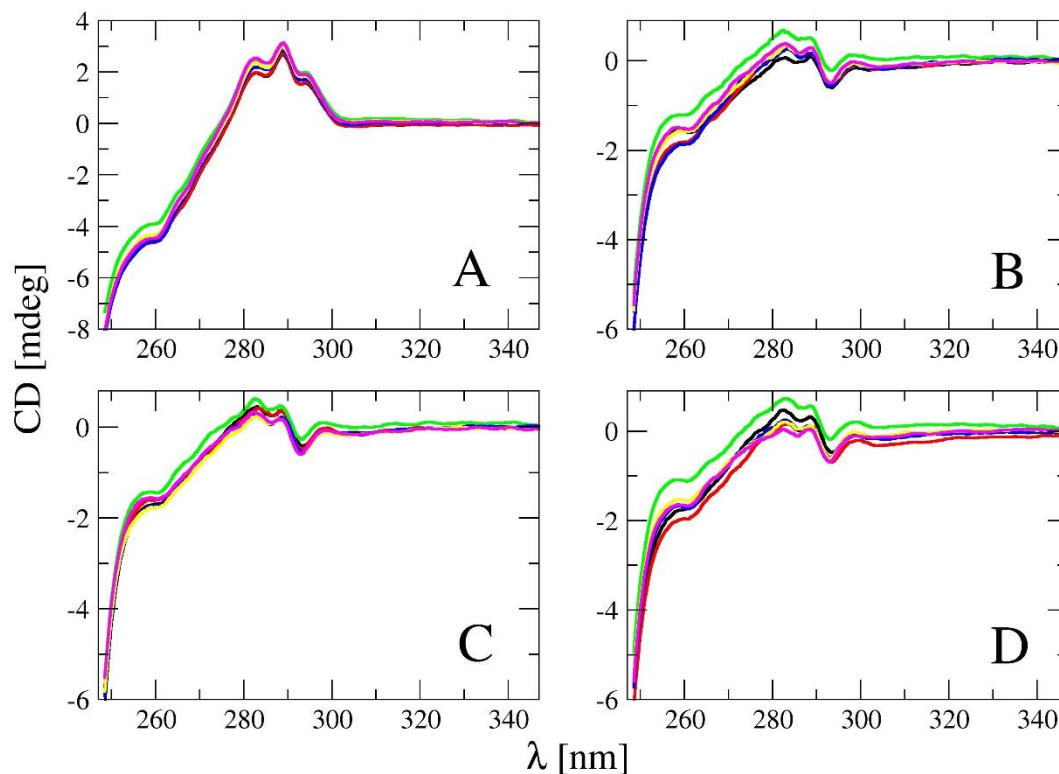
Widma dichroizmu kołowego z zakresu dalekiego ultrafioletu uzyskane dla albuminy, zostały przedstawione na Rysunku 65 natomiast nie zostały poddane dekonwolucji, za pomocą programu BeStSel, gdyż były mierzone od 205 nm, a program nie oferuje takiego zakresu dekonwolucji. Widma poniżej 205 nm nie mogły być rejestrowane przy sile jonowej od 50 mM, gdyż absorbancja była na tyle wysoka (powyżej wartości 8), że rejestracja sygnału CD była niemożliwa.



Rysunek 65. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie dalekiego ultrafioletu: A – 20 μ M BSA + bufor, B – 20 μ M BSA + 6 mM SDS, C – 20 μ M BSA + 20 mM SDS, D – 20 μ M BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy.

Interpretując widma dichroizmu kołowego przedstawione na Rysunku 65 dla albuminy, widać, że efekt siły jonowej wpływający na zmianę w strukturze II-rzędowej białka, jest znacznie mniejszy niż dla 2 poprzednich białek. Siła jonowa w bardzo niewielkim stopniu wpływa na strukturę albuminy, widma się pokrywają, delikatnie odbiega widmo, gdzie siła jonowa roztworu była najwyższa, tj. 250 mM. Podobnie jest dla próbki, gdzie stężenie SDS było najwyższe, widać zmianę w wyglądzie widm dichroizmu kołowego pomiędzy różnymi siłami jonowymi roztworu, jednak zmiany te nie są duże, w istocie obejmują obszar w okolicy 220 nm, co wskazuje, że siła jonowa wpływa na zmianę struktury II-rzędowej albuminy pod wpływem SDS poprzez zmianę głównie zawartości frakcji α -helis.

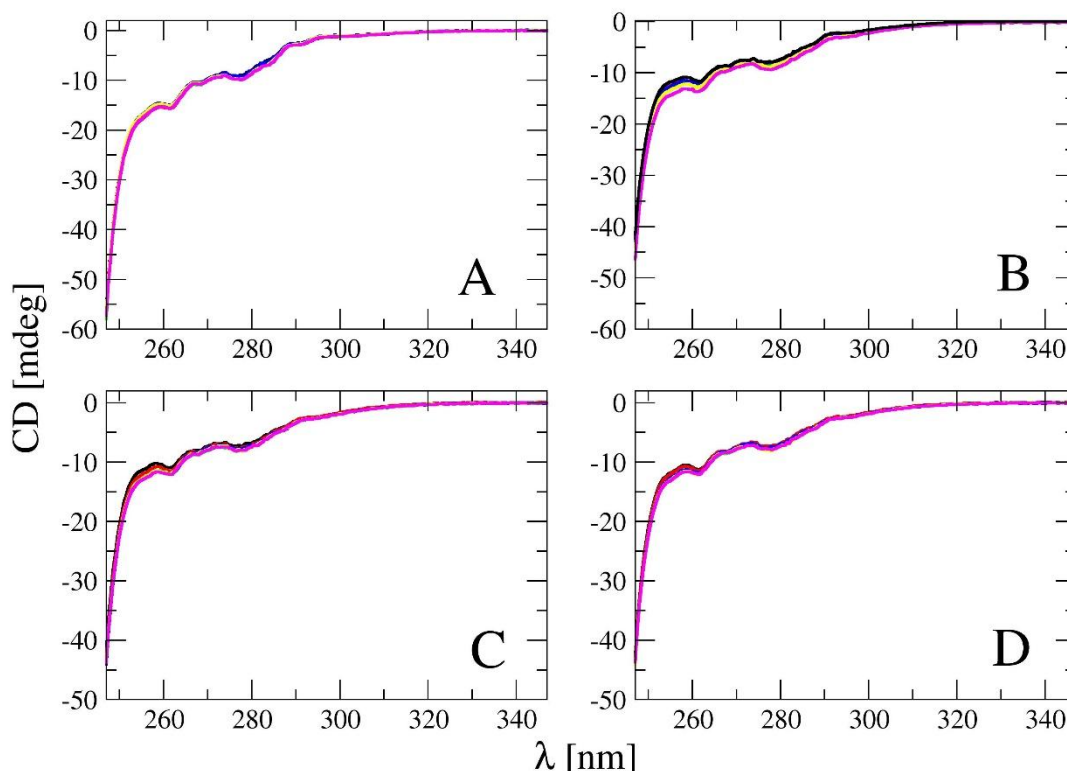
Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla lizozymu, zostały przedstawione na Rysunku 66.



Rysunek 66. Widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie bliskiego ultrafioletu: A – 40 μ M HEWL + bufor, B – 40 μ M HEWL + 6 mM SDS, C – 40 μ M HEWL + 20 mM SDS, D – 40 μ M HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy.

Interpretując widma dichroizmu kołowego lizozymu w zakresie NUV z Rysunku 66, widać, że w przypadku wszystkich próbek, największą zmianę obserwuje się, gdy siła jonowa roztworu wynosi 100 mM. W przeciwieństwie do wyników z zakresu FUV, gdzie siła jonowa 100 mM wywoływała najmniejszą zmianę w strukturze II-rzędowej białka. Pozostałe wartości siły jonowej wywołują zmiany bez większej zależności od jej wartości czy też wartości stężenia SDS. W przypadku czystego lizozymu obserwuje się zmianę wokół reszt tyrozyny i fenyloalaniny, a w przypadku próbek z SDS wokół reszt wszystkich 3 aminokwasów aromatycznych.

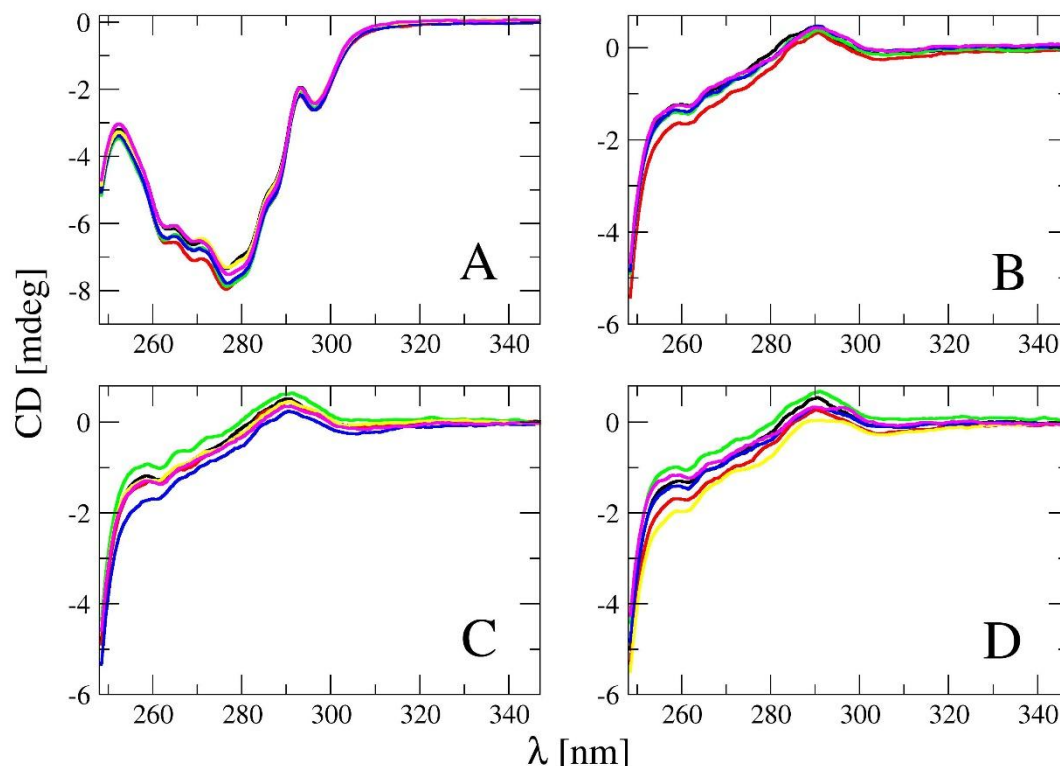
Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla albuminy, zostały przedstawione na Rysunku 67.



Rysunek 67. Widma dichroizmu kołowego albuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu. A – 40 μ M BSA + bufor, B – 40 μ M BSA + 6 mM SDS, C – 40 μ M BSA + 20 mM SDS, D – 40 μ M BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy.

Interpretując widma przedstawione na Rysunku 67 dla albuminy, widać, że podobnie jak to miało miejsce w przypadku pomiarów FUV, siła jonowa w bardzo niewielkim stopniu wpływa na zmiany w strukturze III-rzędowej czystej albuminy – widma pokrywają. W przypadku zmian strukturalnych indukowanych SDS dla próbek, gdzie stężenie wynosiło 10 mM oraz 40 mM, różnicę można zauważyć tylko w okolicy 260 nm, czyli w okolicy reszt fenyloalaniny i to przy najwyższej sile jonowej roztworu 250 mM. W przypadku próbki zawierającej najniższe stężenie SDS, poniżej CMC widać, że widma nie pokrywają się w okolicach wszystkich 3 aminokwasów aromatycznych, czyli siła jonowa wpływa na zmianę struktury III-rzędowej w okolicy tryptofanu, tyrozyny oraz fenyloalaniny, co więcej różnicę widać przy 3 różnych wartościach siły jonowej: 150 mM, 200 mM oraz 250 mM.

Widma dichroizmu kołowego z zakresu bliskiego ultrafioletu uzyskane dla α -laktoalbuminy, zostały przedstawione na Rysunku 68.



Rysunek 68. Widma dichroizmu kołowego α -laktoalbuminy w zakresie bliskiego ultrafioletu: A – 40 μ M LALBA + bufor, B – 40 μ M LALBA + 6 mM SDS, C – 40 μ M LALBA + 20 mM SDS, D – 40 μ M LALBA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor różowy

Interpretując widma umieszczone na Rysunku 68A, widać, że w przypadku roztworu zawierającego czystą α -laktoalbuminę, siła jonowa wpływa na strukturę III-rzędową białka, gdyż widma nie pokrywają się poniżej 290 nm, a o oznacza zmianę struktury w okolicy wszystkich 3 aminokwasów aromatycznych. W przypadku próbki zawierającej stężenie SDS 3 mM (Rysunek 68B) największą zmianę kształtu widma, czyli zmianę struktury III-rzędowej białka, widać przy sile jonowej roztworu wynoszącej 50 mM. Przy pozostałych wartościach siły jonowej 100-250 mM, widma niemalże pokrywają się z tymi w sile jonowej 0 mM, co oznacza brak wpływu na strukturę, którą osiąga białko pod wpływem surfaktantu. W przypadku dwóch pozostałych próbek z wyższymi stężeniami SDS, tj. 10 mM oraz 40 mM, największą zmianę widma widać przy sile jonowej 100 mM. Ponadto różnicę w okolicy wszystkich 3 aminokwasów aromatycznych widać przy wszystkich wartościach siły jonowej w przedziale 150 nm – 250 nm, stąd wniosek, że siła jonowa wpływa na strukturę III-rzędową α -laktoalbuminy, jaką przyjmuje białko pod wpływem oddziaływania z SDS.

Podsumowując widać, że siła jonowa roztworu, w którym bada się oddziaływania SDS z białkami, wpływa na zmianę struktury II– jak i III–rzędowej wszystkich trzech białek. Podobnie jak w poprzednich eksperymentach, nie ma jednej uniwersalnej ścieżki tych zmian. Zależy ona przede wszystkim od danego białka, ale również od samej wartości siły jonowej czy stężenia surfaktantu. W eksperymentach użyto trzech różnych stężeń SDS, poniżej, nieco powyżej oraz znacznie powyżej CMC. Są to wartości dla 10 mM buforu fosforanowym o pH 7 i w temperaturze 25°C, gdzie CMC SDS wynosi $4,61 \pm 0,01$ mM^[66], przy wyższych siłach jonowych należy pamiętać, że CMC jest bardzo wrażliwe na siłę jonową, ponieważ wzrost siły jonowej zmniejsza odpychanie elektrostatyczne między grupami hydrofilowym^[1].

3.2.5. Kinetyka przemian struktury II–rzędowej albuminy, indukowana przez dodecylsiarczan sodu

3.2.5.1. Wpływ stężenia SDS na kinetykę przemian strukturalnych w albuminie

Znając już wpływ zarówno stężenia SDS jak również siły jonowej na zmiany strukturalne zachodzące w albuminie, kolejnym istotnym aspektem, było zbadanie kinetycznych aspektów tych zmian, zarówno w II–rzędowej (detekcja dichroizmu kołowego) jak i III–rzędowej albuminy (detekcja fluorescencji). W tym celu, wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem przystawki stopped–flow przy spektrometrze Chirascan Plus. Wykorzystywany był bufor fosforanowy o pH 7, w stężeniu NaH_2PO_4 3,33 mM oraz Na_2HPO_4 3,45 mM. Końcowe stężenie białka wynosiło 10 μM . Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 26.

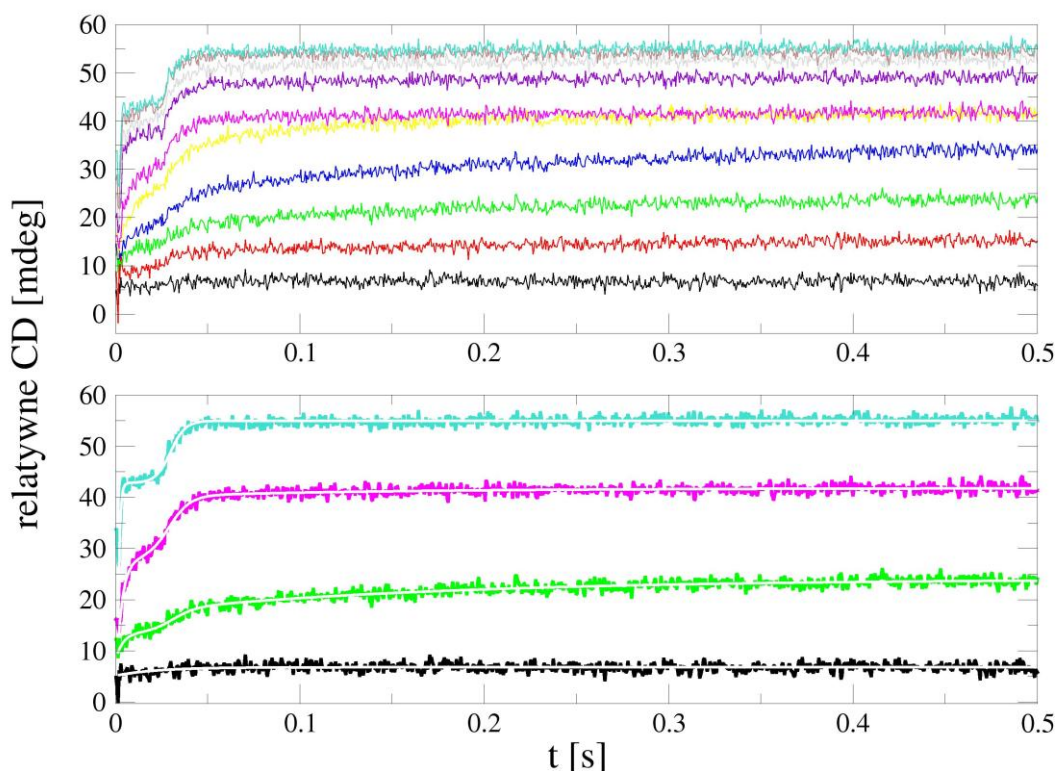
Tabela 26. Lista próbek albuminy (BSA) do pomiarów kinetycznych z detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μM BSA	bufor
2	20 μM BSA	2 mM SDS
3	20 μM BSA	6 mM SDS
4	20 μM BSA	8 mM SDS
5	20 μM BSA	10 mM SDS

6	20 μ M BSA	14 mM SDS
7	20 μ M BSA	16 mM SDS
8	20 μ M BSA	18 mM SDS
9	20 μ M BSA	20 mM SDS
10	20 μ M BSA	40 mM SDS
11	20 μ M BSA	80 mM SDS

Rejestrowane były krzywe postępu reakcji w czasie z jednoczesną detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji. Wybraną długością fali wzbudzenia była wartość 220 nm, została ona wybrana na podstawie pomiarów stacjonarnym w zakresie FUV. Długość drogi optycznej w urządzeniu wynosiła 2 mm. W trakcie pomiarów wykorzystywano filtr odcinający 320 nm (Schott WG 320). Końcowa krzywa postępu reakcji, została uzyskana poprzez uśrednienie 300 skanów. Każdy skan trwał 0,5s. Tak jak to miało miejsce w przypadku eksperymentów kinetycznych α -chymotrypsyny tak i tutaj, aby móc oceniać i analizować wpływ SDS na strukturę białka, należy analizować relatywne krzywe postępu reakcji (od krzywej białko–SDS odejmuje się krzywą białko – bufor).

Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego zostały przedstawione na Rysunku 69.



Rysunek 69. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją dichroizmu kołowego (górny panel) 20 μM BSA + 2 mM SDS – kolor czarny, 20 μM BSA + 6 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM BSA + 10 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM BSA + 12 mM SDS – kolor żółty, 20 μM BSA + 14 mM SDS – kolor różowy, 20 μM BSA + 18 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM BSA + 20 mM SDS – kolor szary, 20 μM BSA + 40 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM BSA + 80 mM SDS – kolor turkusowy oraz (dolny panel) relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją dichroizmu kołowego z dopasowanie funkcji – biały kolor. Wzbudzenie 220 nm.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego umieszczone na Rysunku 69, widać, że widoczny przebieg zaczyna się od niewielkiego spadku fluorescencji (0,0025s). Następnie sygnał zaczyna rosnąć, przy czym, w przypadku próbek, gdzie stężenie SDS wynosi 6 mM lub więcej w obserwowanym przebiegu reakcji pomiędzy albuminą a SDS, można wyróżnić kolejne dwa etapy. W związku z tym, można przypuszczać, że cała reakcja pomiędzy albuminą a SDS ma charakter trzyetapowy, z czego pierwszy w większości zachodzi w czasie martwym urządzenia. Etap ten, może być związany z początkowymi zmianami w strukturze drugorzędowej, np. szybką reorganizacją helis i β -katek po kontakcie białka z SDS. Z przebiegu krzywych postępu reakcji widać, że białko przyjmuje ostateczną strukturę II- rzędową czasie krótszym niż 0,1s. Wszystkie krzywe osiągają plateau.

Do relatywnych krzywych reakcji, za pomocą programu Origin została dopasowana funkcja, w której nie uwzględniono pierwszego etapu, który w znacznej części zachodzi w czasie martwym urządzenia, a uwzględniono dwa kolejne etapy, w pełni widoczne:

$$S(t) = \left(A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + S_1 \right) + \left(A_2 \exp\left(-\left(\frac{t-t_0}{\tau_2}\right) + S_2 \right) \left(0,5 \left(1 + \tanh\left(\frac{t-t_0}{\Delta}\right) \right) \right) \right) \quad (20)$$

gdzie $S(t)$ – sygnał mierzony w czasie, A_1, A_2 – względne amplitudy pierwszego i drugiego etapu reakcji, τ_1, τ_2 – czasy życia pierwszego i drugiego etapu reakcji, S_1, S_2 – wyrazy wolne funkcji eksponencjalnej, t_0 – przesunięcie czasowe przejście między etapami osiąga połowę wartości, Δ – zakres czasu przełączania 1 i 2 etapu reakcji.

W funkcji opisanej równaniem 20 człon $\left(0,5 \left(1 + \tanh\left(\frac{t-t_0}{\Delta}\right) \right) \right)$, to tzw. czynnik modelujący przechodzenie z jednego etapu reakcji do drugiego, gdzie $\tanh$ zmienia wartości od -1 do +1 i w t_0 ma płynne i ciągle przejście (w porównaniu z innymi funkcjami, które mogą modelować włączanie się drugiego etapu). t_0 – to czas w którym rozpoczyna się drugi etap reakcji. Wynika on z faktu, że etap ten nie zaczyna się w punkcie 0 oraz, że może zajść po pierwszym lub w wyniku pierwszego etapu. Gdyby oba etapy były niezależne od siebie, wówczas zaczynałyby się w 0. Parametry S_1, S_2 („offsety”), czyli wartości mierzonego sygnału w stanie ustalonym po zaniku pierwszego i drugiego etapu, określają „poziom końcowy” każdego z nich, co jest równoważne przesunięciu funkcji w pionie. Delta (Δ) informuje o zakresie czasu przejścia z pierwszego etapu do drugiego (jak szeroki jest obszar "współlistnienia" obu procesów), gdy Δ przyjmuje małe wartości, występują szybkie przejścia, gdy duże – wolne. „Małe” i „duże” są względne do skali czasu, w której zachodzi zjawisko, tak więc porównuje się wartości Δ z wartościami czasów życia τ_2 ^[87,88].

W wyniku dopasowania uzyskano dwa zestawy czasów życia τ oraz względnych amplitud A , a także wartości Δ które zostały umieszczone w Tabeli 27.

Tabela 27. Czasy życia, względne amplitudy oraz Δ wraz z błędami zmian zachodzących w strukturze II-rzędowej albuminy w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu Origin z dopasowania do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego, dla próbek: 20 μ M BSA + 2 mM SDS, 20 μ M BSA + 6 mM SDS, 20 μ M BSA + 8 mM SDS, 20 μ M BSA + 10 mM SDS, 20 μ M BSA + 12 mM SDS, 20 μ M BSA + 14 mM SDS, 20 μ M BSA + 16 mM SDS, 20 μ M BSA + 18 mM SDS, 20 μ M BSA + 20 mM SDS, 20 μ M BSA + 40 mM SDS, 20 μ M BSA + 80 mM SDS.

C_{SDS} [mM]	τ_1 [s]	τ_2 [s]	Δ	A_1	A_2
2	0.0228±0.0053*	–	–	-1.6±0.3	–
6	0.0284±0.0020*	–	–	-6.0±0.2	–
8	0.0040±0.0017	0.1623±0.01238	0.0126±0.0029	-5.6±1.1	-5.7±0.2
10	0.0040±0.0014	0.2282±0.01459	0.0179±0.0023	-7.6±1.1	-9.8±0.12
12	0.0054±0.0010	0.1012±0.0056	0.0128±0.0014	-14.9±0.9	-6.5±0.2
14	0.0031±0.0003	0.1313±0.0323	0.0116±0.0010	-27.4±2.3	-1.5±0.2
18	0.0020±0.0001	0.1010±0.0168	0.0069±0.0006	-48.4±3.0	-1.9±0.2
20	0.0033±0.0002	0.0929±0.0140	0.0069±0.0007	-24.8±0.9	-2.3±0.2
40	0.0012±0.0001	0.0116±0.0016	0.0019±0.0005	-116.4±15.5	-5.2±0.8
80	0.0010±0.0001	0.0083±0.0011	0.0024±0.0008	-142.9±27.1	-7.1±1.7

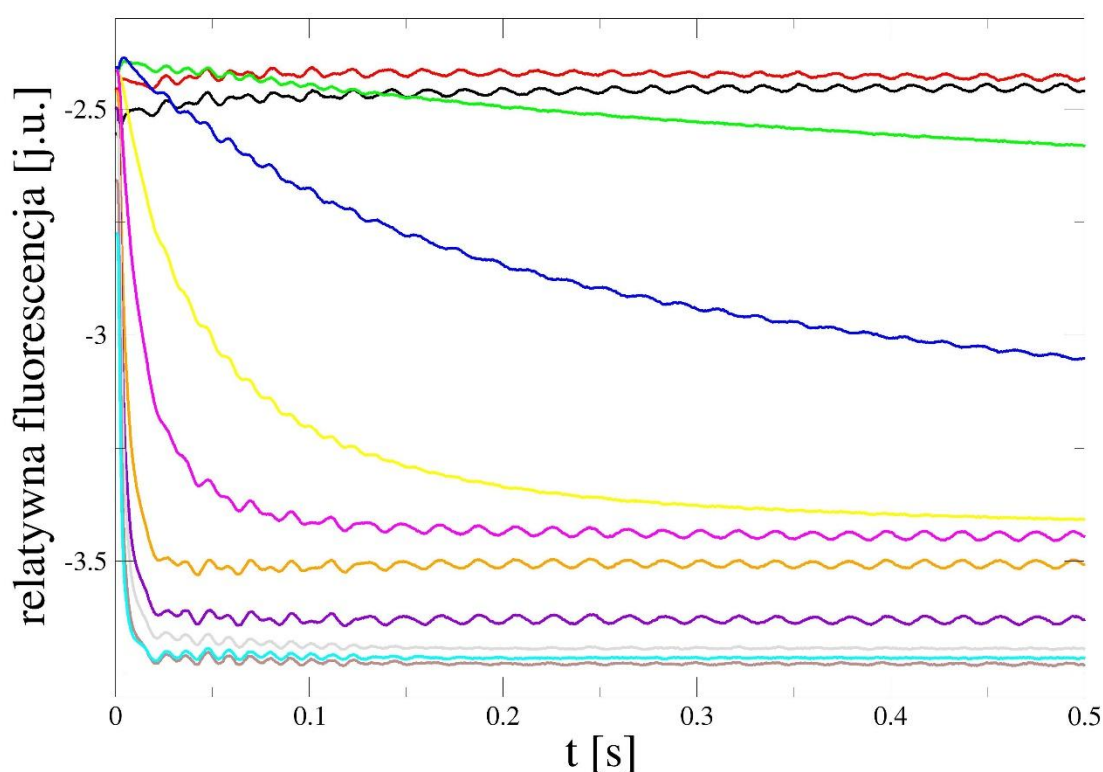
* w przypadku próbek 20 μ M BSA + 2 mM SDS oraz 20 μ M BSA + 6 mM SDS, została dopasowana funkcja posiadająca człon odpowiadający tylko jednemu etapowi $S(t) = \left(A_1 \exp\left(\frac{-t}{\tau_1}\right) + S_1\right)$.

