

Avidiini-HABA -kompleksin karakterisointi ja kontrollointi



**Pro gradu -tutkielma
Milja Luukkonen
Jyväskylän yliopisto
Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Solu- ja molekyylibiologian osasto
Toukokuu 2011**

Alkusanat

Pro gradu -tutkielma tehtiin Jyväskylän yliopistossa Bio- ja ympäristötieteiden laitoksella solu- ja molekyylibiologian osastolla vuosien 2010-2011 aikana. Vuoden työn tuloksena tutkielma valmistui lopulta toukokuussa 2011. Poikkitieteellisessä graduaiheessani tutustuin fysiikan ja kemian ihmeelliseen maailmaan, joka oli minulle melko vierasta aluetta. Nämä toivat mukanaan monia uusia menetelmiä, joiden sisäistäminen loi lisähaastetta graduntekoon. Tutkimusaiheeseen ja menetelmiin opastamisesta saan kiittää graduohjaajaani professori Janne Ihalaista, joka joutui myös takomaan päähäni fysikaalisia ilmiöitä varmasti kyllästymiseen asti. Kiitokset siis myös kärsivällisyydestä ja ymmärtävyydestä. Kiitos kuuluu myös toiselle ohjaajalleni tutkija Vesa Hytöselle neuvoista ja kommentteista työni aikana. Lisäksi haluan kiittää Eila Korhosta ystävällisestä avunannosta aina sitä tarvitessa sekä kaikista elämänohjeista. Kiitokset myös Juha Määtälle avusta kalorimetrimittauksissa Tampereella sekä Päivi Ruokolalle neuvoista FTIR-mittauksissa.

Tämä tutkimusprosessi oli kaikkiaan varsin opettavainen ja yksi henkisen kasvun paikka. Työn aikana tunsin kehittyväni monessa eri asiassa, mutta suurinta tyydytystä antoi oivalukseni tutkia pH:n vaikutusta tutkittaviin molekyyliihin. Ajatuksen sain yhden lukemani artikkelin innoittamana ja vielä innostuneempi olin, kun huomasin pH:n olevan käyttökelpoinen parametri tutkimuksia ajatellen. Onnistumiset antoivat luottamusta ja lisäsivät mielenkiintoa tieteellistä tutkimusta kohtaan. Luottamuksesta ja kannustuksesta haluankin vielä kiittää perhettäni ja ystäviä, jotka ovat tukeneet elämäni tiellä.

Jyväskylässä 3.5.2011

Milja Luukkonen

Tekijä: Milja Luukkonen
Tutkielman nimi: Avidiini-HABA-kompleksien karakterisointi ja kontrollointi
English title: Characterization and control of the avidin-HABA complex
Päivämäärä: 3.5.2011 **Sivumäärä:** 74+3

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Molekyylibiologia
Tutkielman ohjaaja(t): Janne Ihalainen, Vesa Hytönen

Tiivistelmä:

Avidiini on tetrameerinen proteiini, jota on tutkittu ja käytetty paljon ligandien sitomiskykynsä ansiosta. Avidiinin luonnollinen ligandi on biotiini, jonka affiniteetti avidiiniin on erittäin voimakas ($K_d=10^{-15}$ M). Avidiini kykenee sitomaan myös muita ligandeja, mutta pienemmällä affiniteetilla. Yksi avidiiniin sitoutuvista molekyyleistä on HABA (4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo) -atsoväri, jota on käytetty avidiini-biotiiniteknologiassa hyväksi.

HABA-molekyylillä on kaksi eri rakenteellista isomeerimuotoa, trans- ja cis-isomeerit. Yleensä se esiintyy tasomaisena molekyylinä eli trans-isomeerina, mutta se voi menettää tasomaisen rakenteensa ja ilmentyä tällöin cis-isomeerina. Avidiiniin sitoutuessaan HABA:n väri muuttuu keltaisesta punertavaksi, ja sitoutuminen voidaan havaita spektroskooppisilla menetelmillä absorption muutoksena. Lisäksi useita erilaisia HABA:n johdannaisia on syntesoitu, ja ne sitoutuvat avidiiniin eri affiniteetilla.

Tässä työssä määritettiin atsovärimolekyylillä HABA:n ja avidiini-HABA -yhdisteiden ominaisuuksia spektroskooppisilla, kromatografisilla ja kalorimetrisilla menetelmillä. Lisäksi HABA-molekyylin ja yhden sen johdanneisen (TAM-017) sitoutumista avidiiniin tutkittiin eri olosuhteissa, kuten eri liuottimissa ja pH-arvoissa. Näiden molekyylin sitoutumista avidiiniin sekä HABA-molekyylin konformaatiota yritettiin myös kontrolloida valon ja liuoksen pH:n avulla. Tällöin pH:n havaittiin vaikuttavan HABA:n ja avidiinin väliseen vuorovaikutukseen. Mikäli HABA-yhdisteiden konformaatiota ja sitoutumista avidiiniin voidaan kontrolloida jonkun ulkoisen tekijän avulla, HABA-tyyppisiä molekyylejä voitaisiin hyödyntää laajalti eri tieteenaloilla. Tämän tutkimuksen tulosten perusteella pH näyttäisikin olevan käyttökelpoinen parametri HABA:n sitoutumisen kontrolloimiseksi.

Avainsanat:

avidini, atsobentseeni, isomerisaatio, kontrollointi

Author: Milja Luukkonen
Title of thesis: Characterization and control of the avidin-HABA complex
Finnish title: Avidiini-HABA-kompleksien karakterisointi ja kontrollointi
Date: 3.5.2011 **Pages:** 74+3

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Molecular biology
Supervisor(s): Janne Ihalainen, Vesa Hytönen

Abstract:

Avidin is a tetrameric protein which has been widely utilized due to its ability to bind different kinds of ligands. Biotin is a natural ligand for avidin and its affinity is very high ($K_d=10^{-15}$ M). However, avidin is able to bind also other ligands with lower affinity. One of the known ligands is HABA (4-hydroxyazobenzene-2-carboxylic acid) and it has been already used in avidin-biotin technology.

Usually HABA exists as a planar molecule, so called trans-isomer, but it may lose the planarity and then exists as a cis-isomer. When HABA is bound to avidin it changes the color from yellow to red, and the binding can be detected by spectral changes. Different derivatives of HABA have been synthesized, and those bind to avidin with different affinity.

In this work we determined the properties of the azomolecules (HABA and TAM-017), avidin and their complex by the spectral, chromatographic and calorimetric procedures. We also examined the binding of the HABA and TAM-017 to the avidin in different solvents and pH. However, the final aim of the work was to study if it would be possible to adjust the conformations of the HABA compounds by external signal, and in this way control the formation of avidin-HABA complexes. Controlling the photoisomerization and binding might allow employing HABA molecules widely in science. The results of this study show that pH might be suitable parameter to control the binding of the HABA.

Keywords:

avidin, azobenzene, isomerization, control

Sisällysluettelo

ALKUSANAT

SISÄLLYSLUETTELO

LYHENTEET JA VIERASPERÄISET SANAT

1 JOHDANTO	8
1.1 Avidiini ja atsobentseenit	8
1.1.1 Avidiini.....	8
1.1.2 Atsobentseenit.....	10
1.1.3 4'-Hydroksiatsobentseeni-2-karboksylihappo (HABA)	11
1.1.4 4-Hydroksi-3-nitroatsobentseeni-3-karboksylihappo (TAM-017).....	12
1.1.5 Avidiini-HABA vuorovaikutus	12
1.1.6 HABA:n spektroskooppiset ominaisuudet	14
1.1.7 Atsobentseenien fotoisomerisaatio ja niiden käyttö.....	15
1.1.8 Atsobentseenien sovelluksia proteiinitutkimuksessa	16
1.1.9 Liuottimen vaikutus atsobentseeneihin.....	18
1.1.10 Tautomeria	19
1.2 Spektroskopiset menetelmät	21
1.2.1 UV/VIS spektroskopia.....	21
1.2.2 Fourier muunnos infrapunaspektroskopia	22
(Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR)	22
1.2.3 CD-spektropolarimetri	24
1.3 Kalorimetriset menetelmät.....	25
1.3.1 Isoterminen titrauskalorimetri.....	25
(Isothermal Titration Calorimetry, ITC)	25
1.4 Kromatografiset menetelmät.....	27
1.4.1 HPLC-geelisuodatus	27
(High Performance Liquid Chromatography).....	27
2 TUTKIMUKSEN TARKOITUS	29
3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	30

3.1 Tutkimusmateriaalit	30
3.2 Avidiinin, atsobentseenien ja kompleksien karakterisointi	31
3.2.1 UV/VIS -spektrofotometriset mittaukset	31
3.2.2 Infrapunaspektroskopiset mittaukset (FTIR)	32
3.2.3 Kromatografiset mittaukset: Geelisuodatus	32
3.2.4 Polyakryyliamidigeelielektroforeesi: SDS-PAGE	33
3.3 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksin kontrollointi	33
3.3.1 Kontrollointi valon avulla	33
3.3.2 Kontrollointi pH:n avulla	34
3.3.2.1 Avidiinin CD-spektroskopiset mittaukset	34
3.3.2.2 Kalorimetrimittaukset	34
4 TULOKSET.....	36
4.1 Avidiinin, atsobentseenien ja kompleksien karakterisointi	36
4.1.1 UV/VIS -spektrofotometriset mittaukset	36
4.1.2 Infrapunaspektroskopiset mittaukset (FTIR)	43
4.1.3 Kromatografiset mittaukset: Geelisuodatus	47
4.2 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksien kontrollointi	52
4.2.1 Kontrollointi valon avulla	52
4.2.2 Kontrollointi pH:n avulla	55
4.2.2.1 Avidiinin CD-spektroskopiset mittaukset	55
4.2.2.2 Kalorimetrimittaukset	56
5 TULOSTEN TARKASTELU.....	59
5.1 Avidiinin, atsobentseenien ja niiden kompleksien karakterisointi	59
5.1.1 Molekyylien ominaisuuksien määrittäminen	59
5.1.2 Atsomolekyylien ja avidiinin väliset vuorovaikutukset	62
5.2 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksien kontrollointi	66
5.2.1 Kontrollointi valon avulla	66
5.2.2 Kontrollointi pH:n avulla	67
5.3 Yhteenveto ja jatkotutkimukset	68
LÄHDELUETTELO	70
LIITE 1.	75

Lyhenteet ja vierasperäiset sanat

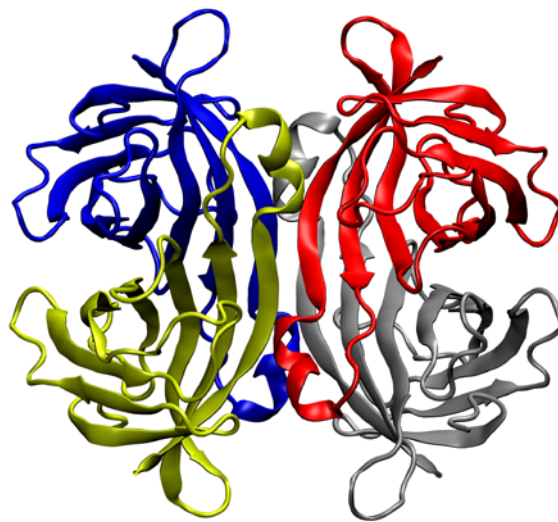
A	absorbanssi
AU	absorbanssiyksikkö
Avd	avidiiniproteiini
Btn	biotiinimolekyyli
cpAvd	sirkulaarisesti permutoitu avidiini (engl. circularly permuted avidin)
DMSO	dimetyylisulfoksidi
DSC	differentiaaliskannauskalorimetri (engl. differential scanning calorimetry)
FTIR	fourier muunnos infrapuna (engl. fourier transform infrared)
HABA	4-hydroksiatsobentseeni-2-karboksylihappo
HPLC	korkean suorituskyvyn nestekromatografia (engl. high performance liquid chromatography)
ITC	isoterminen titrauskalorimetri (engl. isothermal titration calorimetry)
K_d	dissosiaatiovakio
K_a	assosiaatio- eli sitoutumisvakio
PAGE	polyakryyliamidigeelielektroforeesi
SDS	natriumdodekyylisulfaatti (engl. sodium dodecyl sulfate)
TAM-017	4-hydroksi-3-nitroatsobentseeni-3-karboksylihappo
UV-VIS	ultravioletti-näkyvävalo

1 Johdanto

1.1 Avidiini ja atsobentseenit

1.1.1 Avidiini

Proteiinit koostuvat aminohapoista, jotka ovat sitoutuneet toisiinsa peptidisidoksilla. Aminohapot muodostavat proteiinin primäärirakenteen, joka taas järjestäytyy monimutkaisemmiksi sekundaarirakenteiksi (α - ja β -rakenteet) ja lopulta 3-ulotteiseksi proteiiniksi. Avidiini on tetrameerinen proteiini, jonka neljä identtistä alayksikköä koostuvat kukin kahdeksasta antiparalleelista β -levystä (Kuva 1) (Livnah ym., 1993b; Pugliese ym., 1993). Sen jokaisessa alayksikössä on sitoutumistasku, johon sopiva pienmolekyylili eli ligandi voi kiinnittyä. Avidiini on glykoproteiini, jonka isoelektrinen piste (nettovaraus on 0) on pH:ssa 10. Avidiini liukenee helposti erilaisiin liuoksiin, ja sen rakenne on vakaa hyvin laajalla pH- ja lämpötila-asteikolla (Green, 1975). Avidiinia on löydetty useiden lintulajien munista ja munanjohtimista sekä sammakoiden kudusta (Hertz ja Sebrell, 1942; Jones ja Briggs, 1962; Korpela ym., 1981; Hytönen ym., 2003). Tieteellisissä tutkimuksissa on kuitenkin käytetty eniten kananmunan valkuaisessa esiintyvää avidiinia. Avidiini kuuluu geeniperheeseen, joka sisältää useita avidiinin kaltaisia geenejä (AVR), joiden biologinen tehtävä on kuitenkin vielä tuntematon (Ahlroth ym., 2000; Niskanen ym., 2005).



Kuva 1. Avidiinin rakennemalli, joka perustuu röntgensädekristallografisesti määritettyyn rakenteeseen PDB 2AVI (Livnah ym., 1993b). Kuvan on tehnyt Vesa Hytönen ohjelmalla VMD 1.8.7.

Streptomyces bakteereista on löydetty avidiininkaltaista proteiinia, streptavidiniä, joka havaittiin alun perin antibioottien seulonnan yhteydessä (Chaiet ja Wolf, 1964). Streptavidiinilla ei ole rakenteessaan hiilihyaattiosaa, kuten avidiinilla. Lisäksi sen isoelektrinen piste on happamassa pH:ssa, eikä se liukene veteen yhtä hyvin kuin avidiini. Kummatkin proteiinit sitovat D-biotiinia, eli H-vitamiinia, mutta avidiini sitoo sitä voimakkaammalla affiniteetilla ($K_d=10^{-15}$ M) (Green, 1975). Dissosiaatiovakio (K_d) ilmaisee reaktion tasapainoa ligandin sitoutuessa proteiiniin, ja sitä käytetäänkin proteiinin ja sen ligandin välisen affiniteetin ilmaisuun. Mitä pienempi dissosiaatiovakio-arvo on, sitä voimakkaammalla affiniteetilla proteiini sitoo ligandia. Streptavidiinin ja avidiinin erilainen affiniteetti HABA-molekyylillä kohtaan on ajateltu johtuvan proteiinien L3,4 silmukan erilaisesta rakenteesta (Hendrickson ym., 1989; Livnah ym., 1993a). Sekä avidiniä että streptavidiniä on käytetty ja tutkittu paljon, ja niitä hyödynnetään usealla eri teknologian alalla, sekä biotieteissä että lääketieteessä (Wilchek ja Bayer, 1999; Keren ym., 2003; Hinds ym., 2004).

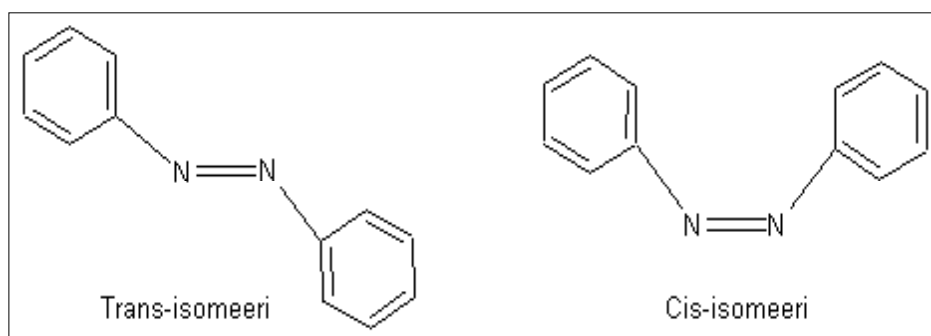
Vahva avidiini-biotiinivuorovaikutus vaikuttaisi olevan biologisesti tärkeä, sillä sen on ajateltu suojaavan kasvavaa alkioita mikrobien aiheuttamilta infektioilta (Green, 1975; Nordlund ym., 2005). Biotiinin sitoutuminen avidiiniin johtaa niiden konformaatioiden, stabiilisuuden ja jäykkyyden muutoksiin (Weber ym., 1989; Livnah ym., 1993b; González ym., 1999; Williams ym., 2003). Kaikista joustavin osa avidiinissa on β -levyjen 3 ja 4 välinen silmukka (L3,4 loop) (Weber ym., 1989; Livnah ym., 1993b; Pugliese ym., 1993). Tämä alue on vuorovaikutuksessa ligandin kanssa, ja se voi olla joko avoimessa tai suljetussa muodossa riippuen ligandin sitoutumisesta. Silmukka on 12 aminohappoa pitkä ja muodostuu aminohappotähteistä 35-46. L3,4 silmukka toimii molekulaarisena säätelijänä rajoittaen biotiinin sekä sen johdannaisen sitoutumista ja edistäen proteiinin muuttumista pseudoentsyymiksi (Pazy ym., 2003; Eisenberg-Domovich ym., 2004). Avidiinin silmukkarakenne on yleensä avoimessa muodossa, mutta biotiinin sitoutuminen stabiloi silmukan konformaation ja ”lukitsee” sen suljettuun muotoon (Livnah ym., 1993b).

Avidiinin ja biotiinin vuorovaikutusta on käytetty laajasti hyödyksi bio- ja nanoteknologiassa (Wilchek ja Bayer, 1990 ja 1999). Niiden välinen sitoutuminen on kuitenkin lähes palautumaton, eikä tällainen vahva sidos ole kovin hyödyllinen kaikissa tilanteissa (Repo ym., 2006). Avidiini sitoo myös useita erilaisia värimolekyylejä ja peptidejä, joilla ei ole

selvää rakenteellista samankaltaisuutta biotiinin kanssa (Green, 1975). Siitä huolimatta ne vaikuttavat sitoutuvan samaan sitoutumiskohtaan avidiinissa, mutta biotiini pystyy kuitenkin syrjäyttämään nämä biomimeettiset molekyylit avidiinin sitoutumistaskuista (Wilchek ja Bayer, 1990; Livnah ym., 1993b).

1.1.2 Atsobentseenit

Atsobentseenit ovat kemiallisia yhdisteitä, joiden fenyylirenkaita erottaa atsosidos $-N=N-$, ja ne voivat muodostaa useita erilaisia aromaattisia yhdisteitä. Atsoyhdisteet ovat suhteellisen vahvoja ja kemiallisesti vakaita, minkä seurauksena niitä on käytetty laajalti teollisuudessa mm. väriyhdisteissä. Atsobentseenikromoforeja voidaan muuttaa kahden geometrisen isomeerin välillä käyttämällä näkyvää valoa. Ilmiötä sanotaan fotoisomerisaatioksi, ja se on sekä nopea että palautuva reaktio. Isomerisaation aikana tapahtuu merkittäviä muutoksia atsobentseenimolekyylien optisissa, geometrisissa, mekaanisissa ja kemiallisissa ominaisuuksissa. Isomerisaatio on täysin palautuva mekanismi, eikä sillä ole sivureaktioita, mikä tekee siitä yhden puhtaimmista valokemiallisista reaktioista. Atsobentseenimolekyyleillä on kaksi isomerisaation muotoa, trans ja cis (Kuva 2). Trans-isomeeri voidaan muuttaa valon avulla cis-muodoksi, joka taas voidaan vaihtaa takaisin trans-muotoon joko valokemiallisesti tai termalisesti. Näistä kahdesta isomeeristä trans-muoto on vakaampi, ja molekyylin geometria vaihtelee tasomaisesta trans-muodosta cis-rakenteeseen, jossa molemmat fenyylirenkaat ovat kääntyneet toisiaan kohti (El Halabieh ym., 2004). Atsobentseenien fotoisomerisaation uskotaan tapahtuvan pyörimis- tai kääntymismekanismin kautta. Trans-konformaation muuttuminen cis-muodoksi tapahtuu pyörimismekanismin ja/tai kääntymismekanismin kautta, kun taas cis-konformaation muuttuminen takaisin trans-tilaan uskotaan tapahtuvan kääntymällä (Mitchell ja King, 1999).

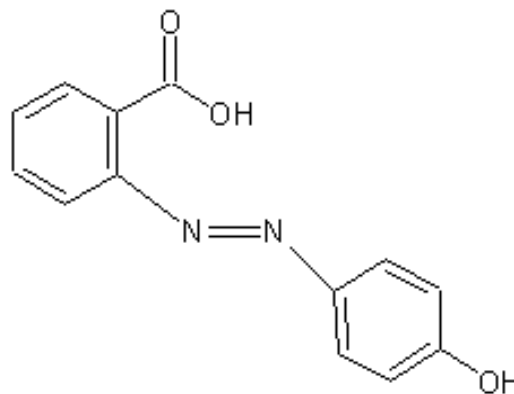


Kuva 2. Atsobentseenien kaksi isomeriamuotoa: trans- ja cis-isomeerit. Kuva on tehty artikkelin Halabieh ym. (2004) mukaan ACD/ChemSketch -ohjelmalla (ACD/Labs 12).

Atsobentseenejä sisältäviä materiaaleja voidaan säteilyttää valolla, jolloin molekyyleissä saadaan aikaan kahden isomeerin välinen isomerisaatioreaktio. Tämä tekee atsobentseeneistä valolla muuttuvia molekyyliä (photoswitches). Isomerisaation aiheuttamat muutokset muuttavat myös molekyyliä ympäröivän ympäristön ominaisuuksia. Atsobentseenejä on hyödynnetty niiden isomeeristen ominaisuuksien ansiosta, ja niiden käyttöä voidaan yhä laajentaa mm. bio- ja nanoteknologiassa (El Halabieh ym., 2004).

1.1.3 4'-Hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo (HABA)

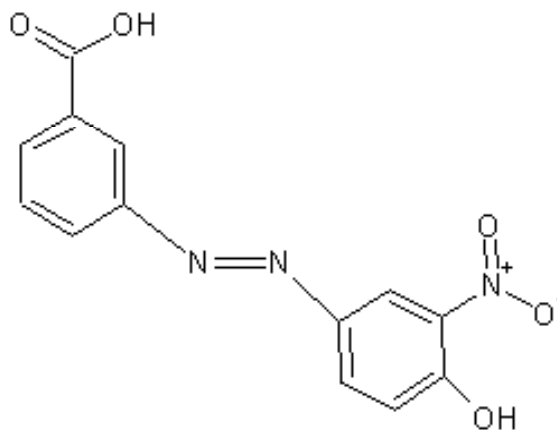
HABA eli 4'-hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihappo (242,23 g/mol) (Kuva 3) on atsoväri, joka sitoutuu avidiiniin, ja siksi sitä on käytetty avidiini-biotiini -teknologiassa (Green, 1970; Wilchek ja Bayer, 1990). Sitoutuessaan avidiiniin HABA:n väri muuttuu keltaisesta punertavaksi. Myös steptavidini ja naudan seerumin albumiini sitovat HABA-molekyyliä, mutta huomattavasti alhaisemmalla affiniteetilla ($K_d=1 \times 10^{-4} \text{M}$) verrattuna avidiiniin ($K_d=6 \times 10^{-6} \text{M}$) (Green, 1990). HABA on tasomainen molekyyli, mutta sitoutuessaan proteiiniin se saattaa menettää tasomaisen rakenteensa ja esiintyä hydratsonitautomeerina. Tämän seurauksena bentsoaattirenkaan proksimaalinen typpi atomi muuttaa muotoaan tasomaisesta sp^2 -konfiguraatiosta tetrahedraaliseen sp^3 -konfiguraatioon. Samalla HABA menettää sen π -elektronien täydellisen konjugaation ja koostuu siten kahdesta tasomaisesta kokonaisuudesta. HABA syrjäyttää avidiiniin sitoutuessaan viisi vesimolekyyliä, aivan kuten avidiinin luonnollinen ligandi, biotiini (Livnah ym., 1993a). HABA:lle on myös syntetisoitu useita erilaisia johdannaisia, joilla on erilaisia ominaisuuksia, ja ne sitoutuvat avidiiniin eri affiniteeteilla (Weber ym., 1992; Paldanius, 2004).



Kuva 3. 4-Hydroksiatsobentseeni-2-karboksyylihapon (HABA) molekyyli rakenne. Kuva on tehty Pro gradu -tutkielman Paldanius (2004) mukaan ACD/ChemSketch -ohjelmalla (ACD/Labs 12).

1.1.4 4-Hydroksi-3-nitroatsobentseeni-3-karboksylihappo (TAM-017)

Yksi HABA:n johdannaisista on 4-hydroksi-3-nitroatsobentseeni-3-karboksylihappo, jonka synteesikoodi on TAM-017 (287 g/mol) (Kuva 4), ja joka sitoutuu avidiiniin suuremmalla affiniteetilla kuin HABA. Se on liukoisena väriltään oranssinkeltainen, eikä avidiinin lisääminen TAM-017 -liuokseen aiheuta merkittävää värimuutosta. TAM-017 absorboi valoa aallonpituudella 380 nm:a, mutta avidiinin lisääminen aiheuttaa sinisiirtymän 364 nm:n kohdalle (Paldanius, 2004). TAM-017 valittiin tähän tutkimukseen paremman affiniteetin ja aikaisemman tutkimuksen (Paldanius, 2004) UV/VIS-spektrin perusteella. Tämän spektrin mukaan TAM-017 saattaa olla eri isomerisaatiomuodossa kuin HABA, koska spektri ei näytä muuttuvan avidiinin lisäämisestä.



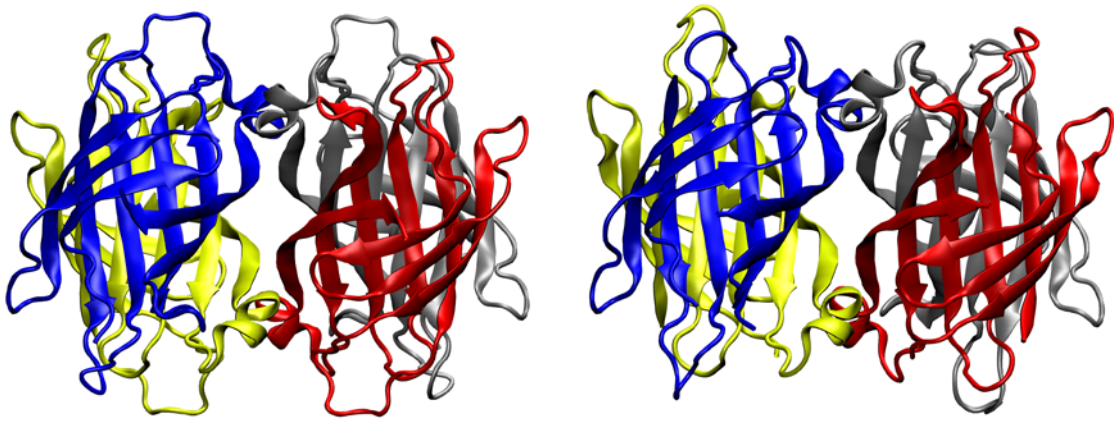
Kuva 4. 4-Hydroksi-3-nitroatsobentseeni-3-karboksylihapon (TAM-017) molekyyli rakenne. Kuva on tehty Pro gradu -tutkielman Paldanius (2004) mukaan ACD/ChemSketch -ohjelmalla (ACD/Labs 12).

