

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Ivana Víšová

Charakterizace proteinů dráhy 2'-5' oligoadenylátů pomocí vibrační spektroskopie

Oddělení fyziky biomolekul, Fyzikální ústav Univerzity Karlovy v Praze

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2015

Děkuji mému vedoucímu Dr. Vladimíru Kopeckému Jr., a Dr. Kateřině Hofbauerové (MFF UK), za vedení práce, pomoc při jejím vypracování i cenné připomínky, Dr. Janu Snášelovi (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.) za přípravu všech zde analyzovaných a měřených vzorků a Dr. Lucii Bednárové, (Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i.) za pomoc s měřením spekter elektronového cirkulárního dichroismu.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 30.7.2015

podpis: Ivana Víšová

Název práce: Charakterizace proteinů dráhy 2'-5' oligoadenylátů pomocí vibrační spektroskopie

Autor: Bc. Ivana Víšová

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav MFF UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Abstrakt: Práce se zabývá strukturní charakterizací dvou významných proteinů dráhy 2'-5' oligoadenylátů, účastnících se imunitní odpovědi organismu na virovou infekci. Studována byla ankyrinová doména myši RNasy L, C-terminální část lidské fosfodiesterázy 12 a následně kompletní lidská fosfodiesteráza 12. Proteiny byly charakterizovány pomocí Ramanovy spektroskopie, infračervené spektroskopie, elektronového cirkulárního dichroismu, dynamického rozptylu světla a jako doplňková měření byla provedena kalorimetrie a gelová elektroforéza. Pro jednotlivé proteiny byla stanovena sekundární struktura, teplotní stabilita, velikost oligomerů a obecně byla provedena jejich základní charakterizace výše zmíněnými metodami.

Klíčová slova: dráha 2'-5' oligoadenylátu, vibrační spektroskopie, Ramanova spektroskopie, infračervená spektroskopie, struktura proteinu

Title: Characterization of proteins of 2'-5' oligoadenylate pathway by means of vibrational spectroscopy

Author: Bc. Ivana Víšová

Department: Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague

Supervisor: RNDr. Vladimír Kopecký, Ph.D.

Assistant supervisors: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Abstract: The work concerns to structural characterization of two important proteins of 2'-5' oligoadenylate pathway participating in an immune response of organism to a viral infection. Studied proteins were ankyrin domain of mouse RNase L, the C-terminal part of human phosphodiesterase 12 and the complete human phosphodiesterase 12. The proteins were characterized by Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, electronic circular dichroism, dynamic light scattering and in addition by two non-spectroscopic methods— differential calorimetry and electrophoresis. For each protein the secondary structures, thermal stability, weight of oligomers and generally a basic characterization by above mentioned methods were provided.

Keywords: 2'-5' oligoadenylate pathway, vibrational spectroscopy, Raman spectroscopy, infrared spectroscopy, protein structure

Obsah

Předmluva	1
1. Proteiny.....	3
1.1. Struktura proteinů	3
1.2. Balení proteinů a denaturace	7
2. Vrozený antivirový imunitní systém obratlovců	8
2.1. 2', 5'-oligoadenylátová dráha.....	9
2.1.1. Ribonukleáza L (RNasa L)	10
2.1.2. 2',5'-fosfodiesteráza (PDE12, 2' PDE).....	13
3. Teorie měřících metod.....	14
3.1. Pružný (elastický) rozptyl	14
3.1.1. Dynamický rozptyl.....	14
3.2. Nepružný (neelastický) rozptyl	16
3.2.1. Ramanova spektroskopie.....	16
3.2.2. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků.....	18
3.2.3. Ramanova spektroskopie proteinů.....	19
3.3. Absorpce	22
3.3.1. Infračervená spektroskopie – FTIR.....	23
3.3.2. FTIR-ATR (Attenuated total reflectance).....	24
3.3.3. Infračervená spektroskopie a sekundární struktura proteinů	25
3.4. Elektronový cirkulární dichroismus.....	25
3.4.1. Elektronový cirkulární dichroismus a sekundární struktura proteinů	26
3.5. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC).....	27
3.5.1. Termodynamika stability a přechodů	27
3.6. Gelová elektroforéza proteinů.....	29
3.6.1. SDS PAGE.....	30
3.7. Způsoby zpracování dat	31
3.7.1. Neuronové sítě.....	31
3.7.2. Určení sekundární struktury z amidových pásů.....	31
3.7.3. Faktorová analýza	36
4. Uspořádání měřících aparatur	37
4.1. Aparatura pro měření dynamického rozptylu	37
4.2. Aparatury pro měření Ramanova rozptylu	37
4.2.1. Ramanův spektrometr s pravoúhloú geometrií.....	37