Interpretując uzyskane czasy życia i względne amplitudy, widać, że w analizowanej części reakcji przy stężeniu SDS powyżej 6 mM można wyróżnić dwa etapy, z określonymi czasami życia. Z rzędów wielkości czasów życia τ_1 oraz τ_2 wynika, że pierwszy etap jest znacznie szybszy niż drugi, więc można przypuszczać, że: (1) pierwszy etap reakcji to pośredni i przejściowy etap, obejmujący rearanżację struktury drugorzędowej lub formowanie się stanów pośrednich, (2) drugi może odpowiadać wolniejszym procesom, takim jak pełna reorganizacja lub stabilizacja nowej struktury drugorzędowej. Widać, że stężenie SDS poniżej CMC, gdzie w roztworze występują jedynie pojedyncze cząsteczki SDS (brak miceli) nie występuje pośredni etap osiągania przez albuminę końcowej stabilnej struktury, tylko ostateczna konformacja albuminy jest uzyskiwana w jednym etapie.

Dodatkowo widać, że wraz ze wzrostem stężenia SDS znacznie spada wartość względnej amplitudy pierwszego etapu co prawdopodobnie wynika z faktu, że ma on mniejszy

udział w całkowitym przebiegu. Uzyskane z dopasowania wartości Δ , są mniejsze niż wartości czasów życia τ_2 (o jeden lub dwa rzędy wielkości), co świadczy o tym, że przejścia między etapami są szybkie. Wraz ze wzrostem stężenia SDS wartość Δ maleje, co może świadczyć o tym, że przejścia robią się jeszcze szybsze. Względna amplituda drugiego etapu utrzymuje się na podobnych poziomach w całym zakresie stężeń SDS i wszystkie krzywe osiągają stan równowagi (relaksacji).

Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji zostały przedstawione na Rysunku 70.



Rysunek 70. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją fluorescencji: 20 μM BSA + 2 mM SDS – kolor czarny, 20 μM BSA + 6 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μM BSA + 10 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM BSA + 12 mM SDS – kolor żółty, 20 μM BSA + 14 mM SDS – kolor różowy, 20 μM BSA + 16 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM BSA + 18 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM BSA + 20 mM SDS – kolor szary, 20 μM BSA + 40 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM BSA + 80 mM SDS – kolor turkusowy. Wzbudzenie 220 nm.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji, umieszczone na Rysunku 70 można wyróżnić 3 ścieżki, w zależności od stężenia SDS. Dla próbek zawierających 1 mM oraz 3 mM SDS (poniżej CMC) fluorescencja białka pod wpływem

wiązania pojedynczych cząsteczek surfaktanu zwiększa się, po czym osiąga stan równowagi (krzywa osiąga plateau), co oznacza, że III-rzędowa struktura białka przyjmuje ostateczną formę. Dla próbek o stężeniu SDS 4 mM oraz 5 mM (okolica CMC), widoczny jest inny charakter zmian sygnału fluorescencji – początkowo narasta a następnie spada i w czasie 0,5s nie osiąga plateau, co oznacza, że przyjęta przez białko konformacja nie jest jeszcze końcowa i stabilna. Dla próbek ze stężeniem SDS powyżej 6 mM powyżej (CMC) sygnał fluorescencji białka od razu spada. Widoczna jest zależność – im wyższe stężenie SDS tym szybciej sygnał fluorescencji się wygasza, wszystkie krzywe osiągają plateau, co oznacza, że struktura III-rzędowa, którą przyjmuje albumina w czasie 0,5s pod wpływem SDS, jest strukturą końcową i stabilną.

Podsumowując, stężenie SDS, ma ogromne znaczenie w kontekście zmian strukturalnych w albuminie. Eksperymenty kinetyczne prowadzą do podobnych wniosków na temat stabilności struktury osiąganej przez albuminę pod wpływem SDS jak pomiary stacjonarne. Zmiany widoczne dla stężeń surfaktantu poniżej CMC dowodzą istotnej roli pojedynczych cząsteczek SDS w zmianach konformacyjnych białka. Na podstawie pomiarów kinetycznych z detekcją dichroizmu kołowego, powyżej stężenia SDS 6 mM, czyli powyżej CMC, można przypuszczać, że cała reakcja jest trzyetapowa, z czego pierwszy etap w większości zachodzi w czasie martwym urządzenia, dwa kolejne są w pełni widoczne w krzywych przebiegu reakcji – widać dobrze rozdzieloną relaksacyjnie, dwufazowość przebiegu.

3.2.5.2. Wpływ siły jonowej na kinetykę przemian strukturalnych w albuminie

Kolejną istotną kwestią wartą uwagi, były aspekty kinetyczne zmian strukturalnych albuminie, przy różnych wartościach siły jonowej roztworu. Niejednokrotnie już w tej pracy podkreślono, jak istotną kwestię odgrywa ten parametr w oddziaływaniach białko-SDS. Wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem przystawki stopped-flow przy spektrometrze Chirascan Plus, w celu zbadania czy siła jonowa roztworu wpływa na kinetykę zmian zachodzących w strukturze II-rzędowej (detekcja dichroizmu kołowego) i III-rzędowej albuminy (detekcja fluorescencji). Wykorzystywany był bufor fosforanowy o pH 7, w stężeniu NaH_2PO_4 3,33 mM oraz Na_2HPO_4 3,45 mM. Końcowe stężenie białka wynosiło 10 μM a SDS 7 mM. Wybrane końcowe stężenie SDS, nie było przypadkowe. Jak pokazują wyniki w podrozdziale 3.4.5.2, przy stężeniu SDS powyżej 6 mM obserwuje się dwuetapowość tworzenia ostatecznej stabilnej struktury II-rzędowej albuminy. Stąd dodatkowym celem tego eksperymentu było sprawdzenie, czy siła jonowa będzie miała wpływ na etapowość zmian struktury. Eksperymenty przeprowadzono przy 10 różnych siłach jonowych rozpuszczalnika: 0

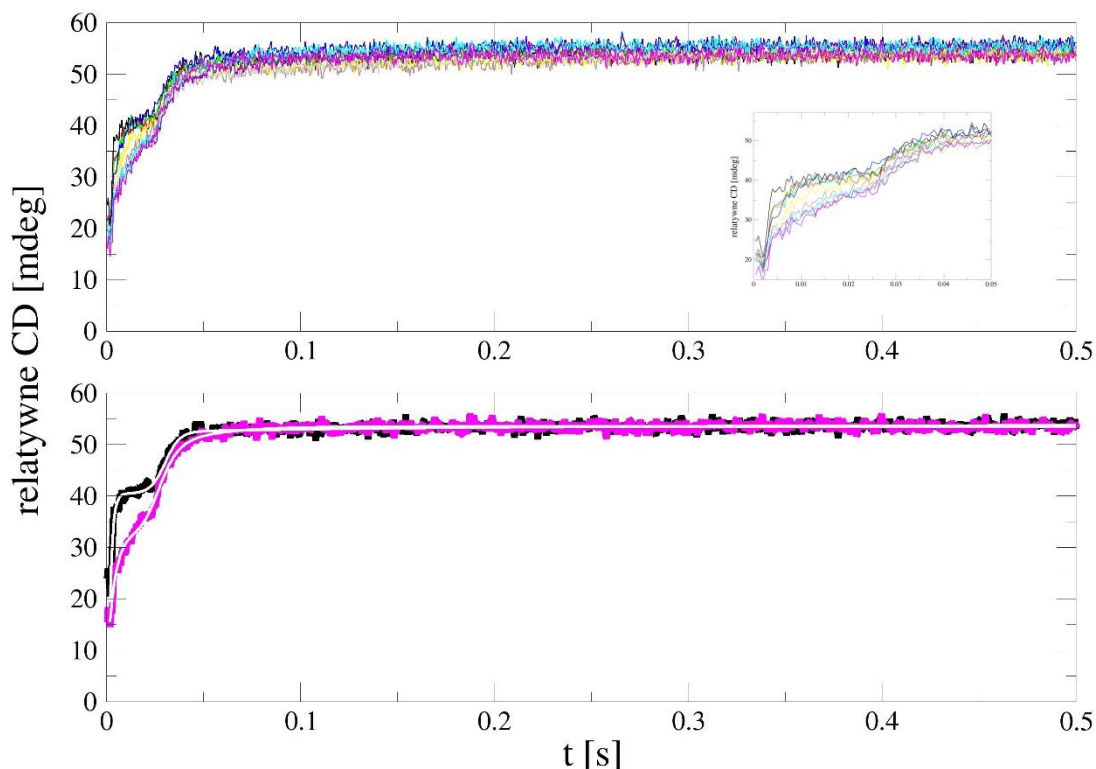
mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM oraz 300 mM. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 28.

Tabela 28. Lista próbek albuminy (BSA) do pomiarów kinetycznych z detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M BSA	bufor
2	20 μ M BSA	14 mM SDS

Rejestrowane były krzywe postępu reakcji w czasie z jednoczesną detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji. Wybraną długością fali wzbudzenia była wartość 220 nm. Długość drogi optycznej w urządzeniu wynosiła 2 mm. W trakcie pomiarów wykorzystywano filtr odcinający 320 nm (Schott WG 320). Końcowa krzywa postępu reakcji, została uzyskana poprzez uśrednienie 300 skanów. Każdy skan trwał 0,5s. Analizowano relatywne krzywe postępu reakcji.

Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego zostały przedstawione na Rysunku 71.



Rysunek 71. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją dichroizmu kołowego (górny panel) 20 μ M BSA + 14 mM SDS w sile jonowej 0 mM – kolor czarny, 10 mM – kolor czerwony, 20 mM – kolor zielony, 30 mM – kolor niebieski, 50 mM – kolor żółty, 75 mM – kolor brązowy, 100 mM – kolor szary, 150 mM – kolor fioletowy, 200 mM – kolor turkusowy, 300 mM – kolor różowy oraz (dolny panel) relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją dichroizmu kołowego z dopasowanie funkcji – kolor biały. Wzbudzenie 220 nm.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego (Rysunek 71), można uznać, że wszystkie krzywe, po czasie ok. 50ms się pokrywają. Może to świadczyć o tym, że niezależnie od wartości siły jonowej roztworu, przy stężeniu SDS 7mM, końcowa, stabilna struktura II-rzędowa jaką przyjmuje albumina nie zależy od siły jonowej roztworu. Podobnie jak w przypadku krzywych z podrozdziału 3.2.5.1 można przypuszczać, że cała reakcja jest trzyetapowa a pierwszy etap ponownie w większości zachodzi w czasie martwym urządzenia. Natomiast to, co jest bardziej interesujące, to obserwacja, że, chociaż przejście z drugiego do trzeciego etapu reakcji (oba etapy są w pełni widoczne w przebiegach krzywych reakcji) dla każdej siły jonowej zachodzi w takim samym czasie, to wraz ze wzrostem siły jonowej staje się ono coraz mniej ostre i wyraźne.

Do relatywnych krzywych reakcji, za pomocą programu Origin została dopasowana funkcja, zgodnie z równaniem 20. Podobnie jak w poprzednim podrozdziale, w funkcji nie

uwzględniono pierwszego etapu, który w znacznej części zachodzi w czasie martwym urządzenia, a uwzględniono dwa kolejne – w pełni widoczne.

W wyniku dopasowania uzyskano dwa zestawy czasów życia τ oraz względnych amplitud A , a także wartości Δ które zostały umieszczone w Tabeli 29.

Tabela 29. Czasy życia wraz z błędami zmian zachodzących w strukturze II-rzędowej albuminy w funkcji stężenia SDS, uzyskane za pomocą programu Origin z dopasowania do relatywnych krzywych postępu reakcji z detekcją dichroizmu kołowego, dla próbki 20 μ M BSA + 14 mM SDS, w siłach jonowych: 0 mM, 10 mM, 20 mM, 30 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM.

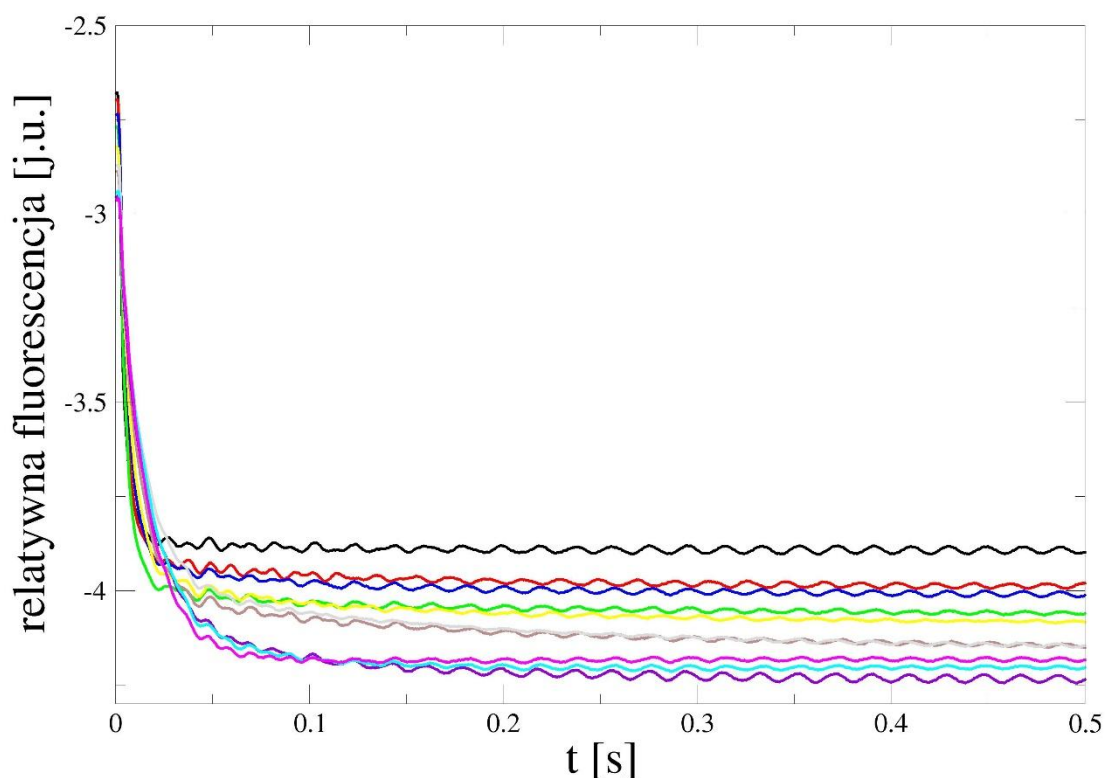
$I_{\text{roztworu}} [\text{mM}]$	$\tau_1 [\text{s}]$	$\tau_2 [\text{s}]$	Δ	A_1	A_2
0	0.0014 $\pm$ 0.0001	0.1598 $\pm$ 0.0460	0.0074 $\pm$ 0.0005	-83.9 $\pm$ 9,0	-1.3 $\pm$ 0.1
10	0.0022 $\pm$ 0.0001	0.0796 $\pm$ 0.0080	0.0064 $\pm$ 0.0005	-55.4 $\pm$ 3,7	-2.9 $\pm$ 0.2
20	0.0027 $\pm$ 0.0002	0.1197 $\pm$ 0.0143	0.0085 $\pm$ 0.0006	-43.4 $\pm$ 2,7	-2.7 $\pm$ 0.1
30	0.0034 $\pm$ 0.0002	0.0906 $\pm$ 0.0090	0.0083 $\pm$ 0.0007	-38.4 $\pm$ 1,9	-3.1 $\pm$ 0.2
50	0.0036 $\pm$ 0.0002	0.1456 $\pm$ 0.0136	0.0088 $\pm$ 0.0007	-36.4 $\pm$ 1,7	-3.7 $\pm$ 0.1
75	0.0044 $\pm$ 0.0004	0.2212 $\pm$ 0.0213	0.0087 $\pm$ 0.0007	-26.8 $\pm$ 1,3	-5.2 $\pm$ 0.1
100	0.0031 $\pm$ 0.0003	0.1879 $\pm$ 0.0131	0.0124 $\pm$ 0.0007	-27.9 $\pm$ 2,1	-6.1 $\pm$ 0.1
150	0.0045 $\pm$ 0.0005	0.0764 $\pm$ 0.0038	0.0097 $\pm$ 0.0007	-24.3 $\pm$ 1,2	-6.2 $\pm$ 0.2
200	0.0060 $\pm$ 0.0007	0.0418 $\pm$ 0.0025	0.0071 $\pm$ 0.0007	-23.4 $\pm$ 0,9	-6.5 $\pm$ 0.4
300	0.0037 $\pm$ 0.0004	0.0237 $\pm$ 0.0040	0.0095 $\pm$ 0.0009	-28,3 $\pm$ 1,7	-4.8 $\pm$ 1.2

Interpretując uzyskane czasy życia i względne amplitudy, widać, że w analizowanej części reakcji można wyróżnić dwa etapy. Z rzędów wielkości czasów życia τ_1 oraz τ_2 wynika, podobnie jak w poprzednim podrozdziale, że pierwszy etap reakcji to pośredni i przejściowy etap, obejmujący rearanżację struktury drugorzędowej lub formowanie się stanów pośrednich, a drugi może odpowiadać wolniejszym procesom, takim jak pełna reorganizacja lub stabilizacja nowej struktury drugorzędowej.

Dodatkowo widać, że wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu rośnie względna amplituda pierwszego etapu reakcji, co może świadczyć o tym, że ma on większy udział w całkowitym przebiegu reakcji. Względna amplituda drugiego etapu utrzymuje się na

podobnych poziomie w całym zakresie stężeń SDS i wszystkie krzywe osiągają stan równowagi (relaksacji). Uzyskane z dopasowania wartości Δ są mniejsze (o jeden lub dwa rzędy wielkości) niż wartości czasów życia τ_2 , co świadczy o szybkich przejściach z pierwszego do drugiego etapu.

Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji zostały przedstawione na Rysunku 72.



Rysunek 72. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją fluorescencji: 20 μM BSA + 14 mM SDS w sile jonowej 0 mM – kolor czarny, 10 mM – kolor czerwony, 20 mM – kolor zielony, 30 mM – kolor niebieski, 50 mM – kolor żółty, 75 mM – kolor brązowy, 100 mM – kolor szary, 150 mM – kolor fioletowy, 200 mM – kolor turkusowy, 300 mM – kolor różowy. Wzbudzenie 220 nm.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji, pokazane na Rysunku 72, widać, że struktura III-rzędowa albuminy, którą przyjmuje białko w wyniku oddziaływania z SDS, silnie zależy od siły jonowej roztworu. Wszystkie krzywe osiągają plateau po czasie ok. 0,1s co oznacza, że przyjęte struktury III-rzędowe przez albuminę we wszystkich siłach jonowych roztworu, są strukturami stabilnymi. Dla wszystkich wartości siły jonowej widać spadek sygnału fluorescencji, a wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu reakcja

między białkiem a SDS zachodzi szybciej, czyli białko szybciej osiąga końcową, stabilną strukturę. Natomiast dla każdej wartości siły jonowej, końcowa struktura albuminy jest inna.

Podsumowując, można stwierdzić, że w przypadku albuminy, siła jonowa, wpływa na przebieg reakcji zmian konformacyjnych zachodzących w białku pod wpływem oddziaływania z SDS. W zależności, czy obserwuje się wpływ siły jonowej poprzez detekcję dichroizmu kołowego czy fluorescencji, widać różne aspekty zmian. Ponadto, wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu przejście pomiędzy drugim a trzecim etapem reakcji staje się mniej ostre i wyraźne. Obserwując zmiany poprzez detekcję dichroizmu kołowego można przypuszczać, że cała reakcja jest trzyetapowa a pierwszy etap w większości zachodzi w czasie martwym urządzenia.

3.2.6. Wpływ dodecylsiarczanu sodu na widma fluorescencji lizozymu i albuminy

Jak już zaobserwowano wcześniej, fluorescencja przynosi wiele cennych informacji na temat zmian konformacyjnych zachodzących w białkach. Wykonano serię eksperymentów z wykorzystaniem spektrofлуorymetru Cary Eclipse firmy Agilent Technologies, celem weryfikacji wpływu dodecylsiarczanu sodu na fluorescencję lizozymu oraz albuminy. Ponadto zbadano wpływ siły jonowej roztworu na fluorescencję białek. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Końcowe stężenie białka wynosiło 10 μM. Eksperymenty przeprowadzono przy 6 różnych siłach jonowych rozpuszczalnika: 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM oraz 250 mM. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 30.

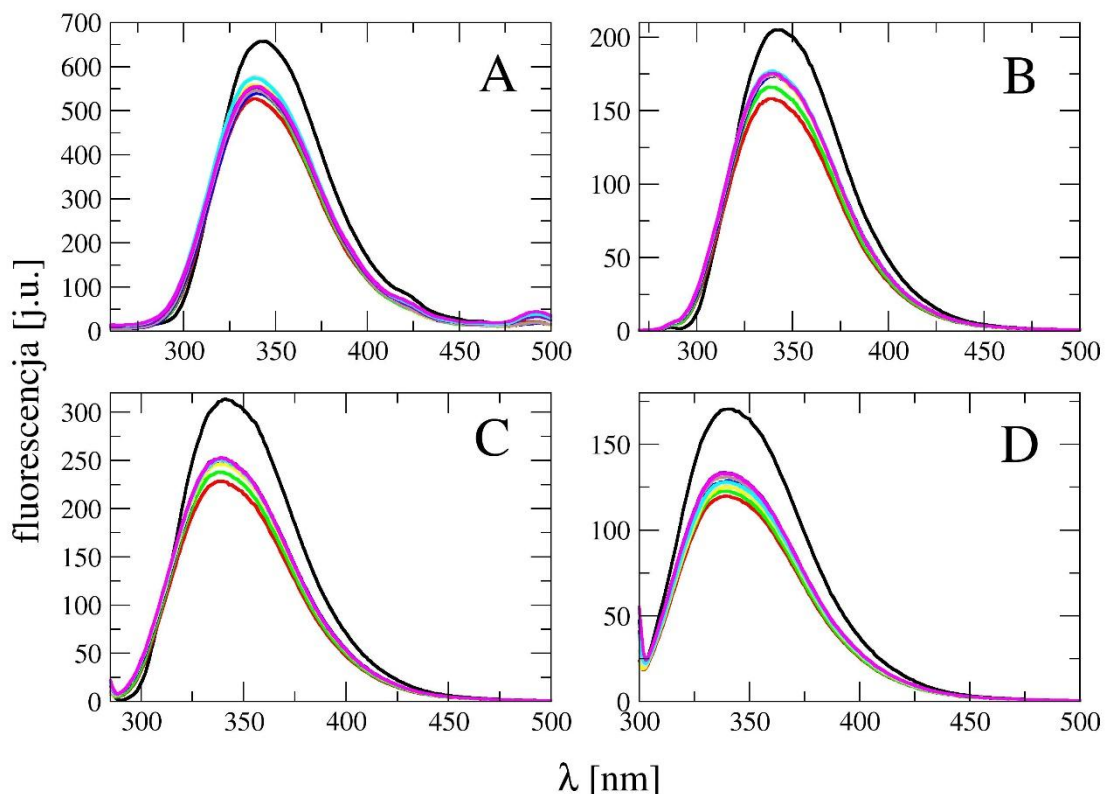
Tabela 30. Lista próbek albuminy (BSA) i lizozymu (HEWL) do pomiarów widm fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μM białka	bufor
2	20 μM białka	4 mM SDS
3	20 μM białka	8 mM SDS
4	20 μM białka	12 mM SDS
5	20 μM białka	16 mM SDS

6	20 μ M białka	20 mM SDS
7	20 μ M białka	40 mM SDS
8	20 μ M białka	60 mM SDS
9	20 μ M białka	80 mM SDS
10	20 μ M białka	100 mM SDS

Rejestrowane były widma fluorescencji. Wybrano cztery długości fali wzbudzenia: 208 nm, 260 nm, 280 nm oraz 295 nm dla lizozymu oraz 220 nm, 260 nm, 280 nm oraz 295 nm dla albuminy. Długości fali wzbudzenia zostały wybrane na podstawie widm dichroizmu kołowego, nie stosowano filtra odcinającego. Długość drogi optycznej zarówno na wzbudzeniu jak i na emisji wynosiła 10 mm. Każde widmo, było pojedynczym skanem rejestrowane z szybkością 30 nm/min, skorygowane o widmo buforu.

Widma fluorescencji lizozymu w zerowej sile jonowej, zostały przedstawione na Rysunku 73.