1.1.5 Avidiini-HABA vuorovaikutus

HABA:n väri- ja spektrimuutokset on yhdistetty HABA:n sitoutumiseen avidiiniin. Lisäksi HABA:n ja avidiinin välisen sitoutumisreaktion on havaittu olevan endoterminen pH:ssa 7, eli reaktion aikana sitoutuu lämpöä (Määttä ym., 2008). HABA ja sen johdannaiset ovat avidiiniin sitoutuessaan vuorovaikutuksessa proteiinin sitoutumistaskun aminohappojen kanssa. HABA:n bentsoaattirenkaan happiatomi muodostaa kolmen vetysidoksen verkoston avidiinin aminohappojen Asn12, Ser16 ja Tyr33 kanssa, jolloin muodostuu happianio-

ni. HABA:n toinen karboksyylinen happi muodostaa vetysidoksia aminohappojen Ser16 ja Thr35 kanssa sekä molekyylin sisäisen vetysidoksen yhden HABA:n typen kanssa. Lisäksi bentseenirenkaalla on hydrofobisia vuorovaikutuksia kolmen aromaattisen aminotähteen, kuten Phe79, Trp97 ja viereisen monomeerin Trp110, kanssa. HABA:n toisessa päässä hydroksifenyylihappi muodostaa vetysidoksen Ser73 kanssa ja on vuorovaikutuksessa Phe72 fenyylirenkaan π -elektronitason kanssa. Lisäksi ligandin hydroksifenyylirengas on kasautunut Trp70 indolirenkaaseen muodostaen varauksen siirtäjä-kompleksin, jossa tryptofaani toimii luovuttajana ja HABA:n hydroksifenyylirengas vastaanottajana (Livnah ym., 1993a). L3,4 silmukan rakenne on häiriintynyt avidiini-HABA rakenteessa (Livnah ym., 1993b), kun taas vastaava silmukka on ”suljetussa” konformaatioissa streptavidinin ja HABA:n (Weber ym., 1992 ja 1994) sekä HABA:n johdannaisten muodostamassa kompleksissa. HABA johdannaisia, joilla on suurempi affiniteetti avidiiniin, tarvitaan parantamaan vuorovaikutukseen perustuvien mittausjärjestelmien herkkyyttä (Livnah ym., 1993a). Jotta HABA-tyyppisiä molekyyliä voitaisiin laajemmin käyttää avidiini-biotiini-tekniologiassa, pitäisi HABA-yhdisteiden sitoutumista avidiiniin pystyä kontrolloimaan jonkun ulkoisen tekijän avulla.

Kohdennetun mutageneesin avulla on kyetty muokkaamaan avidiinin sitomisominaisuuksia muuttamalla proteiinin rakennetta, jolloin ligandien affiniteettiä avidiiniin on saatu muutettua (ks. yleiskatsaus Laitinen ym., 2006 ja 2007; Määttä ym., 2008). Täten rekombinanttiavidiineja on tuotettu myös atsoyhdisteiden affiniteetin parantamiseksi. Määttä ym. 2008 havaitsivat, että mutaatio N118M (Asn118 korvaaminen metioniinilla) avidiinissa lisää HABA:n sitoutumista ja vähentää biotiinin sitoutumisaffiniteettiä avidiiniin. Kyseinen N118M mutaatio liitettiin myös sirkulaarisesti permutoituun avidiiniin eli cpAvd4->3 konstruktiin, josta puuttui β -levyjen 3 ja 4 välinen silmukka (Kuva 5). HABA on osoittautunut sitoutuvan tähän rekombinanttiavidiiniin voimakkaammin kuin villityypin avidiiniin (Määttä ym., 2008). Tällaisia rekombinanttiavidiineja voidaan hyödyntää sovelluksissa, joissa tarvitaan HABA:n voimakkaampaa affiniteettiä avidiiniin.



Kuva 5. Avidiinin villityyppi (vasemmalla) ja sirkulaarisesti permutoitu muoto (oikealla). Kuvat perustuvat PDB-rakenteisiin 2AVI (villityypin avidiini, Livnah ym., 1993) ja 2JGS (permutoitu avidiini, Määttä ym. 2008). Kuvat on tehnyt Vesa Hytönen ohjelmalla VMD 1.8.7.

1.1.6 HABA:n spektroskooppiset ominaisuudet

Atsoväriyhdisteiden spektroskooppisia ominaisuuksia vesiliuoksissa on tutkittu UV-spektroskopiolla. HABA-molekyylille on havaittu kaksi absorptiospektrin huippua, 350 nm:ssa ja 440 nm:ssa, jotka ovat seurausta HABA:n kahdesta erilaisesta konformaatiosta. Avidiinin tiedetään vaikuttavan HABA:n absorptiospektriin merkittävästi, ja niiden kompleksi absorboi lähellä aallonpituutta 500 nm:a. Yleisesti ottaen absorptiospektrin muutokset heijastaa vaihteluita fysikaaliskemiallisessa ympäristössä, joka ympäröi proteiinia ja siihen sitoutunutta ligandia, sekä muutoksia kaksoissidoksen konjugaatiossa sitoutumisen seurauksena. Lisäksi absorptiospektrissä on havaittu lähinnä punasiirtymiä, vaikkakin myös spektrin sinisiirtymiä on havaittu. HABA:n on myös osoitettu esiintyvän hydratsonitautomeerina ollessaan sitoutuneena avidiiniin (Kuva 9). Atsovärien vuorovaikutukset proteiinin kanssa aiheuttavat useita samanaikaisia muutoksia, ja ligandin sitoutuminen johtaakin absorption intensiteetin eroavaisuuksiin sekä spektrin siirtymiseen. Spektraaliset muutokset johtuvat molekyylien sisäisistä ja niiden välisistä vetysidosten muodostumisista ja kaksoissidosten uudelleenjärjestäytymisestä (Livnah ym., 1993a; Repo ym., 2006).

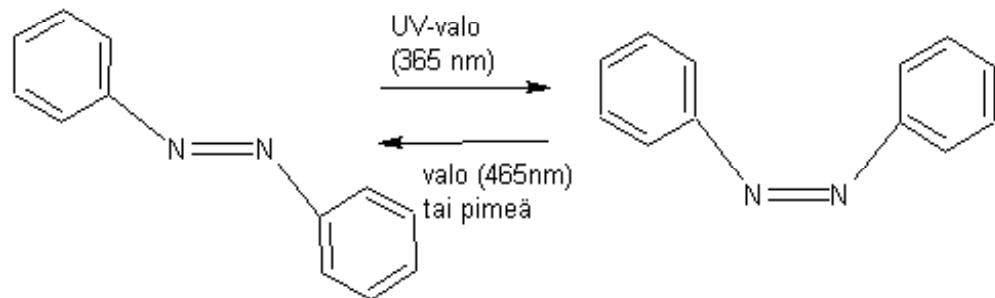
1.1.7 Atsobentseenien fotoisomerisaatio ja niiden käyttö

Jotkut biologiset tapahtumat voidaan aktivoida valosignaalin avulla. Tällöin kromoforin virittyminen aiheuttaa jonkinlaisen kemiallisen reaktion, kuten fotoisomerisaation. Virittymisen ja reaktion aktivoimisen jälkeen kromofori palaa alkuperäiseen perustilaansa. Biomateriaaleja, joita voidaan säädellä valon avulla, voidaan hyödyntää mm. katalyyysi-, sitoutumis- ja tunnistamistoiminnoissa. Näitä valolla muuttuvia biomateriaaleja on käytetty erilaisissa bioteknologian sovelluksissa, sillä niiden avulla voidaan säädellä esimerkiksi entsyymien aktiivisuutta tai ne voidaan liittää kiinteisiin pintoihin ja sähköisiin muuntajiin (Willner ja Rubin, 1996). Niiden käyttöä voidaan laajentaa myös muihin biologisiin toimintoihin, ja ne voidaan liittää mm. DNA:n, reseptoreiden tai hormonien toimintaan. Valon avulla muuttuvat molekyylit ovat herättäneet mielenkiintoa myös nanoteknologiassa niiden monien käyttömahdollisuuksien ansiosta (Willner, 1997).

Atsobentseenien isomeerimuotoa voidaan vaihtaa trans- tai cis-isomeeriksi ulkoisen signaalin, kuten valon, elektronien tai lämpötilan, avulla. Tästä isomeerin muuttumisesta seuraa laaja geometrinen muutos tasomaisesta trans-muodosta kolmiulotteisempaan ja tiiviimpään cis-muotoon (El Halabieh ym., 2004). Molekyylin rakenteellinen muutos on yhdistetty optisten ja elektronisten ominaisuuksien huomattavaan vaihteluun. Jotta näitä ominaisuuksia pystyttäisiin hyödyntämään esimerkiksi nanoteknologiassa, on välttämätöntä järjestää molekyylit kiinnittämällä ne kiinteään pintaan (Willner ja Willner, 2001). Atsobentseenien kahta isomerisaation muotoa voidaan muuttaa valokemiallisesti toiseksi muodoksi säteilyttämällä molekyylejä valon eri aallonpituuksilla (Kuva 6). Atsobentseenien trans-muoto on lämpödynaamisesti vakaa, mutta altistamalla UV-säteilylle se vaihtaa konformaatiota cis-isomeeriksi. Sininen valo tai lämpö taas palauttaa molekyylin takaisin trans-isomeeriksi. Molekyyliden ympäristö vaikuttaa termaaliseen eli lämmöstä johtuvaan palautumiseen, mutta ilmiö on monimutkainen, eikä sen mekanismia tunneta tarkasti (Hoffmann ym., 2000).

Atsobentseeneihin perustuvien rakenteiden fotoisomerisaatiota on käytetty useissa optomekaanisissa molekulaarisissa sovelluksissa (Blevins ja Blanchard, 2004; Yager ja Barrett, 2006; Comstock ym., 2007), kuten tiedon varastoinnissa hydrofiilisiin polymeereihin

(Antonov ym., 2003; Petrova ym., 2005) ja kuljetuksessa biomembraanien läpi (Willner, 1997; Volgraf ym., 2007). Monet sovellukset kuitenkin vaativat tällaisten molekyylien muutosten olevan termaalisesti vakaita tietyllä aikavälillä (Dunn ym., 2009). Myös atsobentseenien johdannaisten valoisomeerisia ominaisuuksia on laajalti tutkittu niiden käyttömahdollisuuksien takia. Niitä voidaan käyttää materiaalina digitaalisen tiedon säilytyksessä (Rasmussen ym., 1999; ks. yleiskatsaus Natansohn ja Rochon, 2002), rakennusosana molekulaarisissa ankkureissa (Qu ym., 2004) ja ionikanavissa (Volgraf ym., 2006 ja 2007) tai ne voivat toimia on-off kytkimenä erilaisissa nanomolekulaarisissa toiminnoissa (Loudwig ja Bayley, 2006).

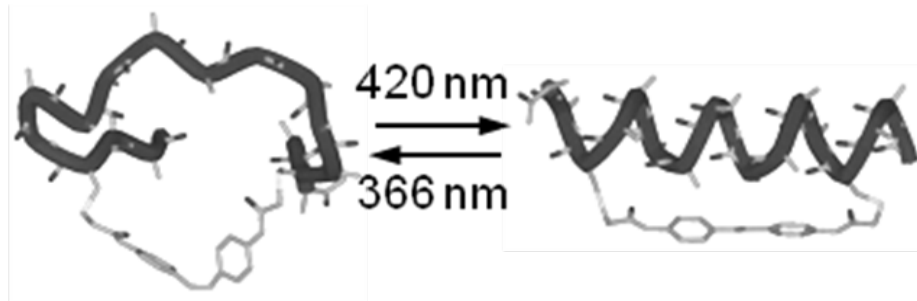


Kuva 6. Atsobentseenien fotoisomerisaatio saadaan aikaiseksi valon avulla. UV-valo muuttaa trans-isomeerin cis-muotoon, ja näkyvä valo tai termalinen pimeäreaktio aiheuttaa molekyylin palautumisen cis-konformaatiosta trans-muotoon. Kuva on tehty artikkelin Halabieh ym. (2004) mukaan ACD/ChemSketch –ohjelmalla (ACD/Labs 12).

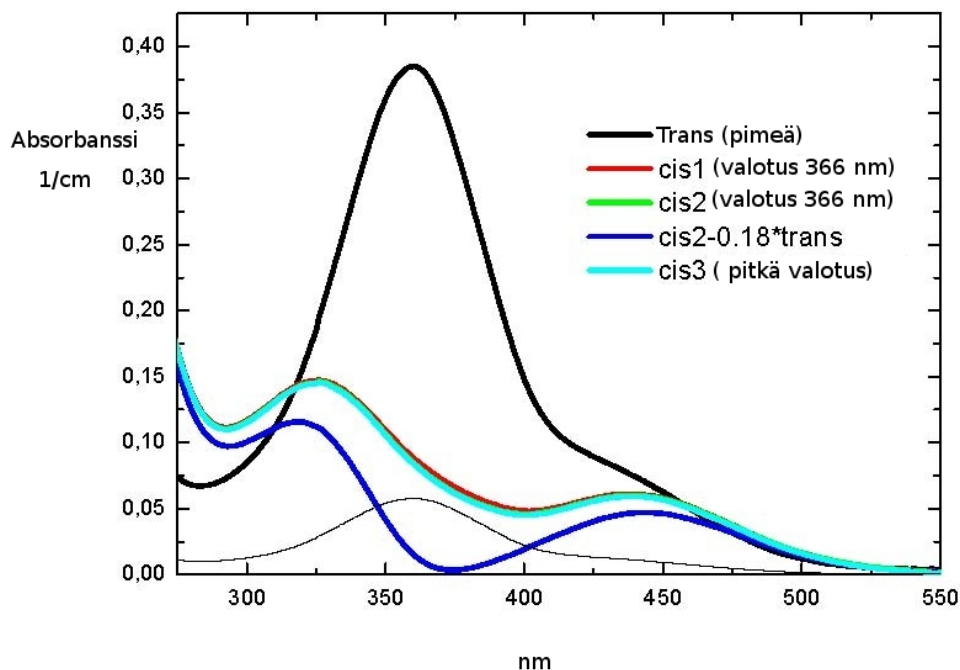
1.1.8 Atsobentseenien sovelluksia proteiinitutkimuksessa

Atsobentseenien käyttömahdollisuudet proteiinitutkimuksessa ovat hyvin laajat, ja esimerkiksi peptidien laskostumista on onnistuttu kontrolloimaan atsobentseenien ja niiden fotoisomerisaation avulla. Ihalaisen ym. (2007) tutkimuksessa proteiinin sekundaarirakenteen, α -kierteen, kahteen kysteiniiniin on kiinnitetty atsobentseeni, jonka konformaatiota voidaan muuttaa valon avulla (Kuva 7). Tämän α -kierteen rakenne on stabiilissa laskostuneessa muodossa, kun atsobentseeni on trans-konformaatiossa. Sen sijaan cis-isomeeri vähentää peptidin kierteisyyttä huomattavasti. Laskostumista kontrolloitiin valolla, jolloin atsobentseeni muuttui trans-muodosta cis-muotoon virittäessä kompleksia valon aallonpituudella 366 nm:a. Cis-muodosta kompleksi muuttui takaisin trans-konformaatioon valaistessa sitä

aallonpituudella 430 nm:a. Kuvassa 8 on UV-VIS-spektrit atsobentseenin kahdesta konformaatiosta, kun atsobentseeni on liitetty α -helikaaliseen peptidiin. Konformaatioiden muutokset ovat nopeita, mutta ne voitiin havaita aikaerotteisen infrapunaspektroskopian avulla. Peptidi-atsobentseenikompleksin laskostuminen tapahtui 700 nanosekunnissa, ja rakenteen avautuminen kesti 150 nanosekuntia cis-isomerisaation seurauksena (Ihalainen ym., 2007).



Kuva 7. Visuaalinen hahmotelma α -kierre-atsobentseeni-kompleksista cis- ja trans-konformaatioissa. Atsobentseenien isomerisaatio saadaan aikaan valon eri aallonpituuksilla, jolloin peptidi joko menettää kierteisyytensä (cis-konformaatio) tai laskostuu stabiiliin kierteiseen rakenteeseen (trans-konformaatio) (Ihalainen ym., 2007).



Kuva 8. UV-VIS-kuva atsobentseenin kahden konformaation spektristä, kun atsobentseeni on liitetty α -helikaaliseen peptidiin. Musta kuvaaja on trans-konformaation absorptiospektri, kun taas muut kuvaajat ovat absorptiospektrejä atsobentseenin cis-muodosta, kun molekyyliä on valotettu 366 nm:n aallonpituudessa. Sinisestä kuvaajasta on vähennetty 18 %:a trans-muodon vaikutusta spektriin. Kuvan datan on kerännyt Janne Ihalainen ja se on tehty OriginPro 8.1-ohjelmalla (OriginLab).

Atsobentseenejä on tutkittu myös entsyymien toiminnan kontrolloimiseksi. Shierling ym. (2010) ovat liittäneet atsobentseenimolekyylejä restriktioentsyymiin, jolloin isomerisaation avulla voitiin kontrolloida entsyymien kykyä pilkkoa DNA:ta. Restriktioentsyymejä käytetään hyödyksi erilaisissa tutkimuksissa, ja ne ovat olennainen osa geenitekniikkaa. Aikaisempien tutkimusten perusteella atsobentseeni kiinnitettiin entsyymien kolmeen α -kierteeseen, joista kaksi sijaitsi DNA:n sitoutumisyksikössä ja yksi katalyyttisessä yksikössä. Lisäksi atsobentseeni liitettiin sellaiselle entsyymien alueelle, joka sijaitsi lähellä proteiinin aktiivista osaa. Atsobentseenien isomerisaatio saatiin aikaiseksi valon avulla, jolloin entsyymien DNA:n pilkkomisaktiivisuutta pystyttiin lisäämään ja vähentämään. Tutkimus osoittaa, että entsyymien toimintaa ja aktiivisuutta voidaan kontrolloida atsobentseenien isomerisaation avulla.

1.1.9 Liuottimen vaikutus atsobentseeneihin

Atsobentseenien trans-isomeerin on havaittu muodostavan dimeereja tai suurempia keräytymiä, mutta tämä vaikuttaisi olevan riippuvainen molekyylin ympäristöstä. (Kojima ym., 2005). Dimeereja muodostuu poolittomissa liuksissa (kuten tolueenissa), mutta polaarisisissa liuksissa atsomolekyylien ja liuottimen väliset vuorovaikutussuhteet ovat niin vahvoja, että ne estävät molekyylien aggregoitumisen (Gabor ym., 1968). Korkeissa konsentraatioissa atsovärit eivät liukene kokonaan veteen tai muihin vesipitoisiin liuksiin, mikä saattaa aiheuttaa omat haasteensa molekyylin käytölle (Dunn ym., 2009).

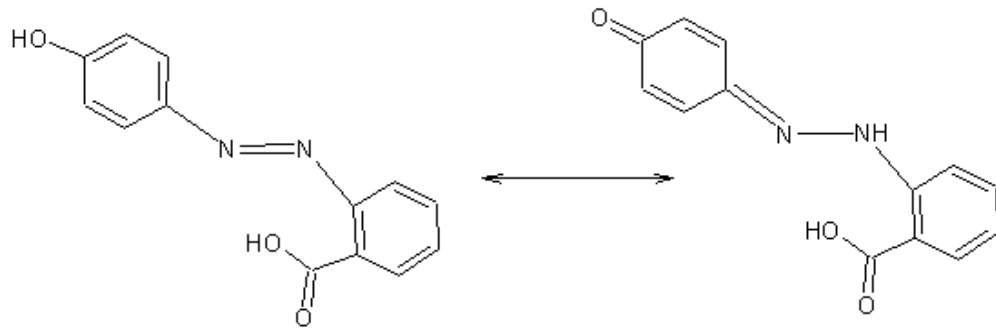
Atsobentseenin cis-muodon stabiilisuus riippuu sen ja sitä ympäröivän liuoksen välisistä vuorovaikutuksista sekä sitoutumisenergiasta. Termaalinen cis-trans -isomerisaatio voi olla itse-katalysoitu reaktio alhaisissa konsentraatioissa (10^{-4} - 10^{-2} M) (Kojima ym., 2005). Isomerisaatio voi olla myös joko hapon tai emäksen katalysoima reaktio, jolloin se tapahtuu nopeammin kuin neutraalissa ympäristössä (Dunn ym., 2009). Monet tekijät vaikuttavat isomerisaation nopeuteen; esimerkiksi lämpötila, pH, konsentraatiot ja liuotin vaikuttavat voimakkaasti atsomolekyylien vuorovaikutussuhteisiin sekä isomerisaatioon (Gabor ym., 1968). Termaalinen relaksaationopeus on voimakkaasti riippuvainen pH:sta, ja nopeus muuttuu huomattavasti, kun pH:ta nostetaan tai lasketaan (Dunn ym., 2009).

1.1.10 Tautomeria

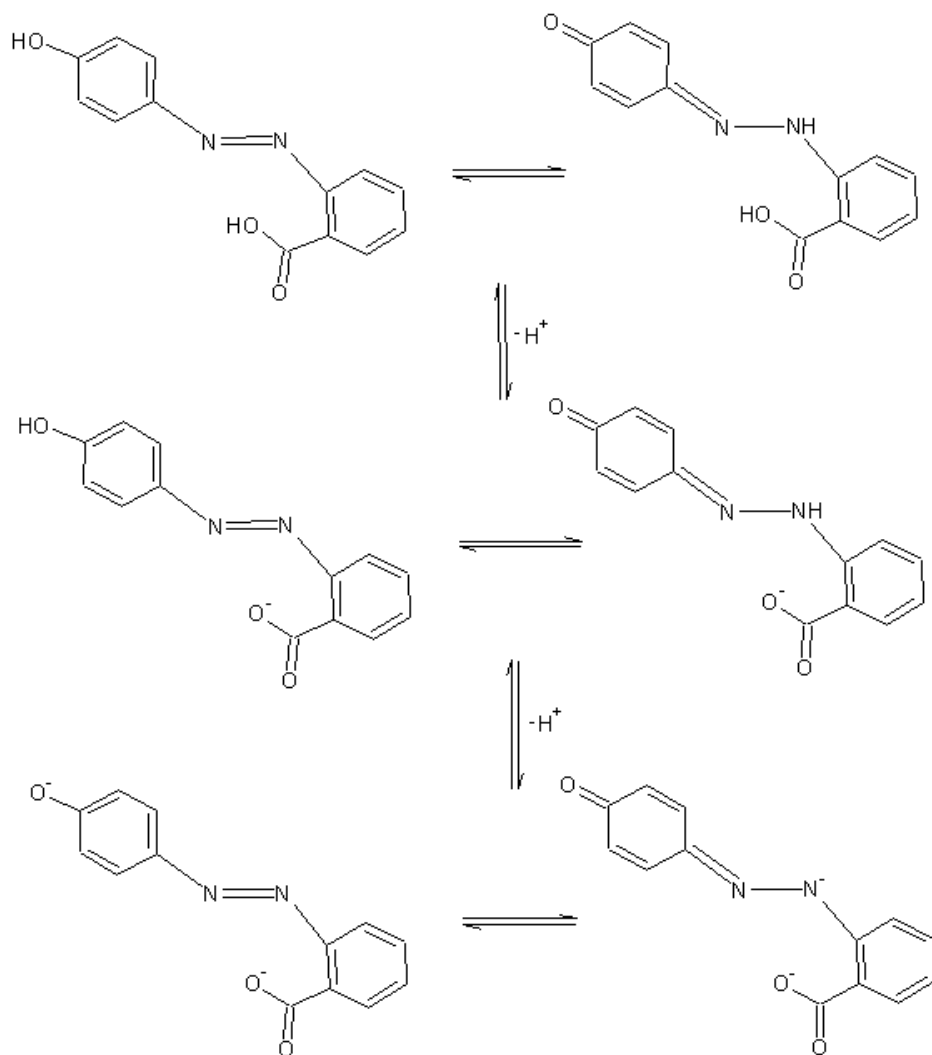
Tautomeerit ovat rakenteellisen isomeerin erityisiä muotoja, joiden kaksoissidos ja vetyatomit suhteessa happiatomiin eroavat toisistaan sijaintinsa perusteella. Toisin sanoen tautomeria tarkoittaa molekyylien sisäisiä atomisiirtymiä, jolloin sama aine voi esiintyä kahdessa eri muodossa. Täten, esimerkiksi asetonilla on kaksi eri tautomeeria, keto- ja enolimuoto, joiden välillä kaksoissidoksen ja vetyatomin paikka muuttuu.

Atsobentseeneillä cis-trans isomerisaatiossa nopeimmat relaksaatiot cis-muodosta takaisin trans-muotoon on havaittu alhaisessa pH:ssa, jossa kaikki atsoyhdisteet esiintyvät yleensä protonoituneena atsoasemassa eli atsotautomeerina. Sen sijaan korkeassa pH:ssa hydroksiatsobentseenien hydroksyyli-ryhmät käyvät läpi deprotonaation (Dunn ym., 2009). Ioni-soitujen muotojen energiat ja geometriat ovat todennäköisesti erilaisia vesiliuoksissa kuin muissa liuottimissa. Vesiliuoksissa ja neutraalissa pH:ssa monoanionisen HABA:n vallitseva muoto on atsotautomeeri (Merlin ja Thomas, 1979). Sen sijaan hydratsonitautomeeri on nähtävissä poolittomissa liuoksissa silloin, kun HABA on esimerkiksi kloroformiin tai tolueneeniin liuotettuna. Etanoliin liuotetuissa molekyyli-ryhmissä on osoitettu olevan molempia muotoja. Absorptiomaksimin sinisiirtymä poolittomista liuoksista polaariisiin voidaan selittää lisääntyneellä atsomolekyylien konjugaatiolla poolittomissa liuoksissa, mikä johtuu molekyylin karboksyylihapon OH-ryhmän ja atsoryhmän proksimaalisen typpi-atomien välisistä vetysidoksista (Farrera ym., 2008).

HABA:n sitoutuessa avidiiniin spektrin absorptioalue siirtyy, mikä johtuu molekyylin muuttumisesta vapaasta atsotautomeerista sitoutuneeseen hydratsonimuotoon (Kuva 9). HABA:n sitoutuminen avidiiniin aiheuttaa protonin siirtymisen hydroksiryhmältä typpelle ja samalla typpien välinen kaksoissidos hajoaa, kun HABA:n tautomeeri muuttuu (Weber ym., 1992; Livnah ym., 1993a). Kuvassa 10 on esitetty hapon ja emäksen vaikutus HABA:n tautomeriaan. Korkeassa pH:ssa HABA deprotonoituu eli luovuttaa karboksyyli-ryhmän protonin (H^+), jolloin siitä tulee monoanioni. HABA pystyy luovuttamaan myös toisen OH-ryhmän protonin. HABA:n ja sen johdannaisten tautomeeriseen tasapainoon vaikuttaa yhdisteen protonaatiotila, liuoksen polaarisuus sekä molekyylin rakenne (Farrera ym., 2008). Käyttämättömyyksiä ajatellen, yksityiskohtainen tieto HABA:n tautomeerien riippuvaisuudesta pH:hon ja ympäröivään liuokseen on välttämätöntä.



Kuva 9. HABA:n eri tautomeerit vapaassa (vasemmalla) ja avidiiniin sitoutuneessa tilassa. Kun HABA on sitoutunut avidiiniin, protoni siirtyy hydroksiryhmältä tyypelle ja samalla tyyppien välinen kaksoissidos hajoaa. Kuva on tehty artikkelin Livnah ym. (1993) mukaan ACD/ChemSketch –ohjelmalla (ACD/Labs 12).