4.2.2.	Konfokální Ramanův mikrospektrometr.....	38
4.3.	Aparatura FTIR spektrometru	39
4.4.	Aparatura pro měření elektronového cirkulárního dichroismu	40
4.5.	Aparatura pro kalorimetrická měření	41
4.6.	Gelová elektroforéza.....	42
5.	Výsledky měření.....	43
5.1.	Myší ankyrinová doména RNasy L	43
5.1.1.	Příprava vzorku	43
5.1.2.	Primární sekvence vzorku ankyrinové domény	44
5.1.3.	Dynamický rozptyl.....	45
5.1.4.	Ramanova spektroskopie.....	47
5.1.5.	Infračervená spektroskopie	53
5.2.	C-terminální část fosfodiesterázy 12	60
5.2.1.	Příprava vzorku	60
5.2.2.	Primární sekvence C-terminální části lidské PDE 12	61
5.2.3.	Dynamický rozptyl.....	62
5.2.4.	Gelová SDS elektroforéza.....	65
5.2.5.	Ramanova spektroskopie.....	65
5.2.6.	Infračervená spektroskopie	70
5.2.7.	Elektronový cirkulární dichroismus.....	72
5.3.	Kompletní lidská fosfodiesteráza 12	73
5.3.1.	Příprava vzorku	73
5.3.2.	Primární sekvence kompletní lidské fosfodiesterázy 12.....	74
5.3.3.	Dynamický rozptyl.....	75
5.3.4.	Ramanova spektroskopie.....	78
5.3.5.	Infračervená spektroskopie	86
5.3.6.	Elektronový cirkulární dichroismus.....	89
5.3.7.	Skenovací diferenciální kalorimetrie.....	90
	Závěr a diskuze.....	92
	Literatura	96
	Seznam tabulek.....	102
	Seznam použitých zkratk.....	103

Předmluva

Motivem vzniku této práce byla snaha přispět k výzkumu na poli vývoje nových léčiv. Jako vhodné téma se ukázala být právě strukturní charakterizace proteinů dráhy 2', 5'-oligoadenylátů, účastnících se imunitní odpovědi organismu na virovou infekci, jelikož na toto téma již byla v minulost ustavena spolupráce mezi Oddělením fyziky biomolekul z Fyzikálního ústavu Univerzity Karlovy v Praze a skupinou Ing. Rosenberga z ÚOCHB AV ČR a bylo tak možné navázat na předchozí výzkum (M. Kříž, a kol., 2012).

Studium vazby ligandů je stěžejní otázkou při výzkumu nových léčiv – ať už se jedná o ligandy inhibující či aktivující. Požadované vlastnosti takových molekul jsou velmi specifické. Musí být dostatečně stabilní v přirozeném prostředí buňky, ale zároveň odbouratelné, musí existovat možnost jak je dostat přes plazmatickou membránu na místo určení a v ideálním případě by měly být schopné aktivovat/deaktivovat cílovou molekulu efektivněji než přirozený ligand. To mimo jiné znamená, že je potřeba zajistit jejich dostatečnou afinitu k vazebnému místu. Pro pochopení způsobu vazby, procesu inhibice či aktivace a potřebné struktury aktivujících molekul je nezbytné znát co nejpodrobněji strukturu cílových enzymů a hlavně jejich vazebných domén.

V případě této práce se jedná o aktivaci *RNasy L* pomocí přirozených oligoadenylátů a jejich potenciálních alternativ. Pro komplexní pochopení celé dráhy a pro eventuální vývoj vhodných aktivačních molekul je třeba porozumět i degradačnímu procesu, který zajišťuje enzym *fosfodiesteráza 12*, což je jediný známý enzym schopným degradace 2', 5'-oligoadenylátů. Studium struktury tohoto enzymu může osvětlit podmínky kladené na strukturu substrátu pro jeho optimální štěpení.

V době zadání práce nebyla struktura obou výše zmíněných proteinů známá. Zkrytalizovat se podařila pouze ankyrinová doména lidské *RNasy L* v přítomnosti navázaných ligandů (N. Tanaka, a kol., 2004), ankyrinová doména samotná však krystalizaci odolávala, stejně tak i lidská *fosfodiesteráza 12*. Jako jediná schůdná možnost alespoň nějaké charakterizace se tak jevílo užití spektroskopických metod.

Spektroskopických metod použitelných pro získání informací o struktuře proteinů je však celá škála. Zatímco žádná z nich není přímo zaměřená na určování primární struktury, sekundární a terciární struktura těmito metodami zkoumána být může. Metody se liší mezi sebou nejen rozlišením, ale také podmínkami vhodným pro měření (například možnostmi rozpouštědla) a informací z měření získanou – velikost a stabilita, složení struktury, ... Metoda s největším rozlišením – na atomární úrovni – je magnetická nukleární rezonance. Přesnost je však kompenzována potřebou velké koncentrace vzorku, nutností izotopického značení a omezením na velikost studované

látky – molekulární hmotnost by neměla přesáhnout 50 kDa, což je pro řadu proteinů nedostatečné. Pro větší molekuly a menší koncentrace vzorků nám zůstávají ostatní spektroskopické metody. Žádná z nich nedává ucelený obraz o struktuře, jejich rozumnou kombinací lze však dosáhnout zajímavých výsledků. V této práci bylo využito metod Ramanovy spektroskopie, infračervené spektroskopie, cirkulárního dichroismu a dynamického rozptylu, jako doplňkové metody pak posloužily nespektroskopické metody, jako je elektroforéza a kalorimetrie.