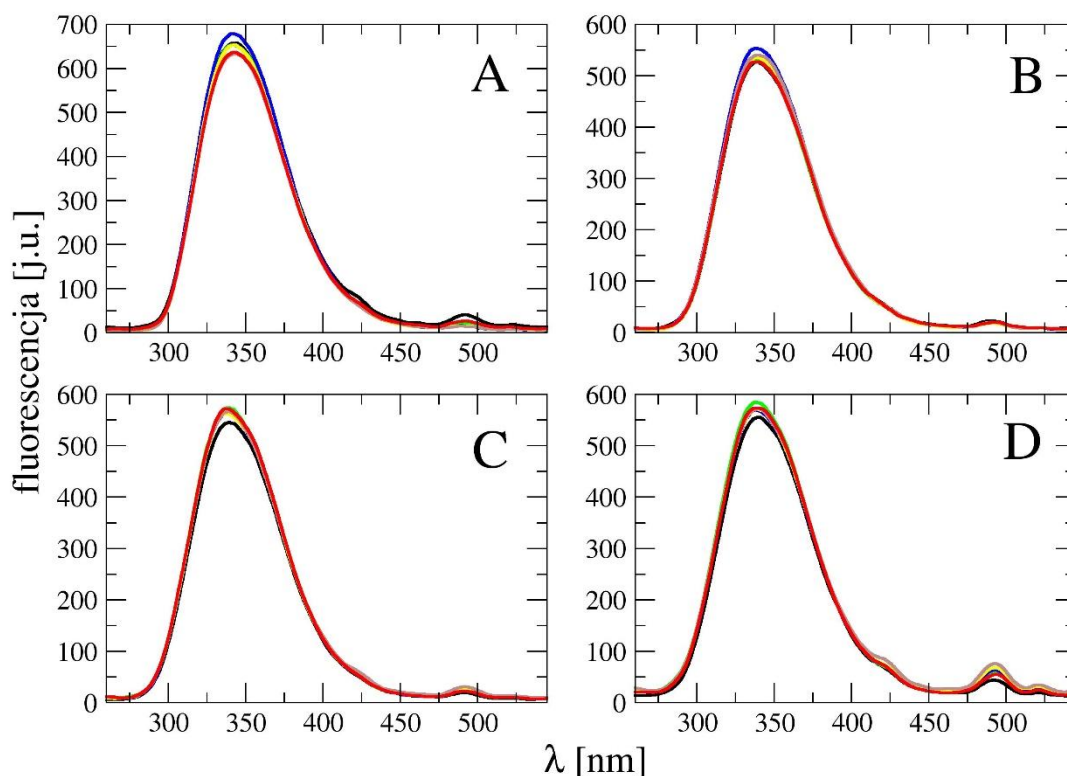


Rysunek 73. Widma fluorescencji lizozymu w zerowej sile jonowej: 20 μ M HEWL + bufor – kolor czarny, 20 μ M HEWL + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M HEWL + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M HEWL + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M HEWL + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M HEWL + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M HEWL + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M HEWL + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M HEWL + 80 mM SDS – kolor turkusowy, 20 μ M HEWL + 100 mM SDS – kolor różowy. A – wzbudzenie 208 nm, B – 260 nm, C – 280 nm, D – 295 nm.

Interpretując widma fluorescencji lizozymu umieszczone na Rysunku 73 widać, że dla wszystkich 4 wzbudzeń, dodanie do roztworu białka roztworu SDS, niezależnie od jego stężenia powoduje wygaszanie fluorescencji. Największą zmianę w sygnale powoduje SDS w stężeniu najniższym, zaś najmniejszą w najwyższym – dla wszystkich 4 wzbudzeń. Ponadto, obserwuje się nie tylko spadek intensywności emisji, ale również przesunięcie maksimum w kierunku krótszych fal, co jest charakterystyczne dla białek posiadających naturalny fluofoor – tryptofan, którego fluorescencja zależy od otoczenia. W tym przypadku tryptofan zmienia otoczenie na bardziej hydrofobowe, co z kolei oznacza, że dochodzi do zmian konformacyjnych białka w jego otoczeniu. Wzbudzenie 295 nm pozwala selektywnie wzbudzać tryptofany w białku, stąd przy tej długości fali wzbudzenia można analizować otoczenie tryptofanu. W lizozymie występują również dwa pozostałe aminokwasy aromatyczne tyrozyna i

fenyloalanina, które również są naturalnymi fluoroforami, zmiany w intensywności emisji informują, że te aminokwasy również zmieniają swoje położenie w białku, czyli to również dostarcza informację na temat zmian konformacyjnych zachodzących w białku w pobliżu tych aminokwasów aromatycznych. W przypadku tych aminokwasów, nie da się ich selektywnie wzbudzać, dlatego dla wzbudzeń 222, 260 oraz 280 nm obserwuje się sygnał pochodzący od wszystkich aminokwasów aromatycznych.

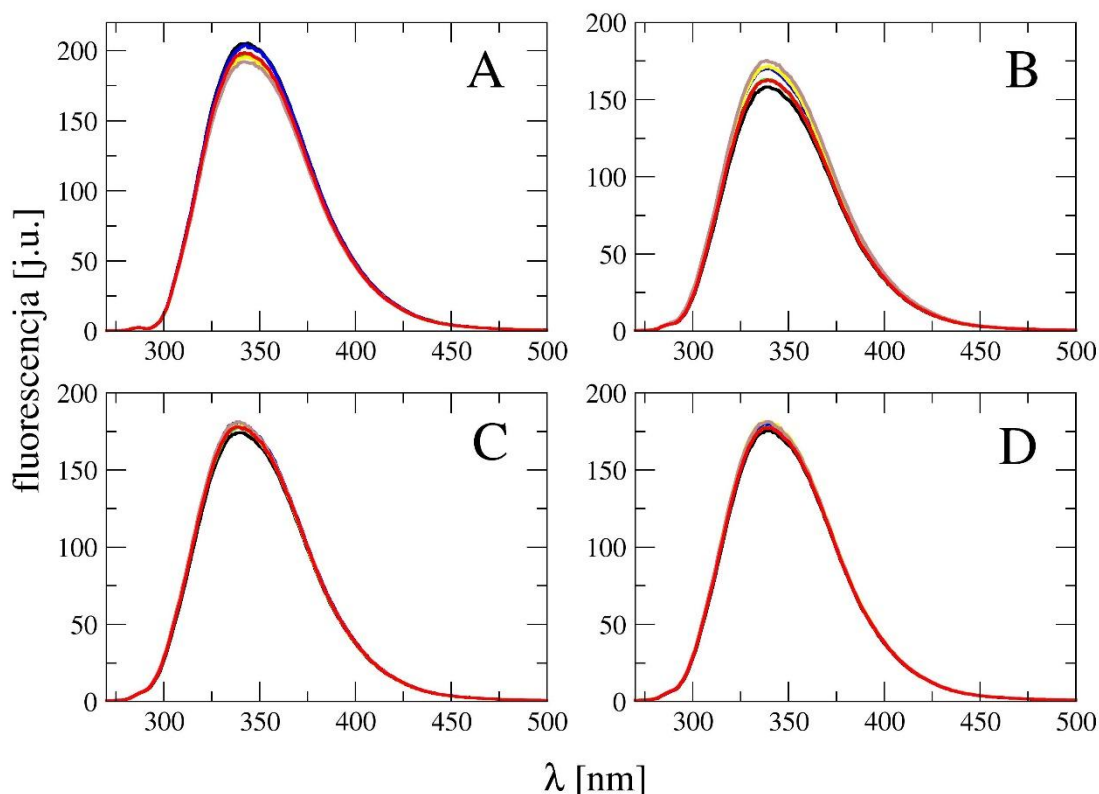
Widma fluorescencji lizozymu dla wybranych 4 próbek przy wzbudzeniu 208 nm we wszystkich siłach jonowych zostały przedstawione na Rysunku 74, dla wzbudzenia 260 nm – na Rysunku 75, dla wzbudzenia 280 nm – na Rysunku 76 a dla wzbudzenia 295 nm – na Rysunku 77. Widma dla pozostałych próbek zostały umieszczone w rozdziale 6, na Rysunkach D6 – D9.



Rysunek 74. Widma fluorescencji lizozymu: A – 20 μ M HEWL + bufor, B – 20 μ M HEWL + 4 mM SDS, C – 20 μ M HEWL + 20 mM SDS, D – 20 μ M HEWL + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 208 nm.

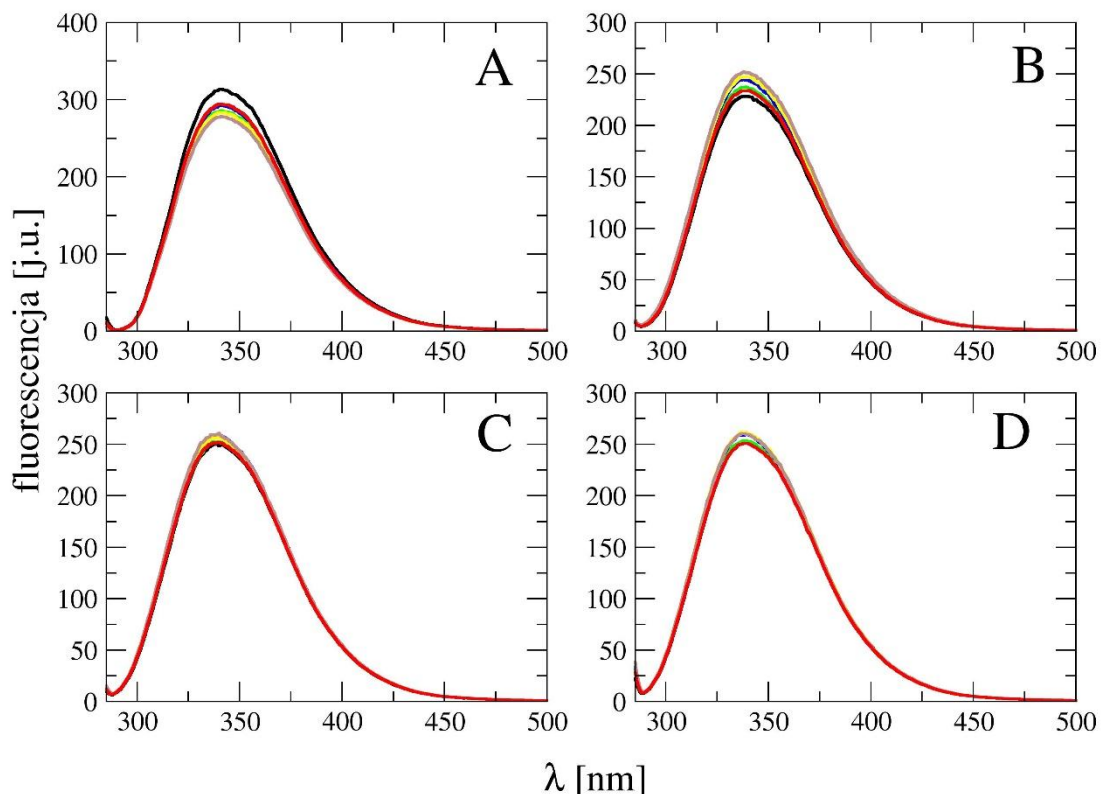
Interpretując widma lizozymu umieszczone na Rysunkach 74 – 77 oraz D6 – D9 widać, że w zależności od wartości, siła jonowa może powodować, ale nie musi zmianę intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji (spadek lub wzrost). W przypadku różnych stężeń SDS (powyżej i poniżej CMC) nie ma regularnej zależności intensywności fluorescencji od wartości siły jonowej – są to mocno nieregularne efekty.

Na Rysunku 74 (wzbudzenie 208 nm) przedstawiono przykładowe 4 próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji – i tak w przypadku próbki bez SDS (Rysunek 74A), jedynie siła jonowa o wartości 150 mM powoduje wzrost intensywności fluorescencji w maksimum, a przy jej pozostałych wartościach spadek. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 74B) jedynie siła jonowa 50 mM nie zmienia intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, przy pozostałych wartościach obserwuje się wzrost sygnału – przy czym najwyższy wzrost występuje przy wartości siły jonowej 150 mM. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 74C) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji a widma pokrywają się. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest znacznie powyżej CMC (Rysunek 74D) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma pokrywają się, z wyjątkiem widma, gdzie siła jonowa wynosiła 100 mM (widać, że sygnał jest wyższy).



Rysunek 75. Widma fluorescencji lizozymu: A – 20 μM HEWL + bufor, B – 20 μM HEWL + 4 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 20 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 260 nm.

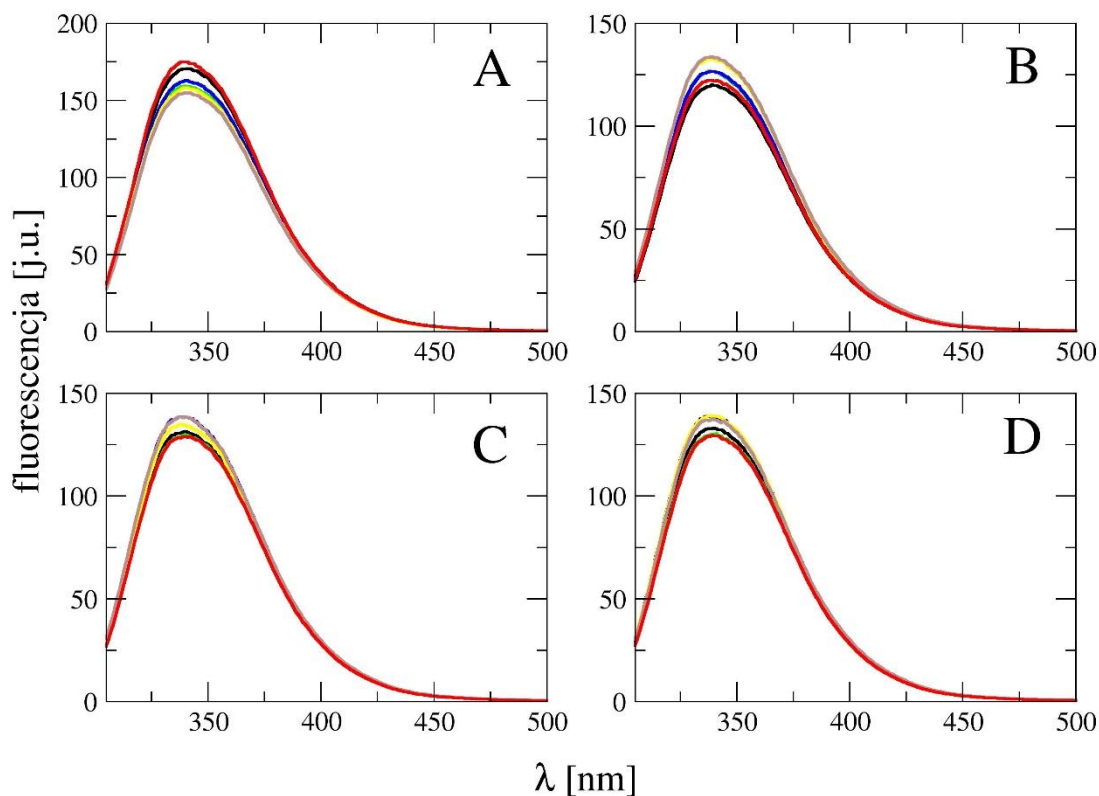
Na Rysunku 75 (wzbudzenie 260 nm) przedstawiono przykładowe 4 próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji – i tak w przypadku próbki bez SDS (Rysunek 75A), przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się spadek intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, natomiast widma nie pokrywają się, co oznacza, że przy różnych wartościach siły jonowej jest różny wpływ na zmianę struktury białka. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 75B) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma również się nie pokrywają. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 75C) obserwuje się niewielki wzrost intensywności fluorescencji dla próbek, w których siła jonowa wynosiła 50 mM i więcej (widma pokrywają się) w porównaniu do próbki w zerowej sile jonowej. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest znacznie powyżej CMC (Rysunek 75D) zachowanie widm jest takie samo jak dla poprzedniej próbki, natomiast wzrost intensywności fluorescencji jest jeszcze mniejszy.



Rysunek 76. Widma fluorescencji lizozymu: A – 20 μM HEWL + bufor, B – 20 μM HEWL + 4 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 20 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 280 nm.

Na Rysunku 76 (wzbudzenie 280 nm) przedstawiono przykładowe 4 próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji, dla próbki bez SDS (Rysunek 76A) wnioski są podobne jak w przypadku wzbudzenia 260 nm. Przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się spadek intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, natomiast widma nie pokrywają się, co oznacza, że przy różnych wartościach siły jonowej jest różny wpływ na strukturę białka. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 76B) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma również się nie pokrywają. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 76C) obserwuje się niewielki wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji przy wszystkich wartościach siły jonowej, widma nie pokrywają się. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest znacznie powyżej CMC (Rysunek 76D) jest podobnie jak dla poprzedniej próbki obserwuje się niewielki

wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji przy wszystkich wartościach siły jonowej, widma nie pokrywają się.

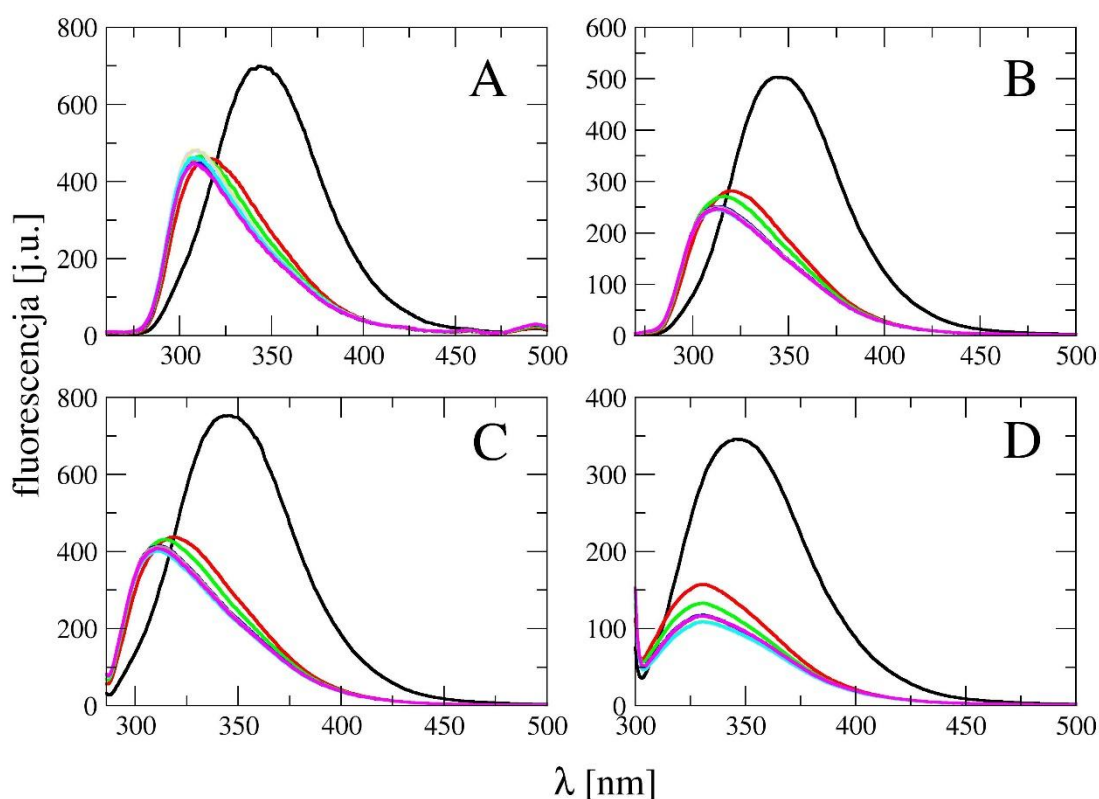


Rysunek 77. Widma fluorescencji lizozymu: A – 20 μM HEWL + bufor, B – 20 μM HEWL + 4 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 20 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 295 nm.

Na Rysunku 77 (wzbudzenie 295 nm) przedstawiono przykładowe 4 próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji – i tak w przypadku próbki bez SDS (Rysunek 77A), dla siły jonowej 50 mM obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, natomiast we wszystkich pozostałych – spadek. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 77B) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma również się nie pokrywają. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 77C) obserwuje się niewielki wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji przy wszystkich wartościach siły jonowej, widma nie pokrywają się. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest znacznie powyżej CMC (Rysunek 77D) jest podobnie

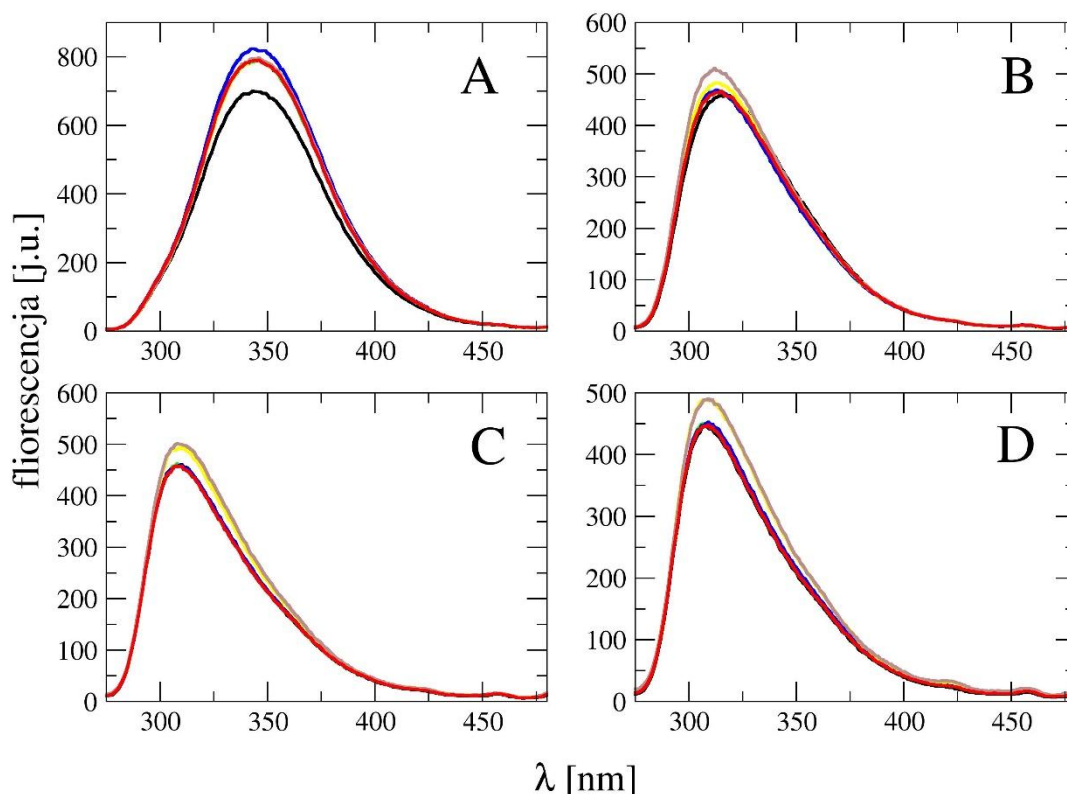
jak dla poprzedniej próbki, a mianowicie obserwuje się jeszcze mniejszy wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji przy wszystkich wartościach siły jonowej, i widma również nie pokrywają się.

Widma fluorescencji albuminy w zerowej sile jonowej, zostały przedstawione na Rysunku 78.



Rysunek 78. Widma fluorescencji albuminy w zerowej sile jonowej: 20 μ M BSA + bufor – kolor czarny, 20 μ M BSA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M BSA + 8 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M BSA + 12 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M BSA + 16 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M BSA + 20 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M BSA + 40 mM SDS – kolor szary, 20 μ M BSA + 60 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M BSA + 80 mM SDS – kolor turkusowy, 20 μ M BSA + 100 mM SDS – kolor różowy. A – wzbudzenie 220 nm, B – 260 nm, C – 280 nm, D – 295 nm.

Widma fluorescencji albuminy dla wybranych 4 próbek przy wzbudzeniu 220 nm we wszystkich siłach jonowych zostały przedstawione na Rysunku 79 dla wzbudzenia 260 nm – na Rysunku 80, dla wzbudzenia 280 nm – na Rysunku 81 a dla wzbudzenia 295 nm – na Rysunku 82. Widma dla pozostałych próbek zostały umieszczone w rozdziale 6, na Rysunkach D10 – D13.

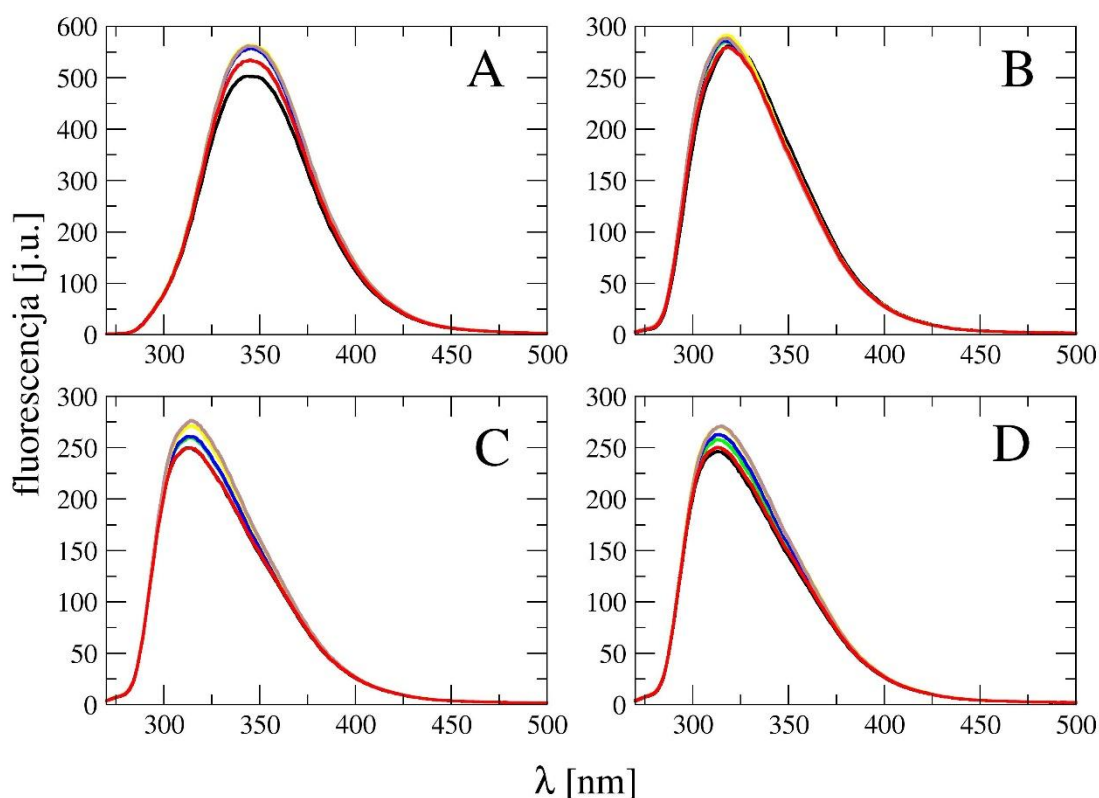


Rysunek 79. Widma fluorescencji albuminy: A – 20 μM BSA + bufor, B – 20 μM BSA + 4 mM SDS, C – 20 μM BSA + 20 mM SDS, D – 20 μM BSA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 220 nm.