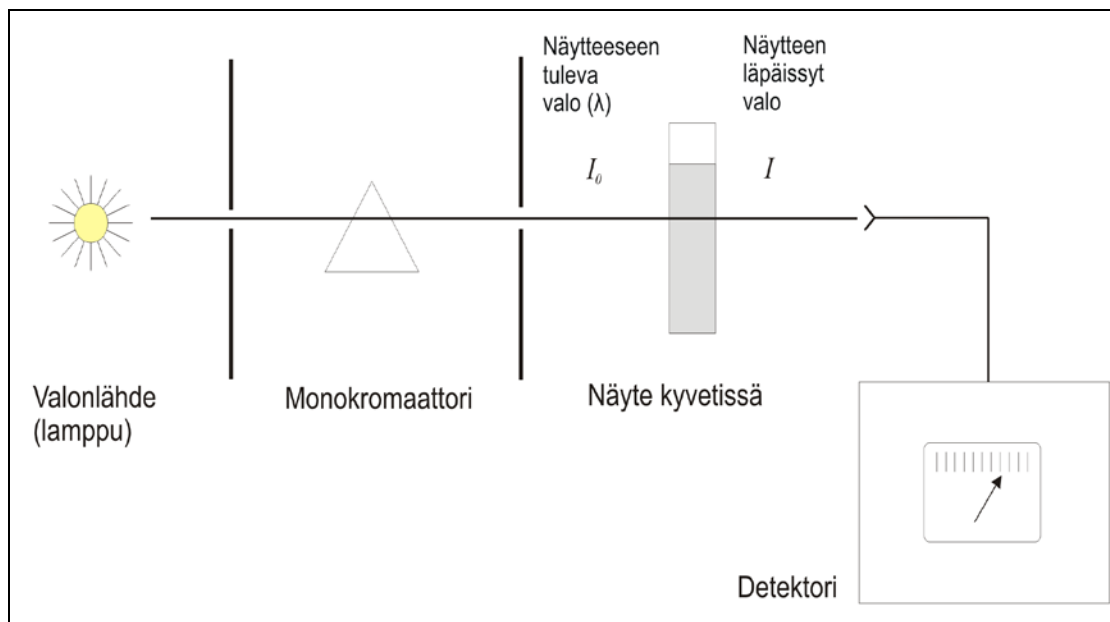
Kuva 10. Happojen ja emästen vaikutus HABA:n tautomeriaan, vasemmalla atso- ja oikealla hydrazonitautomeerit. Deprotonoituessaan HABA luovuttaa karboksyyli- ja fenoliryhmän protonin (H^+), jolloin siitä tulee monoanioni (keskimmäiset molekyylit). HABA pystyy luovuttamaan myös toisen hydroksiryhmän protonin, jolloin se esiintyy dianionina (kuvassa alhaalla vasemmalla). Kuva on tehty artikkelin Farrera ym. (2008) mukaan ACD/ChemSketch –ohjelmalla (ACD/Labs 12).

1.2 Spektroskopiset menetelmät

1.2.1 UV/VIS spektroskopia

Sähkömagneettinen spektri sisältää ultravioletti- ja näkyvän valon säteilyalueen aallonpituudessa 200-800 nm:a. Kun valo kulkee näytteen läpi tällä alueella, valoenergiaa sitoutuu, ja näytteen molekyylit virittyvät korkeammille energiatiloille. Molekyylit, jotka pystyvät absorboimaan valoa, ovat kromoforeja. Niiden rakenne ja ympäristö vaikuttavat siihen, millä taajuudella valoa absorboituu. Valoenergiaa käytetään elektronien siirtymiseen perustilalta virittyneeseen tilaan. Absorption määrä noudattaa Beer-Lambertin lakia $A = \epsilon \cdot c \cdot l$, jossa epsilon (ϵ) on molaarinen absorptiviteetti, c on molaarinen konsentraatio ja l on valotien pituus (Sheehan, 2009).

Biomolekyylien ominaisuuksia voidaan tutkia ja analysoida spektroskooppisilla tekniikoilla. UV/VIS -spektroskopiaa voidaan käyttää molekyylien identifioimiseen tai näytteen konsentraation määrittämiseen. Tiettyjä aallonpituuksia voidaan lisäksi käyttää tunnettujen biomolekyylien tutkimisessa, koska esimerkiksi aminohappojen tiedetään absorboivan valoa 210 ja 280 nm:ssa, kun taas DNA absorboi voimakkaasti aallonpituudessa 260 nm:a. Kaikkein tärkeimmät absorptiospektriin vaikuttavat ympäristötekijät ovat pH, polaarisuus ja molekyylien järjestäytyminen. Protonaation tai deprotonaation vaikutukset ovat seurausta pH:n muutoksesta, mikä usein johtaa eroihin kromoforien protonoituneiden ja deprotonoituneiden muotojen absorptiospektrien välillä. Ympäristön liuoksen polaarisuus ja kromoforien geometria vaikuttavat kromoforien absorptiospektreihin. Absorptiospektrejä mitataan spektrofotometrillä, jossa valonlähteenä toimivan lampun valo ohjataan kyvetissä olevaan näytteeseen. Osa tästä valosta absorboituu, ja valon intensiteetin pieneneminen voidaan määrittää, kun näytteestä läpipääsevä valo havaitaan detektorilla (Kuva 11). Tiettyissä standardoiduissa olosuhteissa absorptiospektri on luonteenomainen tietyille biomolekyyliille, ja täten spektroskopia voi tarjota hyödyllisen kemiallisen tunnistusmenetelmän verratessa molekyyliä toisiinsa. Spektrin muutokset kertovatkin usein molekyylien rakenteellisista eroista (Sheehan, 2009).



Kuva 11. Ultravioletti/näkyvän valon spektrofotometrin laiteasetelma. Valon aallonpituus kulkee lampusta monokromaattorin kautta kyvettiin, jossa on mitattava näyte. Osa valosta absorboituu näytteeseen, mutta läpi kulkeva valo mitataan detektorin avulla. Näytteen absorbanssi saadaan, kun näytteen läpäisseen valon intensiteettiä (I) verrataan näytteeseen tulevan valon intensiteettiin (I_0). Täten absorbanssi on $\log I_0/I$, joka on sama kuin $\epsilon \cdot c \cdot l$. Kuva on tehty Sheehan (2009) kuvan mukaan ohjelmalla CorelDRAW12 (CorelDRAW Graphics Suite 12).

1.2.2 Fourier muunnos infrapunaspektroskopia

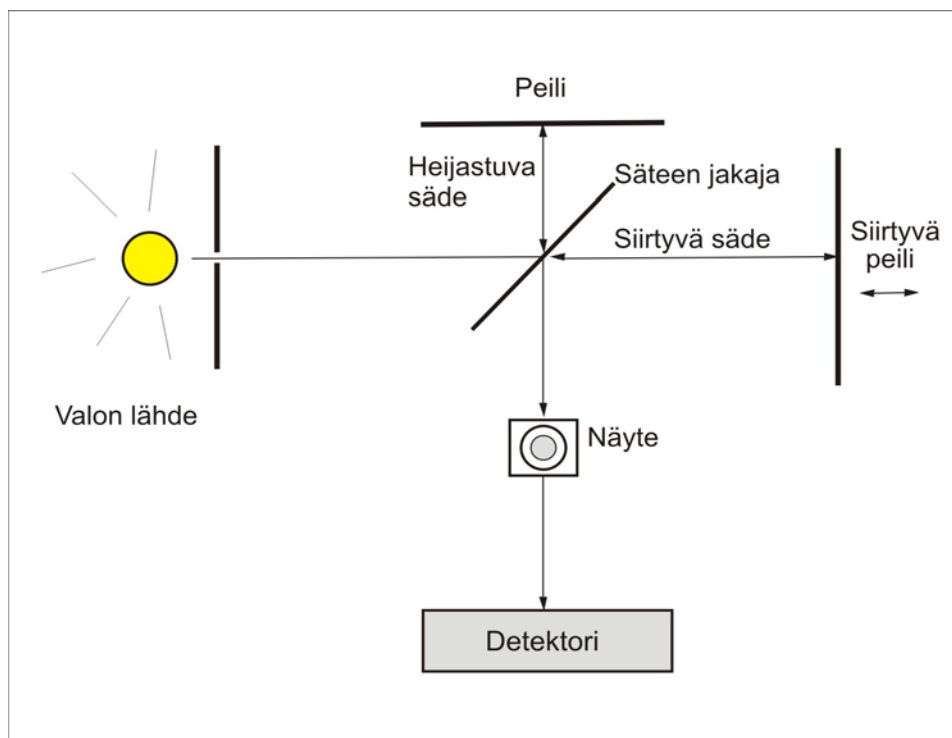
(Fourier Transform Infrared spectroscopy, FTIR)

Infrapunaspektroskopiassa käytetään sähkömagneettispektrin infrapuna-aluetta, ja hyödynnetään molekyylien kykyä absorboida valoa taajuuksilla, jotka ovat luonteenomaisia sidosten värähdyksille. Infrapuna-absorptio on siis seurausta sähkömagneettiaaltojen vuorovaikutuksesta molekyylien värähtelyiden kanssa (Barth, 2007). Määritettävissä oleva energia johtuu molekulaarisista energiapintojen muodoista, atomien massasta ja sidosvahvuuksista. Molekyylien värähtelytaajuus on seurausta molekyylien sisäisistä ja keskinäisistä vuorovaikutuksista ja on siten riippuvainen sidosten voimakkuudesta sekä polaarisuudesta (Barth ja Zscherp, 2002).

FTIR-spektroskopia on interferenssiin perustuva tekniikka, jossa jokainen molekyyli näkyy tietynlaisena FTIR-spektrinä molekyylin kemiallisen rakenteen mukaisesti (Sheehan, 2009). Värähtelyspektri antaa tietoa mm. molekyylin kemiallisesta rakenteesta, sidosten pi-

tuudesta, lujuudesta ja konformaatiosta, sekä vetysidoksista (Barth, 2007). FTIR-menetelmän onkin todistettu olevan hyödyllinen erityisesti proteiinien ja peptidien rakenteiden sekä niiden dynaamisten ominaisuuksien selvittämisessä. Esimerkiksi, absorptio amidi I-alueella ($1597\text{-}1672\text{ cm}^{-1}$) on etupäässä liitetty C=O sidoksen värähtelyihin, kun taas absorptio amidi II-alueella ($1480\text{-}1575\text{ cm}^{-1}$) johtuu osittain N-H sidoksen taipumisesta ja C-N sidoksen venymisestä. FTIR-mittauksia on käytetty proteiinien sekundaaristen rakenteiden, kuten α -kierteiden, -käännöksien ja β -levyjen, määrittämisessä. Lisäksi erityisesti rakenteiden muutoksia, jotka ovat seurausta pH:n vaihteluista, ionivoimakkuuksista, paine- tai lämpötilaeroista, ligandin sitoutumisesta tai proteiinin laskostumisesta, voidaan analysoida tällä menetelmällä. FTIR-spektroskopiaa käytetään myös reaktioiden seuraamisessa ja yhdisteiden tunnistamisessa sekä molekyyli-rakenteiden selvittämisessä (Sheehan, 2009).

FTIR-menetelmällä mitatessa avidiinin amidi I värähtely sijaitsee 1633 cm^{-1} :ssa. Tämä piikki on indikaatiivinen β -levyn ja pidempien ketjurakenteiden esiintymiselle proteiinissa. Biotiinin lisääminen avidiiniin ei aiheuttanut merkittäviä muutoksia spektrissä, ja näin voidaan olettaa, ettei se myöskään aiheuta proteiinin konformaation muutoksia sekundaarisella rakennetasolla (Swamy ym., 1996). Tämä on todettu myös tunnettujen röntgensädekrystallografialla määritettyjen rakenteiden perusteella (Livnah ym. 1993b). Avidiinin ja avidiini-biotiini-kompleksin spektrit ovat hyvin samankaltaisia keskenään, mutta pienet erot alueella 1554 ja 1662 cm^{-1} oletetaan johtuvan biotiinista, ja erot 1630 cm^{-1} kohdilla muutosista avidiinin rakenteessa (Swamy ym., 1996). Lähinnä vaikuttaisi kuitenkin siltä, että avidiinin sitoutumistaskun silmukkarakenne ”lukittuu” biotiinin sitoutuessa, jolloin proteiinin rakenne ”tiivistyy” ja protonien vaihtonopeus pienenee merkittävästi (Celej ym., 2004).



Kuva 12. Infrapunaspektrofotometrin laiteasetelma, jossa säteen jakaja sekä peilit ohjaavat valon säteen kulkeutumista näytteeseen, jonka absorptio mitataan detektorin avulla. Kuva on tehty Sheehan (2009) kuvan mukaan ohjelmalla CorelDRAW12 (CorelDRAW Graphics Suite 12).

1.2.3 CD-spektropolarimetri

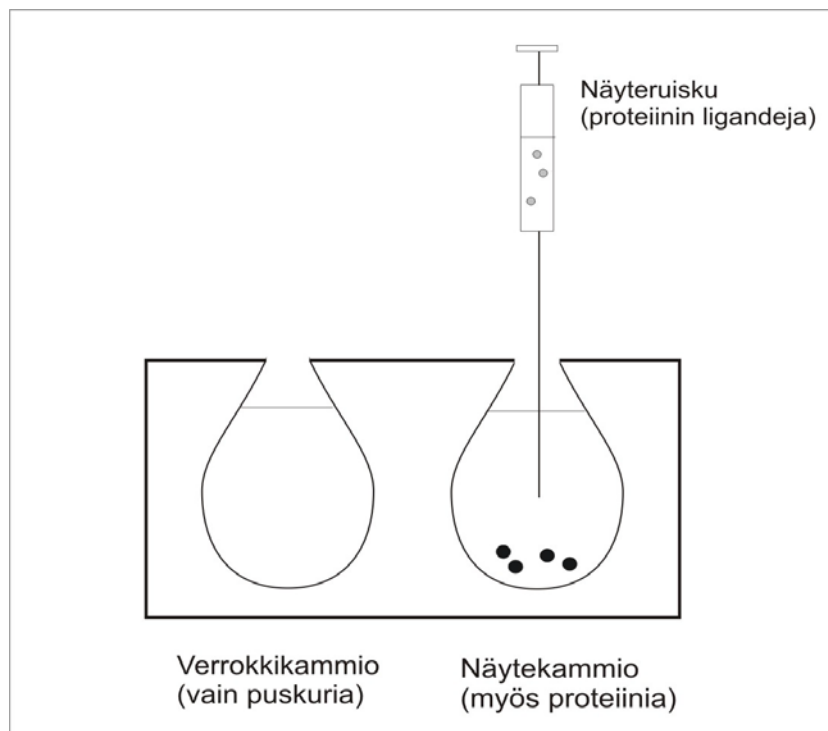
Sirkulaarinen dikroismi (CD) tarkoittaa eroa vasenkätisen ja oikeakätisen ympyräpolaroidun valon absorptiossa. Dikroismi tapahtuu, kun molekyyli sisältää yhden tai useamman kiraalisen kromoforin. CD-spektropolarimetrillä mitataan molekyylien sirkulaarisen dikroismin spektriä, ja se on erinomainen menetelmä proteiinien sekundaarisen rakenteen, laskostumisen ja sitoutumisominaisuuksien määrittämisessä. Kun epäsymmetriset molekyylit ovat vuorovaikutuksessa valon kanssa, ne voivat absorboida oikea- ja vasenkätistä sirkulaarisesti polarisoitua valoa eri alueilla, jolloin tuloksena on valotason pyöriminen. Rakenteellisesti erilaisilla aineilla on tietynlainen CD-spektri, ja koska proteiinien spektrit ovat konformaatiosta riippuvaisia, CD-spektrin perusteella voidaan päätellä tuntemattomien proteiinien rakenteita ja havainnoida rakenteellisia konformaatiomuutoksia (Greenfield, 2007).

1.3 Kalorimetriset menetelmät

1.3.1 Isoterminen titrauskalorimetri (Isothermal Titration Calorimetry, ITC)

Biomolekyylien vuorovaikutussuhteiden ymmärtäminen vaatii usein sitoutumisenergetiikan määrittämistä. Kalorimetria on käytössä olevista tekniikoista ainoa, jolla voidaan tutkia makromolekyylien fysikaalisia voimia mittaamalla lämmön määrää biologisissa reaktioissa. Näiden voimien kuvaamiseen tarvitaan termodynaamisten parametrien, kuten sitoutumisenergian, entalpian, entropian ja lämpökapasiteetin muutosten määrittämistä. Kalorimetrisistä tekniikoista DSC- (differential scanning calorimetry) ja ITC- (isothermal titration calorimetry) kalorimetriaa käytetään eniten biologisten makromolekyylien tutkimisessa (Privalov ja Potekhin, 1986; Privalov, 1989).

Isoterminen titrauskalorimetri (ITC) on ainut suora menetelmä lämmön muutoksen mittaamiseen, silloin kun molekyylit muodostavat komplekseja vakio- lämpötilassa (Perozzo ym., 2004). ITC-menetelmällä voidaan mitata biomolekyylien välisiä vuorovaikutuksia sekä kuvata esimerkiksi proteiinin ja ligandin välisiä termodynaamisia ominaisuuksia. ITC mittaa molekyylien välistä sitoutumisenergiaa määrittämällä vapautuvaa tai sitoutuvaa lämpöä sitoutumisreaktion aikana, mikä voidaan ilmaista sitoutumisentalpian muutoksena (Doyle, 1997). ITC-menetelmä perustuu lämpötilaeron määrittämiseen verrokki- ja näytekammion välillä. Molemmat kammiot täytetään vedellä tai puskurilla, mutta näytekammioon lisätään myös tutkittavat molekyylit (Kuva 13). Ligandi viedään kammioon pitkän injektoruiskun avulla, ja pyörivä ruiskuputki johtaa nesteiden sekoittumiseen näytekammiossa (Leavitt ja Freire, 2001). ITC-menetelmällä mitataan siis kahden kammion välistä lämpötilaeroa proteiini-ligandi -kompleksien muodostuessa jokaisen ligandi-injektion jälkeen. Kompleksin muodostuminen näytekammiossa aiheuttaa lämmön vapautumista tai sitoutumista, ja kammioiden lämpötilaeron mukaan voidaan määrittää, onko reaktio ekso-terminen vai endoterminen. Lämpöä mitataan energiana ($\mu\text{cal}/\text{sec}$), jota tarvitaan pitämään vakio- lämpötila näyte- ja verrokkikammion välillä. Kun keskenään reagoivat molekyylit ovat saturoituneet, lämpösignaali pienenee vähitellen (Doyle, 1997).



Kuva 13. ITC-laitteessa on kaksi kammiota, joista toinen sisältää pelkkää puskuria tai vettä (verrokkikammio) ja toinen on näytekammio, joka sisältää myös proteiinia. Näytekammioon lisätään tutkittavaa ligandia injektioruiskun avulla, ja kammioiden välistä lämpötilaeroa mitataan molekyylien sitoutumisreaktion aikana. Kuva on tehty Sheehan (2009) kuvan mukaan ohjelmalla CoreIDRAW12 (CoreIDRAW Graphics Suite 12).

Mitattu data voidaan esittää sigmoidisen plotin tai saturaatiokäyrän avulla, ja mittaustuloksiin vaikuttaa mm. reaktiivilavuus, molekyylien konsentraatiot ja lisätyn ligandin määrä (Sigurskjold ym., 1991; Bundle ja Sigurskjold, 1994). Proteiinin ja ligandin välistä vuorovaikutusta voidaan kuvata mm. sitoutumisvakiolla, joka saadaan määritettyä molekyylien konsentraatioiden ja eri konsentraatiosuhteilla mitattujen sitomisentalpoiden perusteella. Sopiva makromolekyylien konsentraatio riippuu reaktion sitoutumisvakiosta, kun taas sitoutumiskäyrän muoto on riippuvainen sitoutumisvakiosta ja molekyylien molaarisesta konsentraatiosta. (Doyle, 1997). Sitoutumisreaktiossa Gibbsin vapaa energia on tärkein termodynaaminen parametri, koska se määrittää mm. biologisten kompleksien stabiilisuuden (Horton ja Lewis, 1992; Williams ym., 1993; Cummings ym., 1995). Entalpiian ja entropian muutos vaikuttavat vapaaseen kokonaisenergiaan. Entalpiian muutos kuvaa energian muutosta sitoutumisen aikana, ja se on monien yksittäisten sidosten muodostumisen ja hajoamisen tulos. Sitoutumisen entalpiian muutos heijastaa proteiinin ja liuoksen välisten vuorovaikutusten häviämistä, proteiinin ja ligandin välisten sidosten muodostumista sekä

liuoksen uudelleenjärjestäytymistä proteiinin pinnan läheisyydessä (Perozzo ym., 2004). Entropia ilmaisee epäjärjestyksen määrää systeemissä, mikä vaikuttaa koko systeemin vapaaseen energiaan. Negatiivinen entropian muutos voi johtua useista erilaisista tekijöistä, mutta positiivinen entropian muutos on vahva osoitus vesimolekyylien vapautumisesta kompleksin pinnasta (Murphy ym., 1993; Murphy ym., 1994). Sitoutumisen stoikiometriaa voidaan käyttää kuvaamaan biomolekyylien sitoutumismekanismia. Jos molempien vuorovaikutuksessa olevien molekyylien konsentraatiot tiedetään, stoikiometri voidaan määrittää molekyylien molaarisen suhteen avulla. Tämä parametri (n) voidaan muokata vastaamaan esimerkiksi sitoutumiskohtien lukumäärää (Perozzo ym., 2004).

Moniin sitoutumisreaktioihin liittyy proteiinin tai ligandin protonien vapautumista tai absorboitumista. Tässä tapauksessa reaktio on pH:sta riippuvainen, ja täten sitoutumisentalpia on riippuvainen reaktiopuskurin ionisaatioentalpiasta. ITC tarjoakin tehokkaan menetelmän arvioida protonaation ja deprotonaation vaikutusta reaktioon (Leavitt ja Freire, 2001).

1.4 Kromatografiset menetelmät

1.4.1 HPLC-geelisuodatus

(High Performance Liquid Chromatography)

Kromatografiset menetelmät tarjoavat merkittävän analyttisen työkalun biomolekyylien tutkimuksessa. Näitä menetelmiä käytetään molekyylien analysoimiseen ja erottamiseen, jolloin voidaan erottaa mm. proteiineja toisistaan. Lisäksi kromatografian antaman datan perusteella voidaan saada tietoa molekyylien rakenteista tai vuorovaikutussuhteista (Chen ja Horváth, 1995).

Korkean suorituskyvyn nestekromatografiassa (HPLC) käytetään painetta, jotta näyteliuos saadaan kulkemaan pakatun kolonnin läpi. Nestekromatografialaitteistossa tärkeitä osia ovat kolonni, pumppu ja detektorit, jotka keräävät tietoja näytteistä. Molekyylien erottuminen tapahtuu kolonnissa, joka sisältää tiiviisti pakatun stationaarifaasin. Tutkittava näyte kulkeutuu liikkuvassa faasissa kolonnin läpi, ja erottuminen perustuukin liikkuvan näyte-

faasin ja kiinteän stationaarifaasin vuorovaikutukseen. Kromatografisissa menetelmissä molekyylien erottuminen voi johtua, esimerkiksi niiden erilaisista sähkövarauksista tai kokoeroista. Geelisuodatuksessa erottuminen tapahtuu molekyylien kokoerojen perusteella, jolloin suuret partikkelit kulkeutuvat kolonnin läpi ennen pienempiä partikkeleita. Erotetut yhdisteet voidaan havainnoida ja analysoida detektorien, kuten UV/VIS-, fluoresenssi- ja sähkökemiallisen detektorin, avulla (Sheehan, 2009).

2 Tutkimuksen tarkoitus

Tutkimuksen lähtökohtana oli avidiini-biotiini -vuorovaikutussuhteen hyödyntäminen sovelluksissa, joissa tarvitaan molekyylien joustavaa sitoutumista. Tällöin tarvitaan sellaisia molekyyliä, joiden affiniteetti avidiiniin on pienempi kuin biotiinilla.

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli kontrolloida avidiiniin sitoutuvan atsovärimolekyylin HABA:n konformaatiota ja avidiini-HABA -yhdisteiden muodostumista ulkoisen signaalin avulla. Tutkimuksessa käytettiin valoa ja pH:ta muuttuvana ulkoisena signaalina, jolla molekyyliä ja sitoutumista yritettiin kontrolloida.

Lisäksi tässä tutkimuksessa tutkittiin HABA:n ja sen johdannaisen (TAM-017) sitoutumista avidiiniin eri olosuhteissa, kuten eri liuotimissa ja eri pH:ssa, sekä määritettiin HABA:n ja avidiinin ominaisuuksia spektroskooppisilla, kalorimetrisilla ja kromatografisilla menetelmillä.

3 Materiaalit ja menetelmät

3.1 Tutkimusmateriaalit

Käytetyt materiaalit, avidiini, HABA- ja HABA:n johdannainen TAM-017, saatiin Tampereen yliopiston Lääketieteellisen teknologian instituutista (IMT). Avidiini oli tuotettu bakteerisoluja hyödyntäen ja puhdistettu affiniteettikromatografisesti. Mittauksissa käytettiin myös kananmunasta eristettyä avidiinia, joka oli hankittu Belovo S.A. -yritykseltä (Bastogne, Belgia) ja kaupallista HABA:a (Sigma-Aldrich). TAM-017 oli valmistettu synteettisesti HABA-molekyyliä muistuttavaksi molekyyliksi Jyväskylän yliopistossa orgaanisen kemian laboratoriossa (Repo ym. 2006). Lisäksi mittauksissa käytettiin kaupallista biotiinia (244,31 g/mol, Sigma-Aldrich).

Tutkimuksia varten valmistettiin 50 mM K-fosfaattipuskuria (pH7), johon avidiini ja sen ligandit liuotettiin. Näin saatiin näyteliuokset, joista avidiinin konsentraatio oli yleensä 0,68 mg/ml (15000 g/mol), kun taas HABA:n (242,23 g/mol) ja TAM-017:n (287 g/mol) konsentraatio oli 0,5 mM lukuun ottamatta muutamia poikkeuksia, kun tarvittiin vahvempia konsentraatioita. 50 mM K-fosfaattipuskuri (pH 7) valmistettiin emäksisestä (K_2HPO_4 , 228,23 g/mol) ja happamasta (KH_2PO_4 , 136,09 g/mol) kantaliuoksesta, jotka oli valmistettu liuottamalla K-fosfaattijauheet veteen niiden molekyylipainon mukaan. Kantaliuoksia yhdistettiin niin, että puskuriliuoksen pH:n mitattiin olevan 7,0. K-fosfaattipuskurin pH:ta säädettiin kantaliuosten ja kaliumhydroksidin (KOH) avulla pH:n vaikutusta tutkittaessa. Lisäksi tutkimuksissa käytettiin tolueenia, dimetyylisulfoksidia (DMSO) ja glyserolia, kun tutkittiin eri liuottimien vaikutusta molekyyleihin.

3.2 Avidiinin, atsobentseenien ja kompleksien karakterisointi

3.2.1 UV/VIS -spektrofotometriset mittaukset

Tutkimuksen alussa avidiinin ja HABA-molekyylien sekä niiden kompleksin spektraalisia ominaisuuksia määritettiin UV/VIS-spektroskoopilla (PerkinElmer Lambda850, USA), ja mittaukset tehtiin 1 cm:n tai 0,2 cm:n lasikyvetteissä. Avidiini, HABA-atsoväri ja HABA-johdannainen, TAM-017, mitattiin 50 mM K-fosfaattipuskurissa (pH7). Niiden absorptiomaksimit määritettiin UV-spektriltä, jolta voitiin myös tarkastella ligandien sitoutumisesta aiheutuvia muutoksia. K-fosfaattipuskuria käytettiin lähtötason määrittämiseen, jonka jälkeen kompleksien spektrofotometrinen titraus suoritettiin kyvetissä, jossa oli 2 ml:a 10 μ M avidiini-liuosta, johon lisättiin HABA-liuosta 25 μ l:a kerrallaan. Jokaisen HABA-lisäyksen jälkeen mitattiin näytteen absorptiospektri. TAM-017 -näytettä mitattiin samalla tavalla kuin HABA-liuosta, mutta määrät olivat puolet pienemmät avidiinin ollessa mukana avidiini-TAM-017 -kompleksin titrauksessa.

Lisäksi UV-spektrofotometriä käytettiin tutkittaessa eri liuottimien (tolueeni, DMSO, glyseroli) vaikutusta HABA-molekyylin spektriin. Myös pH:n vaikutusta avidiinin, HABA-atsovärin, TAM-017:n ja kompleksien ominaisuuksiin tutkittiin tällä menetelmällä. Avidiini ja avidiini-HABA-kompleksi mitattiin tällöin eri pH-arvoissa, jotta voitiin tarkastella, vaikuttaako pH niiden spektreihin. Mittauksissa käytettiin puskurin pH:ta 7,8, 10 ja 12, jotka näyttivät kuitenkin hieman muuttuvan ajan kuluessa. HABA:n ja avidiini-HABA:n pH-mittauksissa käytettiin vahvoja 10-kertaisia kantaliuoksia, joita laimennettiin UV-spektrien saamiseksi. Liuosten konsentraatiot voitiin tarkistaa absorptiokertoimen avulla eli absorptiviteetilla, joka riippuu absorboivasta aineesta, säteilyn aallonpituudesta, lämpötilasta sekä liuosmittauksissa käytettävästä liuottimesta. Väriaineiden absorptiokertoimet ovat yleensä suuria, joten vähäisetkin ainemäärät aiheuttavat liuoksen voimakkaan värin ja absorptiospektrin.