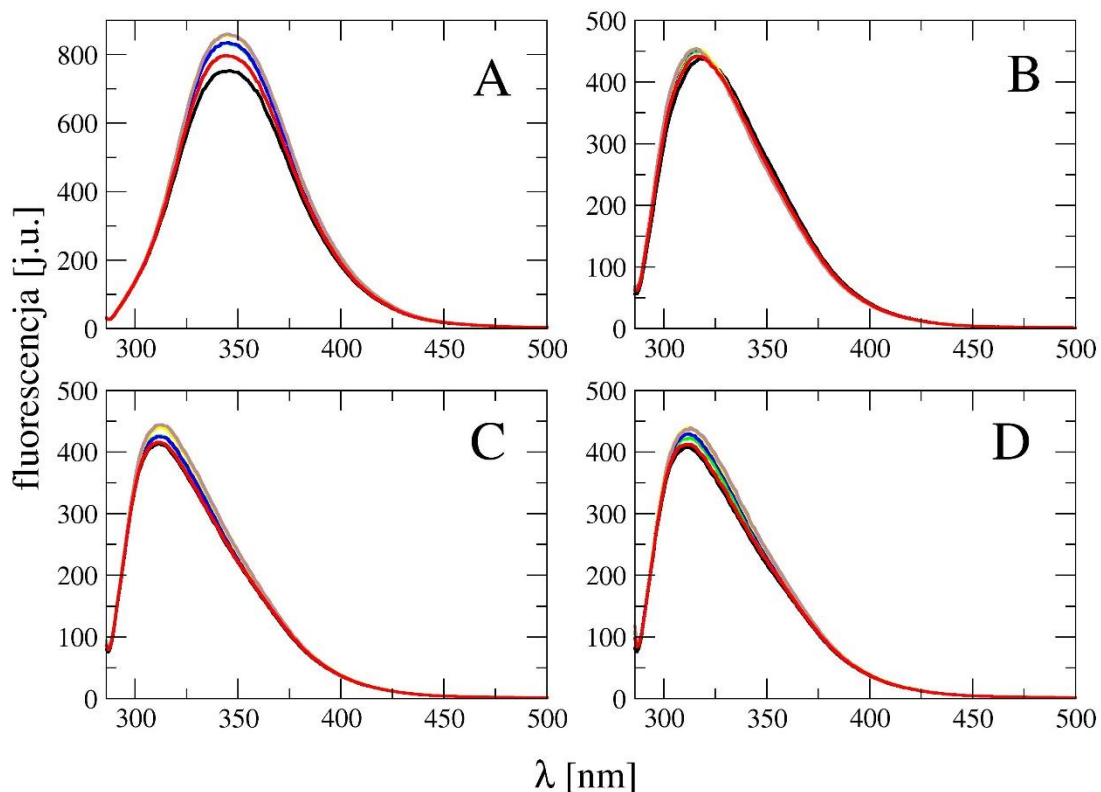
Interpretując widma albuminy umieszczone na Rysunkach 79 – 82 oraz D10 – D13 widać, że podobnie jak w przypadku lizozymu w zależności od wartości siły jonowej może ona powodować, ale nie musi, zmianę intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji (spadek lub wzrost), natomiast, przy wzbudzeniach 220 nm, 260 nm oraz 280 nm, gdy stężenie SDS jest poniżej CMC obserwuje się dodatkowo przesunięcie widma w kierunku krótszych długości fali. Zatem można wysunąć wniosek, że siła jonowa wpływa na zmiany konformacyjne zachodzące w białku, pod wpływem SDS. I tak jak dla lizozymu, dla albuminy również w przypadku różnych stężeń SDS (powyżej/poniżej CMC) nie ma żadnej szczególnie widocznej zależności między wzrostem, spadkiem lub brakiem intensywności fluorescencji w maksimum a wartością siły jonowej.

Na Rysunku 79 (wzbudzenie 220 nm) przedstawiono przykładowe 4 próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji – w przypadku próbki bez SDS

(Rysunek 79A), przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma pokrywają się z wyjątkiem siły jonowej o wartości 150 mM. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 79B) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji oraz przesunięcie w kierunku krótszych długości fal. W przypadku próbek gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 79C oraz 79D) dla sił jonowych w zakresie 0 – 150 mM nie dochodzi do żadnej zmiany sygnału natomiast w przypadku sił jonowych 200 oraz 250 mM, widać wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji.



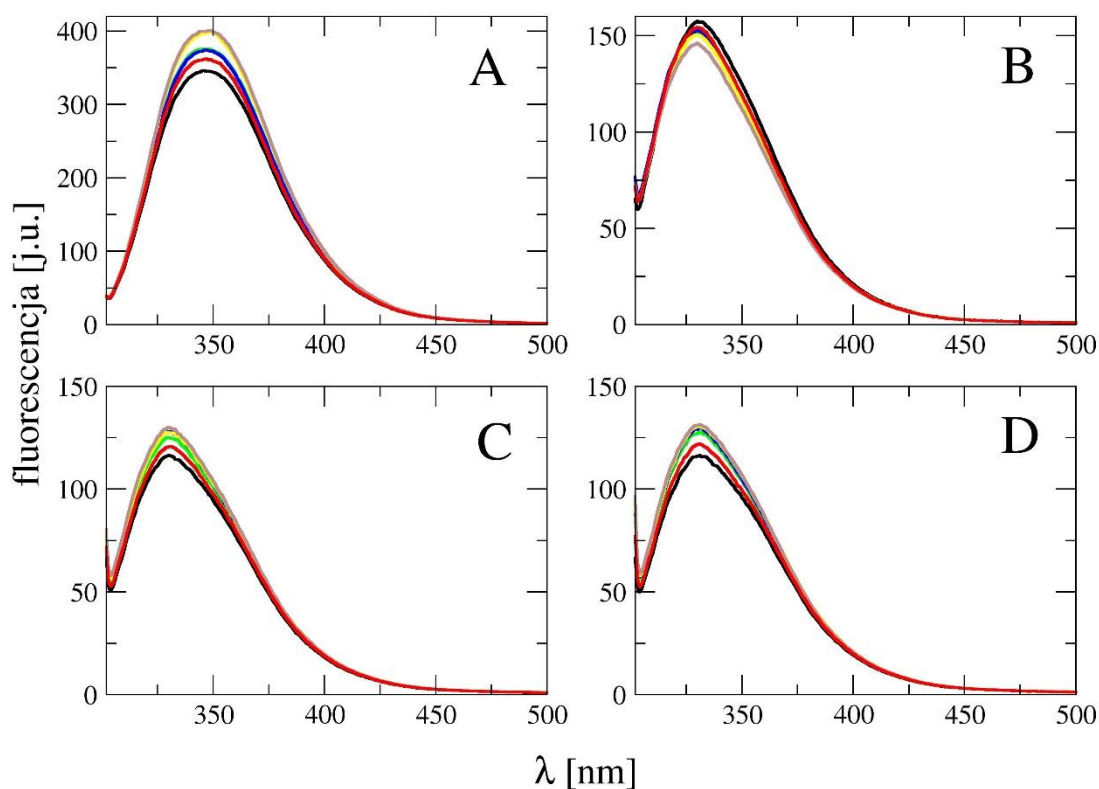
Rysunek 80. Widma fluorescencji albuminy: A – 20 μM BSA + bufor, B – 20 μM BSA + 4 mM SDS, C – 20 μM BSA + 20 mM SDS, D – 20 μM BSA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 260 nm.



Rysunek 81. Widma fluorescencji albuminy: A – 20 μM BSA + bufor, B – 20 μM BSA + 4 mM SDS, C – 20 μM BSA + 20 mM SDS, D – 20 μM BSA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 280 nm.

Na Rysunkach 80 i 81 (wzbudzenia 260 nm oraz 280 nm), przedstawiono po 4 przykładowe próbki dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji w zależności od stężenia SDS w roztworze. Oba wzbudzenia w analizie zostały ze sobą połączone, gdyż dla obu efekt jest taki sam. W przypadku próbki bez SDS (Rysunek 80A i 81A), przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma pokrywają się z wyjątkiem siły jonowej o wartości 50 mM. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 80B i 81B), powyżej siły jonowej 50 mM obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji oraz przesunięcie w kierunku krótszych długości fal – widma te nakładają się na siebie. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest powyżej CMC (Rysunek 80C i 81C) przy sile jonowej równej 50 mM nie dochodzi do żadnej zmiany w intensywności fluorescencji, natomiast dla pozostałych wartości siły jonowej, obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji. W przypadku próbki gdzie stężenie SDS jest znacznie

powyżej CMC (Rysunek 80D i 81D) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji, widma nie pokrywają się.



Rysunek 82. Widma fluorescencji albuminy: A – 20 μM BSA + bufor, B – 20 μM BSA + 4 mM SDS, C – 20 μM BSA + 20 mM SDS, D – 20 μM BSA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy. Wzbudzenie 295 nm.

Na Rysunku 82 (wzbudzenie 295 nm) przedstawiono po 4 przykładowe próbki, dla których siła jonowa wywołuje różne efekty w widmie fluorescencji w zależności od stężenia SDS w roztworze. W przypadku próbek bez SDS lub gdy jego stężenie jest powyżej CMC (Rysunek 82A, 82C, 82D) przy wszystkich wartościach siły jonowej obserwuje się wzrost intensywności fluorescencji białka w maksimum emisji a gdy stężenie SDS jest poniżej CMC (Rysunek 82B) obserwuje się spadek. W żadnym przypadku, widma nie pokrywają się.

Podsumowując, siła jonowa w większości zbadanych przypadków wywołuje zmianę w widmie fluorescencji obu zbadanych białek – zarówno w roztworach zawierających czyste białko jak i białko z SDS. Widać wyraźną różnicę, pomiędzy widmami gdzie stężenie SDS jest poniżej a gdzie powyżej CMC, jednak należy pamiętać, że wartość CMC silnie zależy od siły

jonowej roztworu, w związku z tym, pomimo, że w sile jonowej 0 mM CMC jest znane i określone, to przy wyższych wartościach siły jonowej jest inne.

3.2.7. Wpływ dodecylsiarczianu sodu na kinetykę zmian strukturalnych lizozymu, albuminy oraz α -laktoalbuminy

Po wykonaniu pomiarów stacjonarnych fluorescencji, wykorzystując spektrometr Stopped-flow SX20 LED firmy Applied Photophysics Ltd, zbadano kinetykę zmian strukturalnych zachodzących w trzech białkach: lizozymie, albuminie oraz dodatkowo w α -laktoalbuminie pod wpływem dodecylsiarczianu sodu a także wpływ siły jonowej na tę kinetykę. Wykorzystywany był 10 mM bufor fosforanowy o pH 7. Końcowe stężenie białka wynosiło 10 μ M. Eksperymenty przeprowadzono przy 6 różnych wartościach siły jonowej rozpuszczalnika: 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM oraz 250 mM. Schemat przygotowania próbek został przedstawiony w Tabeli 31.

Tabela 31. Lista próbek albuminy (BSA) i lizozymu (HEWL) do pomiarów kinetycznych z detekcją fluorescencji (roztwór do pomiarów powstawał poprzez mieszanie w stosunku objętościowym 1:1 roztworu A i roztworu B).

Próbka	Roztwór wyjściowy A	Roztwór wyjściowy B
1	20 μ M białka	bufor
2	20 μ M białka	4 mM SDS
3	20 μ M białka	6 mM SDS
4	20 μ M białka	8 mM SDS
5	20 μ M białka	10 mM SDS
6	20 μ M białka	12 mM SDS
7	20 μ M białka	14 mM SDS
8	20 μ M białka	16 mM SDS
9	20 μ M białka	18 mM SDS
10	20 μ M białka	20 mM SDS

11	20 μ M białka	40 mM SDS
12	20 μ M białka	60 mM SDS
13	20 μ M białka	80 mM SDS
14	20 μ M białka	100 mM SDS

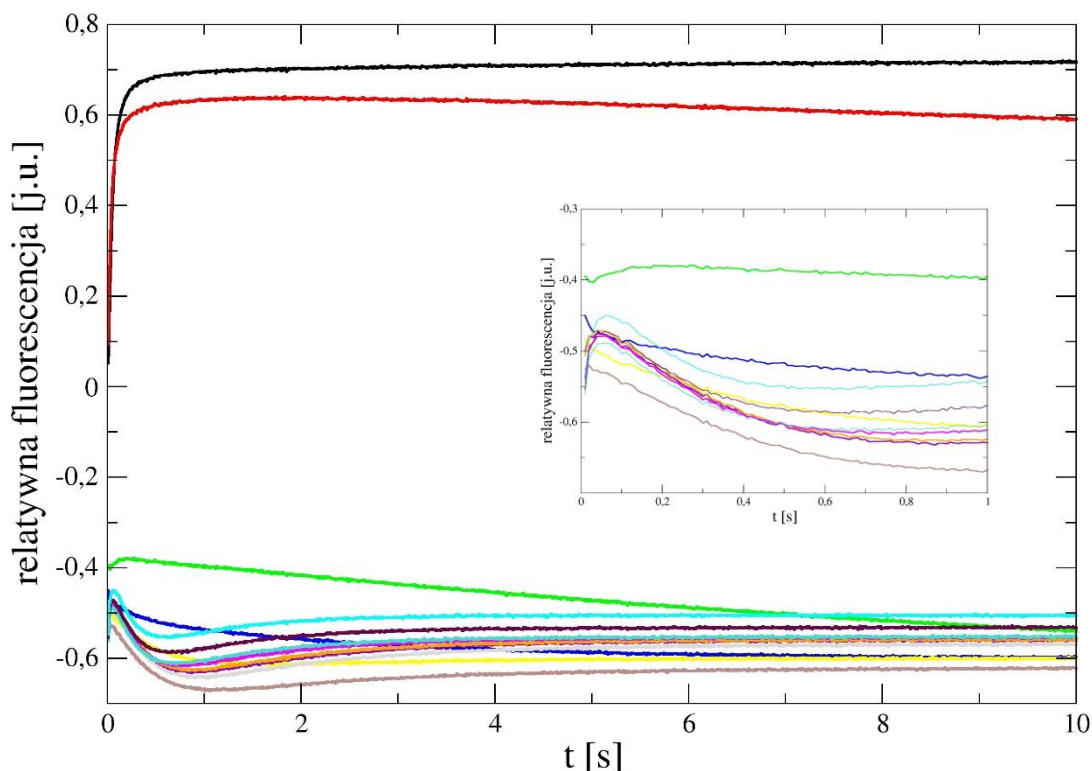
Rejestrowane były krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji. Dla obu białek wybrano długość fali wzbudzenia 295 nm, a długość drogi optycznej wynosiła 2 mm. Końcowa krzywa postępu reakcji, została uzyskana poprzez uśrednienie 12 skanów dla lizozymu i α -laktoalbuminy oraz 20 skanów dla albuminy. Każdy skan trwał 10s dla lizozymu, 0,5s dla albuminy oraz 20s dla α -laktoalbuminy. Analizowane były relatywne krzywe postępu reakcji.

Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji lizozymu w zerowej sile jonowej, zostały przedstawione na Rysunku 83, dla albuminy na Rysunku 84 a dla α -laktoalbuminy na Rysunku 85.

Na Rysunku 86 zostały przedstawione relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji dla 3 wybranych próbek lizozymu, przy wzbudzeniu 295 nm we wszystkich siłach jonowych, krzywe dla pozostałych próbek zostały umieszczone w rozdziale 6, na Rysunku D14.

Na Rysunku 87 zostały przedstawione relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji dla trzech wybranych próbek albuminy przy wzbudzeniu 295 nm we wszystkich siłach jonowych, krzywe dla pozostałych próbek zostały umieszczone w rozdziale 6, na Rysunku D15.

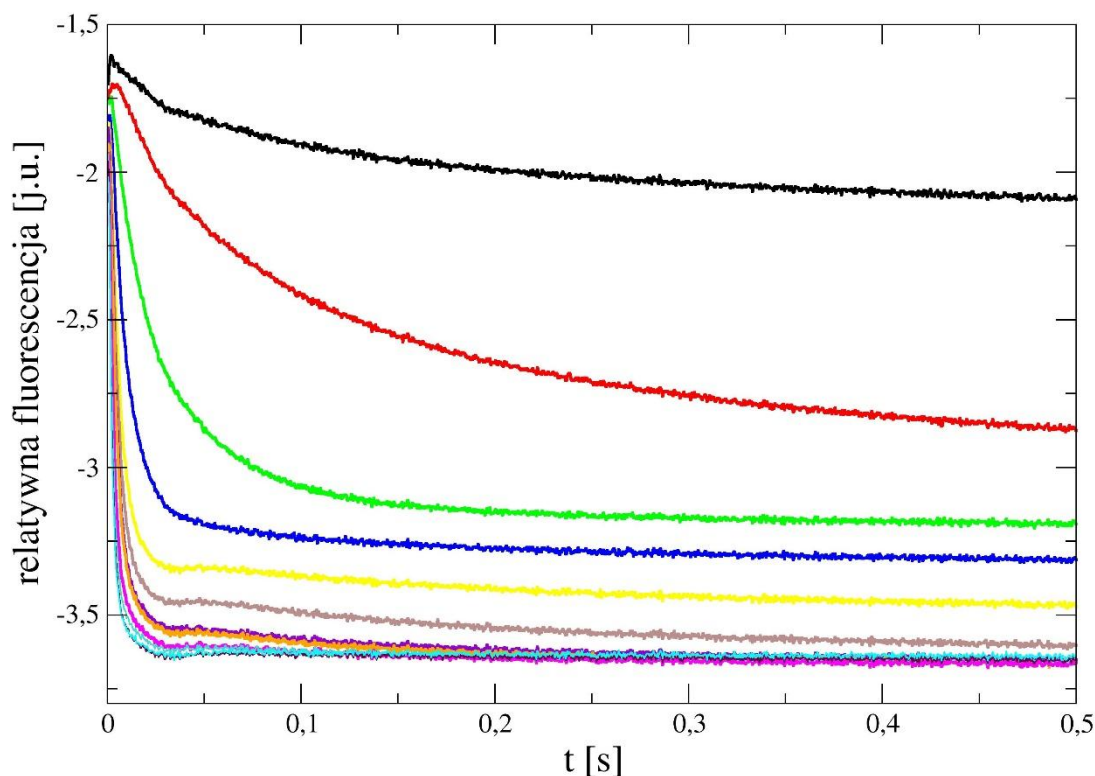
Na Rysunku 88 zostały przedstawione relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji dla trzech wybranych próbek α -laktoalbuminy przy wzbudzeniu 295 nm we wszystkich siłach jonowych, krzywe dla pozostałych próbek zostały umieszczone w rozdziale 6, na Rysunku D16.



Rysunek 83. Relatywne krzywe postępu reakcji lizozymu z detekcją fluorescencji w zerowej sile jonowej: 20 μM HEWL + 2 mM SDS – kolor czarny, 20 μM HEWL + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM HEWL + 6 mM SDS – kolor zielony, 20 μM HEWL + 8 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM HEWL + 10 mM SDS – kolor żółty, 20 μM HEWL + 12 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM HEWL + 14 mM SDS – kolor szary, 20 μM HEWL + 16 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM HEWL + 18 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM HEWL + 20 mM SDS – kolor różowy, 20 μM HEWL + 40 mM SDS – kolor turkusowy, 20 μM HEWL + 80 mM SDS – kolor bordowy, 20 μM HEWL + 100 mM SDS – kolor cyjan.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji lizozymu umieszczone na Rysunku 83, widać, że: (1) relatywna fluorescencja białka pochodząca od tryptofanu maleje wraz ze wzrostem stężenia surfaktantu, (2) dwie pierwsze krzywe, dla których stężenie SDS jest poniżej CMC znacznie odbiegają od pozostałych. Sygnał fluorescencji jest znacznie większy od pozostałych – nie zaczyna się od tego samego miejsca a reszta krzywych ma dużo niższy sygnał. Może to oznaczać, że pewna część reakcji pomiędzy SDS a białkiem zachodzi w czasie martwym urządzenia. Fluorescencja krzywych postępu reakcji, w których stężenie SDS było poniżej CMC narasta pod wpływem SDS, po czym osiąga stan równowagi i krzywe się wywłaszczają. Dla próbki o stężeniu SDS bliskim CMC sygnał jest znacznie niższy. Narastanie sygnału ma miejsce tylko na początku przebiegu reakcji, a następnie spada, nie osiągając plateau. Dla stężeń surfaktantu nieco powyżej CMC (5 mM – 9

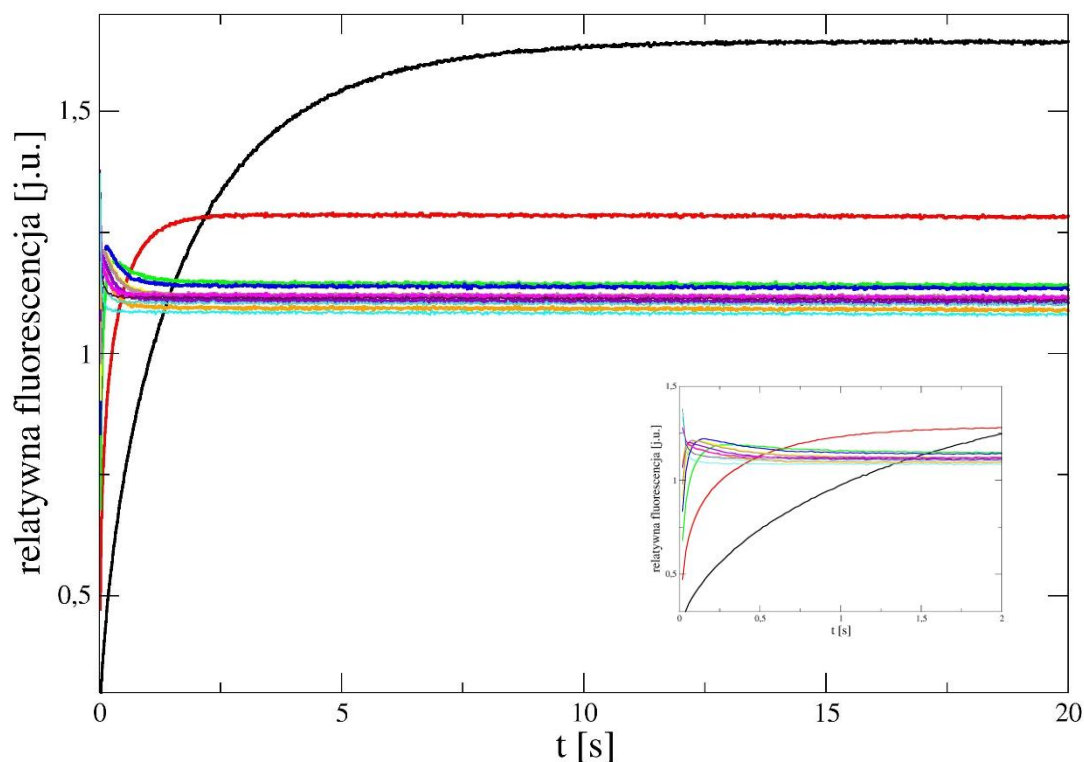
mM) – sygnał fluorescencji spada osiągając plateau. W stężeniu SDS powyżej 10 mM widać początkowo narastanie sygnału następnie jego znaczny spadek i kolejny wzrost.



Rysunek 84. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją fluorescencji w zerowej sile jonowej: 20 μM BSA + 2 mM SDS – kolor czarny, 20 μM BSA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μM BSA + 6 mM SDS – kolor zielony, 20 μM BSA + 8 mM SDS – kolor niebieski, 20 μM BSA + 10 mM SDS – kolor żółty, 20 μM BSA + 12 mM SDS – kolor brązowy, 20 μM BSA + 14 mM SDS – kolor szary, 20 μM BSA + 16 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μM BSA + 18 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μM BSA + 20 mM SDS – kolor różowy, 20 μM BSA + 40 mM SDS – kolor turkusowy, 20 μM BSA + 80 mM SDS – kolor bordowy, 20 μM BSA + 100 mM SDS – kolor cyjan.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji albuminy umieszczone na Rysunku 84, widać, że krzywe nie zaczynają się w tym samym punkcie, co wskazuje na to, że podobnie jak w przypadku lizozymu, reakcja zaczyna się w czasie martwym urządzenia. Wraz ze wzrostem stężenia surfaktanu widoczne jest obniżenie sygnału fluorescencji w czasie. Im wyższe stężenie SDS, tym reakcja zachodzi szybciej i białko szybciej osiąga stan równowagi, czyli końcową stabilną strukturę. Dodatkowo można zauważyć, że gdy stężenia surfaktantu jest wyższe niż CMC, pojawia się dodatkowy etap reakcji – po nagłym

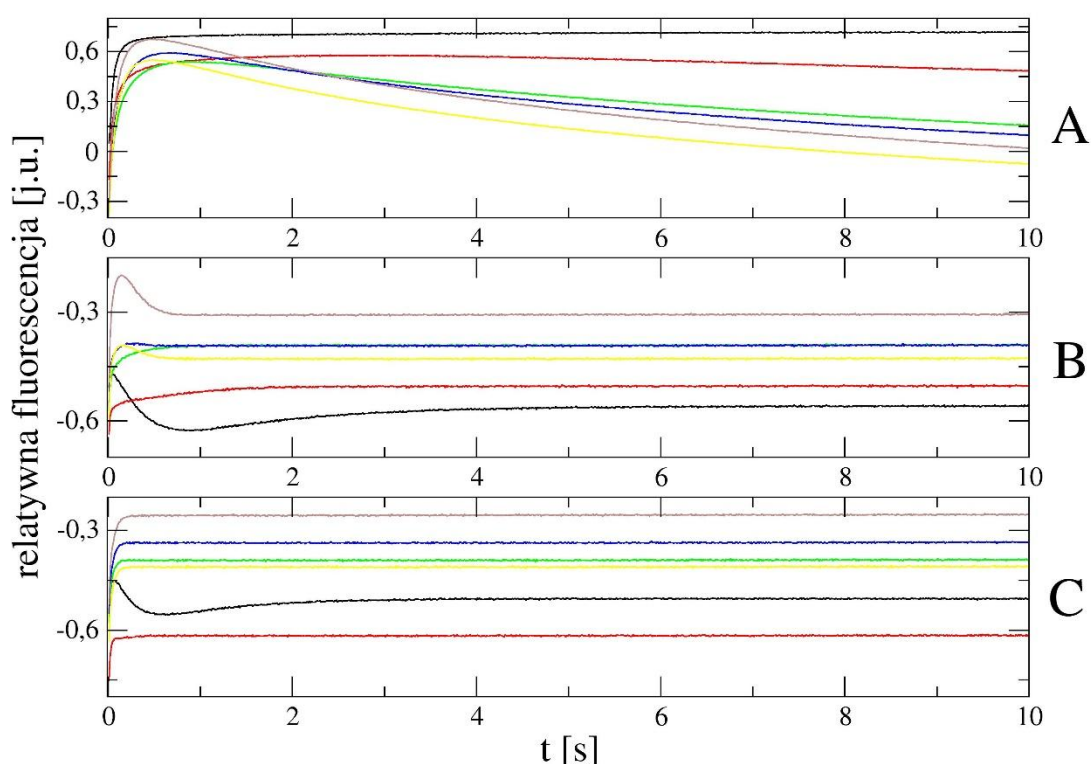
spadku fluorescencji, następuje jej wzrost a następnie znowu spadek i osiągnięcie przez krzywą plateau.