3.2.2 Infrapunaspetroskopiset mittaukset (FTIR)

Infrapunamittauksissa tarkasteltiin avidiinin, biotiinin ja HABA-molekyylien spektrejä Magna-IR760 spektrometrillä (Nicolet Instrument Corporation, Madison, USA). FTIR-mittausten avulla voitiin tutkia rakenteiden mahdollisia muutoksia ligandin sitoutuessa avidiiniin. Mittauksia varten K-fosfaattipuskurit valmistettiin D₂O:hon, mutta muutoin samalla tavalla kuin aiemmin. Lisäksi näytteistä täytyi tehdä konsentraatioiltaan kymmenkertaista verrattuna UV-spektroskooppisiin mittauksiin, jotta spektrin piikit voitiin havaita FTIR-spektroskoopilla. Laitteen asetuksissa käytettiin valotusaukon eli apertuurin kokoa 7, näytteen vahvistuskerroin oli 2 ja kyvetin välilevy (spacer) oli 50 µm tai 100 µm, joka on tällöin mittauksen valotien pituus. Biotiinin konsentraatio oli 20 mM:a, mutta HABA-näytteen konsentraatioksi saatiin huonon liukoisuuden takia ainoastaan 1,3 mM:a, ja avidiinin konsentraation laskettiin olleen 0,57 mM:a. Avidiinin ja biotiinin kompleksi mitattiin lisäämällä biotiinia vähitellen avidiiniliuokseen ja mittaamalla spektri jokaisen lisäyksen jälkeen. Myös avidiini-HABA-kompleksi mitattiin samalla tavalla.

3.2.3 Kromatografiset mittaukset: Geelisuodatus

Geelisuodatusta käytettiin avidiinin, HABA-molekyylien ja niiden kompleksin analysointiin. Mittaukset tehtiin HPLC-kromatografilla (Shimadzu LC-10ATvp, Shimadzu corporation, Kioto, Japani). Näytteiden havainnointiin käytettiin sekä UV/VIS fotodiodirividetektoria (SPD-M10Avp, Shimadzu, Japani) että fluoresenssidetektoria (RF-10Ax1, Shimadzu, Japani). Näytteiden konsentraatiot olivat samat kuin aikaisemmissa mittauksissa, eli 0,68 mg/ml avidiinille ja 0,5 mM HABA-atsovärille. Ne oli liuotettu 50 mM K-fosfaattipuskuriin (pH7), johon oli lisätty 150 mM NaCl:a. Kromatografissa käytetty pylväs oli GFC-SEC Silica pylväs (Phenomenex, tilavuus 14,3 ml). Liukoisen faasin virtausnopeus oli 0,5 ml/min, ja näytteen tilavuus 10 µl. Avidiini-HABA-kompleksin näytteessä HABA:n suhde avidiiniin oli 1:10.

3.2.4 Polyakryyliamidigeelielektroforeesi: SDS-PAGE

SDS-PAGE:a eli natriumdodekyylisulfaatti polyakryyliamidigeelielektroforeesia käytettiin avidiinin molekyylipainon sekä puhtauden arvioimisessa. Proteiinit sitovat SDS:a, joka aiheuttaa molekyylin negatiivisen varauksen, jolloin ne liikkuvat sähkökentässä kohti positiivista napaa. Geelin koostumus aiheuttaa suurien molekyylien hitaan liikkumisen verrattuna pienien molekyylien liikkumiseen. 15 % PAGE-geeli tehtiin erillisistä ala- ja ylägeelistä (Liite 1), jotka eroavat toisistaan Tris-HCl-puskurin pH:n ja konsentraation perusteella. Geeli valmistettiin PAGE-valutelineessä ja näytteet ajettiin ajokammiossa, jossa käytettiin ajopuskuria (Liite 1). Geeliajo tehtiin 180 V sähkövirralla, ja geeli värjättiin liuoksessa, joka sisälsi 0,04 % Serva Blue R -väriä, 25 % isopropanolia, 10 % etikkahappoa. Tämän jälkeen geeliltä tulkittiin avidiininäytteen proteiinivyöhykkeitä, ja vertaamalla näytteen liikkuvuutta molekyylipainoltaan tunnetun standardin (Bio-Rad low) liikkuvuuteen, voitiin määrittää tutkittavan proteiinin molekyylipaino.

3.3 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksin kontrollointi

3.3.1 Kontrollointi valon avulla

HABA-molekyylien isomerisaatiota yritettiin kontrolloida valon avulla käyttäen sekä vapaita molekyyliä että avidiini-HABA-komplekseja. Konformaation muutos pyrittiin aikaansaamaan UV-valolla, ja virityksen jälkeen molekyylihuu mitattiin UV-spektrifotometrillä. Isomerisaatio yritettiin havaita mahdollisten spektraalisten muutosten perusteella. Fotoisomerisaation tiedetään kuitenkin olevan erittäin nopea reaktio (~20 ps) ja molekyylien pyrkivän jatkuvasti stabiilimpaan trans-muotoon. Täten myös cis-konformaation havaitseminen täytyy tapahtua nopeasti tai reaktio täytyy saada hidastumaan.

Käytimme muutamaa eri valonlähdettä ja useita lasifilttereitä, jotta isomerisaatio olisi pysytty havaitsemaan. Jokainen värillinen lasifiltteri suodatti valosta tietyn aallonpituuden, joka saavutti viritettävän näytteen. Virityksessä käytetyt filterit suodattivat valoa aallonpi-

tuuksien 300-500 nm:n välillä, mm. filtitrit 359, 378, 404, 406, 422, 438, 457, 458, 480 ja 498 nm. Lisäksi käytettiin ohutta valokuitua, jolla valo voitiin ohjata suoraan näytteeseen. Suurin osa virityksistä tehtiin käyttämällä tätä valokuitua, mutta myös suoraa valotusta kokeiltiin, jolloin näyte asetettiin kyvetissä suoraan linssin ja filtitrin eteen. Ilman filtitreitä voimakkain mitattu valoteho oli 0,6 W, mutta useimmissa mittauksissa valon teho filtitrin jälkeen oli 10-30 mW. Tästä valotehosta kuitenkin vain pieni osa oli haluttua aallonpituutta, koska filtitrit päästävät läpi useampaa eri aallonpituutta, jotka vaikuttavat valotehon mittaukseen. HABA-molekyylien ja avidiini-HABA-kompleksin valolla viritystä kokeiltiin myös eri liuottimissa (K-fosfaattipuskuri, tolueeni, DMSO, glyseroli) sekä eri pH:ssa.

3.3.2 Kontrollointi pH:n avulla

3.3.2.1 Avidiinin CD-spektroskopiset mittaukset

Avidiinin stabiilisuutta eri pH:ssa tarkasteltiin CD-spektropolarimetrillä (Jasco J-715), jolla voidaan havaita muutoksia proteiinien sekundaarirakenteissa. Avidiinin rakenteen stabiilisuus tutkimuksessa käytetyissä pH-arvoissa oli tärkeää, kun avidiini-HABA -kompleksien muodostumista haluttiin kontrolloida. Käytimme samoja pH-arvoja kuin UV-spektroskopisissa mittauksissa, eli pH 7, 8, 10 ja 12. Avidiininäytteet laimennettiin 20 mg/ml vahvuisesta liuoksesta CD-mittauksia varten. Mittauksissa käytettiin neljän mittaus-tuloksen summausta, jotta saatiin luotettavampi keskiarvoistulos.

3.3.2.2 Kalorimetrimittaukset

HABA-molekyylien sitoutumista avidiiniin ja niiden välistä sitoutumisenergetiikkaa eri pH:ssa tutkittiin isotermisen titrauskalorimetrin (ITC) avulla Lääketieteellisen teknologian instituutissa Tampereella. ITC-laitteella (VP-ITC Isothermal Titration Calorimeter, Micro-Cal, Northampton, MA) mitattiin proteiinin ja ligandin välisiä termodynaamisia ominaisuuksia, joiden perusteella voitiin arvioida HABA:n ja avidiinin välisiä vuorovaikutuksia sekä pH:n vaikutusta HABA:n sitoutumiseen. Myös TAM-017 sitoutumista avidiiniin tutkittiin pH:ssa 8. Molekyylit ja avidiini liuotettiin K-fosfaattipuskureihin, joiden pH:t oli säädetty KOH:lla arvoon: 7,8,10 tai 11. Mittauksissa HABA-liuoksen konsentraatio oli 1-2 mM, TAM-017:n 1 mM ja avidiinin 100 μ M (Taulukko 1). Laitteiston lämpötila oli säädet-

ty +25C°:een, injektioiden määrä oli 20 ja referenssiteho 10 μ cal/s, paitsi pH:ssa 11 käytettiin 17 μ cal/s tehoa. Avidiinin ja joidenkin mittausten atsoväreiden tarkat konsentraatiot onnistuttiin laskemaan absorbanssiarvojen ja molaarisen absorptiviteetin avulla. Konsentraatioiden ja mittaustulosten perusteella kullekin mittaukselle tehtiin data-analyysit ja määritettiin termodynaamiset parametrit MicroCal Origin 7.0 -ohjelmalla (Origin-Lab Corporation, Northampton, MA).

Taulukko 1. Kalorimetrimittauksien HABA- ja TAM-017-näytteiden määrät (mg/10ml) ja niiden konsentraatiot (mM) eri pH-liuoksissa.

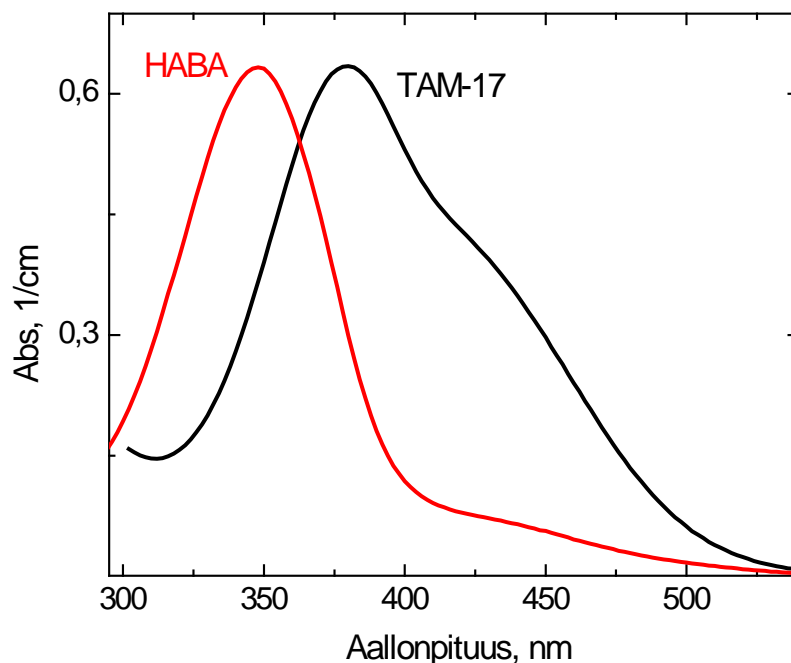
ITC-näyte	mg/ 10 ml	Konsentraatio (mM)
HABA pH7	2,45	1,0
HABA pH 8	3,68	1,5
HABA pH 10	4,94	2,0
HABA pH 11	5,03	2,1
TAM-017 pH8	2,89	1,0

4 Tulokset

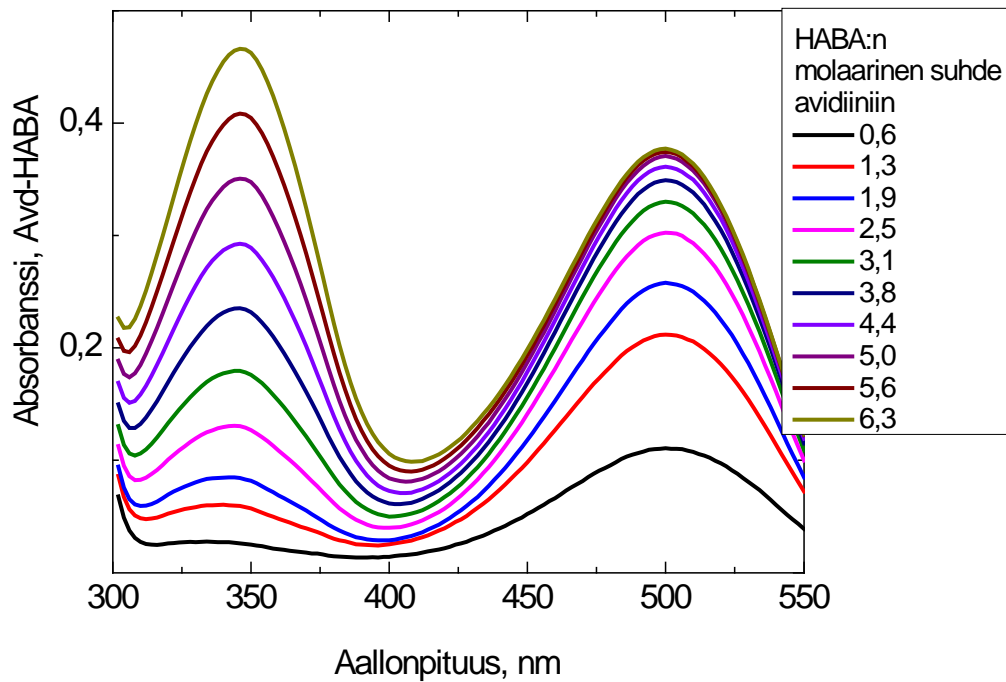
4.1 Avidiinin, atsobentseenien ja kompleksien karakterisointi

4.1.1 UV/VIS -spektrofotometriset mittaukset

UV/VIS-spektroskopisten mittausten perusteella HABA:n havaittiin absorboivan UV-valoa aallonpituudella 348 nm ja TAM-017 absorboi 380 nm:ssa (Kuva 14). Molemmat atsobentseenit olivat liuotettuna K-fosfaattipuskuriin (pH7). Lisäksi avidiinin ja HABA:n yhdistäminen aiheutti spektraalisen muutoksen, jolloin kompleksi absorboi aallonpituudella 500 nm (Kuva 15). HABA-liuoksen lisääminen avidiini-liuokseen kasvatti spektrin piikin intensiteettiä 500 nm:ssa, mutta vähitellen piikin kasvu väheni ja HABA:n absorptioalueen maksimipiikki 348 nm:ssa alkoi kasvaa reilusti. HABA:n lisääminen avidiini-liuokseen aiheutti spektrin muutoksen lisäksi värireaktion, jolloin HABA:lle ominainen liuoksen keltainen väri muuttui punaiseksi.

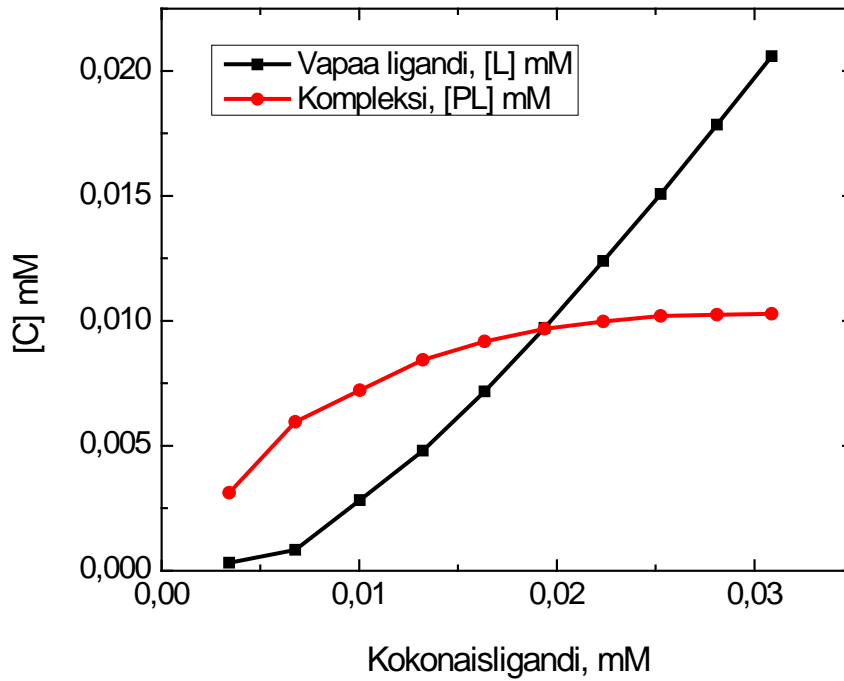


Kuva 14. HABA:n ja TAM-017-johdannaisen absorptiospektit 50 mM K-fosfaattipuskurissa (pH7) UV-spektrofotometrillä mitattuna. HABA absorboi aallonpituudella 348 nm ja TAM-017 380 nm.

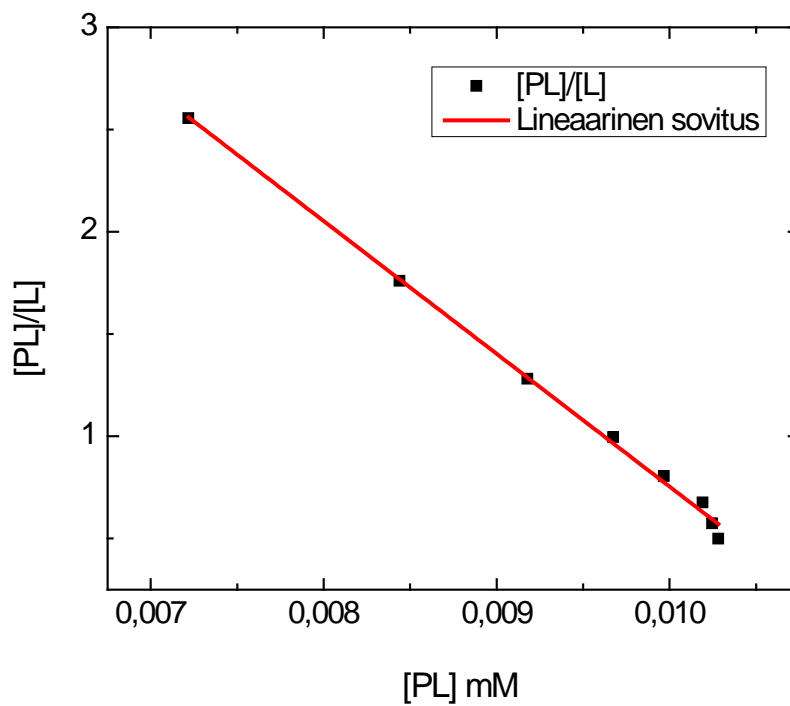


Kuva 15. Avidiini-HABA-kompleksin (500nm) ja vapaan HABA:n (~350nm) suhde HABA-liuosta lisätessä. Spektrit avidiini-HABA-kompleksista jokaisen HABA-lisäyksen jälkeen. Kuvassa on esitetty HABA:n ja avidiinin molaarinen suhde.

Avidiini-HABA-liuoksesta voitiin määrittää vapaan ligandin ja kompleksin konsentraatioiden suhde (Kuva 16), kun HABA-näytettä lisättiin avidiiniin Kuvan 15 mukaisesti. Kuvasta 16 nähdään, kuinka vapaan ligandin konsentraatio kasvaa heti ensimmäisten lisäysten jälkeen lähes lineaarisesti, kun taas kompleksin konsentraatio alkaa vakiintua tietylle tasolle suunnilleen kuudennen HABA-lisäyksen jälkeen, jolloin HABA:n molaarinen suhde avidiiniin on 3,8. Myös avidiini-HABA-kompleksin konsentraation ja vapaan ligandin konsentraation suhde kompleksin konsentraation funktiona (Kuva 17) voitiin määrittää Kuvan 15 perusteella. Tällöin mittauspisteille voitiin sovittaa lineaarinen suora, jonka kulmakertoimen avulla määritettiin ligandin assosiaatiovakio ($1/M$) (Taulukko 2).



Kuva 16. Avidiini-HABA-liuoksessa vapaan ligandin ja kompleksin konsentraation suhde, kun HABA-liuosta lisätään avidiiniin kuvan 15 mukaisesti.

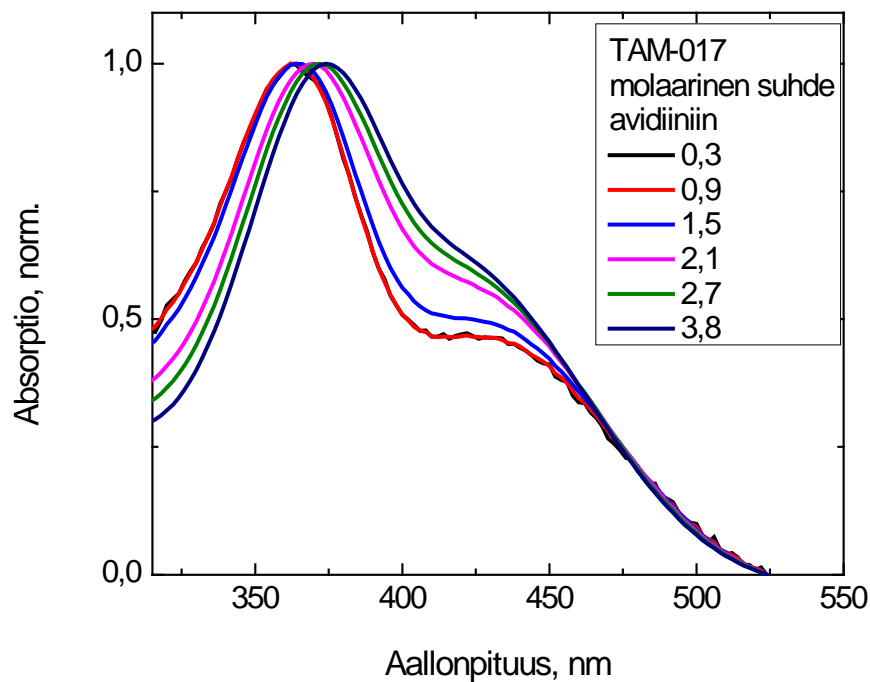


Kuva 17. Avidiini-HABA-kompleksin konsentraation ja vapaan ligandin konsentraation suhde kompleksin konsentraation funktiona kuvan 15 mukaan, jolloin mittausarvoille (pisteet) on määritetty lineaarinen suora.

Taulukko 2. Kuvan 17 lineaariselle suoralle määritettiin kulmakerroin, joka on ligandin assosiaatiokvannon negaatio. Tämän perusteella laskettiin molekyylin assosiaatiokvanto ($1/M$).

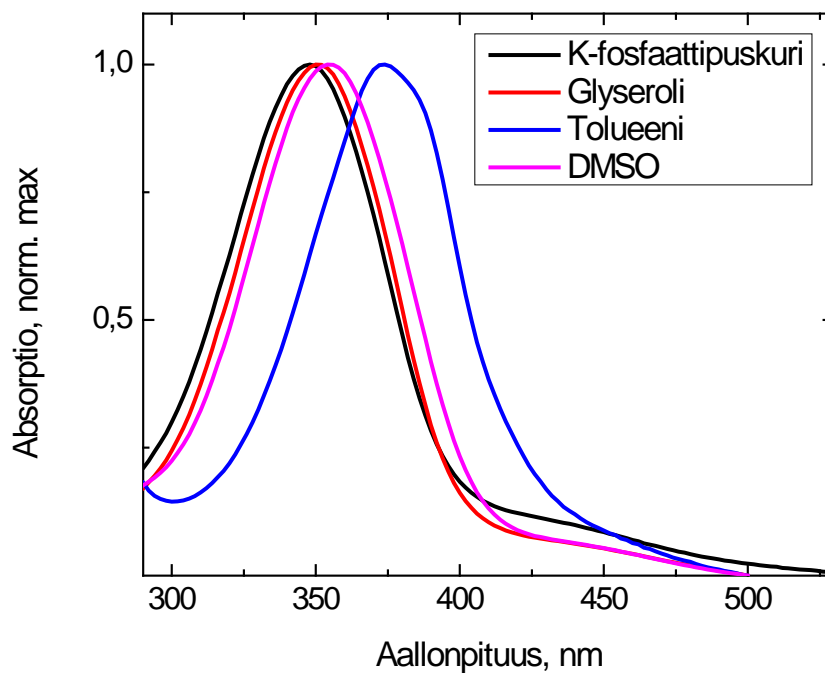
	Arvo
Suoran kulmakerroin	-649
Assosiaatiokvanto ($1/M$)	$6,49 \cdot 10^5$

HABA-johdannaisen, TAM-017:n, spektrejä mitattiin UV/VIS-spektrofotometrillä, jolloin sen absorptiomaksimi havaittiin 380 nm:ssa sekä lisäksi loiva olkapiikki 430 nm:ssa (Kuva 14). Avidiinin lisääminen ei aiheuttanut huomattavaa spektrin siirtymää, mutta maksimiinkin pieni siirtymä nähtiin 374 nm:n kohdalla. Kuvassa 18 TAM-017-liuosta on lisätty avidiiniin, ja titrauksen spektrit on normalisoitu maksimikohtaansa spektrisiirtymän havainnoinnin helpottamiseksi. Lisäksi TAM-017 havaittiin liukenevan huonosti vesipitoiseen puskuriin, eikä värimuutosta tapahtunut avidiinia lisätessä vaan TAM-017 -liuos pysyi kellertävänä.



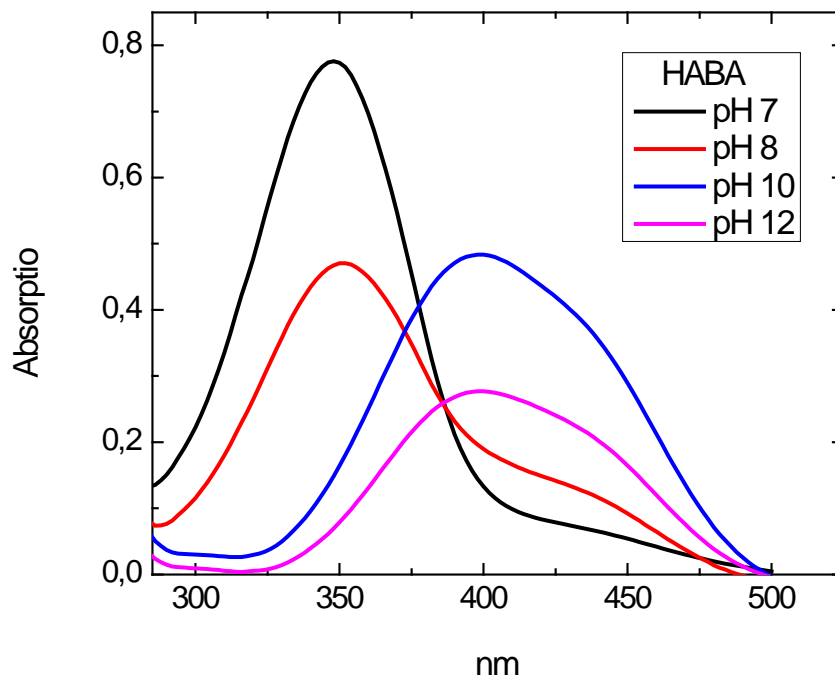
Kuva 18. Avidiini-TAM-017-kompleksin absorptiospektri 374 nm:ssa, kun TAM-17 -liuosta on lisätty avidiiniin vähitellen. Kuvassa on esitetty TAM-017:n molaarinen suhde avidiinin konsentraatioon verrattuna.

Tutkittaessa muutaman eri liuottimen vaikutusta HABA-molekyylin spektriin voitiin havaita spektrin siirtymisiä (Kuva 19). Liuottimina käytettiin K-fosfaattipuskurin lisäksi toluenia, glyserolia ja DMSO:ta. K-fosfaattipuskurissa HABA tuotti maksimiä 348 nm:ssä ja glyserolissa piikki näkyi 350 nm:n kohdalla. Tolueneeniin liuotettuna HABA tuotti absorptiopiikin 374 nm:ssä, ja DMSO:hon liuotettuna piikki muodostui 354 nm:ssä. Kuvan 19 absorptiospektrit on normalisoitu niiden maksimiarvoon.