Rysunek 85. Relatywne krzywe postępu reakcji α -laktoalbuminy z detekcją fluorescencji w zerowej sile jonowej: 20 μ M LALBA + 2 mM SDS – kolor czarny, 20 μ M LALBA + 4 mM SDS – kolor czerwony, 20 μ M LALBA + 6 mM SDS – kolor zielony, 20 μ M LALBA + 8 mM SDS – kolor niebieski, 20 μ M LALBA + 10 mM SDS – kolor żółty, 20 μ M LALBA + 12 mM SDS – kolor brązowy, 20 μ M LALBA + 14 mM SDS – kolor szary, 20 μ M LALBA + 16 mM SDS – kolor fioletowy, 20 μ M LALBA + 18 mM SDS – kolor pomarańczowy, 20 μ M LALBA + 20 mM SDS – kolor różowy, 20 μ M LALBA + 40 mM SDS – kolor turkusowy, 20 μ M LALBA + 80 mM SDS – kolor bordowy, 20 μ M LALBA + 100 mM SDS – kolor cyjan.

Interpretując relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji α -laktoalbuminy umieszczone na Rysunku 85, można zauważyć, że podobnie jak w przypadku poprzednich białek, krzywe nie zaczynają się w tym samym punkcie, co wskazuje na to, że i ta reakcja zaczyna się w czasie martwym urządzenia. Podobnie jak w przypadku lizozymu, dwie krzywe, w których stężenie SDS było poniżej CMC, znacznie odbiegają od pozostałych. W obu przypadkach widać narastanie fluorescencji, po czym krzywe osiągają plateau. W zakresie stężeń SDS 4 mM – 10 mM obserwuje się początkowo narastanie sygnału, a następnie jego spadek, aż do uzyskania przez układ stanu równowagi, natomiast, gdy stężenie SDS znacznie przewyższa CMC, widać spadek sygnału.

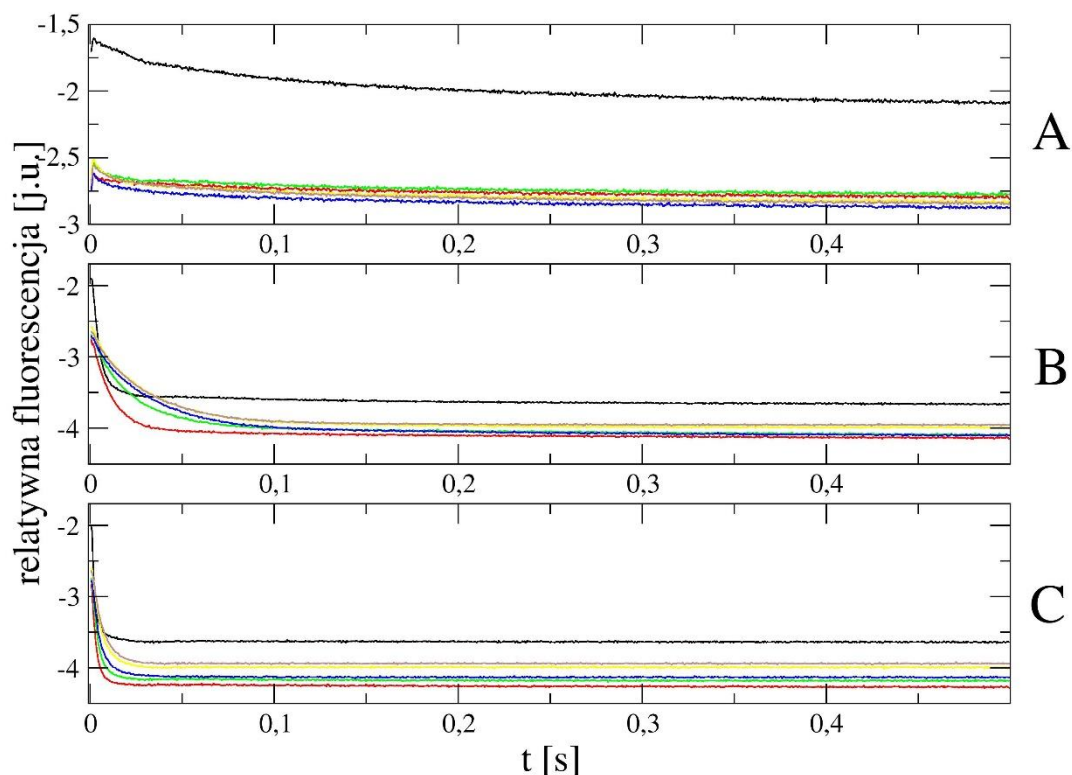
Podsumowując, krzywe uzyskane dla wszystkich trzech białek w zerowej sile jonowej, pokazują, że zmiany konformacyjne zachodzące w białkach pod wpływem SDS, obserwowane poprzez pomiar fluorescencji przy wzbudzeniu 295 nm w zależności od stężenia SDS, mogą być nawet trzyetapowe i dopiero po upływie kilku sekund dla lizozymu i α -laktoalbuminy oraz kilkadziesiąt milisekund dla albuminy, uzyskują stabilną strukturę. Ponadto widać, jak istotną rolę w przebiegu procesu odgrywa stężenie SDS i oddziaływania białka z pojedynczymi cząsteczkami surfaktantu, gdy stężenie SDS jest poniżej CMC. Powyżej CMC, gdy w roztworze są obecne micelle, można dostrzec dodatkowe etapy zmian konformacyjnych – białko może przyjmować formę pośrednią, która w czasie zmienia się w stabilną strukturę końcową.



Rysunek 86. Relatywne krzywe postępu reakcji lizozymu z detekcją fluorescencji: A – 20 μ M HEWL + 2 mM SDS, B – 20 μ M HEWL + 18 mM SDS, C – 20 μ M HEWL + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.

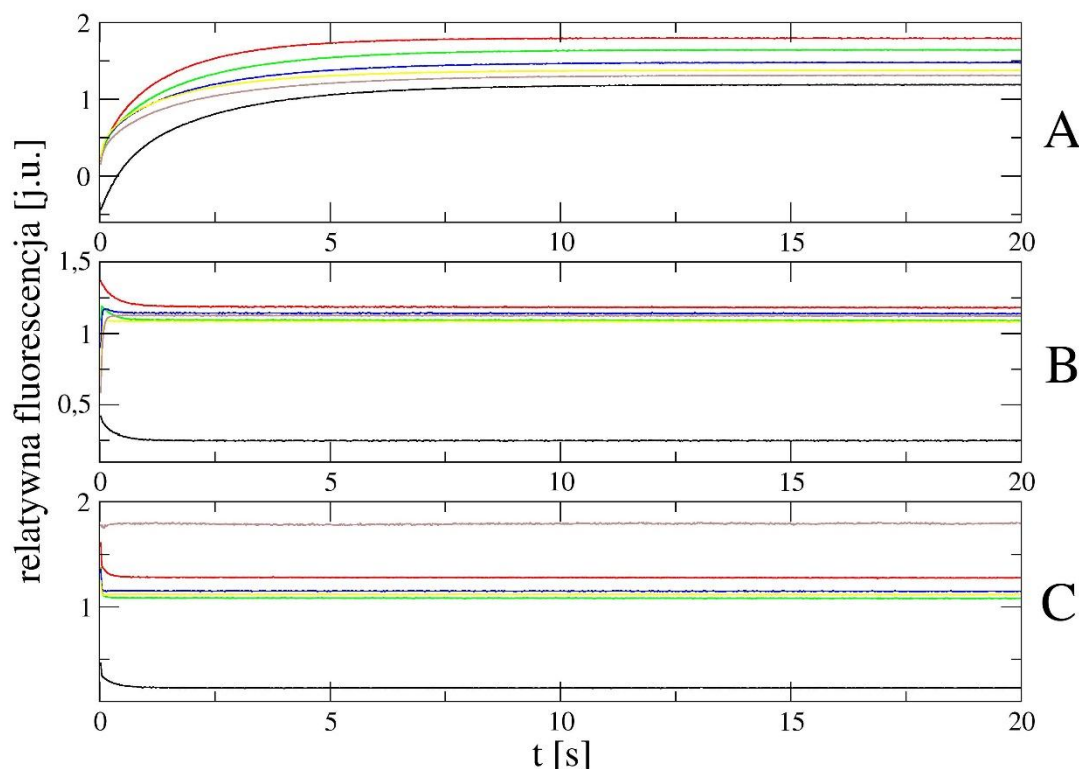
Interpretując krzywe przedstawione na Rysunku 86 oraz D14, widać, że siła jonowa, ma znaczący wpływ na obserwowany proces – zmiany konformacyjne w białku, zachodzące pod

wpływem SDS oraz na ostateczną strukturę, jaką białko przyjmuje. Dla wszystkich próbek, gdzie stężenie SDS było powyżej 2 mM, krzywa w zerowej sile jonowej odbiega kształtem od pozostałych. Im wyższa wartość siły jonowej, tym sygnał fluorescencji jest wyższy. Wszystkie krzywe osiągają plateau, co oznacza, że lizozym osiąga ostateczną stabilną strukturę. Ponadto, można zauważyć pewne powtarzalne ścieżki zmian sygnału w czasie, w konkretnych przedziałach stężenia SDS. W przypadku próbki, w której stężenie końcowe surfaktantu wynosiło 2 mM (Rysunek 86A) widać, że wraz ze wzrostem siły jonowej, powyżej 50 mM, w trakcie zmian konformacji lizozymu pojawia się dodatkowy etap – początkowo narastający sygnał zaczyna spadać. Krzywe nie osiągają plateau przez 10 sekund, tym czasie białko nie osiąga ostatecznej stabilnej struktury. W przypadku, gdy stężenie SDS wynosi między 3 mM (Rysunki D14A – D14G) a 10 mM (Rysunek 86B) w przypadku siły jonowej w przedziale 50 mM – 100 mM obserwuje się narastanie sygnału w czasie, a powyżej tej wartości (150 mM – 250 mM) pojawia się dodatkowy etap początkowo narastający sygnał zaczyna spadać by następnie osiągnąć plateau. W przypadku, gdy stężenie SDS wynosi między 20 mM (Rysunki D14H, D14I oraz D14J) a 50 mM (Rysunek 86C) tylko dla zerowej siły jonowej widać spadek sygnału, a dla wszystkich pozostałych wartości siły jonowej (50 mM – 250 mM) wzrost. Wszystkie krzywe osiągają plateau. Żadne z krzywych się nie pokrywają, co oznacza, że w zależności od stężenia SDS i siły jonowej roztworu, białko osiąga inną strukturę III-rzędową.



Rysunek 87. Relatywne krzywe postępu reakcji albuminy z detekcją fluorescencji: A – 20 μ M BSA + 2 mM SDS, B – 20 μ M BSA + 18 mM SDS, C – 20 μ M BSA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.

Interpretując krzywe przedstawione na Rysunku 87 oraz D15, siła jonowa wpływa na kształt krzywych w zależności od stężenia SDS, im wyższa wartość siły jonowej tym szybszy spadek sygnału, czyli siła jonowa wpływa na szybkość zmian konformacyjnych w albuminie wywołanych SDS. Dodatkowo siła jonowa powoduje zanik dwuetapowości reakcji, w przypadku, gdy jej wartość wynosi 50 mM i więcej (Rysunki 87B, 87C oraz D15A – D15J). Wszystkie krzywe osiągają plateau, co oznacza, że albumina osiąga końcową, stabilną strukturę.



Rysunek 88. Relatywne krzywe postępu reakcji α -laktoalbuminy z detekcją fluorescencji: A – 20 μ M LALBA + 2 mM SDS, B – 20 μ M LALBA + 18 mM SDS, C – 20 μ M LALBA + 100 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.

Interpretując krzywe przedstawione na Rysunku 88 oraz D17, widać, że podobnie jak w przypadku lizozymu oraz albuminy, siła jonowa wpływa na przebieg procesu, a tym samym na zmiany strukturalne α -laktoalbuminy. W przypadku, gdy siła jonowa w roztworze wynosi 50 mM, to niezależnie od stężenia SDS, krzywa znacznie odbiega od pozostałych – ma znacznie niższy sygnał. Podobnie jak w przypadku lizozymu, można zauważyć pewne cechy charakterystyczne wyglądu krzywych zależne od stężenia SDS. Dla stężenia SDS między 2 (Rysunek 88A) a 3 mM (Rysunek D17A), dla wszystkich wartości siły jonowej obserwuje się wzrost sygnału fluorescencji. Dla próbek, gdzie stężenie SDS wynosi między 4 mM a 9 mM (Rysunki D17B – D17F) w przypadku, gdy siła jonowa wynosi między 50 mM a 150 mM widać, dwuetapowość w reakcji: początkowe narastanie a następnie spadek sygnału. Dla siły jonowej między 200 mM a 250 mM oraz 0 mM – tylko narastanie sygnału. Gdy stężenie SDS wynosi między 9 mM a 10 mM, (Rysunki 88B oraz D17G), dla sił jonowych w przedziale 0 mM – 50 mM, widać spadek sygnału, w przedziale 100 mM – 150 mM nadal widać

dwuetapowość reakcji, początkowe narastanie a następnie spadek sygnału, w przedziale 200 mM – 250 wciąż widać narastanie sygnału. Gdy stężenie SDS wynosi 20 mM (Rysunek D17H) a siła jonowa jest w przedziale 0 mM – 150 mM obserwuje się spadek sygnału, a w przedziale 200 mM – 250 mM nadal jego wzrost. W przedziale stężeń SDS między 30 mM a 50 mM (Rysunki 88C oraz D17H – D17J), przy wszystkich wartościach siły jonowej widać spadek sygnału.

Podsumowując, krzywe uzyskane dla wszystkich trzech białek pokazują, że zmiany konformacyjne białek pod wpływem SDS, obserwowane poprzez pomiar fluorescencji (pomiar kinetyczne), są silnie zależne zarówno od stężenia SDS (można wyróżnić pewne zakresy stężeń surfaktantu, dla których widać tylko wzrost sygnału, tylko spadek albo wzrost i spadek sygnału dla jednego przebiegu), jak i wartości siły jonowej (tutaj podobnie można zauważyć pewne tendencje w przebiegu krzywych, w zależności od wartości siły jonowej). Dla wszystkich białek, największą zmianę obserwuje się w momencie, gdy siła jonowa z zerowej wzrasta do wartości 50 mM. Podobnie jak w przypadku pomiarów stacjonarnych fluorescencji, należy pamiętać o fakcie zmiany CMC SDS w funkcji siły jonowej. Oba eksperymenty pokazują, jak istotne w kontekście badań oddziaływań białek z SDS i obserwacji zmian struktury biomolekuł pod wpływem surfaktantu, jest dobranie odpowiednich warunków eksperymentu, takich jak stężenie surfaktantu czy wartość siły jonowej, aby w odpowiedni sposób móc interpretować uzyskane dane.

4. Podsumowanie

Układ białko–surfaktant, a w szczególności białko–SDS, jest niezwykle ciekawym obiektem badawczym. Wpływ dodecylosiarczanu sodu na zmiany konformacyjne w białkach (struktura II– i III–rzędowa), a przede wszystkim, stanowiąca główny wątek rozprawy kinetyka tych zmian, z jednej strony daje ogromne możliwości badawcze, z drugiej zaś jest zjawiskiem chwilami nieprzewidywalnym, zaskakującym, trudnym do zbadania dostępnymi metodami czy do interpretacji. Niewątpliwie jednak, daje ona podstawy do zrozumienia wielu zachodzących procesów molekularnych.

Podsumowując uzyskane wyniki:

1. Zmiany strukturalne zachodzące w strukturze II– i III–rzędowej białek pod wpływem SDS, zależą od kilku głównych czynników:

- *stężenia surfaktantu* – pojedyncze cząsteczki surfaktantu (stężenie SDS poniżej CMC) odgrywają równie istotną rolę w zmianach konformacyjnych białek jak i micelle (stężenie SDS powyżej CMC);
 - *stężenia badanego białka* – istnieje próg stężenia SDS, powyżej którego w roztworze zawierającym białko i SDS, nie ma wolnych frakcji białka;
 - *procedury przygotowania próbek* – czy przed osiągnięciem końcowego stężenia SDS w roztworze, wyjściowy roztwór białka, zawierał już pewną ilość surfaktantu czy też nie; w przypadku α -chymotrypsyny, zarówno końcowa struktura II– jak i III–rzędowa silnie zależy od procedury przygotowania próbek do pomiarów widm dichroizmu kołowego; w przypadku α -laktoalbuminy końcowa struktura II–rzędowa nie zależy od procedury, natomiast III–rzędowa już tak; w przypadku lizozymu oraz albuminy, żadna ze struktur nie zależy od procedury przygotowania próbek;
 - *siły jonowej roztworu* – siła jonowa roztworu, w którym prowadzone są badania wpływa na zmiany zachodzące w strukturze II–i III–rzędowej trzech badanych białek: α -laktoalbuminy, lizozymu oraz albuminy; widać to w: (1) pomiarach stacjonarnych widm dichroizmu kołowego – w strukturze II–rzędowej obserwuje się przede wszystkim zmianę zawartości frakcji α -helis i β -katek, w III–rzędowej zmiany w kształcie widm, które wskazują na zmiany konformacyjne w okolicy aminokwasów aromatycznych, (2) pomiarach kinetycznych z detekcją fluorescencji – największą zmianę w przebiegu krzywych postępu reakcji obserwuje się w momencie, gdy siła jonowa z zerowej wzrasta do wartości 50 mM, ponadto w zależności od wartości siły jonowej obserwuje się spadek bądź wzrost sygnału w czasie, a także może wzrastać liczba etapów reakcji.
2. Nie można przyjąć, że dla wszystkich białek i stężeń SDS, struktura II– i III–rzędowa, którą przyjmuje dane białko w wyniku interakcji z surfaktantem, jest stabilną w czasie strukturą końcową. Dla α -chymotrypsyny osiągnięta struktura II–rzędowa, jest stabilną strukturą, przez co najmniej 320 minut a III–rzędowa przez co najmniej 200 minut; w przypadku albuminy i lizozymu jest podobnie: osiągnięta struktura II–rzędowa jest stabilną strukturą przez co najmniej 270 minut a III–rzędowa przez co najmniej 300 minut – w tym czasie nie zachodzą żadne pośrednie zmiany w strukturze białek; przypadku α -laktoalbuminy, gdy stężenie SDS jest: (1) powyżej CMC, osiągnięta struktura II–rzędowa jest stabilną strukturą, przez co najmniej 270 minut, (2) poniżej CMC jest, strukturą niestabilną, która zmienia się

w czasie i swoją stabilność uzyskuje po co najmniej 270 minutach; w przypadku struktury III-rzędowej α -laktoalbuminy, zarówno poniżej jak i powyżej CMC, struktura, którą przyjmuje białko pod wpływem surfaktantu nie jest strukturą stabilną, i nie stabilizuje się przez co najmniej 300 minut.

3. Zarówno stężenie SDS jak i siła jonowa roztworu wywołują zmianę w widmie fluorescencji albuminy oraz lizozymu. Widać wyraźną różnicę, pomiędzy widmami, gdzie stężenie SDS jest poniżej a gdzie powyżej CMC. W zależności od stężenia surfaktantu i wartości siły jonowej można zaobserwować spadek bądź wzrost emisji fluorescencji białek, czy też przesunięcie maksimum emisji. Należy jednak pamiętać, że wartość CMC silnie zależy od siły jonowej roztworu, w związku z tym, pomimo, że w sile jonowej 0 mM w 10 mM buforze fosforanowym CMC jest znane i określone, to przy wyższych wartościach siły jonowej jest inne.
4. W zależności, czy obserwuje się zmiany strukturalne w białkach wywołane SDS poprzez detekcję dichroizmu kołowego czy fluorescencji, widać różne aspekty tych zmian. Zmiany strukturalne zachodzące w α -chymotrypsynie pod wpływem SDS, charakteryzują się trzema (zgodnie z wynikami CD) dla struktury II- i III-rzędowej lub czterema (zgodnie z wynikami fluorescencji) dla struktury III-rzędowej, nieodwracalnymi etapami.
5. Zmiany strukturalne zachodzące w białkach pod wpływem dodecylosiarczanu sodu badane metodą dichroizmu kołowego zachodzące w strukturze II-rzędowej znacznie różnią się od zmian zachodzących w strukturze III-rzędowej – dla α -chymotrypsyny różni się kinetyka tych zmian (stałe szybkości reakcji), względne amplitudy, a także reakcje zachodzą z różną szybkością.
6. Kinetyka zmian strukturalnych białek silnie zależy od stężenia surfaktanu oraz od wartości siły jonowej roztworu. W przypadku albuminy, w badaniach kinetyki zmian struktury II-rzędowej pod wpływem SDS w funkcji stężenia surfaktantu jak i w funkcji siły jonowej roztworu, reakcja zachodzi w trzech etapach, z czego pierwszy jest najszybszy i w większości zachodzi w czasie martwym urządzenia – może on być związany z początkowymi zmianami w strukturze drugorzędowej, np. szybką reorganizacją α -helis i β -katek po kontakcie białka z SDS, drugi etap to etap pośredni i przejściowy, mogący obejmować rearanżację struktury drugorzędowej czy formowanie się stanów pośrednich, natomiast trzeci może odpowiadać wolniejszym procesom, takim jak pełna reorganizacja lub stabilizacja nowej struktury drugorzędowej. Przy stężeniu SDS poniżej CMC, gdzie występują jedynie pojedyncze cząsteczki SDS (brak miceli) nie występuje pośredni etap

osiągania przez białko końcowej stabilnej struktury. Wraz ze wzrostem siły jonowej roztworu, zanika wyraźne przejście pomiędzy drugim a trzecim etapem reakcji.

7. Wkład fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku, do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji, zależy od długości fali wzbudzenia, i nie dlatego że sama fluorescencja tryptofanów zależy od tej energii, lecz dlatego, że ścieżki bezpromienistej utraty energii przez tryptofany, podczas przejść do najniższego wzbudzonego stanu singletowego (S1), z którego możliwa jest emisja promieniowania na sposób fluorescencji, zachodzą z różnym prawdopodobieństwem.

5. Konkluzje i perspektywy

Na podstawie przeprowadzonych eksperymentów, z różnymi białkami, stanowczo można powiedzieć, że nie ma jednej, uniwersalnej ścieżki opisującej kinetykę zmian strukturalnych, zachodzących w białkach pod wpływem dodecylosiarczanu sodu. Nie ma również jednej metody badawczej, dającej jednoznaczne wyniki do interpretacji.

Należy szczególnie podkreślić, co zostało zaobserwowane w trakcie eksperymentów i ich analizy, że zmiany zachodzące w strukturze II- i III-rzędowej białek, nie zawsze są ze sobą ściśle skorelowane, a wręcz zachodzą one zupełnie innymi ścieżkami, przy tych samych warunkach pomiarowych. Ponadto, obserwacja tych zmian różnymi metodami badawczymi z detekcją różnych wielkości fizycznych, może się od siebie znacząco różnić a także ujawniać niewidoczne dotąd zjawiska.

To jak wiele czynników wpływa na interakcje białko-SDS, z pewnością wymaga dalszej pracy. To, co udało się zaobserwować w trakcie prowadzonych badań, to fakt, że ogromny wpływ na zmiany zachodzące w strukturze białka ma stężenie surfaktantu, szczególnie ważne jest określenie stężenia względem CMC, gdyż jak to zostało pokazane w wielu eksperymentach, oddziaływania białek z pojedynczymi cząsteczkami ma ogromne znaczenie w kontekście badań układów białko-SDS. Potwierdza się, że siła jonowa odgrywa również niezwykle istotną rolę w zachodzących w białku zmianach konformacyjnych i ich kinetyce. Duże znaczenie ma również bufor, w którym prowadzone są eksperymenty, nie ma jednego uniwersalnego do obserwowania interakcji białko-surfaktant. Zdecydowanie widać, że tak jak w wielu innych badaniach, powinien być on dobierany indywidualnie pod konkretne białko i wybraną metodę badawczą. Kolejny ważny aspekt to procedura przygotowywania roztworów do pomiarów, gdyż widać, jak kluczową odgrywa ona rolę i jak duży wpływ potrafi mieć na osiąganą przez białko końcową strukturę oraz kinetykę zmian zachodzących w

biomolekułach. Stabilność układów białko–SDS w czasie, jest również niewątpliwie ważnym elementem. Jak widać, w przypadku niektórych białek potrzebny jest dłuższy czas na ustabilizowanie się układu i osiągnięcie przez białko stabilnej struktury. Dużym problemem w badaniu interakcji białko–SDS jest czas, w jakim zachodzą zmiany strukturalne. Dla niektórych białek, reakcja jest na tyle szybka, że w całości zachodzi w czasie martwym urządzenia, a dla niektórych zachodzi w czasie tak krótkim, że uzyskanie właściwych do dalszej analizy krzywych, jest niemalże niemożliwe. Sprawy nie ułatwia również zjawisko fotowysbielania – w kontekście badań spektrofluorymetrycznych bardzo ważny jest dobór odpowiedniego źródła światła.

Na co należy również zwrócić szczególną uwagę w rozprawie to odkrycie, nigdzie wcześniej nieopisane i nieopublikowane, dotyczące wkładu fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji. Jest ono zależne od długości fali wzbudzenia. Badania na ten temat są kontynuowane, zostały dodatkowo poszerzone o inne białka, a także o warunki prowadzenia pomiarów, takie jak wykorzystywany bufor, jego pH czy wartość siły jonowej roztworu.

Wykonane i przeanalizowane pomiary stacjonarne, ale przede wszystkim kinetyczne, pozwalają na zaprojektowanie dalszych eksperymentów w taki sposób, aby dobrać jak najdogodniejsze warunki pomiarowe, które uwzględniają wszystkie znaczące elementy wpływające na powodzenie badań. Dzięki temu, możliwe jest uzyskanie najdokładniejszego obrazu kinetyki zmian strukturalnych zachodzących w białkach pod wpływem SDS. Wiadomo już, jakie elementy mają wpływ na eksperymenty, o czym należy pamiętać i na co zwrócić uwagę.

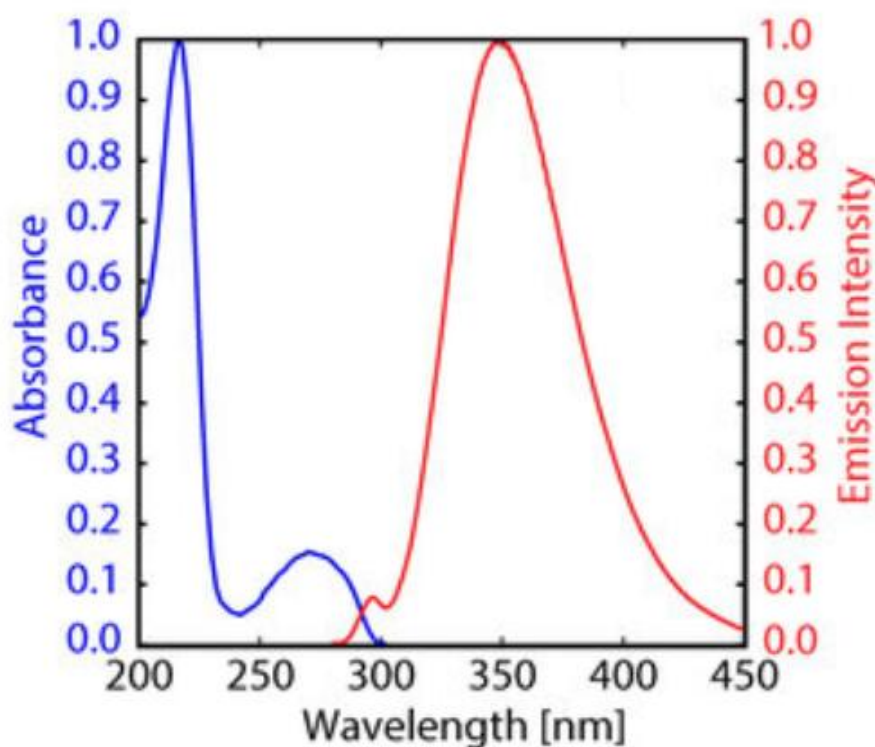
Badania dotyczące kinetyki zmian strukturalnych w białkach indukowanych SDS, są i będą kontynuowane. Przede wszystkim, pomiary kinetyczne z wykorzystaniem spektrofotometru Chirascan Plus z przystawką stopped-flow z detekcją dichroizmu kołowego i fluorescencji, przy różnych długościach fali wzbudzenia, zarówno w FUV jak i NUV dla wybranych białek. Dadzą one możliwość na przeprowadzenie analizy, pozwalającej na określenie ilości procesów relaksacji, stałych szybkości reakcji czy względnych amplitud, a także, na sprawdzenie czy zmiany zachodzące w strukturze II-rzędowej są takie same czy inne niż w strukturze III-rzędowej. Ciekawych wyników mogą również dostarczyć analogiczne kinetyczne badania w różnych warunkach pomiarowych, celem sprawdzenia, jak parametry układu, takie jak siła jonowa, pH roztworu, czy wprowadzenie do układu zagęszczacza

molekularnego, wpływają na kinetykę zmian strukturalnych w białkach i parametry ją opisujące.

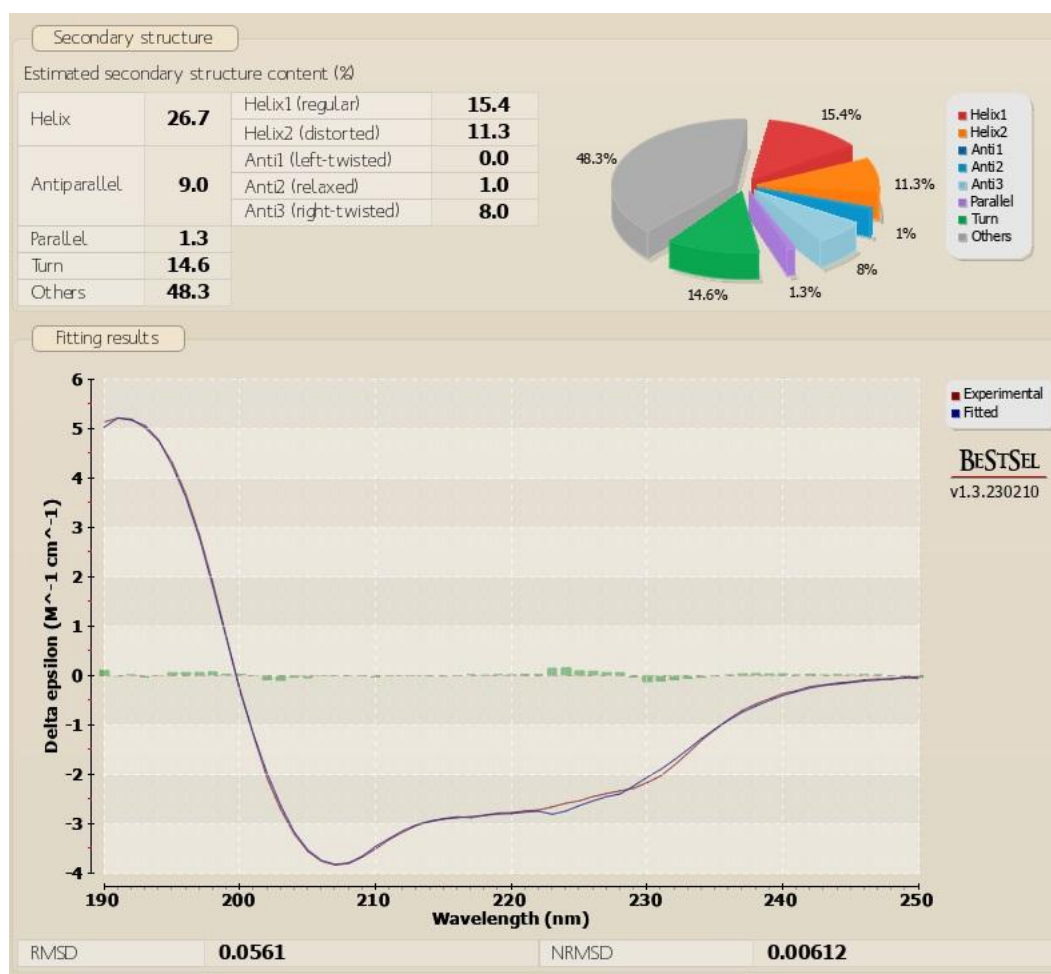
Niewątpliwie obszarem, który również wymaga kontynuacji badań jest temat dotyczący wkładu fluorescencji emitowanej przez poszczególne tryptofany w białku do całkowitej zarejestrowanej fluorescencji. Tutaj starannie należy dobrać białka do badań i wprowadzić mutanty, w których można całkowicie wyeliminować tryptofany lub zwiększyć ich ilość. Istotne jest również, aby do badań kinetycznych, wprowadzić inne białka, które podobnie jak α -chymotrypsyna charakteryzują się długoczasową relaksacją po dodaniu do roztworu białka SDS.

Podsumowując, przeprowadzone badania, wykonane i zanalizowane eksperymenty opisane w rozprawie, stanowią solidny fundament badań układów białko-surfaktant i dostarczają szeregu nowych i cennych informacji na temat kinetyki zmian strukturalnych zachodzących w biomolekułach pod wpływem dodecylsiarczanu sodu. Badania są cały czas kontynuowane, udoskonalane i z całą pewnością są i będą fundamentalną częścią prowadzonych dalszych badań naukowych.

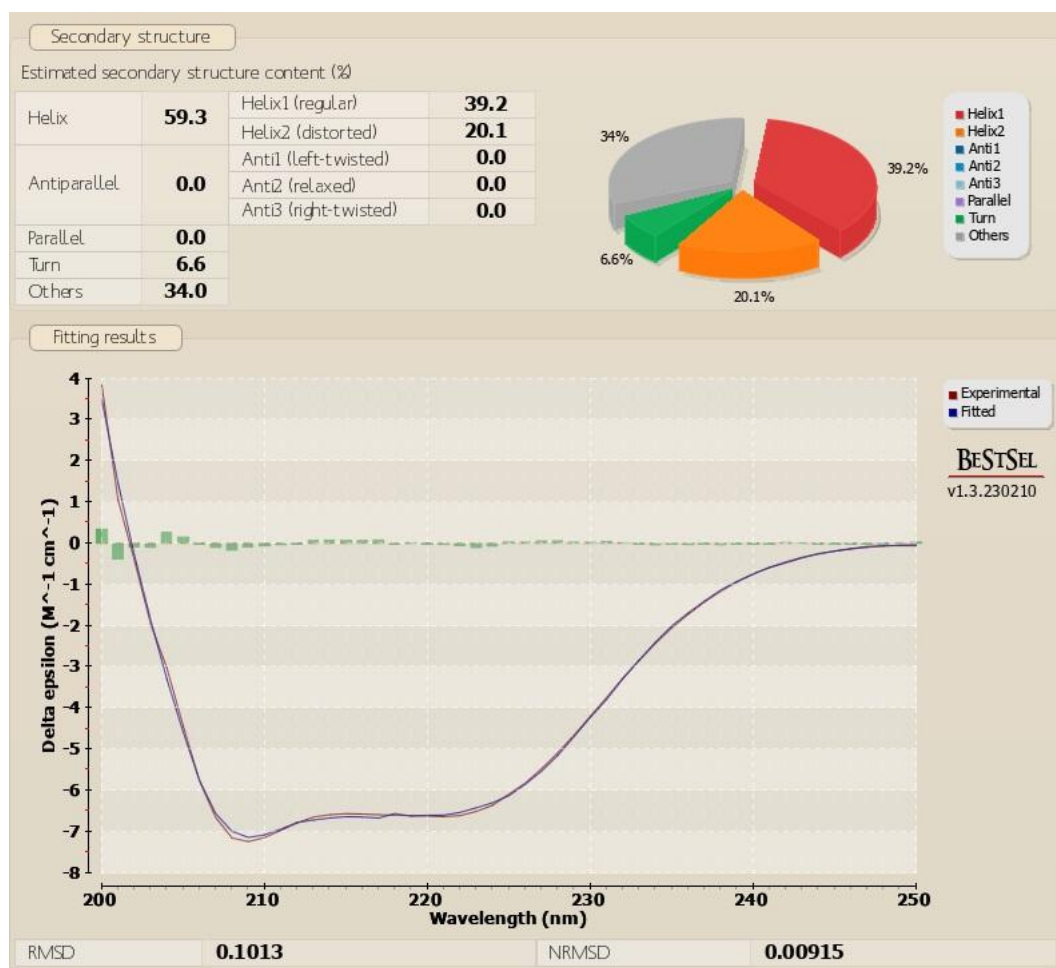
6. Dodatek



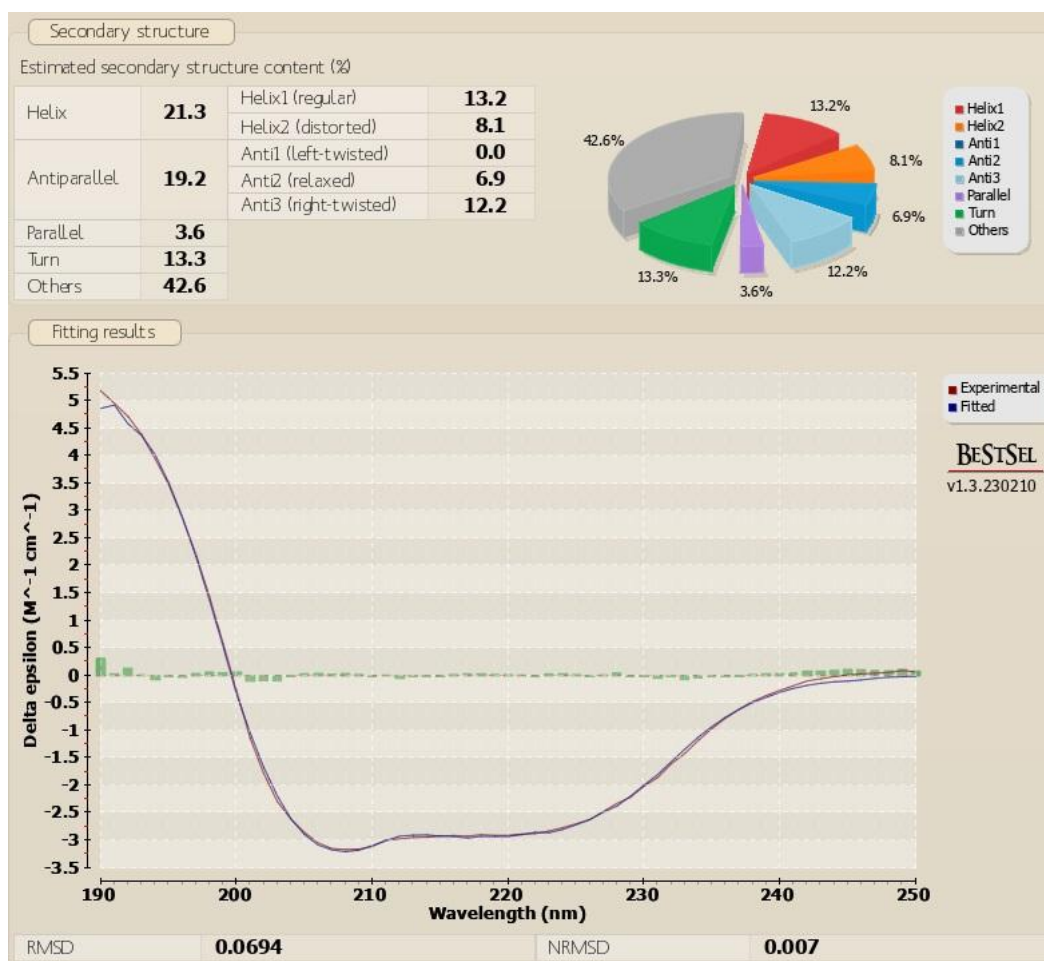
Rysunek D1. Widmo absorpcji – kolor niebieski oraz widmo fluorescencji – kolor czerwony tryptofanu^[25].



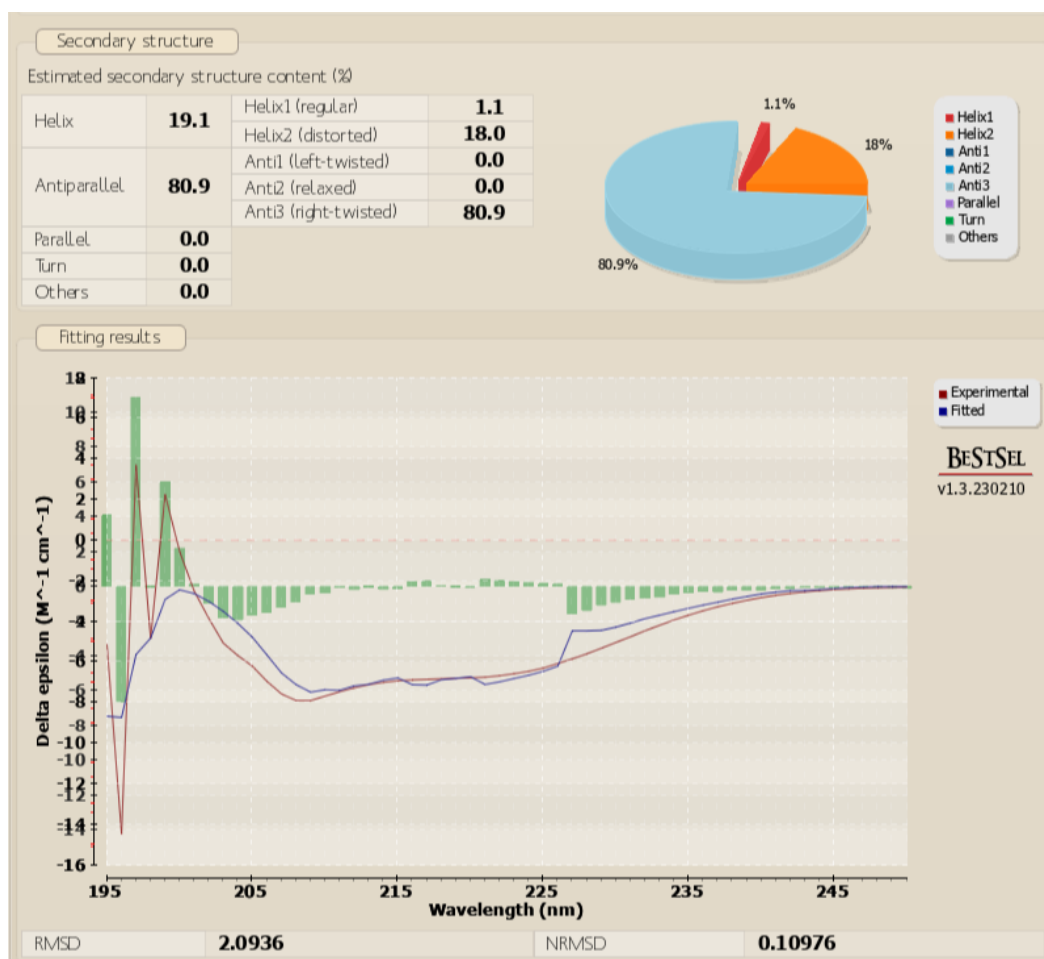
Rysunek D2. Wynik dekonwolucji przeprowadzonej dla 10 μM lizozymu w buforze fosforanowym za pomocą programu BeStSel.



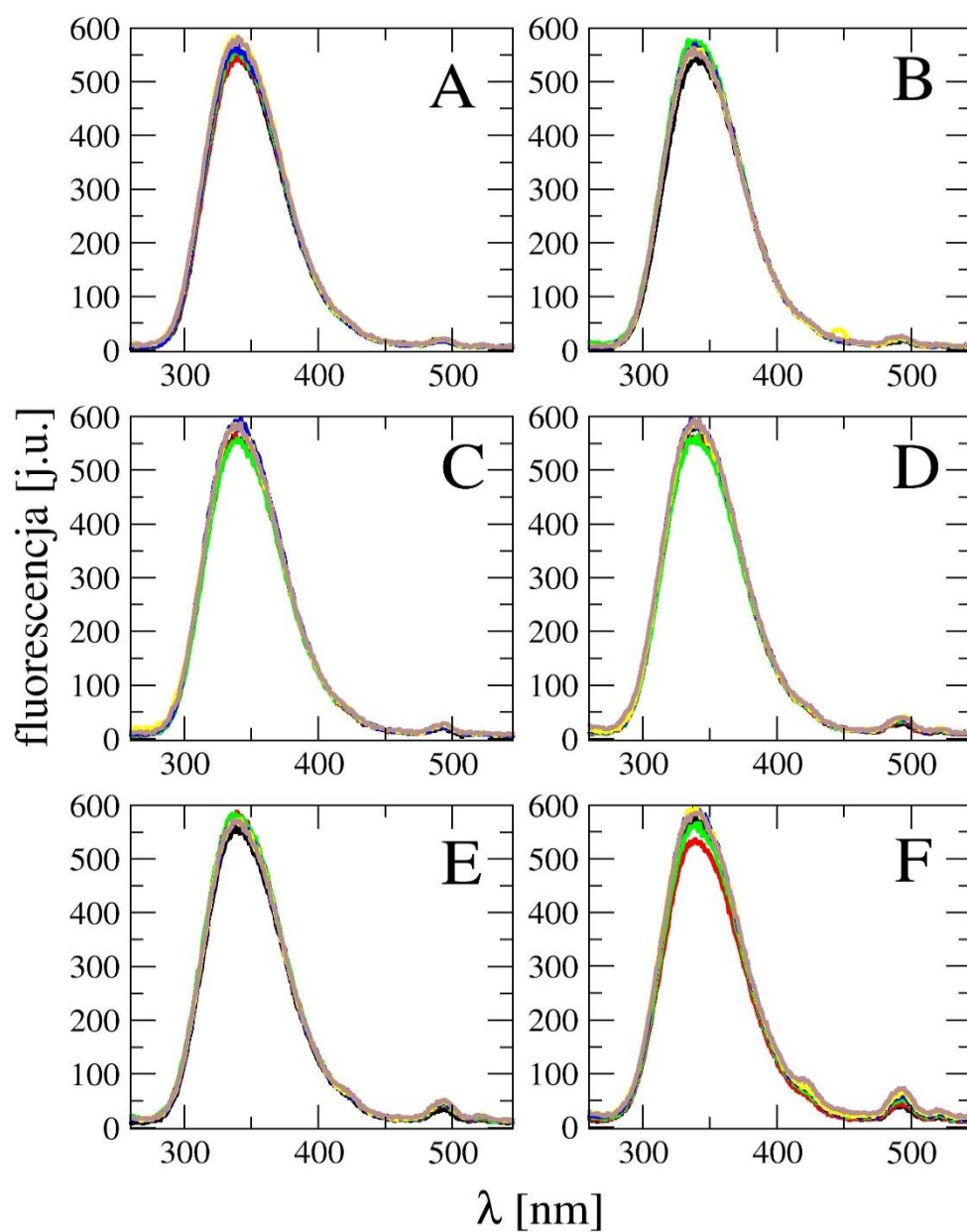
Rysunek D3. Wynik dekonwolucji przeprowadzonej dla 10 μM albuminy w buforze fosforanowym za pomocą programu BeStSel.



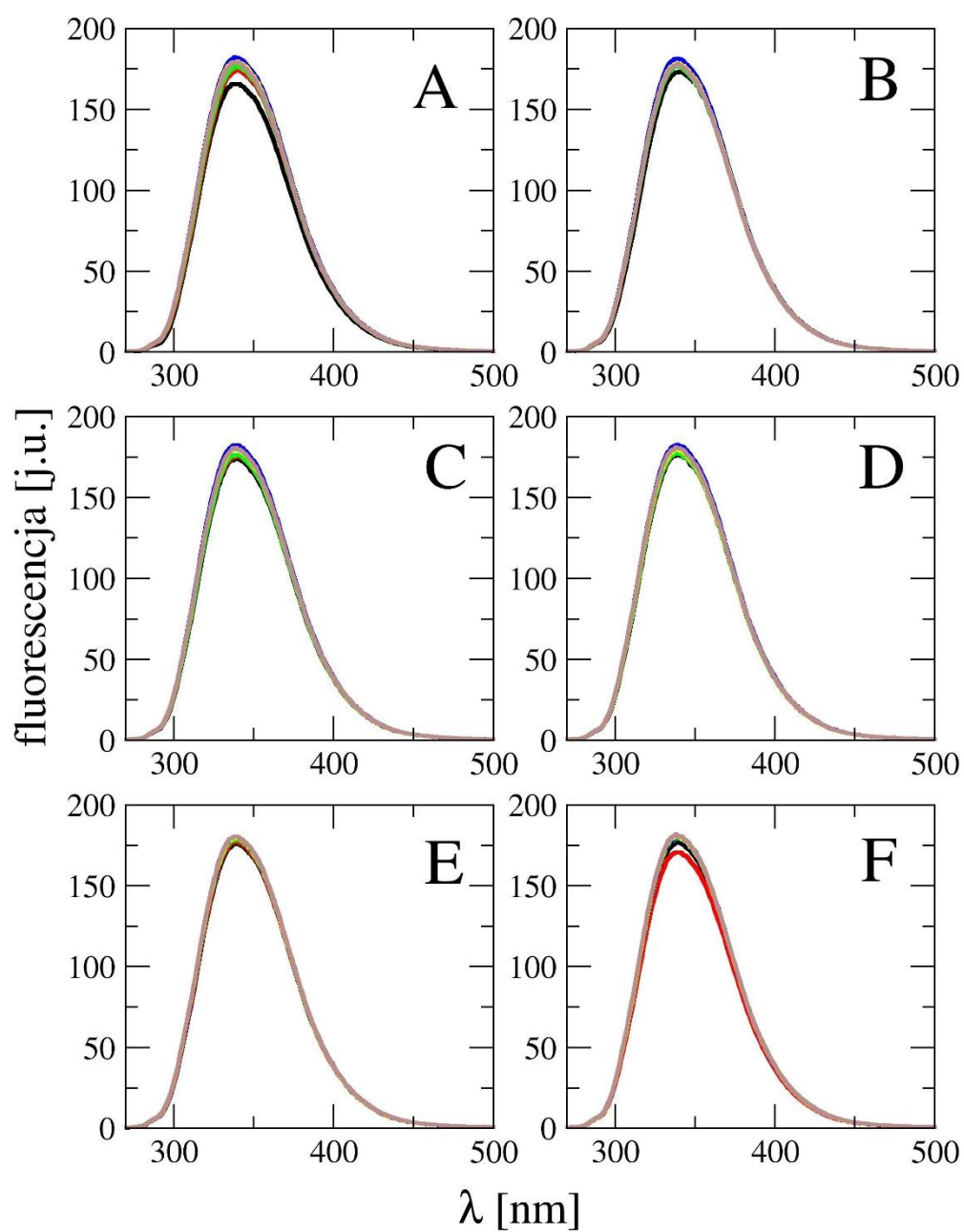
Rysunek D4. Wynik dekonwolucji przeprowadzonej dla 10 μM α -laktoalbuminy w buforze fosforanowym za pomocą programu BeStSel.