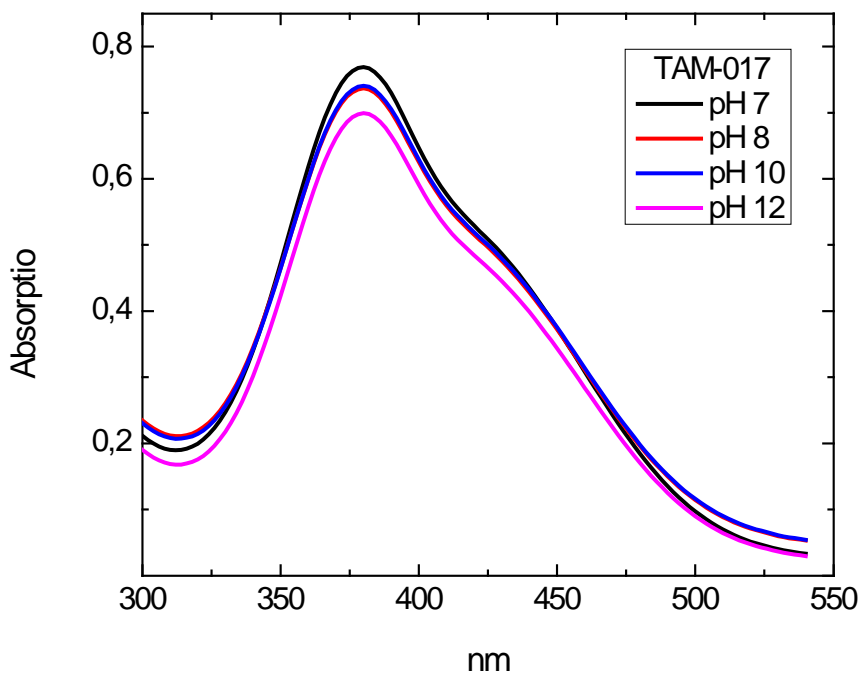


Kuva 19. HABA:n absorptiospektrit eri liuottimissa, puskuri (50 mM K-fosfaatti, pH7), glyseroli, tolueni ja DMSO. Spektrit on normalisoitu niiden maksimiarvoon.

UV/VIS spektroskopiaa käytettiin myös pH:n vaikutuksen tutkimiseen, jolloin HABA:a, TAM-017:a, ja niiden avidiini-komplekseja mitattiin puskureissa, joissa oli eri pH. HABA absorboi valoa aallonpituudessa 348 nm pH:ssa 7 muodostaen yhden, kapean piikin, joka levenee, madaltuu ja siirtyy pidemmille aallonpituuksille pH:n kasvaessa (Kuva 20). Maksimipiikki 352 nm:ssa havaittiin pH:ssa 8, ja lisäksi piikki laski loivasti pidemmille aallonpituuksille muodostaen lievän olkapiikin 434 nm:ssa. Korkeammat pH-arvot, 10 ja 12, aiheuttivat spektrin selkeän siirtymän ja leveän absorptiopiikin aallonpituuksien 350 - 470 nm välille. Molemmissa liuksissa piikin maksimikohta oli 398 nm:ssa, josta se laski loivasti 500 nm:iin. Näiden pH-liuosten välillä oli kuitenkin pieni ero, sillä pH 12 tuotti matalamman ja tasaisemman piikin kuin pH 10. TAM-017 spektriin pH ei vaikuttanut, vaan ainoastaan maksimipiikin intensiteetti 380 nm:ssa oli korkein pH:ssa 7 ja matalampi muissa pH-liuksissa (Kuva 21).

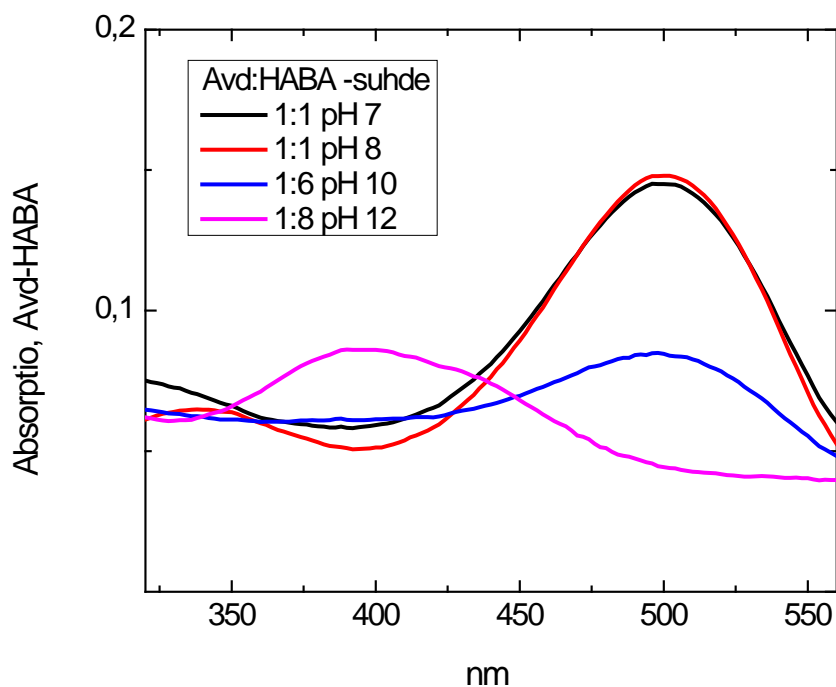


Kuva 20. HABA:n absorptiospektrit 50 mM K-fosfaattipuskurissa eri pH-liuksissa.



Kuva 21. TAM-017 -molekyylin absorptiospektrit K-fosfaattipuskurissa eri pH:ssa.

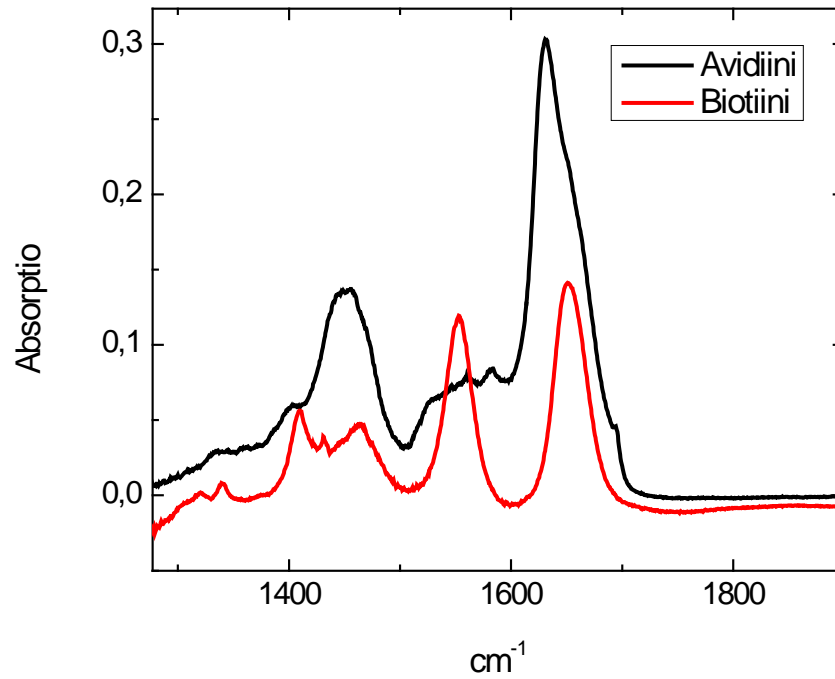
Avidiini-HABA-kompleksi mitattiin eri pH:ssa, jotta voitiin tarkastella, vaikuttaako pH kompleksin spektriin (Kuva 22). Kompleksi muodosti selvän maksimiinkin aallonpituudella 500 nm pH:ssa 7 ja 8. Näistä pH 8 näytti tuottavan korkeamman maksimiinkin sekä lisäksi pienen absorptiopiikin 340 nm:ssa. Sen sijaan pH:ssa 7 toista absorptiopiikkiä ei havaittu kahden eri mittaustulosten perusteella, mutta pieni spektrin intensiteetin nousu oli nähtävissä ennen avidiinin absorptiopiikkiä. Korkeammissa pH-arvoissa (pH 10 ja 12) spektri näytti leveämmältä kuin alemmissa pH:ssa. Avidiini-HABA-kompleksi absorboi jonkin verran 500 nm:ssa pH:ssa 10, ja piikki näytti laskevan tästä loivasti lyhyemmille aallonpituuksille. Sen sijaan pH:ssa 12 ei ollut lainkaan absorptiopiikkiä kompleksin aallonpituusalueella (500 nm), mutta matala absorptiopiikki havaittiin 396 nm:ssa, ja se laski vähitellen 500 nm:n alueelle. Lisäksi avidiinin maksimiinkin havaittiin olevan 280 nm:ssa kaikissa pH-liuoksissa, mutta kuitenkin pH:ssa 7 absorptiopiikin intensiteetti oli suurempi kuin pH:ssa 12. Liuosten pH näytti hieman muuttuvan ajan kuluessa, mikä vaikuttaa olennaisesti absorptiospektreihin sekä mahdollisesti HABA:n sitoutumisominaisuuksiin.



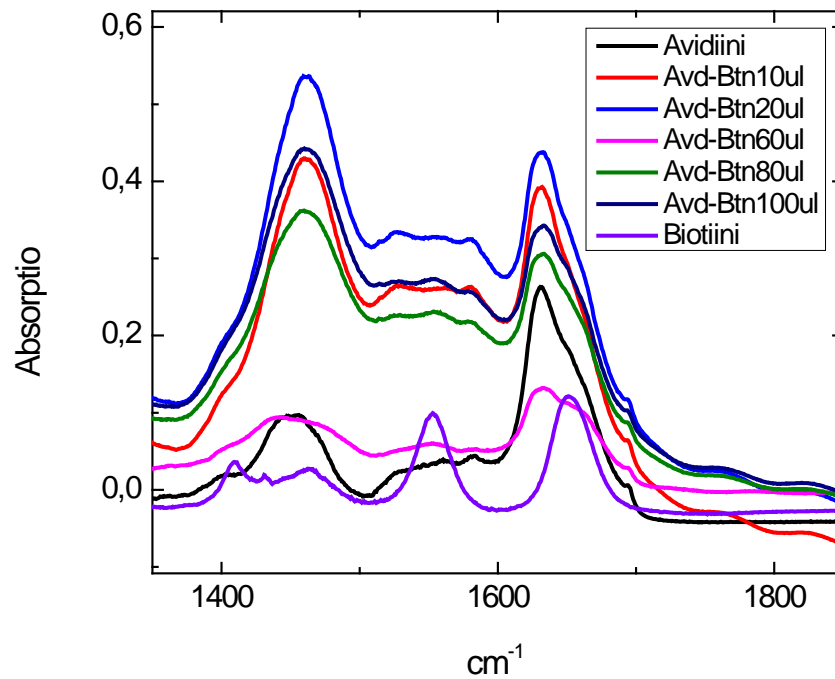
Kuva 22. Avidiini-HABA-kompleksin absorptiospektrit K-fosfaattipuskurissa eri pH:ssa.

4.1.2 Infrapunaspektroskopiset mittaukset (FTIR)

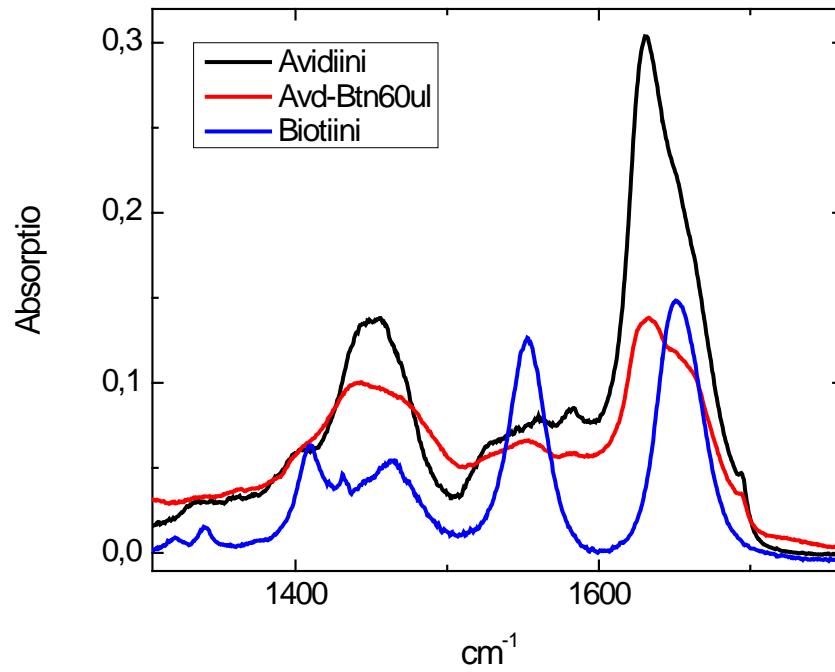
Avidiinin, biotiinin ja niiden kompleksin spektrit (Kuvat 23 ja 24) saatiin mitattua niin, että maksimipiikit oli määriteltävissä. Avidiinin vahvimmat piikit olivat alueilla 1631 cm^{-1} ja 1453 cm^{-1} ja biotiinilla 1653 ja 1553 cm^{-1} . Avidiini-biotiini-kompleksin spektrissä (Kuva 24) havaittiin kaksi maksimipiikkiä alueilla 1631 cm^{-1} ja 1459 cm^{-1} , ja piikkien intensiteetti oli suurempi kuin avidiinin tai biotiinin ollessa yksinään. Kuvassa 25 avidiinin, biotiinin ja niiden kompleksin (biotiinia $60\text{ }\mu\text{l}$) spektrit on suhteutettu toisiinsa niin, että ne ovat vertailukelpoisia keskenään. Avidiinin ja biotiinin summaspektri (Avd+Btn) sekä avidiini-biotiini-kompleksin (Avd-Btn) FTIR-spektri normalisoitiin, ja niiden spektrit on esitetty kuvassa 26. HABA-liuoksen pienestä konsentraatiosta johtuen sen absorptio jäi vähäiseksi, mutta pienet piikit oli havaittavissa alueilla 1603 , 1584 ja 1563 cm^{-1} (Kuva 27). Lisäksi mitattiin avidiini-HABA-kompleksi, jolloin absorptiopiikit näkyivät alueilla 1631 ja 1441 cm^{-1} (Kuva 28). Kompleksin spektri ei näyttänyt juuri eroavan avidiinin spektristä.



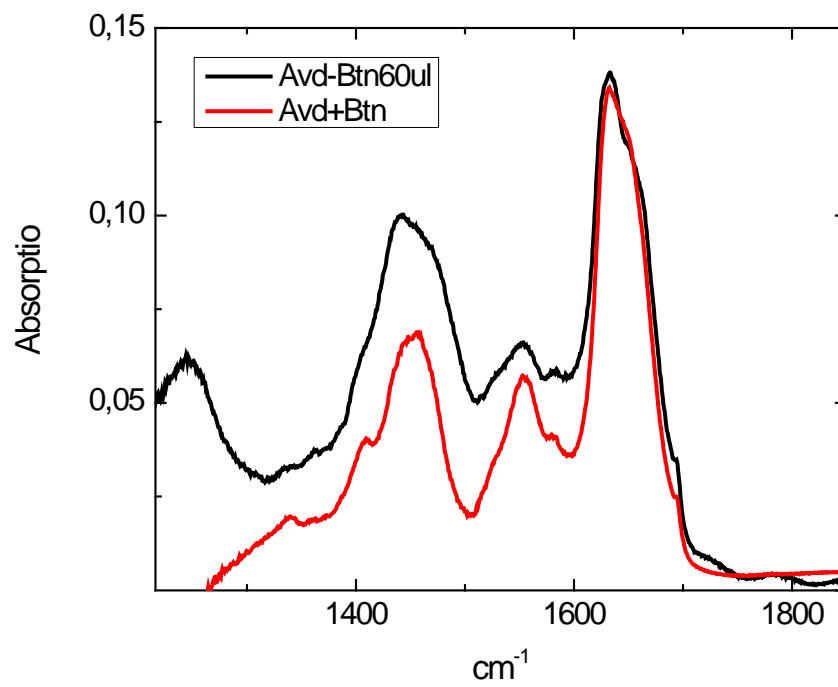
Kuva 23. Avidiinin ja biotiinin spektrit infrapunaspektroskopiolla mitattuna (kyvetin välikappaleen koko oli 100 μm). Avidiinin vahvimmat piikit olivat alueilla 1631 cm^{-1} ja 1453 cm^{-1} ja biotiinilla 1653 cm^{-1} ja 1553 cm^{-1} .



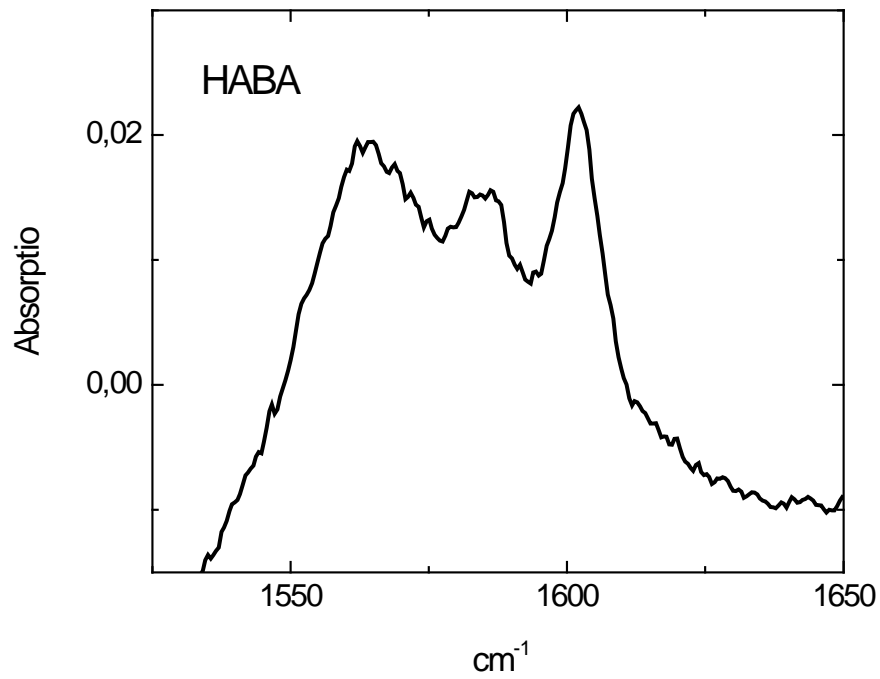
Kuva 24. Avidiini-biotiini-kompleksin sekä avidiinin ja biotiinin FTIR-spektrit alueella 1350-1850 cm^{-1} . Biotiinia lisättiin avidiiniinliuokseen viisi kertaa ja kyvetin välilevy oli 100 μm .



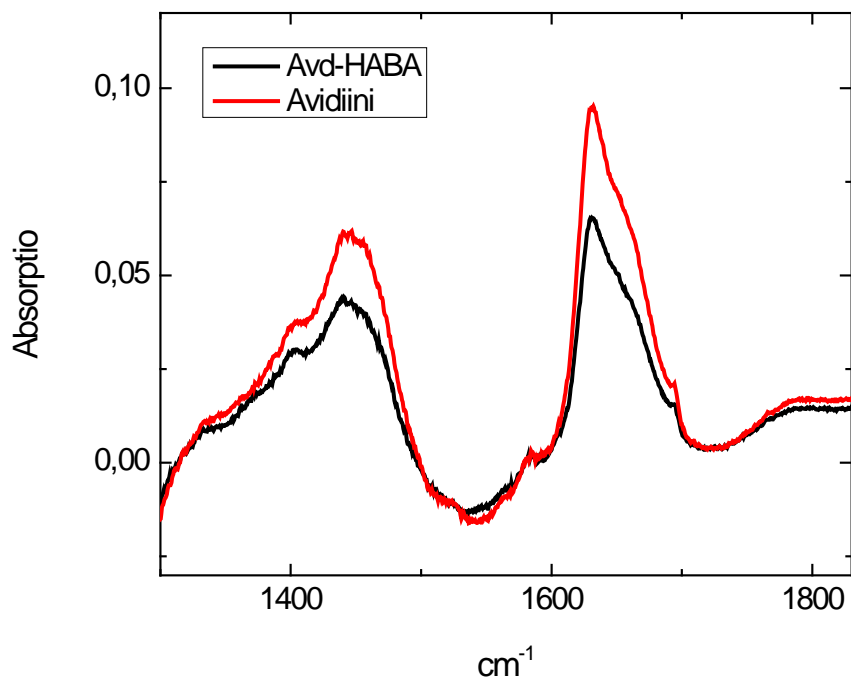
Kuva 25. Avidiinin, biotiinin ja avidiini-biotiini (lisätty 60 μl) -kompleksin FTIR-spektrit.



Kuva 26. Avidiinin ja biotiinin summaspektri (Avd+Btn) sekä avidiini-biotiini-kompleksin (Avd-Btn60 μl) FTIR-spektri.



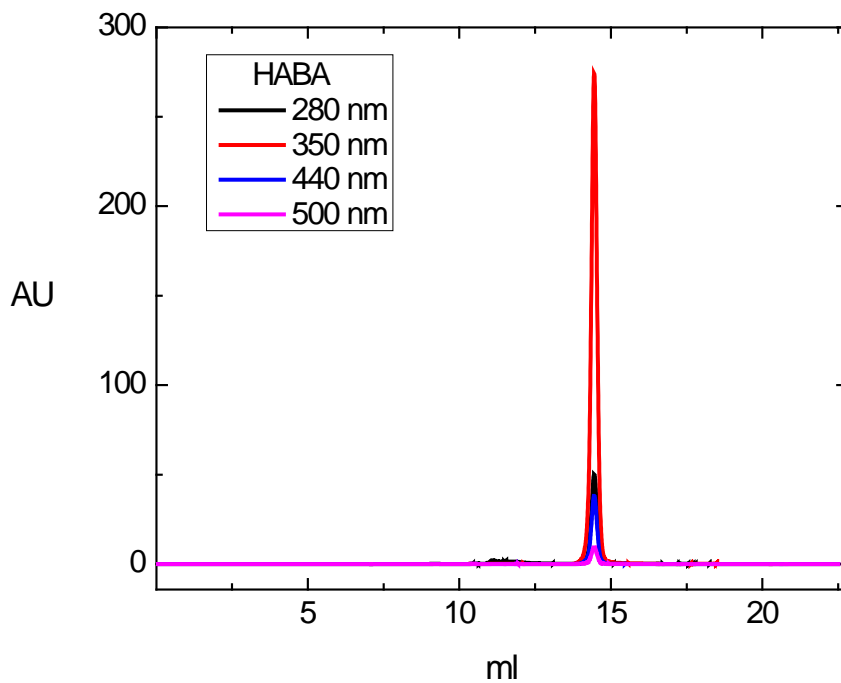
Kuva 27. HABA:n FTIR-spektri (kyvetin välikappale kokoa 50 μm). Vahvimmat absorptiopiikit ovat alueilla 1603, 1584 ja 1563 cm^{-1} .



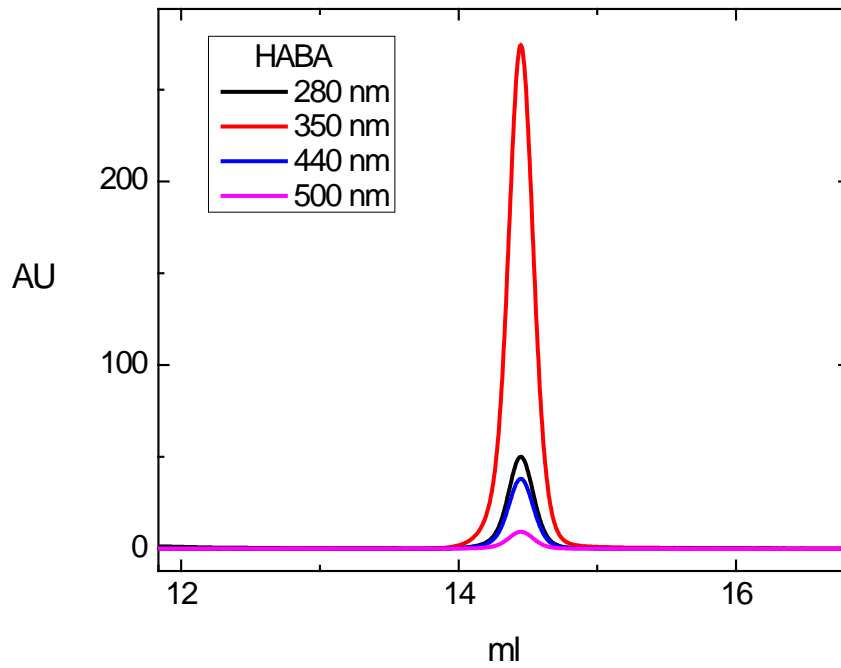
Kuva 28. Avidiini-HABA-kompleksin ja avidiinin FTIR-spektrit. Kyvetin välikappale oli kokoa 50 μm , ja avidiini-HABA-kompleksin absorptiopiikit näkyvät alueilla 1631 ja 1441 cm^{-1} .

4.1.3 Kromatografiset mittaukset: Geelisuodatus

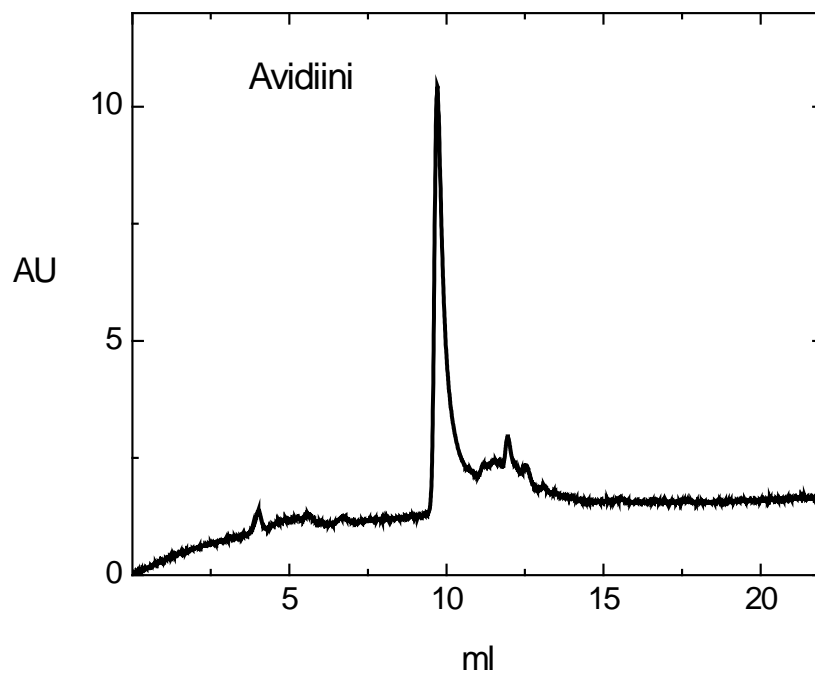
Kromatografisella menetelmällä analysoitiin HABA- ja avidiininäytteet, jolloin niille saatiin kromatogrammit, jossa absorbanssiyksikkö (AU) on esitetty tilavuuden funktiona (ml). Tilavuus (ml) x-akselilla kertoo, kuinka paljon puskuriliuosta on ajettu pakatun kolonnin läpi. Näytteen tilavuus oli jokaisella ajokerralla 10 μ l. Kuvissa 29-32 on avidiinin, HABA:n ja niiden kompleksin (HABA:n suhde avidiiniin 1:10) kromatogrammit. Lisäksi kuvassa 33 on esitetty avidiinin ja HABA:n normalisoitu summakromatogrammi avidiini-HABA-kompleksin kromatogrammin rinnalla.



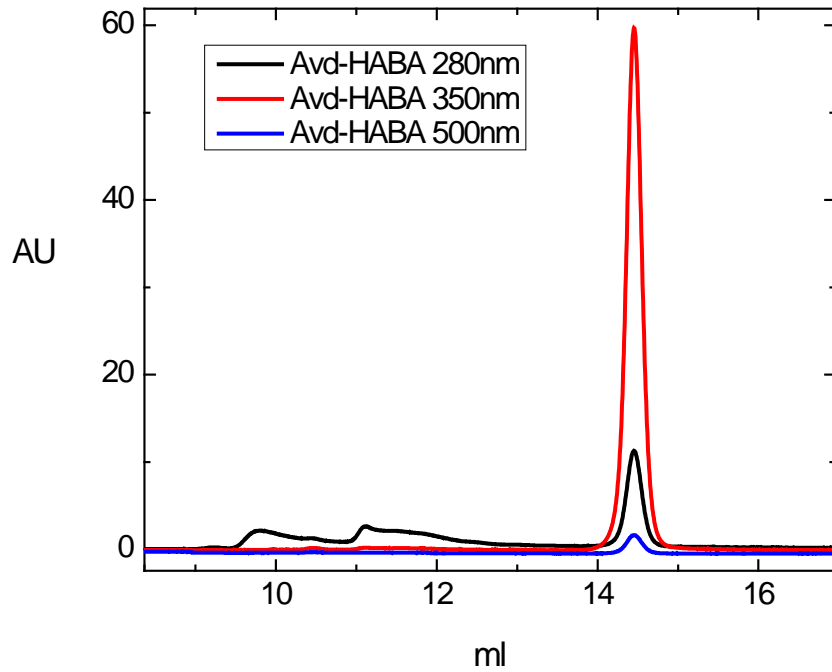
Kuva 29a. HABA:n kromatogrammi eri detektioaallonpituuksilla (280, 350, 440 ja 500 nm).