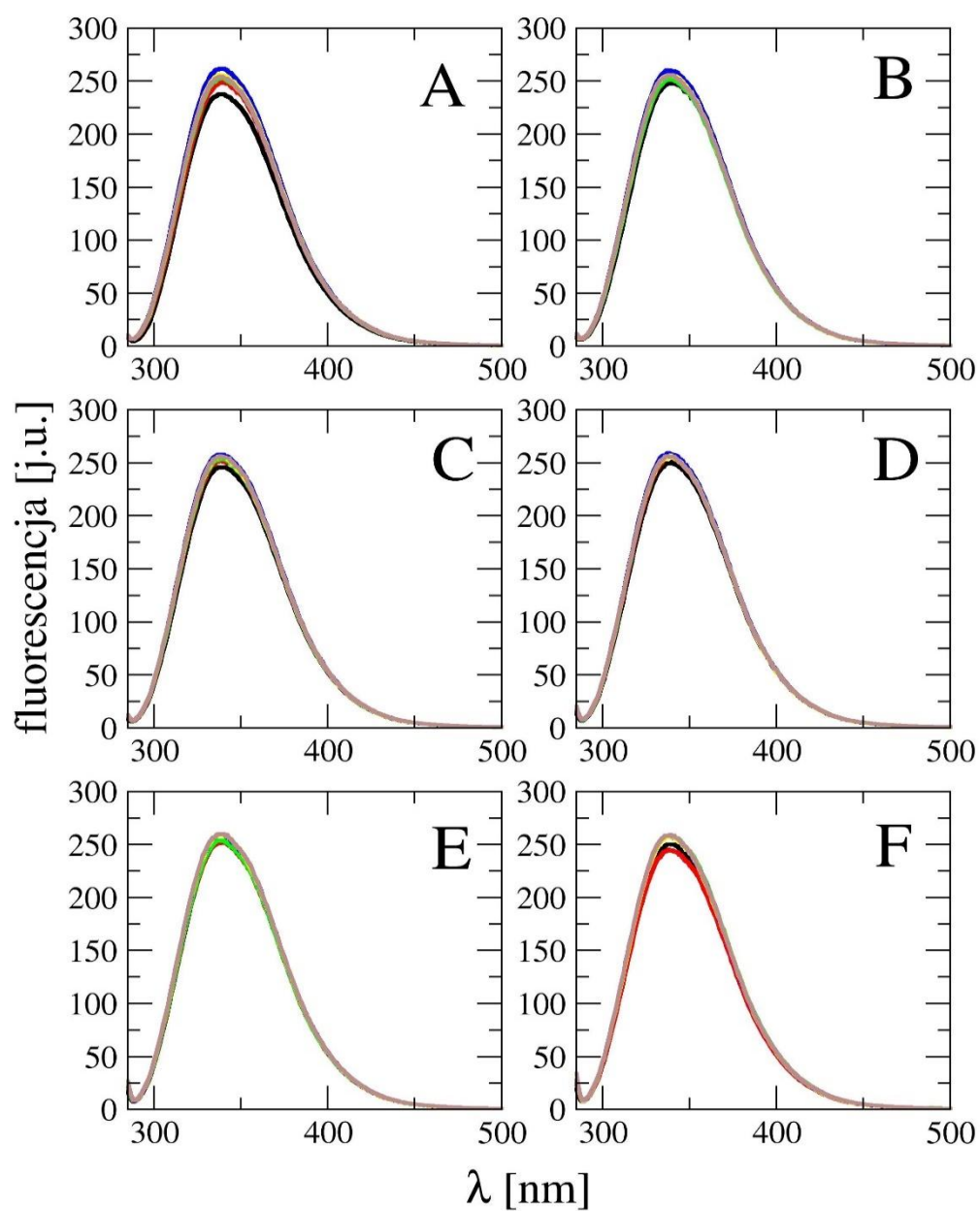
Rysunek D5. Wynik dekonwolucji przeprowadzonej dla 20 μM albuminy + 80 mM SDS w buforze fosforanowym za pomocą programu BeStSel.



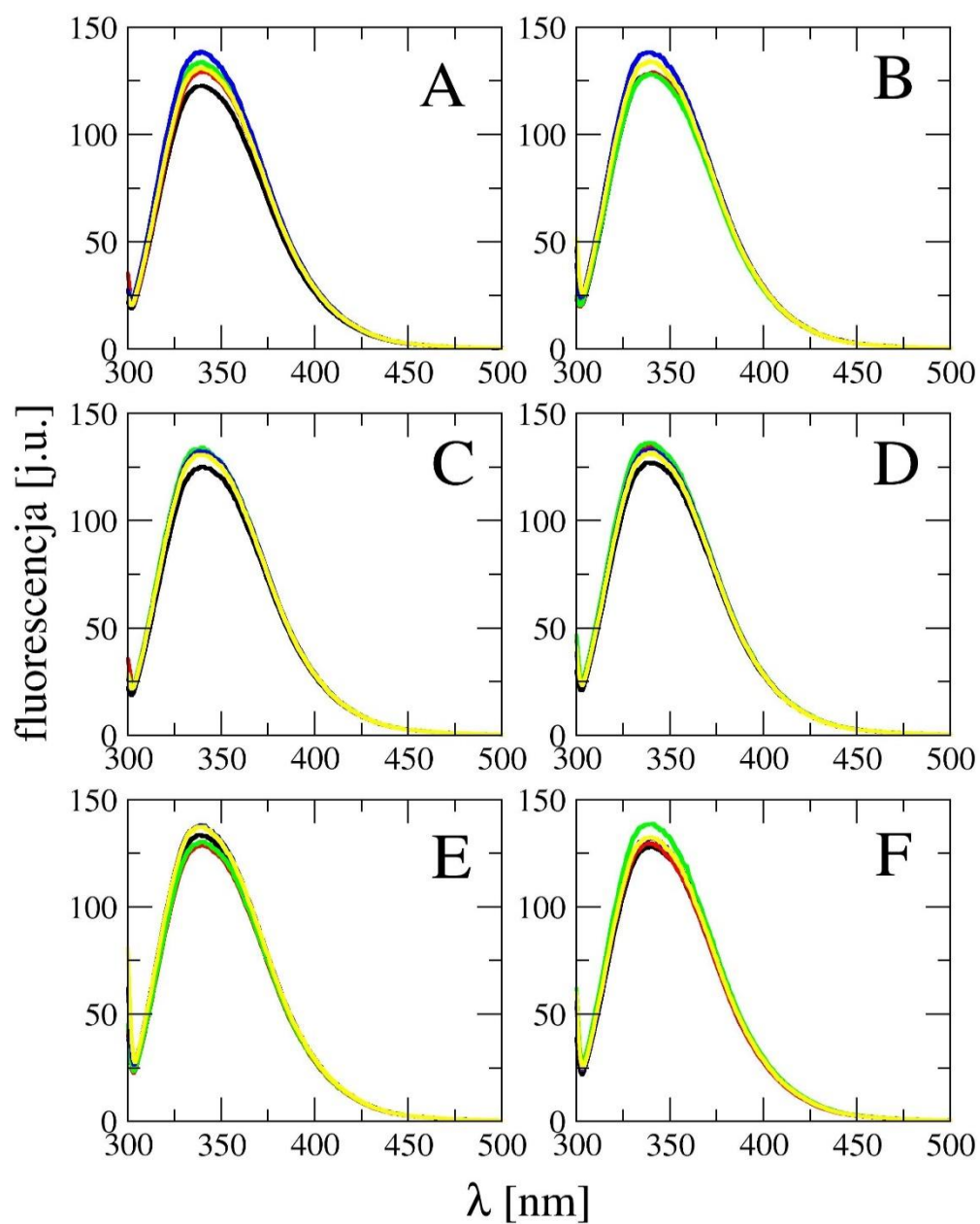
Rysunek D6. Widma fluorescencji lizozymu. Wzbudzenie 208 nm. A – 20 μM HEWL + 8 mM SDS, B – 20 μM HEWL + 12 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 16 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 40 mM SDS, E – 20 μM HEWL + 60 mM SDS, F – 20 μM HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



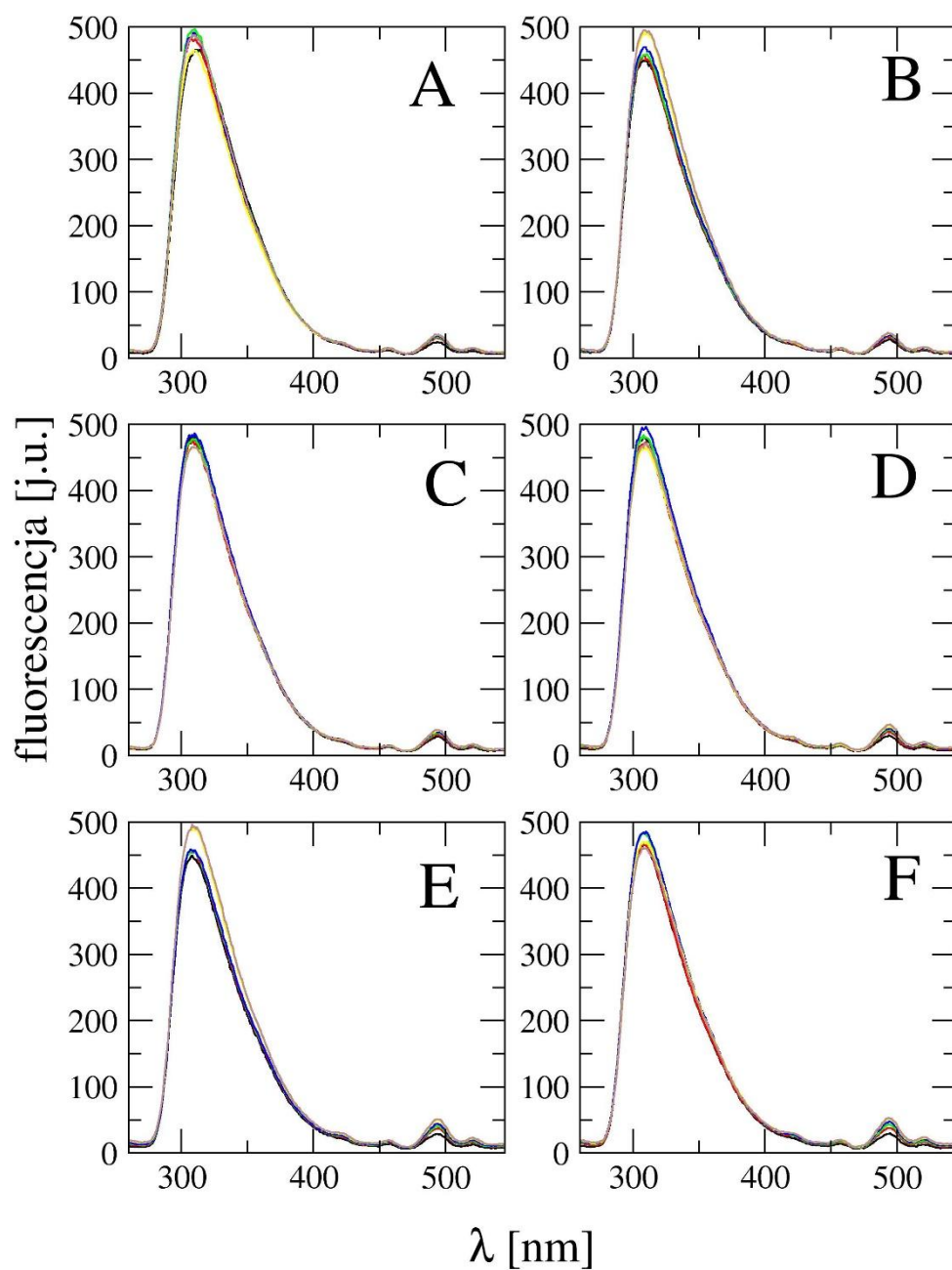
Rysunek D7. Widma fluorescencji lizozymu. Wzbudzenie 260 nm. A – 20 μ M HEWL + 8 mM SDS, B – próbka 20 μ M HEWL + 12 mM SDS, C – 20 μ M HEWL + 16 mM SDS, D – 20 μ M HEWL + 40 mM SDS, E – 20 μ M HEWL + 60 mM SDS, F – 20 μ M HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



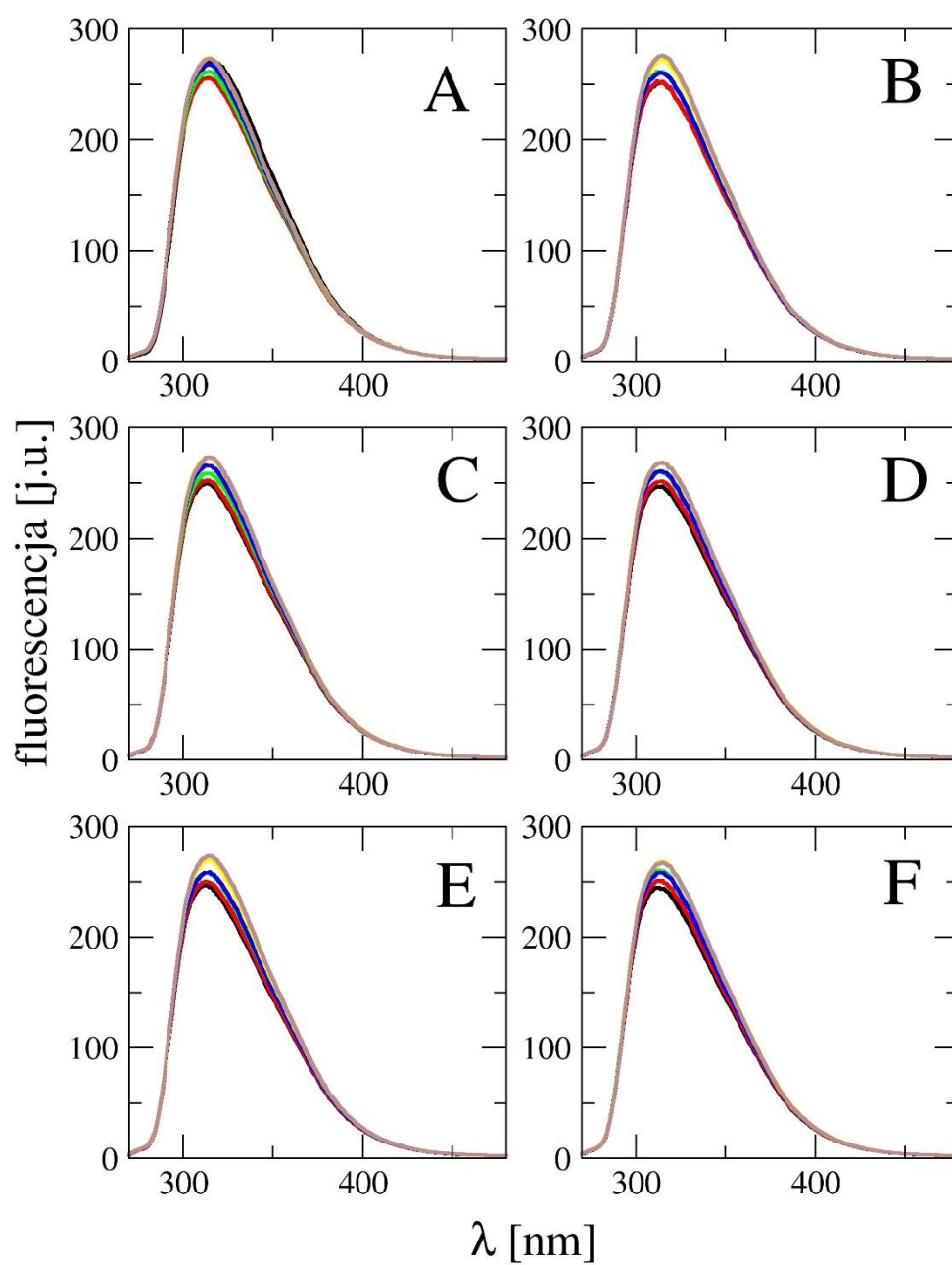
Rysunek D8. Widma fluorescencji lizozymu. Wzbudzenie 280 nm. A – 20 μ M HEWL + 8 mM SDS, B – 20 μ M HEWL + 12 mM SDS, C – próbka 20 μ M HEWL + 16 mM SDS, D – 20 μ M HEWL + 40 mM SDS, E – 20 μ M HEWL + 60 mM SDS, F – 20 μ M HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



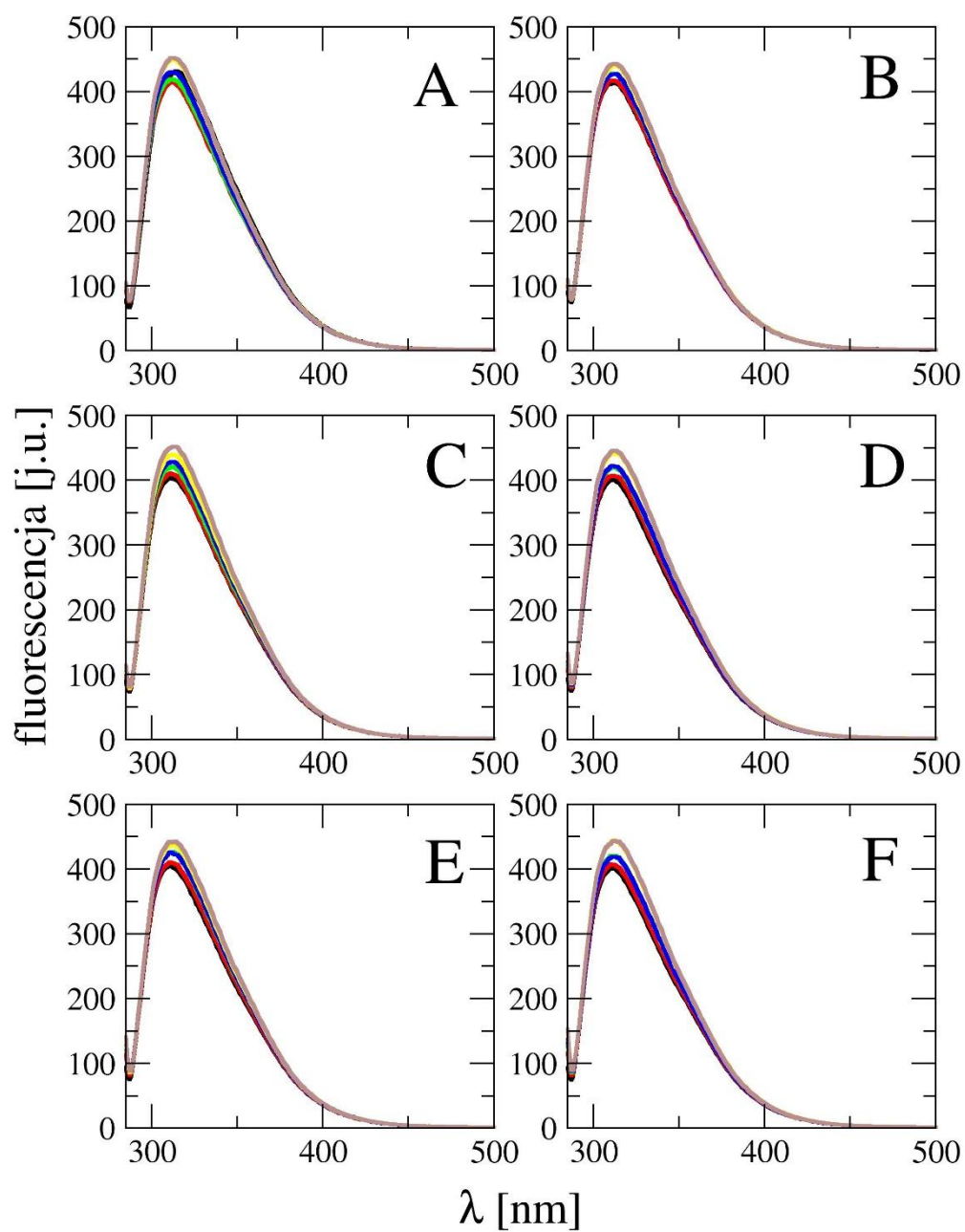
Rysunek D9. Widma fluorescencji lizozymu. Wzbudzenie 295 nm. A – 20 μM HEWL + 8 mM SDS, B – 20 μM HEWL + 12 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 16 mM SDS, D – próbka 20 μM HEWL + 40 mM SDS, E – 20 μM HEWL + 60 mM SDS, F – próbka 20 μM HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



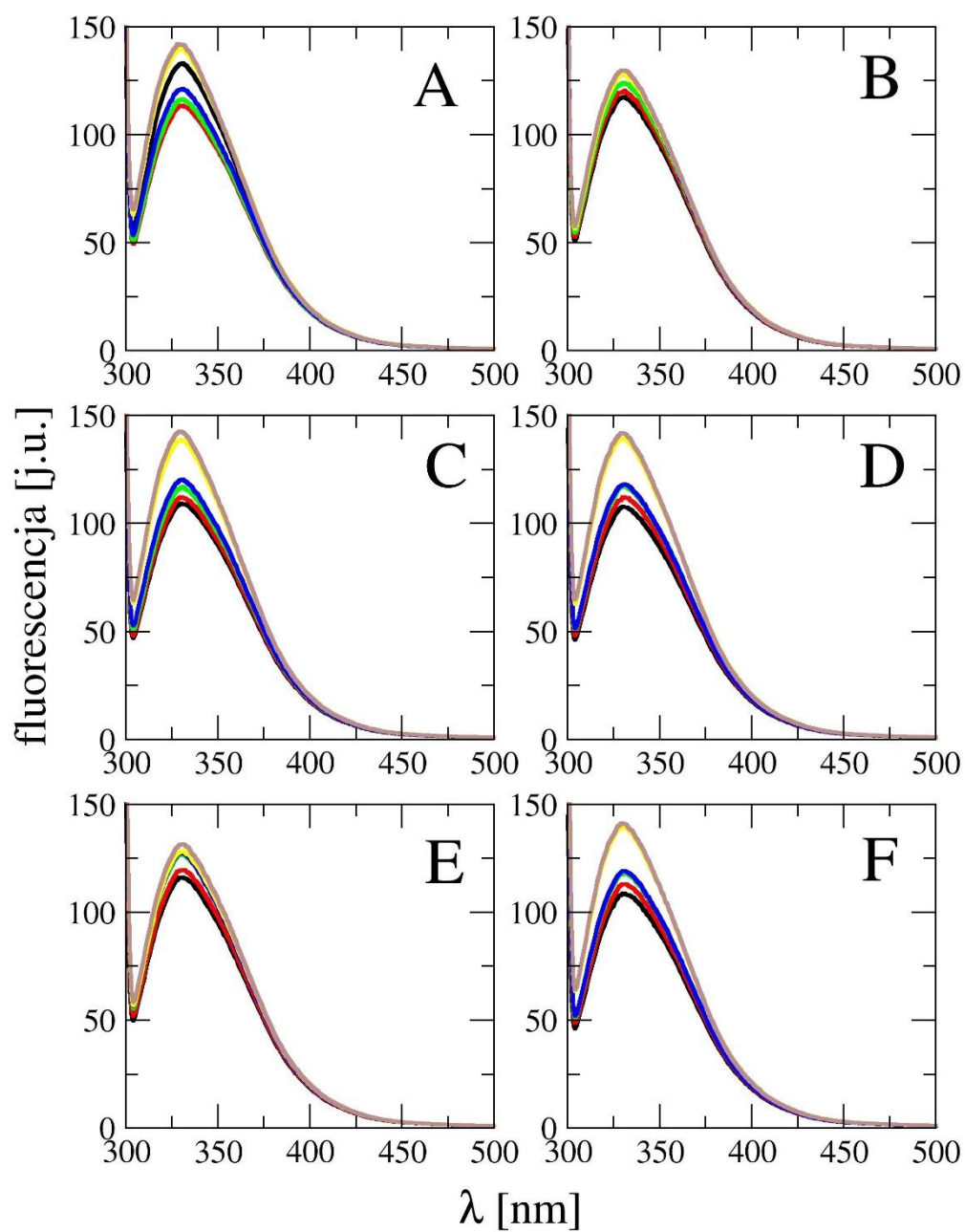
Rysunek D10. Widma fluorescencji albuminy. Wzbudzenie 220 nm. A – 20 μM BSA + 8 mM SDS, B – 20 μM BSA + 12 mM SDS, C – 20 μM BSA + 16 mM SDS, D – próbka 20 μM BSA + 40 mM SDS, E – 20 μM BSA + 60 mM SDS, F – 20 μM BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



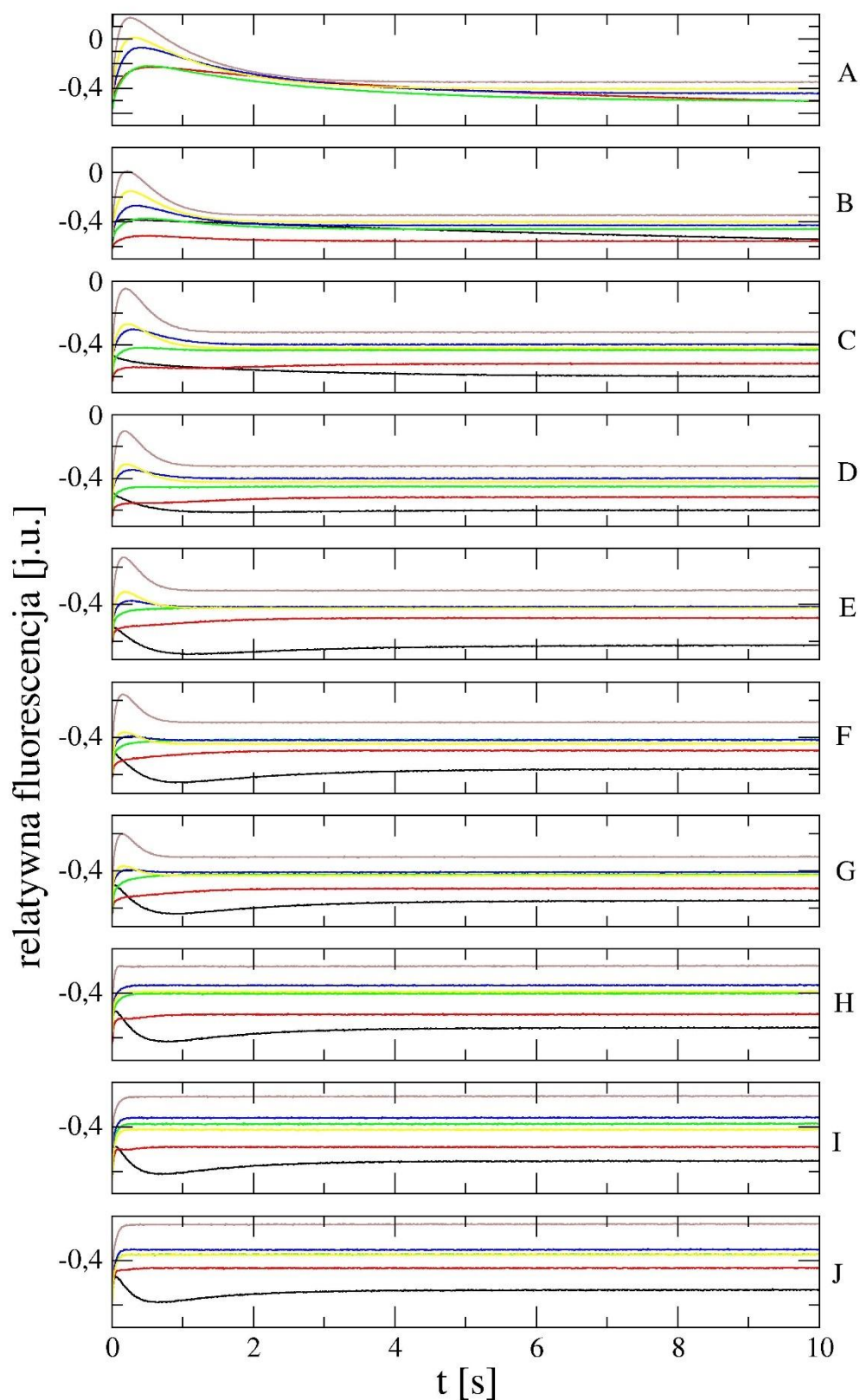
Rysunek D11. Widma fluorescencji albuminy. Wzbudzenie 260 nm. A – 20 μM BSA + 8 mM SDS, B – 20 μM BSA + 12 mM SDS, C – 20 μM BSA + 16 mM SDS, D – próbka 20 μM BSA + 40 mM SDS, E – 20 μM BSA + 60 mM SDS, F – 20 μM BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