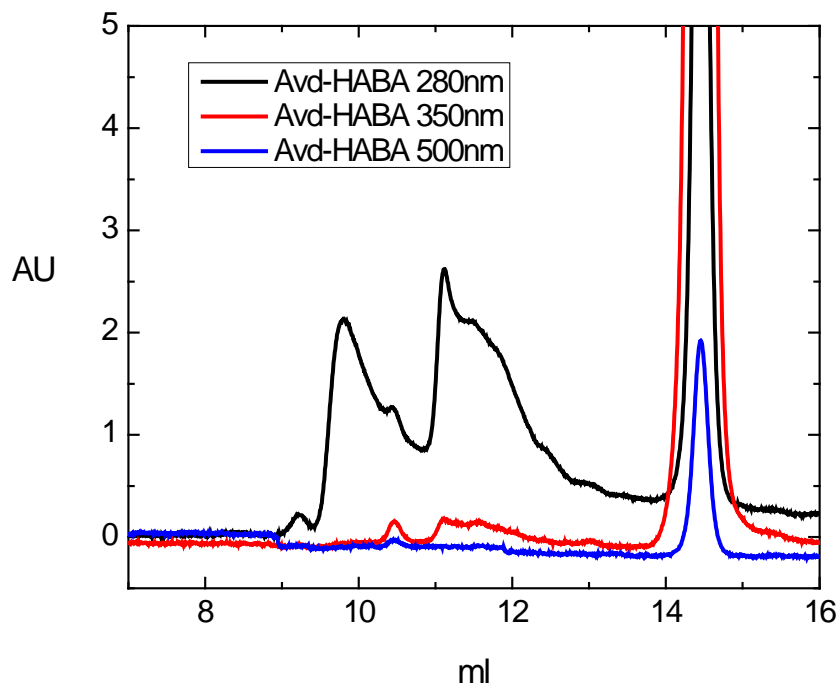
Kuva 29b. HABA:n kromatogrammi eri aallonpituuksilla, kun puskuria on ajettu kolonin läpi suunnilleen 14,4 ml.



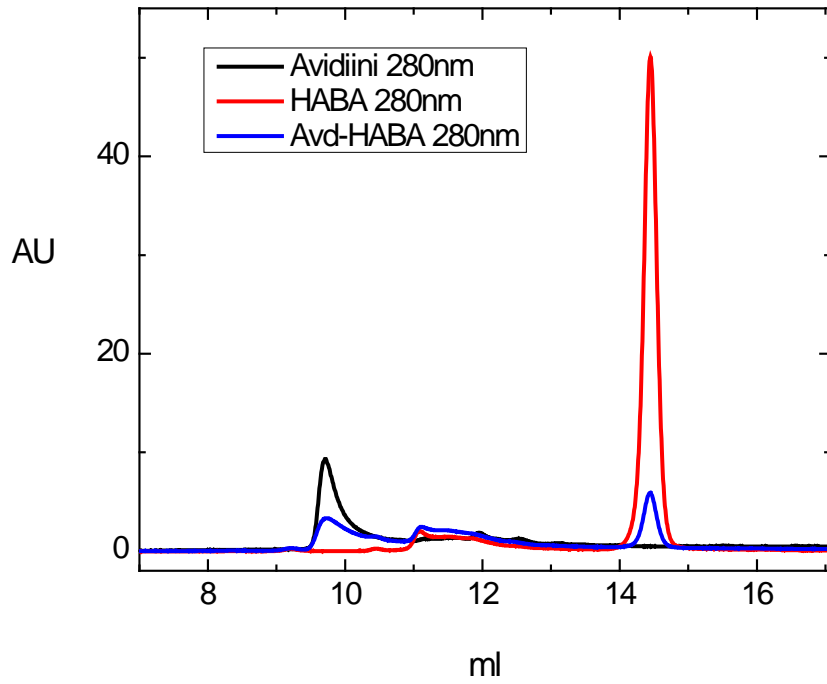
Kuva 30. Avidiinin kromatogrammi aallonpituudella 280 nm.



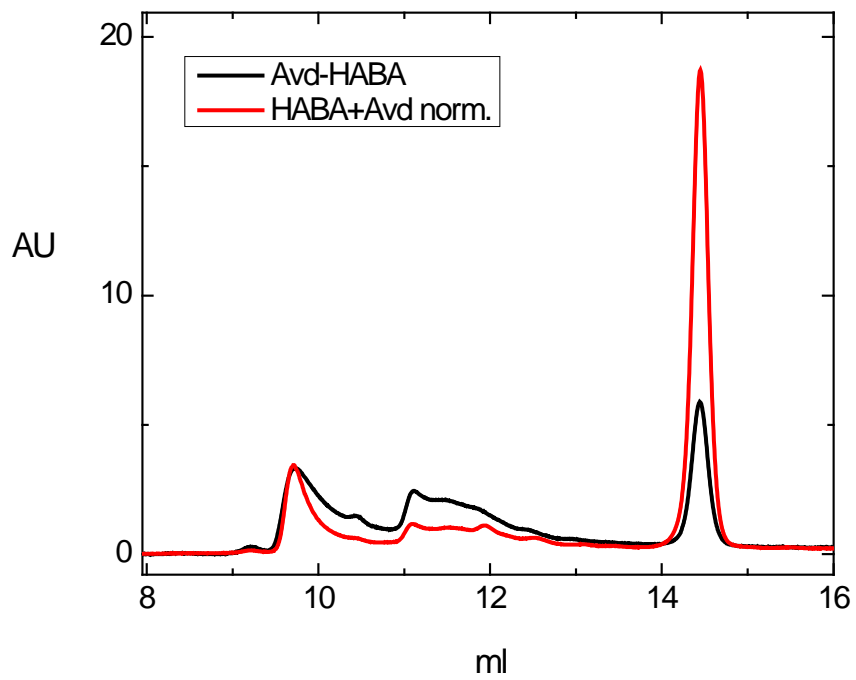
Kuva 31a. Avidiini-HABA-kompleksin (HABA 1:10) kromatogrammi eri aallonpituuksilla (280, 350 ja 500 nm).



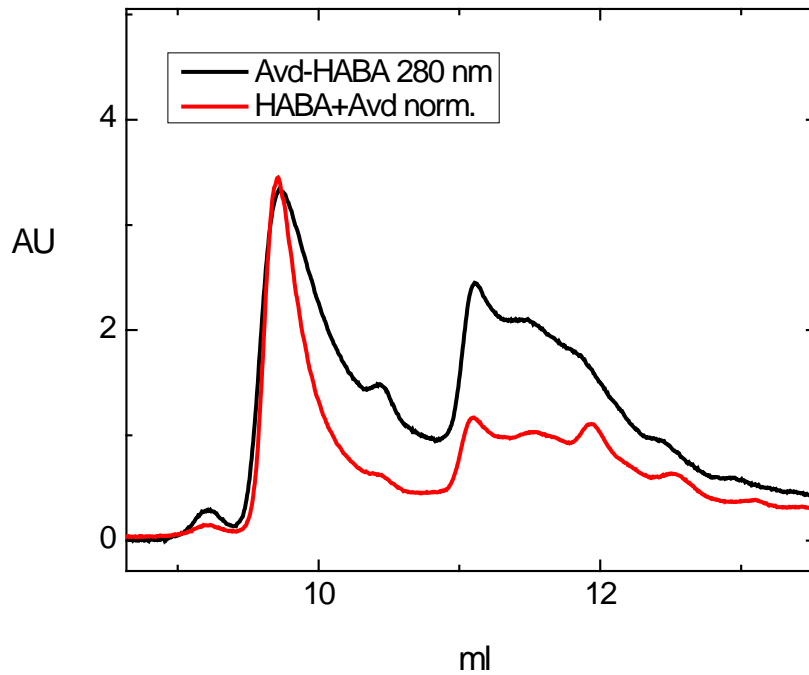
Kuva 31b. Avidiini-HABA-kompleksin (HABA 1:10) kromatogrammi eri aallonpituuksilla (280, 350 ja 500 nm). Kuva tarkennettu kohtaan, jossa kolonnin läpi on ajettu ~9-14 ml puskuria.



Kuva 32. Avidiinin, HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksin kromtogrammit aallonpituudella 280 nm.

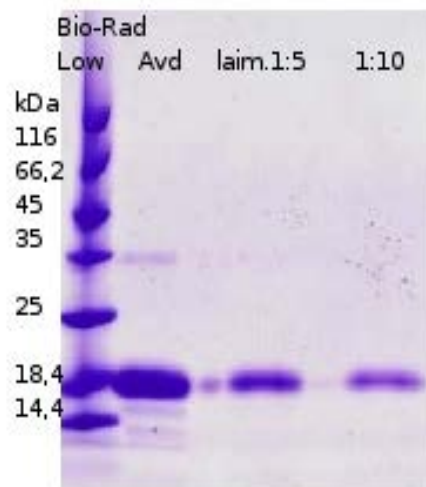


Kuva 33a. Avidiini-HABA-kompleksin sekä HABA:n ja avidiinin (HABA+Avd) normitettu summakromatogrammi aallonpituudella 280 nm.



Kuva 33b. Avidiini-HABA-kompleksin sekä HABA:n ja avidiinin (HABA+Avid) normitettu summakromatogrammi aallonpituudella 280 nm. Kuva tarkennettu kohtaan, josta pitäisi pystyä havaitsemaan kompleksin piikki kromatogrammissa (~9-10 ml).

Lisäksi SDS-PAGE:a käytettiin avidiinin lisäanalysoimiseksi (Kuva 34).

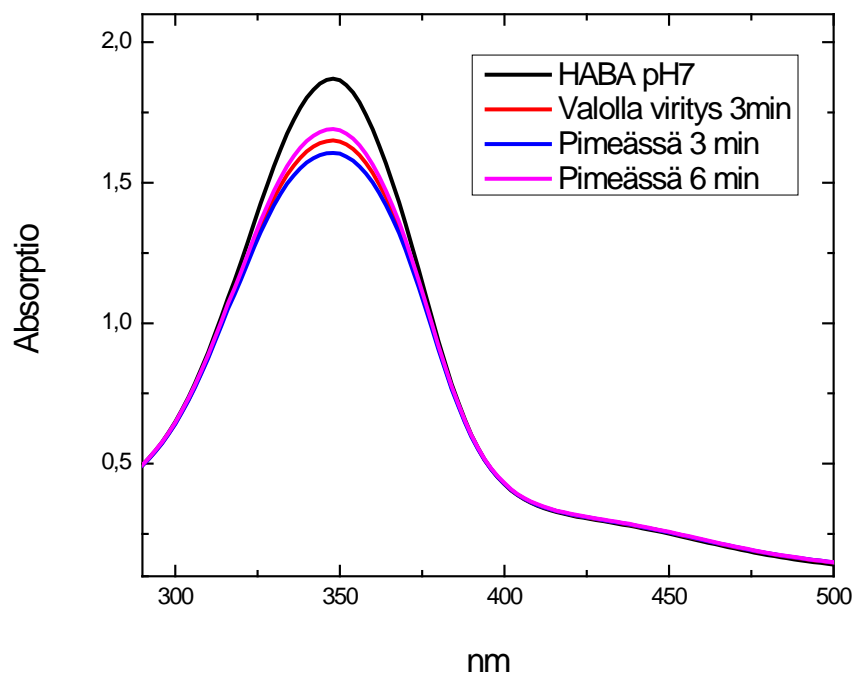


Kuva 34. SDS-PAGE-geelikuva kananmunasta eristetystä avidiinista (0,68mg/ml) sekä sen laimennokset 1:5 ja 1:10. Vasemmalla Bio-Rad low standardiproteiini, ja sen vieressä avidiininäytteet. Suurin proteiini vyöhyke näkyy himmeänä kohdassa 35 kDa:a ja päävyöhyke on ~18 kDa kokoinen, jonka jälkeen geelillä on nähtävissä myös pienempiä proteiini vyöhykkeitä.

4.2 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksien kontrollointi

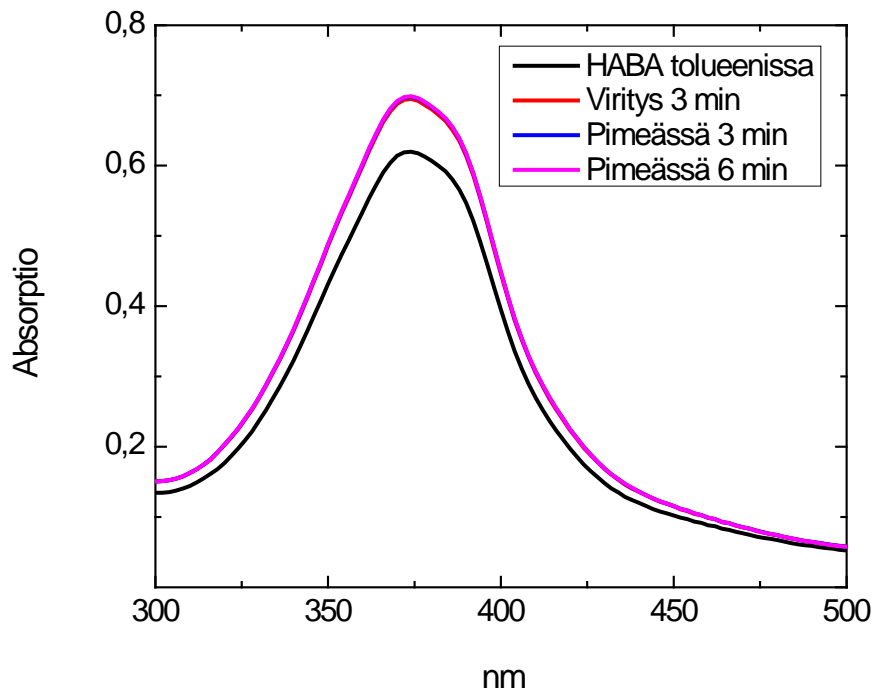
4.2.1 Kontrollointi valon avulla

Avidiini-HABA-kompleksia viritettiin valon avulla eri pH:n omaavissa liuoksissa, jotta voitiin havaita oliko pH:lla vaikutusta HABA:n fotoisomerisaatioon avidiiniin sitoutuneessa muodossa. Mittausten perusteella pH:ssa 7 ja 8 näkyi kompleksin maksimipiikin pieneneminen valolla virityksen jälkeen. Lisäksi HABA-molekyylien viritys 0,6 W:n lampun teholla pH:ssa 7 tuotti maksimipiikin intensiteetissä selkeän pienenemisen, kun molekyyliä valotettiin kolme minuuttia (Kuva 35). Valolla virityksen jälkeen näytettä pidettiin pimeässä kolme minuuttia, jolloin absorptiopiikki näytti edelleen laskevan. Kuuden minuutin pimeässä olon jälkeen HABA:n piikin intensiteetti oli hieman noussut, mutta ei kuitenkaan lähtöpiikin tasolle.

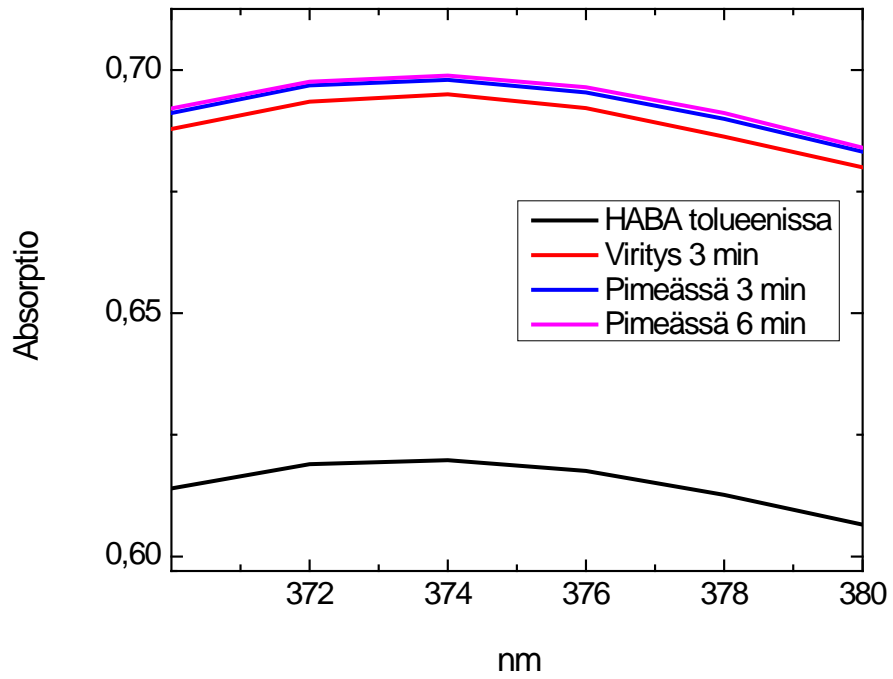


Kuva 35. HABA:n viritys 50 mM K-fosfaattipuskurissa (pH 7) 0,6 W:n valoteholla käyttäen aallonpituuksia 380 nm ja >700 nm.

HABA-molekyylien valotusta kokeiltiin myös eri liuottimissa. HABA:n ollessa liuotettuna tolueeniin piikin intensiteetti kasvoi huomattavasti valolla virityksen jälkeen, ja intensiteetissä tapahtui edelleen pientä kasvua, kun liuosta pidettiin pimeässä (Kuva 36a ja b). DMSO:ssa HABA:n absorptiointensiteetti aallonpituusalueella 320-390 nm näytti sen sijaan hieman laskevan valolla virityksen jälkeen. Lisäksi kokeiltiin glyserolia, johon liuotettiin HABA-atsoväriä ja viritettiin samalla tavalla UV-valolla, mutta spektraalisia muutoksia ei havaittu. Tutkimuksessa käytettiin useita eri aallonpituuksia läpäiseviä filttareita, mutta ne näyttivät tuottavan samankaltaisen spektrin valolla virityksen jälkeen.



Kuva 36a. HABA:n kolmen minuutin suora viritys led-valolla tolueeniin liuotettuna, jolloin valotus tapahtui aallonpituusalueella 360-390 nm.

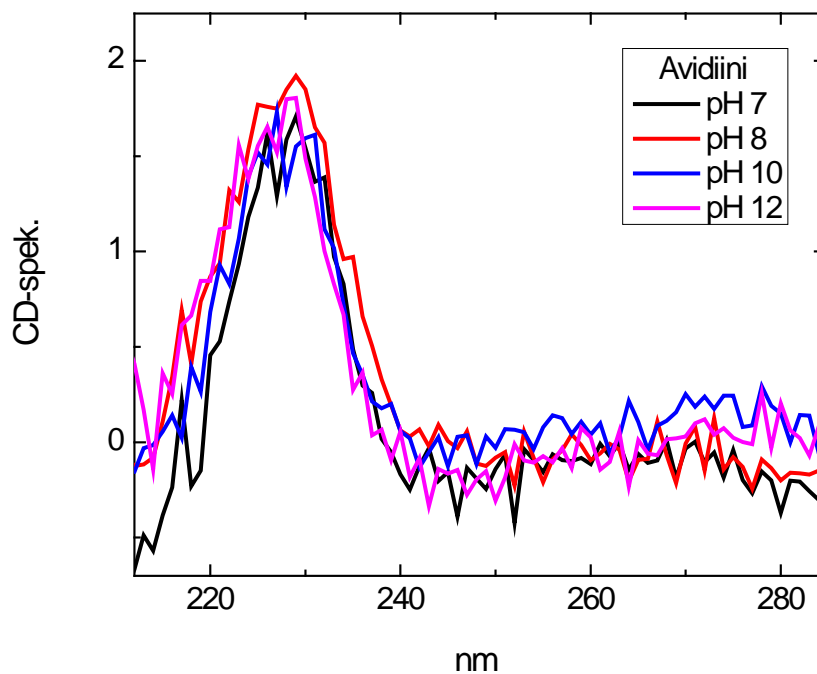


Kuva 36b. HABA:n ollessa tolueeniin liuotettuna kolmen minuutin suora viritys led-valolla, jolloin saatiin absorptiospektrit kuvassa 36a. Kuvassa samat spektrit aallonpituusalueella 370-380 nm.

4.2.2 Kontrollointi pH:n avulla

4.2.2.1 Avidiinin CD-spektroskopiset mittaukset

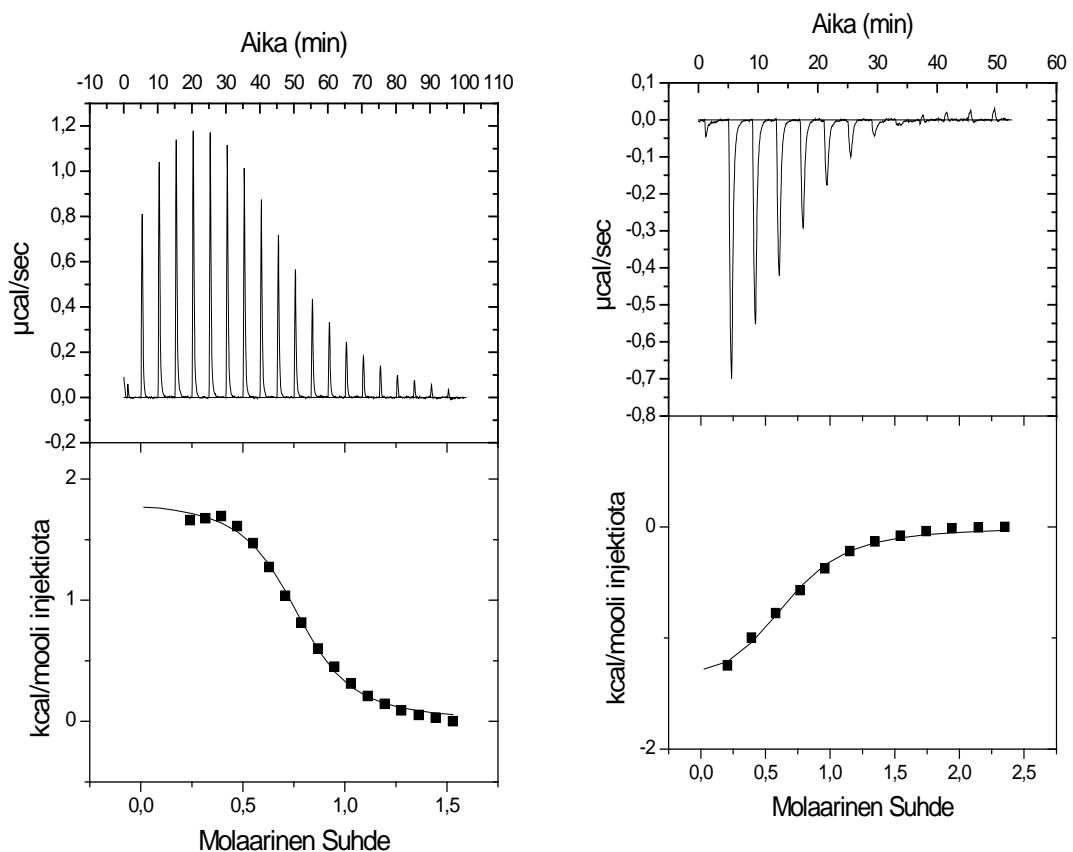
Avidiinin stabiilisuutta eri pH:ssa tarkasteltiin CD-spektropolarimetrillä, jolla voitiin havaita proteiinin rakenteiden muutoksia. Avidiininäytteiden CD-spektrit näyttivät samankaltaisilta kaikissa pH:ssa (pH 7,8,10 ja 12), joissa maksimipiikki muodostui 228 nm:n kohdalle (Kuva 37). Spektrien välillä esiintyi kuitenkin pieniä eroja, esimerkiksi 280 nm kohdalla pH:n 7 ja 8 spektrit eroavat hieman pH:sta 10 ja 12.



Kuva 37. Avidiinin CD-spektri 50 mM K-fosfaattipuskurin eri pH-arvoissa (pH 7,8,10 ja 12).

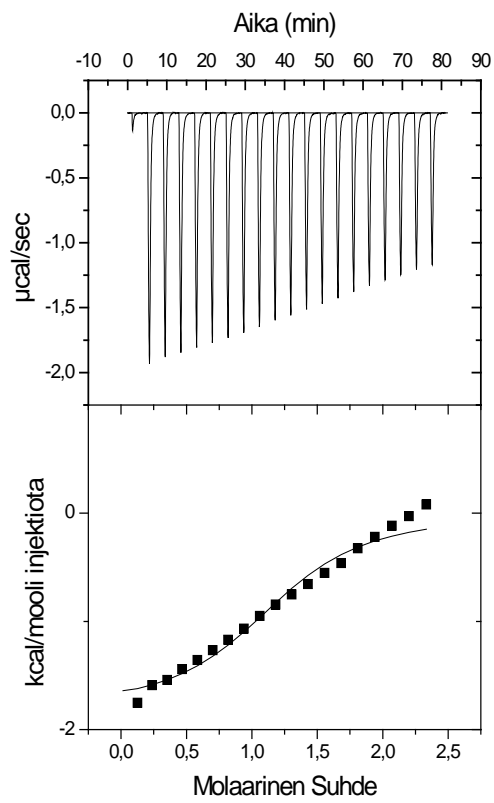
4.2.2.2 Kalorimetrimittaukset

HABA-atsovärin sitoutumista avidiiniin eri pH:ssa (pH 7, 8, 10 ja 11) tutkittiin ITC-menetelmän avulla, jolloin sitoutumisreaktioille saatiin titraatiokäyrät. Kuvissa 38-42 nähdään energiamäärä (kcal/sec) titraation aikana sekä sitoutumisreaktion saturaatiokäyrä kussakin pH:ssa. Lisäksi kalorimetrian analyysiohjelma (Microcal Origin) antoi kunkin käyrän perusteella näytteen sitoutumisvakion, entalpiian, entropian ja stoikiometrisen arvon eri pH-liuoksissa (Taulukko 3). Myös HABA:n johdannainen TAM-017 mitattiin kalorimetrialla pH:ssa 8. Kalorimetriassa käytettyjen näyteliuosten pH näytti pH-mittarilla mitatessa hieinan muuttuvan ajan kuluessa, mikä vaikutti liuosten spektreihin (Kuva 42).