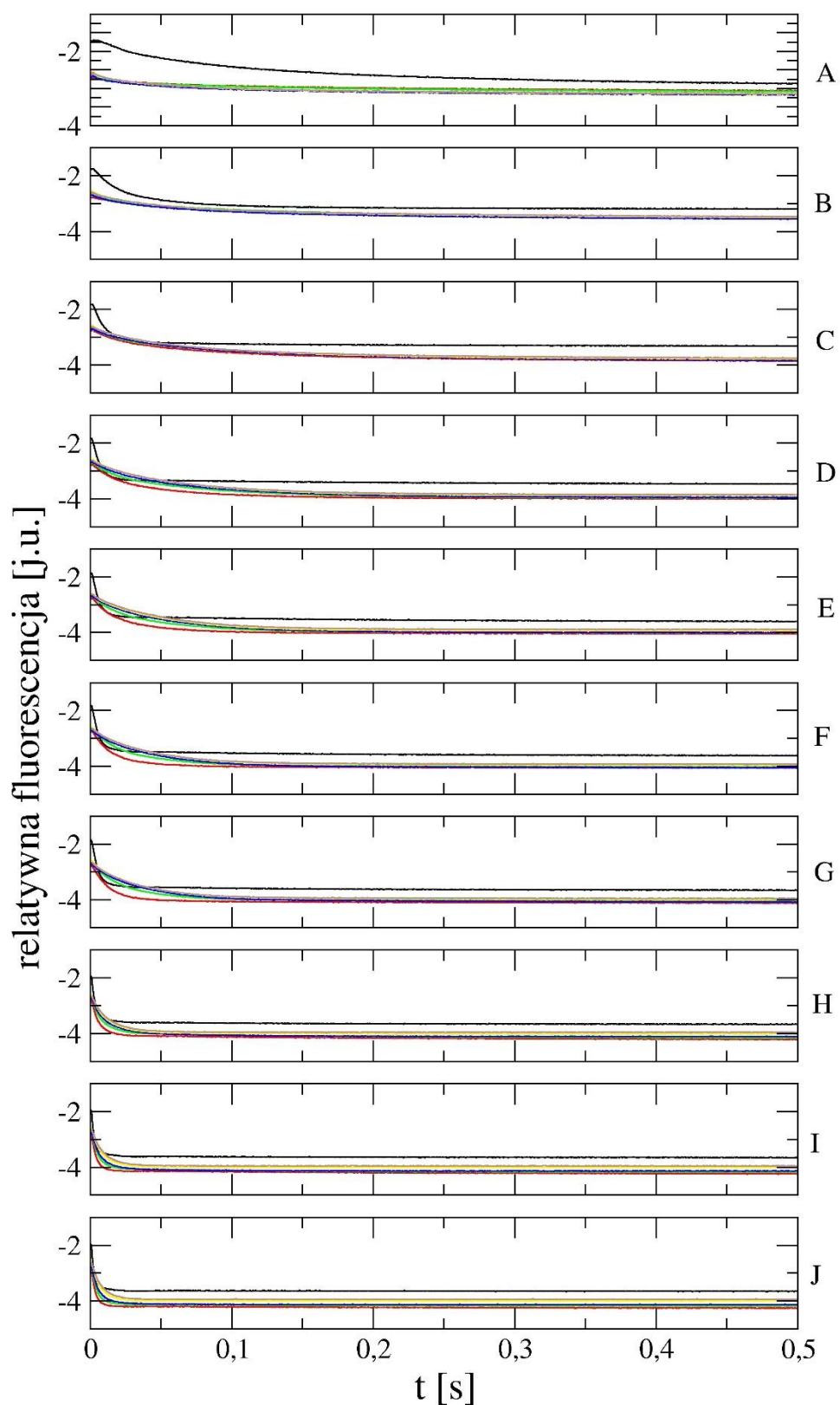
Rysunek D12. Widma fluorescencji albuminy. Wzbudzenie 280 nm. A – 20 μM BSA + 8 mM SDS, B – próbka 20 μM BSA + 12 mM SDS, C – 20 μM BSA + 16 mM SDS, D – 20 μM BSA + 40 mM SDS, E – 20 μM BSA + 60 mM SDS, F – próbka 20 μM BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



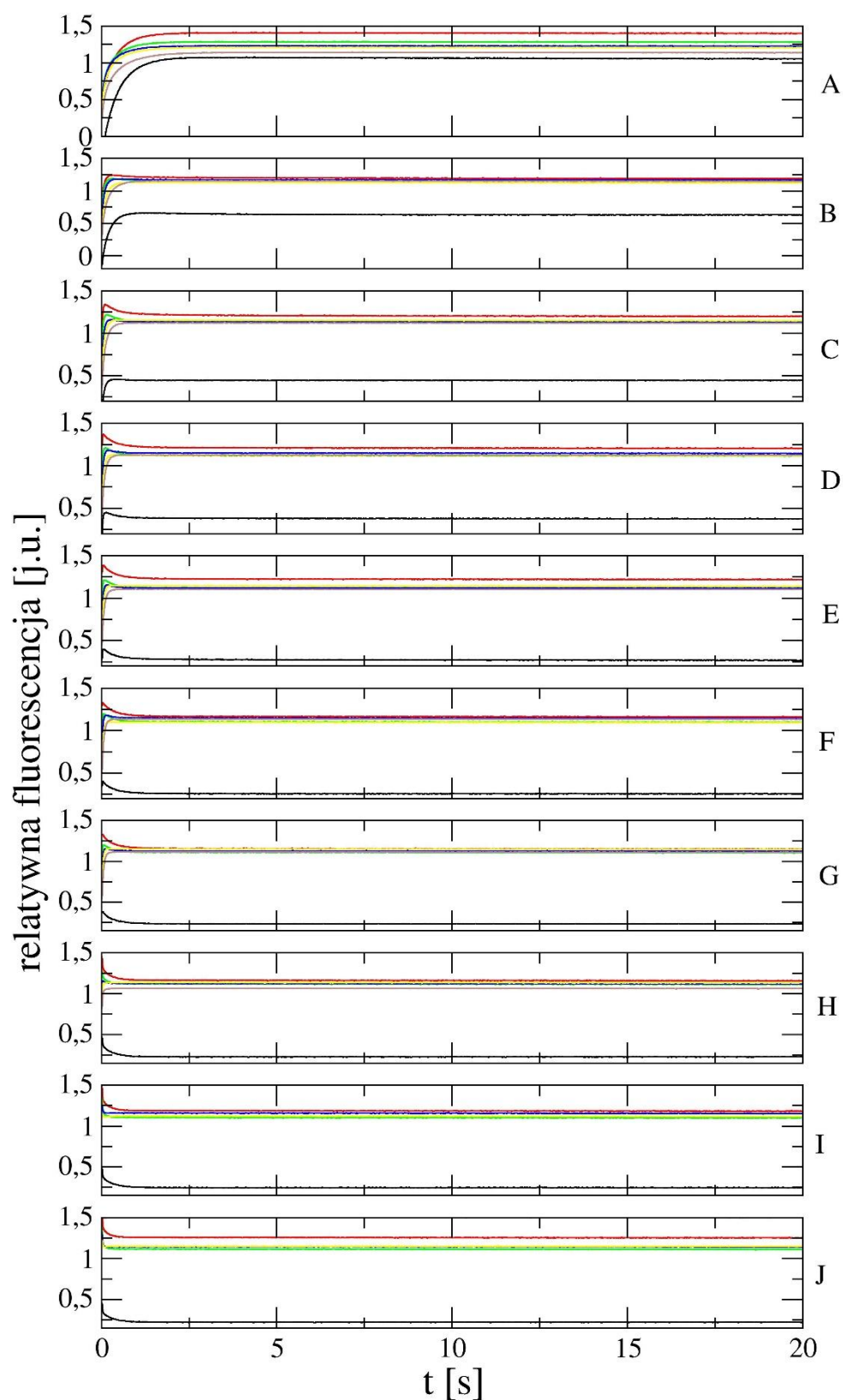
Rysunek D13. Widma fluorescencji albuminy. Wzbudzenie 295 nm. A – 20 μM BSA + 8 mM SDS, B – 20 μM BSA + 12 mM SDS, C – 20 μM BSA + 16 mM SDS, D – 20 μM BSA + 40 mM SDS, E – 20 μM BSA + 60 mM SDS, F – 20 μM BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



Rysunek D14. Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji lizozymu. A – 20 μM HEWL + 6 mM SDS, B – 20 μM HEWL + 8 mM SDS, C – 20 μM HEWL + 10 mM SDS, D – 20 μM HEWL + 12 mM SDS, E – 20 μM HEWL + 14 mM SDS, F – 20 μM HEWL + 16 mM SDS, G – 20 μM HEWL + 18 mM SDS, H – 20 μM HEWL + 40 mM SDS, I – 20 μM HEWL + 60 mM SDS, J – 20 μM HEWL + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



Rysunek D15. Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji albuminy. A – 20 μM BSA + 6 mM SDS, B – 20 μM BSA + 8 mM SDS, C – 20 μM BSA + 10 mM SDS, D – 20 μM BSA + 12 mM SDS, E – 20 μM BSA + 14 mM SDS, F – 20 μM BSA + 16 mM SDS, G – 20 μM BSA + 18 mM SDS, H – 20 μM BSA + 40 mM SDS, I – 20 μM BSA + 60 mM SDS, J – 20 μM BSA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.



Rysunek D16. Relatywne krzywe postępu reakcji z detekcją fluorescencji α -laktoalbuminy. A – 20 μ M LALBA + 6 mM SDS, B – 20 μ M LALBA + 8 mM SDS, C – 20 μ M LALBA + 10 mM SDS, D – 20 μ M LALBA + 12 mM SDS, E – 20 μ M LALBA + 14 mM SDS, F – 20 μ M LALBA + 16 mM SDS, G – 20 μ M LALBA + 18 mM SDS, H – 20 μ M LALBA + 40 mM SDS, I – 20 μ M LALBA + 60 mM SDS, J – 20 μ M LALBA + 80 mM SDS. Siła jonowa 0 mM – kolor czarny, 50 mM – kolor czerwony, 100 mM – kolor zielony, 150 mM – kolor niebieski, 200 mM – kolor żółty, 250 mM – kolor brązowy.

7. Literatura

- [1]. Otzen, D. Protein-Surfactant Interactions: A Tale of Many States. *Biochim. Biophys. Acta* 2011, 1814, 562–591.
- [2]. Takeda, K.; Moriyama, Y. Kinetic Aspects of Surfactant-Induced Structural Changes of Proteins - Unsolved Problems of Two-State Model for Protein Denaturation. *J. Oleo Sci.* 2015, 64, 1143–1158.
- [3]. Dave, N., & Joshi, T. (2017). A Concise Review on Surfactants and Its Significance. *International Journal of Applied Chemistry*, 13(3), 663–672.
- [4]. D. Bajpai, V.K. Tyagi Laundry detergents: an overview *J. Oleo Sci.*, 56 (2007), pp. 327-340.
- [5]. L. Oldenhove de Guertechin, Surfactants: Classification, G. Broze (red.), *Handbook of Detergents, Part A: Properties*; New York, Marcel Dekker INC., 1999, s. 7
- [6]. Fainerman, V. B., Möbius, D., & Miller, R. (Eds.). (2001). *Surfactants: Chemistry, interfacial properties, applications (Studies in Interface Science, Vol. 13)*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science. ISBN 978-0-444-50962-8, 20.
- [7]. Domínguez, A. M. P., Fernández, A. C., González, N., Iglesias, E. L., & Montenegro, L. C. (1997). Determination of critical micelle concentration of some surfactants by three techniques. *Journal of Chemical Education*, 74(10), 1227–1231.
- [8]. M. Kaoud, M. E. Awad, Pipeline flow improvement by drag reduction agent, August 2019, DOI:10.13140/RG.2.2.14894.05447.
- [9]. Laurier L. SchramM, Elaine N. Stasiuk, D. Gerrard Marangoni, Surfactants and their applications, *Annu. Rep. Prog. Chem., Sect. C*, 2003, 99, 3–48
- [10]. Ghosh, S., Ray, A., & Pramanik, N. (2020). Self-assembly of surfactants: An overview on general aspects of amphiphiles. *Biophysical Chemistry*, 265, Article 106429.
- [11]. Bhattarai, A., Niraula, T. P., & Chatterjee, S. K. (2014). Sodium dodecyl sulphate: A very useful surfactant for scientific investigations. *Journal of Knowledge-based Innovation in China*, 2(1), 111–113.
- [12]. R.M. Garavito, S. Ferguson-Miller, Detergents as tools in membrane biochemistry, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 32403–32406.

- [13]. Kurzepa, J., Szpetnar M., (2014). Aminokwasy, peptydy, białka. W J. Kurzepa (red.), *Chemia organizmów żywych* (s. 5–15). Radomskie Towarzystwo Naukowe. ISBN 978-83-88100-18.
- [14]. Feher, J. J. (2012). *Quantitative Human Physiology: An Introduction* (2nd ed.). Academic Press. Chapter 2.3, "Protein Structure" (pp. 100–109).
- [15]. Christian Anfinsen, The formation and stabilization of protein structure, „*Biochemical Journal*”, 128 (4), 1972, s. 737–49.
- [16]. R. Morris, K. A. Black, E. J. Stollar, Uncovering protein function: from classification to complexes, *Essays in Biochemistry* (2022) 66 255–285
- [17]. Chichili, V. P. R., Kumar, V., & Sivaraman, J. (2013). Linkers in the structural biology of protein–protein interactions. *Protein Science*, 22(2), 153–167.
- [18]. Masson, P., & Lushchekina, S. (2022). Conformational stability and denaturation processes of proteins investigated by electrophoresis under extreme conditions. *Molecules*, 27(20), Art. 6861.
- [19]. Yu, Y.-M., & Fukagawa, N. K. (2020). Protein and amino acids. In B. P. Marriott, D. F. Birt, V. A. Stalling, & A. A. Yates (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition: Basic Nutrition and Metabolism* (11th ed., Vol. 1, pp. 63–85). Academic Press.
- [20]. Szaleniec M., Rugor A. *Enzymy - katalizatory życia Wszechświat* 118 (2017) 108-117.
- [21]. Heald, M. A., & Marion, J. B. (1995). *Classical Electromagnetic Radiation*, Saunders College Publishing.
- [22]. Warren, L. (2018). *Polarization in Electromagnetic Systems* (2nd ed.), Artech House.
- [23]. Selleri, F. (1992). *Wave-particle duality*. Springer.
- [24]. Sadlej, J. (2002). *Spektroskopia molekularna*. Warszawa: WNT.
- [25]. Beaven, G. H., & Holiday, E. R. (1952). Ultraviolet absorption spectra of proteins and amino acids. *Advances in Protein Chemistry*, 7, 319–386.
- [26]. Li, Y., & Lee, J. S. (2019). Staring at protein-surfactant interactions: Fundamental approaches and comparative evaluation of their combinations – A review. *Analytica Chimica Acta*, 1063, 18–39.

- [27]. D.E. Otzen, Protein unfolding in detergents: effect of micelle structure, ionic strength, pH, and temperature, *Biophys. J.* 83 (2002) 2219–2230.
- [28]. A. Yonath, A. Podjarny, B. Honig, A. Sielecki, W. Traub, Crystallographic studies of protein denaturation and renaturation. 2. Sodium dodecyl sulfate induced structural changes in triclinic lysozyme, *Biochemistry* 16 (1977) 1418–1424.
- [29]. A.K. Bhuyan, On the mechanism of SDS-induced protein denaturation, *Biopolymers* 93 (2009) 186–199.
- [30]. Crystallisation of sodium dodecyl sulfate and the corresponding effect of 1-dodecanol addition M.N. Jones, Protein–surfactant interactions, in: S. Magdassi (Ed.), *Surface activity of proteins*, Marcel Dekker, New York, 1996, pp. 237–284.
- [31]. Otzen, D. E., Sehgal, P., & Westh, P. (2009). α -Lactalbumin is unfolded by all classes of surfactants but by different mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science*, 329(2), 273–283.
- [32]. R. Schomaecker, B.H. Robinson, P.D. Fletcher, Interaction of enzymes with surfactants in aqueous solution and in water-in-oil microemulsions, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1* (84) (1988) 4203–4212
- [33]. Y. Shi, W. Luo, W.-X. Tian, T. Zhang, H.-M. Zhou, Inactivation and conformational changes of fatty acid synthase from chicken liver during unfolding by sodiumdodecyl sulfate, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30 (1998) 1319–1330.
- [34]. C.A. Nelson, The binding of detergents to proteins. I. The maximum amount of dodecyl sulfate bound to proteins and the resistance to binding of several proteins, *J. Biol. Chem.* 246 (1971) 3895–3901.
- [35]. Kajal, & Pathania, A. R. (2021). Chemistry behind serum albumin: A review. *E3S Web of Conferences*, 309, Article 01086.
- [36]. <https://www.rcsb.org/>
- [37]. <https://bestsel.elte.hu/index.php>
- [38]. Thermo Fisher Scientific. Extinction coefficients: A guide to understanding extinction coefficients, with emphasis on spectrophotometric determination of protein concentration [Technical Note].

- [39]. Jahanban-Esfahlan, A., Ostadrahimi, A., Jahanban-Esfahlan, R., Roufegarinejad, L., Tabibiazar, M., & Amarowicz, R. (2019). Recent developments in the detection of bovine serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 602–617.
- [40]. Sheng, L., Wang, J., Huang, M., Xu, Q., & Ma, M. (2022). The changes of secondary structures and properties of lysozyme along with the egg storage. *International Journal of Biological Macromolecules*, 211, 260–269.
- [41]. Janek, T., Rodrigues, L. R., Gudiña, E. J., & Burger, J. (2021). Synergistic effect of hen egg white lysozyme and lysosomotropic surfactants on cell viability and membrane permeability. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 208, 112096.
- [42]. Wang, C., & Du, D. (2013). Searching for hydrodynamic orienting effects in the association of tri-N-acetylglucosamine with hen egg-white lysozyme. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(8), 2360–2367.
- [43]. Chaudhuri, A., & Chattopadhyay, A. (2011). Lipid binding specificity of bovine α -lactalbumin: A multidimensional approach. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115(16), 5304–5311.
- [44]. Permyakov, E. A., & Berliner, L. J. (2015). α -Lactalbumin: Structure and function. In V. Skulachev (Ed.), *α -Lactalbumin: Structure and function* (pp. 1–30). Springer.
- [45]. Gault, S., Jaworek, M. W., Winter, R., & Cockell, C. S. (2018). High pressures increase α -chymotrypsin enzyme activity under perchlorate stress. *Scientific Reports*, 8, Article 2930
- [46]. <https://www.worthington-biochem.com/products/chymotrypsinogen/manual>
- [47]. Scanes, C. G. (Ed.). (2012). *Protein metabolism*. Academic Press.
- [48]. Mar, A., Coyle, B., & Lim, S. H. (2021). UV–VIS absorption spectroscopy: Lambert-Beer reloaded. *Analytica Chimica Acta*, 1189, 339063.
- [49]. Instruction Manual, User's System Guide, Spectrophotometer Uv-2401, <https://acmerevival.com/wp-content/uploads/2021/06/Shimadzu-UV-2401PC-UV-VIS-Recording-Spectrophotometer-Manual.pdf>
- [50]. <https://www.agilent.com/en/product/molecular-spectroscopy/fluorescence-spectroscopy/fluorescence-systems/cary-eclipse-fluorescence-spectrophotometer>
- [51]. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed.). Springer.

- [52]. Kelly, S. M., Jess, T. J., & Price, N. C. (2005). How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1751(2), 119–139.
- [53]. <https://www.photophysics.com/>
- [54]. Rogers, D. M., Jasim, S. B., Dyer, N. T., Auvray, F., Réfrégiers, M., & Hirst, J. D. (2020). Electronic circular dichroism spectroscopy of proteins. *Chemical Reviews*, 120(14), 7809–7831.
- [55]. T. Krell, M.J. Horsburgh, A. Cooper, S.M. Kelly, J.R. Coggins, Localization of the active site of type II– dehydroquinases. Identification of a common arginine-containing motif in the two classes of dehydroquinases, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 24492 – 24497.
- [56]. Johnson, K. A. (1992). *The stopped-flow technique in analytical chemistry*. Royal Society of Chemistry.
- [57]. Kuzmič, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: Application to HIV proteinase. *Anal. Biochem.* 1996, 237, 260–273.
- [58]. (37) Kuzmič, P. DynaFit - A Software Package for Enzymology. *Methods Enzymol.* 2009, 467, 247–280.
- [59]. <https://bestsel.elte.hu/index.php>
- [60]. Sreerama, N., & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: Comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Analytical Biochemistry*, 287(2), 252–260.
- [61]. <http://www.biokin.com/dynafit/>
- [62]. Tolman, R. C. (1925). The principle of microscopic reversibility. *The Journal of Chemical Physics*, 3(2), 65–71.
- [63]. Nielsen, M. M.; Andersen, K. K.; Westh, P.; Otzen, D. E. Unfolding of β -Sheet Proteins in SDS. *Biophys. J.* 2007, 92, 3674.
- [64]. Patel, J. T.; Belsham, H. R.; Rathbone, A. J.; Friel, C. T. Use of Stopped-Flow Fluorescence and Labeled Nucleotides to Analyze the ATP Turnover Cycle of Kinesins. *J. Visualized Exp.* 2014, 92, No. e52142.

- [65]. Stachurska, K.; Grochowski, P.; Antosiewicz, J. M. Diffusional Encounter Rate Constants for Xanthone and 2-Naphthoic Acid by Flash Photolysis Experiments and Brownian Dynamics Simulations: Substantial Effects of Polarizability of the Triplet State. *J. Phys. Chem. B* 2019, 123, 9328–9342.
- [66]. Fuguet, E.; Ràfols, C.; Roses, M.; Bosch, E. Critical micelle concentration of surfactants in aqueous buffered and unbuffered systems. *Anal. Chim. Acta* 2005, 548, 95–100.
- [67]. Kuehner, D. E., Engmann, J., Fergg, F., Wernick, M., Blanch, H. W., & Prausnitz, J. M. (1999). Multiple coexisting species of sodium dodecyl sulfate–bovine serum albumin complexes as detected by capillary electrophoresis. *Journal of Physical Chemistry B*, 103(8), 1368–1374.
- [68]. Stachurska, K.; Marcisz, U.; Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. Circular Dichroism Spectra of α -Chymotrypsin–SDS Solutions Depend on the Procedure of Their Preparation. *ACS Omega* 2022, 7, 23782–23789.
- [69]. Li, Y.; Lee, J. Staring at protein-surfactant interactions: Fundamental approaches and comparative evaluation of their combinations - A review. *Anal. Chim. Acta* 2019, 1063, 18–39.
- [70]. Stachurska, K.; Marcisz, U.; Długosz, M.; Antosiewicz, J. M. Kinetics of Structural Transitions Induced by Sodium Dodecyl Sulfate in α -Chymotrypsin. *ACS Omega* 2023, 8, 49137–49149.
- [71]. Halford, S. E. Stopped-Flow Fluorescence Studies on Saccharide Binding to Lysozyme. *Biochem. J.* 1975, 149, 411–422.
- [72]. Stachurska, K.; Antosiewicz, J. M. Contribution of Each Tryptophan to the Total Fluorescence Emitted by a Protein with Multiple Tryptophan Residues Depends on the Energy of the Excitation Radiation Quantum, *ACS Omega*, 2024, 16;9(43):43998–44004.
- [73]. Kumar, A., & Singh, S. K. (2022). Novel insights in linking solvent relaxation dynamics and protein conformations utilizing red edge excitation shift approach. *Journal of Molecular Liquids*, 350, 118480.
- [74]. Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy* (3rd ed.). Springer.
- [75]. Korn, E. D. (Ed.). (1975). *Methods in Membrane Biology* (Vol. 4: Biophysical Approaches). New York, NY: Plenum Press (Springer). ISBN 978-0-306-36804-2

- [76]. Micsonai, A., Bulyáki, É., & Kardos, J. (2021). BeStSel: From Secondary Structure Analysis to Protein Fold Prediction by Circular Dichroism Spectroscopy. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2199, pp. 175–186). Springer.
- [77]. Lee, J.-Y., Cheng, X. & Wang, Y. (2021). Ultraviolet plasmonic enhancement of the native fluorescence of tryptophan on aluminum nano-hole arrays. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 54(13), 135107.
- [78]. Kęcki, Z. (1992). *Podstawy spektroskopii molekularnej*. Warszawa: PWN.
- [79]. Takeda, K.; Takagi, S. Stopped-Flow Circular Dichroism Study on Conformational Change of Alpha-Chymotrypsin by Sodium Dodecyl Sulfate. *Agric. Biol. Chem.* 1981, 45, 777–779.
- [80]. Takeda, K. Conformational Change of Delta-chymotrypsin Caused by Sodium Dodecyl Sulfate as Studied by Stopped-flow Circular Dichroic Method. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1982, 55, 1335–1339.
- [81]. Takeda, K. A Kinetic Study on the Conformational Change of Bovine Serum Albumin Induced by Sodium Dodecyl Sulfate. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 1983, 56, 1037–1040.
- [82]. Kwok, A.; Camacho, I. S.; Winter, S.; Knight, M.; Meade, R.M.; Van der Kamp, M. W.; Turner, A.; O'Hara, J.; Mason, J. M.; Jones, A. R.; Arcus, V. L.; Pudney, C. R. A Thermodynamic Model for Interpreting Tryptophan Excitation-Energy-Dependent Fluorescence Spectra Provides Insight Into Protein Conformational Sampling and Stability. *Front. Mol. Biosci.* 2021, 8, No. 778244. 778244.
- [83]. Pedersen, J. N.; Lyngsø, J.; Zinn, T.; Otzen, D. E.; Pedersen, J. S. A Complete Picture of Protein Unfolding and Refolding in Surfactants. *Chem. Sci.* 2020, 11, 699–712.
- [84]. Jensen, G. V.; Pedersen, J. N.; Otzen, D. E.; Pedersen, J. S. Multi-Step Unfolding and Rearrangement of α -Lactalbumin by SDS Revealed by Stopped-flow SAXS. *Front. Mol. Biosci.* 2020, 7, 125.
- [85]. 16) Krainer, G.; Hartmann, A.; Bogatyr, V.; Nielsen, J.; Schlierf, M.; Otzen, D. E. SDS-induced multi-stage unfolding of a small globular protein through different denatured states revealed by single-molecule fluorescence. *Chem. Sci.* 2020, 11, 9141–9153.
- [86]. Bhuyan, A. K. On the Mechanism of SDS-induced Protein Denaturation. *Biopolymers* 2010, 93, 186–199.

[87]. Kim, D., Kim, W., & Kim, S. (2023). Tanh works better with asymmetry. W *Advances in Neural Information Processing Systems* 36 (artykuł nr 12536–12554).

[88]. Rädler, J. (2010, Smooth transition between functions with tanh. Jörg Rädler.