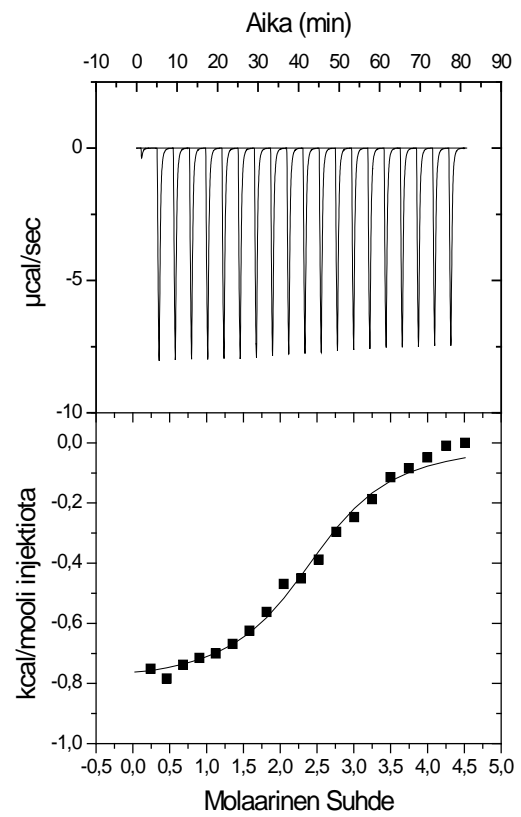


Kuva 38. HABA-avidinin ITC-mittaus pH:ssa 7

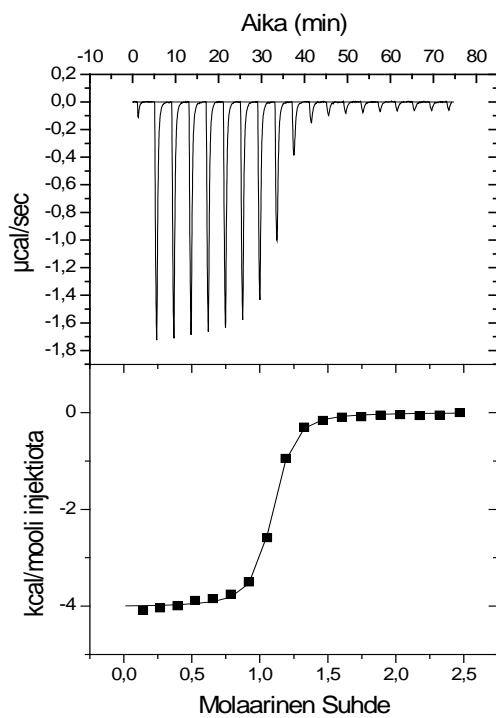
Kuva 39. HABA-avidinin ITC-mittaus pH:ssa 8



Kuva 40. HABA-avidinin ITC-mittaus pH:ssa 10



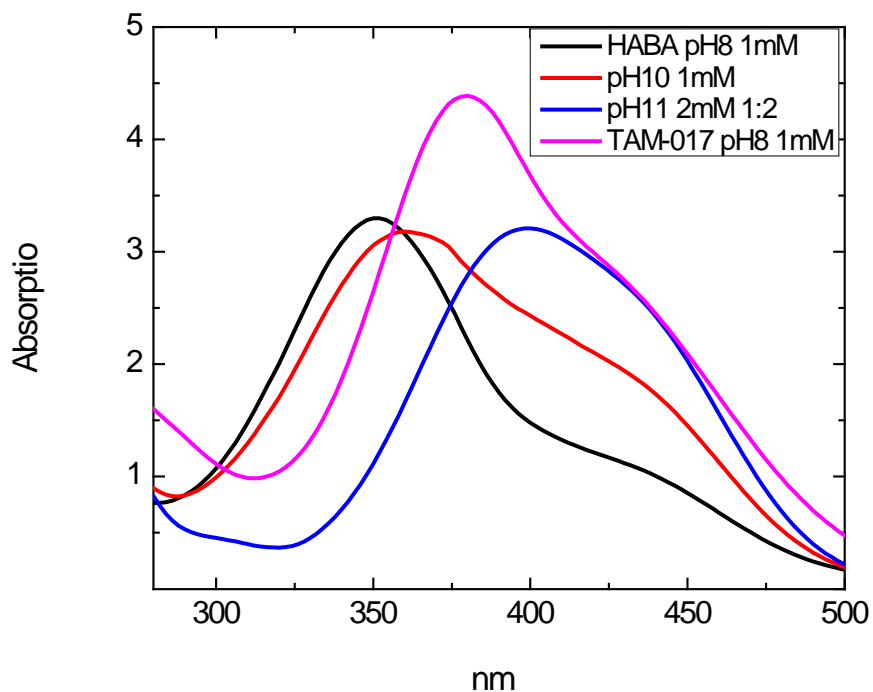
Kuva 41. HABA-avidinin ITC-mittaus pH:ssa 11



Kuva 42. TAM-017-avidinin ITC-mittaus pH:ssa 8

Taulukko 3. Kalorimetrimittauksien HABA-avidiini vuorovaikutussuhteiden termodynaamiset parametrit eri pH-arvoissa (pH 7,8,10 ja 11), sekä TAM-017-avidiinin termodynaamiset parametrit pH:ssa 8.

Näyte	Konsentr. (mM)	Sitoutumisvakio (K_a) M^{-1}	Entalpia (H) J	Entropia (S) J/K	Stoikiometria (N)
HABA pH 7	1,0	$2,09 \times 10^5$	1828 ± 32	30,5	0,75
HABA pH 8	1,5	$1,08 \times 10^5$	-1505 ± 89	18,0	0,63
HABA pH 10	2,0	$8,30 \times 10^4$	-1810 ± 99	16,4	1,21
HABA pH 11	2,1	$7,89 \times 10^4$	-802 ± 20	19,7	2,46
TAM-017 pH 8	1,0	$2,53 \times 10^6$	-4014 ± 23	15,8	1,04



Kuva 42. ITC-mittauksissa käytettyjen HABA ja TAM-017 näytteiden absorptiospektrit eri pH-liuoksissa 9 vuorokautta kalorimetrimittausten jälkeen. HABA-näyte pH:ssa 11 (~2 mM) on laimennettu 1:2, muut näytteet ovat konsentraatioiltaan 1 mM.

5 Tulosten tarkastelu

5.1 Avidiinin, atsobentseenien ja niiden kompleksien karakterisointi

5.1.1 Molekyyliden ominaisuuksien määrittäminen

Tässä tutkimuksessa käytettiin kolmea eri menetelmää, UV/VIS-spektroskopiaa, fourier muunnos infrapunaspektroskopiaa ja kromatografista geelisuodatusta, molekyyliden absorptio-ominaisuuksien määrittämisessä. UV/VIS-spektroskopisissa mittauksissa määritettiin atsobentseenien, avidiinin ja niiden kompleksien absorptioalueet, joiden perusteella voidaan havaita konformaatiomuutokset sekä kompleksien muodostuminen. Infrapunaspektroskopiaa käytettiin molekyyliden rakenteiden sekä niiden muutosten määrittämisessä, sillä liganidin sitoutuminen saattaa aiheuttaa konformaatiomuutoksia proteiinissa ja siten vaikuttaa sen absorptiospektriin. Molekyylejä analysoitiin myös kromatografisella geelisuodatusmenetelmällä, josta saatiin tietoa pylvään läpi ajettujen molekyyliden puhtaudesta ja absorptioista eri aallonpituuksilla.

Käytetyistä menetelmistä UV/VIS-spektroskopia on kaikista tehokkain menetelmä absorptioiden määrittämisessä. Tulosten perusteella HABA-atsoveri ja sen johdannainen TAM-017 absorboivat valoa hieman eri aallonpituuksilla, ja siksi niiden spektrien maksimi- ja minimaalipisteet näkyvät eri kohdassa (Kuva 14). Tämä erilainen absorptio johtuu niiden rakenteellisista eroista. Lisäksi muutaman eri liuottimen vaikutusta HABA-molekyyliin tutkittiin UV/VIS-spektroskopian avulla. Kuvan 19 perusteella liuoksen polaarisuus vaikuttaa HABA:n spektriin, sillä poolittomat liuokset aiheuttavat maksimi- ja minimaalipisteen siirtymän pidemmille aallonpituuksille. Tässä työssä käytetyistä liuottimista tolueni oli poolittomin, ja siksi se aiheutti suurimman maksimi- ja minimaalipisteen siirtymän. Spektrin muutoksiin vaikuttaa molekyyliden vuorovaikutukset liuottimen kanssa, ja etenkin niiden välisillä vetysidoksilla on todennäköisesti suuri merkitys HABA:n spektraalisissa ominaisuuksissa. Täten, tutkimuksessa käytetyllä liuottimella saattaa hyvinkin olla suuri vaikutus molekyyliin ja sen vuorovaikutuksiin toisten molekyyliden kanssa.

Lisäksi UV/VIS-mittausten avulla tutkittiin pH:n vaikutusta molekyyliin. Tulosten perusteella pH näytti aiheuttavan muutoksia sekä HABA-molekyyliin että avidiini-HABA-kompleksin spektreihin (Kuvat 20 ja 22). HABA-molekyylien spektrit siirtyivät pidemmille aallonpituuksille (punasiirtymä), kun pH kasvoi, ja samalla absorptiopiikkien intensiteetti laski. Täten pH näyttää vaikuttavan molekyylien absorptio-ominaisuuksiin. Farrera ym. (2008) mukaan pH:n nousu aiheuttaa HABA:n deprotonaation, jolloin se luovuttaa protonia. Myös tämän työn tulosten perusteella näyttää siltä, että pH vaikuttaa HABA:n kemiallisiin ominaisuuksiin, mikä aiheuttaa absorptiomuutokset HABA:n spektrissä. Sen sijaan TAM-017:n absorptioon pH:lla ei näyttänyt olevan suurta vaikutusta (Kuva 21). Täten TAM-017 saattaa olla stabiilimpi molekyyli, koska se ei näytä olevan niin herkkä ympäristön vaihteluille. Yleisesti UV/VIS-mittauksissa hankaluuksia tuotti puskureiden ja näytteiden pH:n lasku ajan myötä. Muutokset pH:ssa vaikuttavat molekyylien absorptioihin, mikä näkyy spektrien muutoksina. Useiden päivien ajan voitiin käyttää samoja näytteitä, mutta pH:n laskun takia jonkin toisen puskuriliuoksen käyttöä voisi kokeilla pH-tutkimuksissa. Lisäksi hyvin pienien määrien punnitseminen (kuten 0,2 mg) tuotti ongelmia, koska vaa'an epätarkkuus saattoi aiheuttaa punnitusvirheitä, ja täten tarkkojen konsentraatioiden määrittäminen oli hankalaa.

FTIR-menetelmällä mitattiin avidiinin, biotiinin, HABA:n ja niiden kompleksien absorptiota infrapuna-alueella. Avidiinin (1631 cm^{-1} ja 1453 cm^{-1}) ja biotiinin (1653 ja 1553 cm^{-1}) maksimipiikit (Kuva 23) vastasivat aiempia tutkimustuloksia (Swamy ym., 1996). Swamy ym. (1996) ovat todenneet, että avidiinin maksimipiikki ($\sim 1631\text{ cm}^{-1}$) osoittaa β -levyn ja pidentyneiden ketjurakenteiden olevan vallitsevia sekundaarisia rakenteita avidiinissa. HABA-liuoksen absorptio jäi todennäköisesti vähäiseksi pienen konsentraation takia, mutta pienet maksimipiikit oli havaittavissa (Kuva 27). FTIR-mittauksissa biotiinia käytettiin eräänlaisena kontrolliligandina, kun menetelmää haluttiin käyttää kompleksien infrapunaspektrien määrittämiseen. Avidiini-biotiini-kompleksin spektreistä havaitaan kompleksin spektrin olevan samankaltainen avidiinin spektrin kanssa (Kuvat 24 ja 25). Tämä kertoo siitä, että merkittäviä sekundaaristen rakenteiden muutoksia ei tapahdu biotiinin sitoutuessa avidiiniin. Mitatut tulokset vastaavat aikaisempien tutkimusten tuloksia (Swamy ym., 1996), joissa avidiinin maksimipiikin on todettu olevan suunnilleen 1633 cm^{-1} :ssa, eikä biotiinin lisääminen ole aiheuttanut huomattavaa spektraalista muutosta avidiinin spektriin

verrattuna. Ainoastaan pieniä eroja havaittiin alueilla 1662, 1630 ja 1554 cm^{-1} , joista erot 1630 cm^{-1} :ssa heijastavat jotain muutoksia avidiinin amidi I -absorptiossa eli proteiinin rakenteessa. Kuvassa 26 on esitetty avidiinin ja biotiinin summaspektri (Avd+Btn) sekä avidiini-biotiini-kompleksin (Avd-Btn) FTIR-spektri, joista nähdään spektrien samankaltaisuus. Näiden spektrien piikkien leveydessä ja intensiteetissä on kuitenkin havaittavissa pieniä eroja, ja lisäksi avidiinin ja biotiinin summaspektrissä on pieni olkapiikki 1400 cm^{-1} :ssa. Pienet muutokset saattavat johtua, esimerkiksi vetysidosten stabiilisuuden muuttumisesta avidiinin rakenteessa biotiinin sitoutumisen aikana. Lisäksi mitattiin avidiini-HABA-kompleksi (Kuva 28), jolloin nähtiin värireaktio keltaisesta punaiseksi. Täten HABA-molekyylin voidaan todeta sitoutuneen avidiiniin, mutta kompleksin spektrissä ei ole nähtävissä suuria muutoksia verrattuna avidiinin spektriin. Huonosta liukoisuudesta johtuen HABA:n konsentraatio oli niin pieni, että sitä ei voitu erottaa avidiinin spektristä. Absorptiopiikkien intensiteettien lasku johtuu todennäköisesti ainoastaan avidiini-liuoksen laimemisesta, kun HABA-liuosta lisättiin näytteeseen. Infrapunamittauksissa yleisenä ongelmana oli lähtölinjan (baseline) vaihtelut eri mittauksien välillä, minkä takia kuvaajia jouduttiin sovittamaan keskenään vertailukelpoisiksi. Tällä menetelmällä ei saatu haluttuja tuloksia avidiini-HABA-kompleksien muodostumisen havainnoimiseksi, mutta menetelmää ja laitteistoa säätämällä voitaisiin kuitenkin saada aikaan parempia tuloksia jatkotutkimuksia ajatellen.

Kromatografisten tulosten perusteella HABA absorboi eniten aallonpituudessa 350 nm, jonkin verran 280 ja 440 nm:ssa ja vähiten 500 nm:ssa (Kuvat 29a ja b). Avidiinin absorptiopiikki havaitaan detektorilla aiemmin, koska se on isompi kuin HABA-molekyyli (Kuva 30). Avidiinin piikki ei ole säännöllisen muotoinen, mikä voi johtua epäpuhtauksista tai avidiinin hajoamisesta prosessin aikana. Avidiini esiintyykin yleensä tetrameerinä, ja täten on mahdollista, että sen alayksiköt eroavat toisistaan ainakin osittain kromatografian pylväässä. Hytönen ym. (2004) ovat havainneet avidiininäytteissä esiintyvän myös polymeerisiä muotoja. Tätä tukee kromatografian jälkeen avidiininäytteestä ajettu SDS-PAGE, jonka geeliltä nähdään useita proteiinvyöhykkeitä (Kuva 34), mutta vain yksi selkeä päävyöhyke (~18 kDa). Avidiinin yhden alayksikön on aiemmin todettu olevan ~15,5 kDa. Tätä koeroa voidaan kuitenkin selittää glykolysaatiolla, koska SDS ei kykene sitoutumaan proteiinin sokeriosiin, jolloin proteiinin koko vaikuttaa todellista suuremmalta. Dimeerin ko-

koinen vyöhyke (35 kDa) taas johtuu todennäköisesti jonkinlaisesta proteiinien kovalenttisesti dimerisoitumisesta.

5.1.2 Atsomolekyylien ja avidiinin väliset vuorovaikutukset

Työssä tutkittiin myös HABA:n ja TAM-017:n sitoutumista avidiiniin UV/VIS-spektroskopian, kromatografisen geelisuodatuksen ja kalorimetrian (ITC) avulla. Sitoutumista arvioitiin HABA:n sitoutumisvakiosta (K_a), joka onnistuttiin määrittämään sekä UV/VIS-spektroskopian että ITC-menetelmän avulla. UV/VIS-spektroskopiassa kompleksin muodostuminen havaittiin absorptioalueen muuttumisesta. Geelisuodatuksessa molekyylit erottuivat koon perusteella, jolloin isommat partikkelit kulkeutuivat pylvään läpi nopeammin kuin pienemmät molekyylit, ja täten näistä tuloksista voitiin arvioida kompleksien muodostuminen. Kalorimetrisistä tuloksista kompleksien muodostuminen havaittiin titraatiokäyrien perusteella.

Väriominaisuuksiensa ansiosta HABA:n sitoutumista avidiiniin voitiin seurata spektrofotometrisesti, ja sitoutuessaan HABA-liuoksen väri muuttui keltaisesta punaiseksi, mikä havaittiin spektrin muutoksena (Kuva 15). Sen sijaan TAM-017 spektriin avidiinin läsnäolo ei aiheuttanut huomattavaa siirtymää (Kuva 18), mikä kertoo siitä, että suuria konformaatiomuutoksia ei tapahdu näiden molekyylien välillä. Vaikka pieniä spektrin muutoksia voidaan TAM-017 spektrissä havaita, näyttää siltä, että sitoutumisreaktion aikana ei tapahdu sellaista rakenteellista muutosta, joka näkyisi selvänä spektrin siirtymisenä kuten avidiini-HABA-kompleksilla. Avidiini-HABA-kompleksin UV/VIS -titraatiospektristä arvioitiin myös saturaatiosuhde, kun sitoutumisesta aiheutuvaa absorptiopiikkiä (500 nm) verrattiin vapaan ligandin piikkiin (350 nm) (Kuva 15). Saturaatiosuhde saadaan avidiinin ja HABA-molekyylien suhteesta, kun avidiini on satureitunut, eli proteiinin kaikki mahdolliset sitoutumispaikat on täytetty. Kuvassa 15 saturaation voidaan arvioida tapahtuneen, kun HABA:n molaarinen suhde avidiiniin on 3,8, koska tämän jälkeen 500 nm:ssa absorptiopiikki ei juuri enää kasva, mutta 350 nm:ssa piikki nousee voimakkaasti. Satureoitumisen jälkeen HABA esiintyy liuoksessa enää vapaana ligandina, minkä takia ainoastaan piikki 350 nm:ssa kasvaa, kun HABA-liuosta yhä lisätään näytteeseen. Saturaatiosuhde määritettiin myös kuvan 16 perusteella vapaan ligandin ja avidiini-HABA-kompleksin konsentraatioi-

den välisestä suhteesta. Ligandin sitoutuminen proteiiniin on toisista sitoutumiskohdista ja ligandeista riippumatonta. Tämän perusteella sitoutumisvakio saadaan: $K = [PL] / [P] [L]$ ja dissosiaatiovakio $K_d = [P] [L] / [PL]$. Kuvassa 16 vapaan ligandin ja kompleksin suorien risteytyessä avidiinin sitoutumispaikat ovat täyttyneet ja HABA esiintyy liuoksessa enää vapaassa sitoutumattomassa muodossa. Kuvasta voidaan myös päätellä, että ligandia on oltava liuoksessa ylimäärin, jotta kaikki sitoutumispaikat proteiinissa täyttyvät. Tämä johtopäätös saadaan siitä, että sekä vapaan ligandin että kompleksin konsentraatiot kasvavat ensimmäisten HABA-lisäysten aikana.

UV/VIS-titrauksessa kompleksin konsentraation ja vapaan ligandin konsentraation suhde esitettiin kompleksin konsentraation funktiona kuvassa 17, jolloin kuvan lineaarisen suoran kulmakertoimen ($-K$) on assosiaatiovakion negaatio. Kulmakertoimen perusteella laskettiin HABA:n assosiaatiovakio ($1/M$), eli sitoutumisvakio $6,49 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Taulukko 2). ITC-mittausten mukaan HABA:n sitoutumisvakioksi (pH 7) saatiin $2,09 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ (Taulukko 3). Näiden kahden eri menetelmän tulokset eroavat toisistaan, joten mittaukset olisi syytä toistaa paremman luotettavuuden saamiseksi. Repo ym. (2006) ovat saaneet HABA:n sitoutumisvakioksi $K_b = 2,9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ differentiaaliskannauskalorimetrian (DSC) avulla. Laskelmat oli tehty proteiinin laskostuneen rakenteen purkautumislämpötilan mukaan perustuen ligandin läsnäoloon sekä entalpian ja lämpökapasiteetin muutokseen proteiinin rakenteen hajoaamisen aikana. Tämän DSC-menetelmän avulla laskettua sitoutumisvakioarvoa ei välttämättä voida pitää ainoana ja oikeana, mutta ainakin se on melko lähellä tässä tutkimuksessa ITC-mittauksissa saatua arvoa. Näiden tulosten perusteella vaikuttaa siltä, että UV-VIS-spektroskopiassa pelkän kuvaajan ja kulmakertoimen perusteella ei ehkä saada luotettavaa sitoutumisarvoa, jolloin on syytä käyttää myös muita menetelmiä tai toistaa mittaukset useaan kertaan. Aikaisemmissa tutkimuksissa TAM-017 affiniteetin on DSC-analyysin perusteella todettu olevan suurempi kuin HABA:lla, ja myös tämän työn ITC-mittausten perusteella TAM-017:n sitoutumisvakio ($2,53 \times 10^6$) on kaikista suurin (Taulukko 3). Suurempi affiniteetti johtuu todennäköisesti sen kemiallisesta rakenteesta, joka on suotuisampi avidiiniin sitoutumisessa kuin HABA:n rakenne. Näiden rakenteita verratessa TAM-017-molekyylin karboksyyli-ryhmä on eri kohdassa kuin HABA:lla, ja lisäksi TAM-017:llä on NO_2 -ryhmä.

UV/VIS-spektroskopiaa käytettiin myös pH:n vaikutuksen tutkimiseen HABA:n ja avidiinin välisessä sitoutumisessa. Nämä pH:n aiheuttamat muutokset ovat nähtävissä kuvassa 22, josta havaitaan spektrin sinisiirtymä lyhyemmille aallonpituuksille pH:ssa 12. Avidiini-HABA-kompleksissa avidiini saattaa aggregoitua tai denaturoitua osittain korkeassa pH:ssa (pH 12), mikä voisi selittää kompleksin spektrien muutokset korkeammissa pH-arvoissa. Green (1975) mukaan avidiini on stabiili pH-alueella 2-13, mutta saattaa olla, että sen sitomistaskujen aminohapoissa ja niiden varauksissa tapahtuu muutoksia, jotka vaikuttavat HABA:n sitoutumiseen ja kompleksin spektriin.

Myös geelisuodatuksella pyrittiin määrittämään avidiini-HABA-kompleksien muodostuminen. Vertaillen avidiinin ja avidiini-HABA-kompleksin (31a ja b) kromatogrammeja kompleksin absorptiopiikki pitäisi näkyä ennen avidiinin piikkiä (< 10 ml), sillä suurimpana molekyylinä kompleksi kulkeutuisi kiinteän faasin läpi ensimmäisenä. Kompleksin muodostuminen havaittiin värimuutoksella keltaisesta punaiseksi, kun HABA lisättiin avidiiniin ennen kromatografiin injektointia. Kuvasta 31 havaitaan, että avidiinin ja HABA:n kompleksiliuoksesta mitataan absorbanssia lähinnä 350 nm:ssa ja vähemmän muilla aallonpituuksilla. Tämä piikki 350 nm:ssa vaikuttaa olevan HABA:n absorptiopiikki, mikä kertoo sen, että HABA havaitaan pääosin sitoutumattomassa muodossa. Absorptio 280 nm:ssa sen sijaan lienee lähinnä avidiinista johtuvaa absorptiota. Kun avidiinin, HABA:n ja kompleksin kromatogrammit on asetettu samaan kuvaan (Kuva 32), avidiinin (~9,8 ml) ja HABA:n (11,2 ja 14,4 ml) absorptiopiikit näkyvät aallonpituudessa 280 nm. Tässä kuvassa kompleksi näyttää absorboivan samojen tilavuuksien kohdalla kuin avidiini ja HABA erikseen, mutta kompleksin piikkien intensiteetti on yleisesti pienempi. Intensiteetin pieneminen on suoraan verrannollinen molekyyliden konsentraatioihin, sillä HABA:n määrä kompleksissa on melko vähäinen ja lisäksi avidiinin pitoisuus laimenee HABA:a lisätessä. Lisäksi kuvassa 32 absorptiopiikki 11,2 ml kohdalla näyttäisi olevan suurempi kompleksilla kuin HABA-molekyylillä yksinään, ja myös piikki 9,8 ml kohdalla vaikuttaa hieman leveämmältä kuin avidiinin absorptiopiikki. Samat kromatogrammien eroavaisuudet voidaan havaita kuvasta 33, jossa on esitetty avidiini-HABA-kompleksin sekä HABA:n ja avidiinin normitettu summakromatogrammi aallonpituudella 280 nm. Näitä kuvaajia verratessa kompleksin kromatogrammissa on eroja verrattuna HABA:n ja avidiinin summakromatogrammiin. Nämä erot johtuvat todennäköisesti avidiinin pienempien alayksiköiden määrän

kasvusta HABA:n ollessa läsnä. Tulosten perusteella vaikuttaakin siltä, että avidiini-HABA-kompleksi hajoaa kromatografiajon aikana, jolloin mitataan lähinnä vapaata HABA:a ja avidiinia, joka esiintyy sekä tetrameerinä että dimeeri- ja monomeerimuodossa. Täten voidaan sanoa, että avidiini-HABA vuorovaikutussuhteet eivät ole kovin vahvoja ja heikko kompleksi ehtii dissosioitua ajon aikana, jolloin havaitaan vain mitätön määrä komplekseja.

Kalorimetrisiä tekniikoita käytettiin sitoutumisreaktioiden ja niiden termodynamiikan tutkimiseen. Tässä työssä HABA:n ja TAM-017:n sitoutumista avidiiniin eri pH-arvoissa tutkittiin myös ITC-menetelmällä. HABA-molekyylin ja avidiinin välisten sitoutumisreaktioiden titraatiokäyrien perusteella havaittiin, että HABA:n sitoutuminen on endoterminen reaktio pH:ssa 7, mutta eksoterminen korkeammissa pH-arvoissa (Kuvat 38-42). Tämä tarkoittaa sitä, että avidiinin ja HABA:n välisessä vuorovaikutuksessa lämpöä sitoutuu pH:ssa 7 ja vapautuu korkeammassa kuin pH 7. Eksotermisen reaktion aikana muodostuu yleensä heikkoja vuorovaikutuksia, kun taas endoterminen reaktio on entropian aikaan saamaa. ITC-mittauksien termodynaamisista analyyseista saatiin selville sitoutumisenergian entalpia, entropia, sitoutumisvakio ja stoikiometria (Taulukko 3). Entalpia kuvaa lämmön sitoutumista tai vapautumista sitoutumisreaktion aikana, ja siihen vaikuttaa sidosten muodostumiset sekä hajoamiset. Avidiinin ja HABA:n välinen sitoutumisreaktio vaikuttaa olevan pH:sta riippuvainen, jolloin sitoutumisentalpia on riippuvainen reaktiopuskurin ionisaatioentalpiasta. Sitoutumisreaktion entalpianmuutos on positiivinen pH:ssa 7, mutta korkeammissa pH-arvoissa se on negatiivinen, mikä kertoo molekyyliden sidosten hajoamisesta korkeassa pH:ssa (Taulukko 3). Entropia ilmaisee epäjärjestyksen määrää ja on osallisena vapaan energian muodostumiseen. Sitoutumisreaktion entropianmuutos on selvästi suurin pH:ssa 7 (30,5 J/K), mutta korkeammissa pH-arvoissa se pysyy lähes samana (~18 J/K). Stoikiometria kertoo sitoutumispaikkojen määrän proteiinin alayksikköä kohden. Avidiinissa on teoriassa neljä sitoutumispaikkaa, eli yksi sitoutumistasku alayksikköä kohden. Mittaustulosten stoikiometria-arvot eivät kuitenkaan yllä yhteen asti pH:ssa 7 ja 8, joten sitoutuminen ei ole aivan täydellistä. Tämä tarkoittaa sitä, että avidiinin kaikki alayksiköt eivät kykene sitomaan ligandia, jolloin osa sitoutumispaikoista jää tyhjäksi. Tyypillisesti avidiinissa onkin hieman biotiinia, jolloin vapaita sitoutumispaikkoja ei ole niin paljon kuin voidaan olettaa. HABA:n stoikiometria pH:ssa 10 ja 11 sekä TAM-017:n stoikiomet-

ria pH:ssa 8 on yli yhden (Taulukko 3). Tämä saattaisi merkitä sitä, että avidiinin alayksikkö sitoo useamman kuin yhden ligandin tai sitoutumispaikkoja onkin useampia. Yleisesti kuitenkin tiedetään, että avidiinin jokaisessa alayksikössä on vain yksi sitoutumispaikka, joka sitoo yhden ligandin. Täten korkeammat stoikiometriarvot johtuvat todennäköisesti vain analyysiohjelman tuottamista virheistä, kun stoikiometriä on määritetty molekyylien konsentraatioiden ja titraatiotulosten perusteella.

5.2 HABA:n ja avidiini-HABA-kompleksin kontrollointi

5.2.1 Kontrollointi valon avulla

Tämän tutkimuksen tärkeä osa oli HABA-molekyylien isomerisaation sekä avidiini-HABA-kompleksien kontrollointi ulkoisen signaalin avulla. HABA:a yritettiin virittää valon avulla, jotta molekyyliessä olisi tapahtunut isomerisaatio, joka olisi havaittu spektrin muutoksena. HABA:n kaksi isomeerimuotoa absorboi eri aallonpituuksilla (350 ja 440 nm), ja siten niiden erottaminen spektrofotometrisesti on mahdollista. HABA:n isomerisaatiota olisi voitu tutkia, jos reaktio ei olisi niin nopeasti palautuva. HABA:n valotusta kokeiltiin eri liuottimissa sekä eri pH:ssa, mutta ainoastaan pieniä spektrin muutoksia saatiin aikaan. Esimerkiksi, HABA-molekyylien viritys 0,6 W:n lampun teholla pH:ssa 7 tuotti maksimipiikin intensiteetissä selkeän pienenemisen (Kuva 35). Myös avidiini-HABA-kompleksia viritettiin valon avulla eri pH-liuoksissa, jotta voitiin havaita oliko pH:lla vaikutusta HABA:n fotoisomerisaatioon avidiiniin sitoutuneessa muodossa. Yleisesti ottaen muutokset olivat joko maksimipiikin laskuja tai nousuja, eikä niinkään piikin siirtymistä eri aallonpituudelle, mistä voitaisiin päätellä molekyylin konformaatiomuutoksen tapahtuneen.

HABA-molekyylien valotusta kokeiltiin myös eri liuottimissa. HABA:n ollessa liuotettuna tolueniin (Kuva 36a ja b) piikin intensiteetti kasvoi huomattavasti valolla virityksen jälkeen. Aikaisempien tutkimusten mukaan liuottimen on huomattu vaikuttavan atsomolekyylien isomerisaatioon. Jotta cis-isomeeri olisi stabiilimpi, pitäisi vahvoja vuorovaikutuksia välttää liuottimen ja molekyylien välillä. Oertel ym. (2009) toteavat toluenin olevan sopiva liuotin atsomolekyylielle trans-cis isomerisaation havaitsemiseksi, ja he ovat raportoi-

neet isomerisaation näkyvän tolueenissa yleensä maksimipiikin intensiteetin pienenemisellä. Täten kuvan 36 absorptiopiikin kasvua ei voida pitää isomerisaationa, mutta spektrin muutos vaatii lisätutkimuksia, jotta saadaan selville, mistä piikin intensiteetin kasvu voi johtua. Vaikuttaa siltä, että työssä käytetyn valon teho oli liian heikko tuottamaan niin laajan isomerisaation HABA-liuoksessa, jotta muutos olisi pystytty havaitsemaan UV/VIS spektroskopiolla. Ongelma johtui todennäköisesti siitä, että filtrit päästivät läpi usean eri aallonpituuden valoa, jolloin viritysaallonpituuden valoteho ei ollut riittävä.

5.2.2 Kontrollointi pH:n avulla

HABA:n sitoutumista avidiiniin kontrolloitiin pH:n avulla, ja näitä tutkimuksia varten haluttiin varmistaa avidiinin stabiilisuus tutkimuksessa käytetyllä pH-alueella. Tämä tehtiin CD-spektropolarimetrillä, jolla tutkittiin avidiinin spektriä eri pH-liuoksissa (Kuva 37). Kuvasta 37 voidaan havaita pieniä spektrien eroja, kuten 280 nm kohdalla ero korkeiden pH-arvojen (10 ja 12) ja neutraalien pH-arvojen (7 ja 8) välillä. Tällä aallonpituudella avidiinin spektri pH:ssa 7 ja 8 näyttää laskevan, kun taas pH:ssa 10 ja 12 spektri vaikuttaa hieman nousevan. Ero saattaa kertoa avidiinin rakenteellisista muutoksista korkeassa pH:ssa, mutta jälleen on otettava huomioon menetelmän herkkyys ja lähtölinjan huomattavat vaihtelut mittauksien välillä. Spektrien väliset erot ovat kuitenkin vähäisiä, joten avidiini vaikuttaa olevan melko stabiili pH-alueella 7-12, sillä CD-spektrit näyttävät samankaltaisilta kaikissa pH-liuoksissa. Näiden mittausten perusteella pH ei vaikuta merkittävästi avidiinin rakenteeseen, ja näin ollen pH:ta voitiin käyttää parametrinä tutkittaessa HABA:n sitoutumista avidiiniin kalorimetrian avulla.

ITC-menetelmää käytettiin HABA:n ja avidiinin vuorovaikutusten kontrolloimiseksi pH:n avulla. Näiden mittausten mukaan HABA:n sitoutuminen heikkenee pH:n noustessa, sillä sitoutuminen ei saturoidu titraation aikana pH:ssa 10 ja 11 (Kuvat 38-41). Myöskään liuosten värimuutosta näissä pH-arvoissa ei havaittu, mikä tukee mittaustuloksia, ja tarkoittaa sitä, että pH vaikuttaa HABA:n sitoutumiseen. Titraatiokäyrien mukaan HABA sitoutuu avidiiniin pH:ssa 7 ja 8 (Kuvat 38 ja 39), mutta pH:ssa 11 sitoutuminen on lähes olematonta. Sitoutumisen heikkeneminen nähdään myös sitoutumisvakion pienenemisestä korkeissa

pH-arvoissa taulukossa 3. Täten pH näyttää vaikuttavan HABA:n vuorovaikutukseen avidiinin kanssa.

Farrera ym. (2008) mukaan korkea pH aiheuttaa HABA:n deprotonaation, jolloin se luovuttaa vetyioneja ja niiden paikka muuttuu. Täten on todennäköistä, että protonien siirtymiset korkeissa pH-arvoissa aiheuttavat molekyyileissä muutoksia, jotka estävät niiden sitoutumisen avidiiniin. Toisaalta sitoutumisen heikkeneminen saattaa olla myös seurausta avidiinin sitoutumistaskun rakenteellisista muutoksista korkeassa pH:ssa. Esimerkiksi, tyrosiinin pKa-arvo on ~10, joten sitoutumispaikan Tyr33 saattaa olla anionimuodossa pH:ssa 11. Aminohappojen ympäristö vaikuttaa kuitenkin niiden ominaisuuksiin, joten pKa-arvot voivat vaihdella ympäristöstä riippuen. Joka tapauksessa avidiinin sitoutumistaskun rakenteen pienikin muutos voi vaikuttaa ligandien sitoutumiseen. Avidiinin pienet rakenteelliset erot eri pH-arvoissa todettiin myös CD-spektropolarimetristen mittausten perusteella, vaikka merkittäviä eroja ei niissä havaittukaan.

ITC-mittauksissa käytettyjen liuosten pH näytti hieman muuttuvan ajan kuluessa, mikä vaikuttaa olennaisesti absorptiospektreihin sekä HABA:n sitoutumisominaisuuksiin (Kuva 43). Muutokset pH-arvoissa eivät olleet kovin suuria, mutta ne näyttivät silti vaikuttavan HABA:n spektreihin. Tämä on otettava huomioon, jos pH:ta käytetään parametrina HABA:n sitoutumisen kontrolloimiseksi. Ongelma johtuu kuitenkin todennäköisesti käytetystä liuottimesta, joten toisen puskurin käyttöä kannattaa harkita.

5.3 Yhteenveto ja jatkotutkimukset

Tässä työssä karakterisoitiin avidiiniproteiinia ja HABA-molekyyliä spektroskooppisilla, kromatografisella ja kalorimetrisella menetelmällä. Lisäksi HABA:n ja sen johdannaisen (TAM-017) sitoutumista avidiiniin tutkittiin eri olosuhteissa, kuten eri liuottimissa ja pH-arvoissa. Tutkimuksen karakterisointiosuus tehtiin, jotta käytetyt molekyylit ja niiden ominaisuudet tulivat tutuiksi ja saatiin tietoa ympäristön vaikutuksista molekyylien ominaisuuksiin ja sitoutumiseen. UV/VIS -spektroskooppiset tulokset osoittivat, että liuotin ja pH vaikuttavat HABA:n kemiallisiin ominaisuuksiin, mikä voitiin todeta spektraalisista muutoksista. Aikaisemmissa tutkimuksissa pH:n on todettu aiheuttavan HABA-molekyylien

deprotonaation korkeassa pH:ssa, mikä saattaa vaikuttaa myös HABA:n vuorovaikutukseen avidiinin kanssa. Täten pH:n merkitystä avidiini-HABA-yhdisteiden muodostumisesta haluttiin tutkia tarkemmin.

Työn toinen osa ja tärkein tavoite oli HABA:n isomerisaation ja avidiini-HABA-yhdisteiden muodostumisen kontrollointi. Atsomolekyylien ja avidiinin välistä vuorovaikutusta yritettiin kontrolloida sekä valon että pH:n avulla. Valolla kontrollointi ei tuottanut odotettua tulosta, sillä isomerisaatiota ei kyetty työn aikana havaitsemaan reaktion nopeuden ja liian pienen valotehon vuoksi. Sen sijaan ITC-menetelmän avulla tutkittiin pH:n vaikutusta HABA:n ja avidiinin välisessä sitoutumisreaktiossa, ja tulosten perusteella pH näytti olevan merkittävä tekijä HABA:n ja avidiinin vuorovaikutuksissa. Täten pH saattaa olla käyttökelpoinen parametri avidiini-HABA-yhdisteiden kontrolloinnissa, sillä jopa pienellä pH:n muutoksella saatiin aikaan vaihteluita HABA:n sitoutumisessa. Lisäksi tulosten perusteella voidaan sanoa, että HABA:n sitoutuminen avidiiniin on heikkoa tai lähes olematonta korkeassa pH:ssa (>10), jolloin protonien siirtymiset todennäköisesti aiheuttavat muutoksia, jotka estävät molekyylien sitoutumisen.

Avidiinia ja HABA-atsoväriä käytetään nykyään paljon erilaisissa tutkimuksissa ja sovelluksissa, joten pH:n vaikutuksen tunteminen avidiini-HABA-kompleksien muodostumisesta on tärkeää. Jatkotutkimuksissa pH:n vaikutusta voisikin testata myös alemmissa pH-arvoissa, jotta nähdään, onko niillä vaikutusta avidiinin ja HABA:n välisessä sitoutumisesta. HABA:n sitoutumisen luonnetta voisi myös tutkia vapaan biotiinin avulla, sillä voimakkaan affiniteetin takia biotiini syrjäyttää HABA-molekyylit avidiinin sitoutumiskohdista. Lisäksi HABA:n isomerisaation valolla kontrollointia tulisi vielä tutkia tarkemmin, esimerkiksi tehokkaamman valon avulla tai hidastamalla isomerisaatioreaktiota olosuhteita muuttamalla. Loppuyhteenvetona voidaan todeta, että avidiini-HABA vuorovaikutusten kontrollointi on erittäin tärkeää, jotta niitä voidaan hyödyntää laajemmin bio- ja nanoteknologiassa sekä lääketieteessä.

Lähdeluettelo

- Ahlroth, M.K., E.H. Kola, D. Ewald, J. Masabanda, A. Sazanov, R. Fries, M.S. Kulomaa. 2000. Characterization and chromosomal localization of the chicken avidin gene family. *Anim.Genet.* 31:367-375.
- Antonov, L., K. Kamada, K. Ohta, F.S. Kamounah. 2003. A systematic femtosecond study on the two-photon absorbing D-[small pi]-A molecules-[small pi]-bridge nitrogen insertion and strength of the donor and acceptor groups. *Phys.Chem.Chem.Phys.* 5:1193-1197.
- Barth, A. 2007. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* 1767:1073-1101.
- Barth, A., C. Zscherp. 2002. What vibrations tell us about proteins. *Q.Rev.Biophys.* 35:369-430.
- Blevins, A.A., G.J. Blanchard. 2004. Effect of Positional Substitution on the Optical Response of Symmetrically Disubstituted Azobenzene Derivatives. *J.Phys.Chem.B.* 108:4962-4968.
- Bundle, D.R., B.W. Sigurskjold. 1994. Determination of accurate thermodynamics of binding by titration microcalorimetry. *Methods Enzymol.* 247:288-305.
- Celej, M.S., G.G. Montich, G.D. Fidelio. 2004. Conformational flexibility of avidin: the influence of biotin binding. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 325:922-927.
- Chaiet, L., F.J. Wolf. 1964. The Properties of Streptavidin, a Biotin-Binding Protein Produced by Streptomyces. *Arch.Biochem.Biophys.* 106:1-5.
- Chen, H., C. Horváth. 1995. High-speed high-performance liquid chromatography of peptides and proteins. *J.Chromatogr. A.* 705:3-20.
- Comstock, M.J., N. Levy, A. Kirakosian, J. Cho, F. Lauterwasser, J.H. Harvey, D.A. Strubbe, J.M. Frechet, D. Trauner, S.G. Louie, M.F. Crommie. 2007. Reversible photomechanical switching of individual engineered molecules at a metallic surface. *Phys.Rev.Lett.* 99,038301.
- Cummings, M.D., R.J. Read, T.N. Hart. 1995. Atomic solvation parameters in the analysis of protein-protein docking results. *Protein Sci.* 4:2087-2099.
- Doyle, M.L. 1997. Characterization of binding interactions by isothermal titration calorimetry. *Curr.Opin.Biotechnol.* 8:31-35.
- Dunn, N.J., W.H. Humphries 4th, A.R. Offenbacher, T.L. King, J.A. Gray. 2009. pH-Dependent cis --> trans isomerization rates for azobenzene dyes in aqueous solution. *J.Phys.Chem.A.* 113:13144-13151.
- Eisenberg-Domovich, Y., Y. Pazy, O. Nir, B. Raboy, E.A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah. 2004. Structural elements responsible for conversion of streptavidin to a pseudoenzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 101:5916-5921.
- El Halabieh, R.H., O. Mermut, C.J. Barrett. 2004. Using light to control physical properties of polymers and surfaces with azobenzene chromophores. *Pure Appl. Chem.* 76:1445-1465.
- Farrera, J., I. Canal, P. Hidalgo-Fernández, M. Pérez-García, O. Huertas, F. Luque. 2008. Towards a Tunable Tautomeric Switch in Azobenzene Biomimetics: Implications for the Binding Affinity of 2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoic Acid to Streptavidin. *Chem.Eur.J.* 14: 2277- 2285.

- Gabor, G., Y.F. Frei, E. Fischer. 1968. Tautomerism and geometric isomerism in arylazophenols and naphthols. IV. Spectra and reversible photoreactions of m- and p-hydroxyazobenzene. *J.Phys.Chem.* 72:3266-3272.
- González, M., C.E. Argarana, G.D. Fidelio. 1999. Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomol.Eng.* 16:67-72.
- Green, N.M. 1970. Spectrophotometric determination of avidin and biotin. *Methods Enzymol.* 18:418-424.
- Green, N.M. 1975. Avidin. *Adv.Protein Chem.* 29:85-133.
- Green, N.M. 1990. Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol.* 184:51-67.
- Greenfield, N.J. 2007. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat.Protocols.* 1:2876-2890.
- Hendrickson, W.A., A. Pahler, J.L. Smith, Y. Satow, E.A. Merritt, R.P. Phizackerley. 1989. Crystal structure of core streptavidin determined from multiwavelength anomalous diffraction of synchrotron radiation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86:2190-2194.
- Hertz, R., W.H. Sebrell. 1942. Occurrence of Avidin in the Oviduct and Secretions of the Genital Tract of several Species. *Science.* 96:257.
- Hinds, B.J., N. Chopra, T. Rantell, R. Andrews, V. Gavalas, L.G. Bachas. 2004. Aligned multiwalled carbon nanotube membranes. *Science.* 303:62-65.
- Hoffmann, K., U. Resch-Genger, F. Marlow. 2000. Photoinduced switching of nanocomposites consisting of azobenzene and molecular sieves: investigation of the switching states. *Microporous Mesoporous Mater.* 41:99-106.
- Horton, N., M. Lewis. 1992. Calculation of the free energy of association for protein complexes. *Protein Sci.* 1:169-181.
- Hytönen, V.P., O.H. Laitinen, A. Grapputo, A. Kettunen, J. Savolainen, N. Kalkkinen, A.T. Marttila, H.R. Nordlund, T.K. Nyholm, G. Paganelli, M.S. Kulomaa. 2003. Characterization of poultry egg-white avidins and their potential as a tool in pretargeting cancer treatment. *Biochem. J.* 372:219-225.
- Hytönen, V.P., O.H. Laitinen, T.T. Airene, H. Kidron, N.J. Meltola, E.J. Porkka, J. Horha, T. Paldanius, J.A. Määttä, H.R. Nordlund, M.S. Johnson, T.A. Salminen, K.J. Airene, S. Ylä-Herttuala, M.S. Kulomaa. 2004. Efficient production of active chicken avidin using a bacterial signal peptide in *Escherichia coli*. *Biochem.J.* 384:385-390.
- Ihalainen, J., J. Bredenbeck, R. Pfister, J. Helbing, L. Chi, I. van Stokkum, G. Woolley, P. Hamm. 2007. Folding and unfolding of a photoswitchable peptide from picoseconds to microseconds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 104:5383-5388.
- Jones, P.D., M.H. Briggs. 1962. The distribution of avidin. *Life Sci.* 1:621-623.
- Keren, K., R.S. Berman, E. Buchstab, U. Sivan, and E. Braun. 2003. DNA-templated carbon nanotube field-effect transistor. *Science.* 302:1380-1382.
- Kojima, M., S. Nebashi, K. Ogawa, N. Kurita. 2005. Effect of solvent on cis-to-trans isomerization of 4-hydroxyazobenzene aggregated through intermolecular hydrogen bonds. *J.Phys.Org.Chem.* 18:994-1000.

- Korpela, J.K., M.S. Kulomaa, H.A. Elo, P.J. Tuohimaa. 1981. Biotin-binding proteins in eggs of oviparous vertebrates. *Experientia*. 37:1065-1066.
- Laitinen, O.H., V.P. Hytönen, H.R. Nordlund, M.S. Kulomaa. 2006. Genetically engineered avidins and streptavidins. *Cell Mol.Life Sci.* 63:2992-3017.
- Laitinen, O.H., H.R. Nordlund, V.P. Hytönen, M.S. Kulomaa. 2007. Brave new (strept)avidins in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 25:269-277.
- Leavitt, S., E. Freire. 2001. Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry. *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11:560-566.
- Livnah, O., E.A. Bayer, M. Wilchek, J.L. Sussman. 1993a. The structure of the complex between avidin and the dye, 2-(4'-hydroxyazobenzene) benzoic acid (HABA). *FEBS Lett.* 328:165-168.
- Livnah, O., E.A. Bayer, M. Wilchek, J.L. Sussman. 1993b. Three-dimensional structures of avidin and the avidin-biotin complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:5076-5080.
- Loudwig, S., H. Bayley. 2006. Photoisomerization of an Individual Azobenzene Molecule in Water: An On Off Switch Triggered by Light at a Fixed Wavelength. *J.Am.Chem.Soc.* 128:12404-12405.
- Merlin, J.C., E.W. Thomas. 1979. Resonance Raman spectroscopic studies of 2-(4'-hydroxyphenylazo)-benzoic acid and some substituted analogs--I. pH effect on spectra. *Spectrochim.Acta, Pt.A: Mol.Spectrosc.* 35:1243-1249.
- Mitchell, G.R., N.R. King. Optimisation of photo-induced geometric isomerisation of azobenzene derivatives in dye-doped polymer films for enhanced photo-induced poling. *Macromol. Symp.* 137:155-165.
- Murphy, K.P., D. Xie, K.C. Garcia, L.M. Amzel, E. Freire. 1993. Structural energetics of peptide recognition: Angiotensin II/antibody binding. *Proteins.* 15:113-20.
- Murphy, K.P., D. Xie, K.S. Thompson, L.M. Amzel, E. Freire. 1994. Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins.* 18:63-67.
- Määttä, J.A., T.T. Airene, H.R. Nordlund, J. Jänis, T.A. Paldanius, P. Vainiotalo, M.S. Johnson, M.S. Kulomaa, V.P. Hytönen. 2008. Rational modification of ligand-binding preference of avidin by circular permutation and mutagenesis. *Chembiochem.* 9:1124-1135.
- Natansohn, A., P. Rochon. 2002. Photoinduced motions in azo-containing polymers. *Chem.Rev.* 102:4139-4175.
- Niskanen, E.A., V.P. Hytönen, A. Grapputo, H.R. Nordlund, M.S. Kulomaa, O.H. Laitinen. 2005. Chicken genome analysis reveals novel genes encoding biotin-binding proteins related to avidin family. *BMC Genomics.* 6:41.
- Nordlund, H.R., V.P. Hytönen, O.H.Laitinen, M.S. Kulomaa. 2005. Novel avidin-like protein from a root nodule symbiotic bacterium, *Bradyrhizobium japonicum*. *J.Biol.Chem.* 280:13250-13255.
- Oertel, U., H. Mart, H. Komber, F. Böhme. 2009. Media effects on the optical properties of proton donor group containing azobenzene derivatives. *Opt.Mater.* 32:54-61.
- Paldanius, T. 2004. Diatsobentseenit. Nimeäminen, synteesi ja sovellutukset. Pro gradu –tutkielma. Jyväskylän yliopisto. Kemian laitos sekä Bio- ja ympäristötieteiden laitos.

- Pazy, Y., B. Raboy, M. Matto, E.A. Bayer, M. Wilchek, O. Livnah. 2003. Structure-based rational design of streptavidin mutants with pseudo-catalytic activity. *J.Biol.Chem.* 278:7131-7134.
- Perozzo, R., G. Folkers, L. Scapozza. 2004. Thermodynamics of protein-ligand interactions: history, presence, and future aspects. *J.Recept.Signal Transduct.Res.* 24:1-52.
- Petrova, S., N. Chichinadze, V. Shaverdova. 2005. Kinetics of the Weigert effect in azo dyes embedded in polymeric matrices with different activities. *Tech.Phys.* 50:227-231.
- Privalov, P.L. 1989. Thermodynamic problems of protein structure. *Annu.Rev.Biophys.Biophys.Chem.* 18:47-69.
- Privalov, P.L., S.A. Potekhin. 1986. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins. *Methods Enzymol.* 131:4-51.
- Pugliese, L., A. Coda, M. Malcovati, M. Bolognesi. 1993. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J.Mol.Biol.* 231:698-710.
- Qu, D.H., Q.C. Wang, J. Ren, H. Tian. 2004. A light-driven rotaxane molecular shuttle with dual fluorescence addresses. *Org.Lett.* 6:2085-2088.
- Rasmussen, P.H., P.S. Ramanujam, S. Hvilsted, R.H. Berg. 1999. A Remarkably Efficient Azobenzene Peptide for Holographic Information Storage. *J.Am.Chem.Soc.* 121:4738-4743.
- Repo, S., T.A. Paldanius, V. Hytönen, T.K.M. Nyholm, K. Halling, J. Huuskonen, O. Pentikäinen, K. Rissanen, J.P. Slotte, T.T. Airene, T.A. Salminen, M. Kulomaa, M. Johnson. 2006. Binding Properties of HABA-Type Azo Derivatives to Avidin and Avidin-Related Protein 4. *Chem.Biol.* 13:1029-1039.
- Schierling, B., A.J. Noel, W. Wende, T. Hien le, E. Volkov, E. Kubareva, T. Oretskaya, M. Kokkinidis, A. Rompp, B. Spengler, A. Pingoud. 2010. Controlling the enzymatic activity of a restriction enzyme by light. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 107:1361-1366.
- Sheehan, D. 2009. Physical Biochemistry: Principles and Applications, 2nd Edition. Wiley-Blackwell. Chapter 2 Chromatography: 40-43, Chapter 3 Spectroscopic Techniques: 58-62, 84-88.
- Sigurskjold, B.W., E. Altman, D.R. Bundle. 1991. Sensitive titration microcalorimetric study of the binding of Salmonella O-antigenic oligosaccharides by a monoclonal antibody. *Eur.J.Biochem.* 197:239-246.
- Swamy, M.J., T. Heimburg, D. Marsh. 1996. Fourier-transform infrared spectroscopic studies on avidin secondary structure and complexation with biotin and biotin-lipid assemblies. *Biophys.J.* 71:840-847.
- Volgraf, M., P. Gorostiza, R. Numano, R.H. Kramer, E.Y. Isacoff, D. Trauner. 2006. Allosteric control of an ionotropic glutamate receptor with an optical switch. *Nat.Chem.Biol.* 2:47-52.
- Volgraf, M., P. Gorostiza, S. Szobota, M.R. Helix, E.Y. Isacoff, D. Trauner. 2007. Reversibly caged glutamate: a photochromic agonist of ionotropic glutamate receptors. *J.Am.Chem.Soc.* 129:260-261.
- Weber, P.C., D.H. Ohlendorf, J.J. Wendoloski, F.R. Salemme. 1989. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science.* 243:85-88.
- Weber, P.C., J.J. Wendoloski, M.W. Pantoliano, F.R. Salemme. 1992. Crystallographic and thermodynamic comparison of natural and synthetic ligands bound to streptavidin. *J.Am.Chem.Soc.* 114:3197-3200.

- Weber, P.C., M.W. Pantoliano, D.M. Simons, and F.R. Salemme. 1994. Structure-Based Design of Synthetic Azobenzene Ligands for Streptavidin. *J.Am.Chem.Soc.* 116:2717-2724.
- Wilchek, M., E.A. Bayer. 1990. Introduction to avidin-biotin technology. *Methods Enzymol.* 184:5-13.
- Wilchek, M., E.A. Bayer. 1999. Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system. *Biomol.Eng.* 16:1-4.
- Williams, D.H., M.S. Searle, J.P. Mackay, U. Gerhard, R.A. Maplestone. 1993. Toward an estimation of binding constants in aqueous solution: studies of associations of vancomycin group antibiotics. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90:1172-1178.
- Williams, D.H., E. Stephens, M. Zhou. 2003. Ligand binding energy and catalytic efficiency from improved packing within receptors and enzymes. *J.Mol.Biol.* 329:389-399.
- Willner, I., S. Rubin. 1996. Control of the Structure and Functions of Biomaterials by Light. *Angew.Chem. Int.Ed.Engl.* 35:367-385.
- Willner, I. 1997. Photoswitchable Biomaterials: En Route to Optobioelectronic Systems. *Acc.Chem.Res.* 30:347-356.
- Willner, I., B. Willner. 2001. Chapter 6. Photochemical Biomolecular Switches: The Route to Optobioelectronics. B.L. Feringa. *Molecular Switches*. Chapter 6:165-214.
- Yager, K.G., C.J. Barrett. 2006. Novel photo-switching using azobenzene functional materials. *J.Photochem.Photobiol.A.* 182:250-261.

Liite 1.**SDS-PAGE -menetelmä****Reagenssit:****SDS Näytepuskuri 2x (Laemmle + β -Merkaptoetanol)**

3.55 ml Ster. H₂O

1.25 ml 0.5 M TRIS-HCl pH 6.8

2.5 ml Glyseroli (J.T.Baker, Deventer/Holland)

2.0 ml 10 % SDS (BDH, Laboratory Supplies Poole, England)

0.2 ml 0.5 % Bromophenol Blue (Sigma, MO/USA)

0.5 ml β -Merkaptoetanol (Merck, Darmstadt, Germany)

1 ml:n erissä -20°C:ssa tai säilytetään +4°C:ssa.

Alageelipuskuri 1.5 M Tris pH 8.8 (500ml)

90.75 g Trizma base (Sigma, MO/USA)

liuota ja säädä pH 8.8 (6M HCl:lla). Täytä 500 ml:ksi.

Ylägeelipuskuri 1 M Tris pH 6.8 (200ml)

24 g Trizma base (Sigma, MO/USA)

liuota ja säädä pH 6.8 (6M HCl:lla). Täytä 200 ml:ksi.

10 % SDS (100 ml)

10 g SDS (BDH, England)

liuota ja täytä 100 ml:ksi. Säilytettävä huoneenlämmössä.

10x Electrodi Ajopuskuri (1000ml)

30.3 g Trizma base (Sigma, MO/USA)

144 g Glysiini (Riedel deHaen, Seelze, Germany)

10 g SDS (BDH, Laboratory Supplies Poole, England)

liuota ja täytä 1l:ksi.

Käyttölaimennos 1x; 200 ml (10x) + 1800 ml H₂O.

Geelin värjäysliuos

0.8 g Brilliant Blue R (Sigma, MO/USA)

500 ml isopropanoli (Merck, Darmstadt, Germany)

200 ml etikkahappo (Sigma, MO/USA)

Geelin teossa käytetyt muut reagenssit:

30 % Acryyliamidi/BIS, (BioRad, Hercules, CA/USA)

TEMED, (BioRad, Hercules, CA/USA)

Ammonium persulfaatti (APS), (MP Biomedicals LLC Eschwege, Germany)

Alageelin valmistus (Ajogeeli):**15 % geeli: 15 ml**

H ₂ O	3.5 ml
30 % Acryyliamidi	7.5 ml
1.5 M Tris pH 8.8	3.8 ml
10 % SDS	150 µl
10 % APS	150 µl
TEMED	6 µl

Ylägeelin eli konsentroitigeelin valmistus:

geeli: 5 ml

H ₂ O	3.4 ml
30 % Acryyliamidi	830 µl
1.0 M Tris pH 6.8	630 µl
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Näytteet valmistettiin samaan tilavuuteen 2x näytepuskurin kanssa, ja seosta kuumennettiin 4 min 95°C lämpölokissa. SDS-PAGE-ajo tehtiin jännitteellä 180 V, ja näytteitä ajettiin noin 45 min. Geeli värjättiin värjäys/kiinnitysliuoksessa 30 min, minkä jälkeen geeliä huuhdeltiin värinpoistoliuoksella (10% etikkahappo).