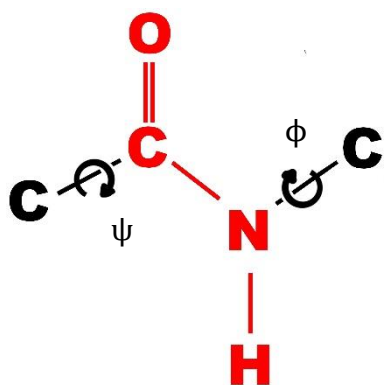
V následujícím textu prezentuji výsledky strukturní charakteristiky celkem tří vzorků. Jako první byla charakterizována ankyrinová (aktivační ligand vázající) doména RNasy L. Protože se během práce ukázalo, že náš vzorek není stabilní a zároveň se objevila práce, ve které se podařilo ankyrinovou doménu zkrystalizovat i bez navázaných oligoadenylátů (Y. Han, a kol., 2012), byla provedena pouze základní charakterizace a dále byla pozornost zaměřena k charakterizaci fosfodiesterázy 12. Ta proběhla nejprve na C-terminálním konci, poté na kompletním enzymu.

1. Proteiny

1.1. Struktura proteinů

Vlastnosti proteinu a jeho schopnost sbalit se se přímo odvíjí od jeho aminokyselinového složení, tedy od jeho tzv. *primární struktury*. Například glycin zlepšuje flexibilitu řetězce, nepolární větvené aminokyseliny naopak strukturu zpevňují a bývají pohřbené hluboko ve struktuře proteinu. Polární residua tvoří vodíkové můstky, v případě cysteinu S–S můstky. Aminokyselinové zbytky s nábojem se často vyskytují na povrchu a zvyšují tak rozpustnost proteinu. Hydrofobní a hydrofilní aminokyseliny zabezpečují hydrofobní interakce, které jsou nepostradatelné při správném balení proteinových struktur. (G.E. Schulz a R.H. Schirmer, 2013)

Aby byl protein schopný plnit své přirozené funkce správným způsobem, musí zaujímat přesně stanovené prostorové uspořádání. To závisí na konformaci peptidového řetězce, která se dá popsat třemi dihedrálními úhly na jeden aminokyselinový zbytek. Rezonance však propůjčuje N–C částečně charakter dvojně vazby (R.B. Corey a L. Pauling, 1953) a vytváří tak z peptidové vazby téměř planární strukturu (s jistými odchylkami (M.W. MacArthur a J.M. Thornton, 1996; L. Vitagliano, a kol., 2001)). K popisu pak stačí pouze dva dihedrální úhly ψ a ϕ (obrázek 1.1). Tyto úhly nejsou ze sterických důvodů libovolné. Jejich nejpravděpodobnější uspořádání vytváří tzv. typy *sekundární struktury*, tedy lokálního uspořádání peptidového řetězce (obrázek 1.2).



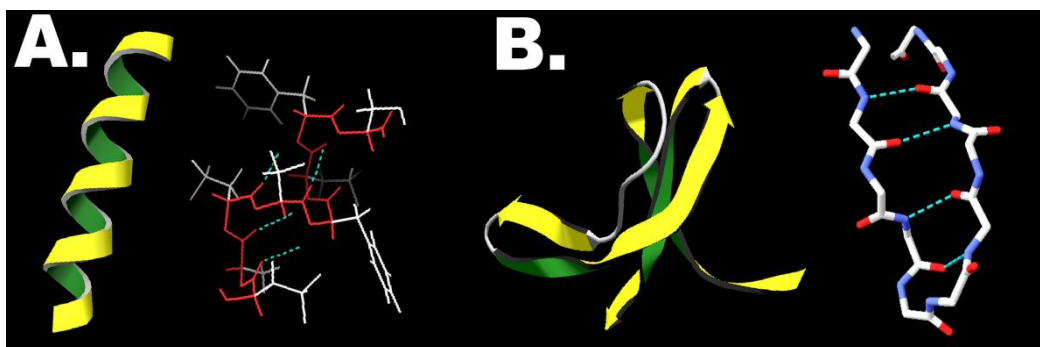
Obrázek 1.1. Schematický náčrt peptidové vazby. Zatímco červená struktura je zpevněna rezonancí, aminokyselinová residua (v obrázku označená černým C) mohou kolem vazeb rotovat a udávají tak konformaci molekuly.

Rozpoznáváme několik následujících základních typů sekundárních struktur.

Helikální struktura (šroubovice) vzniká stočením polypeptidového řetězce u všech aminokyselin o stejný úhel ψ a ϕ . Šroubovice je chirální útvar – může být levotočivá nebo pravotočivá. Pro $\phi = -57^\circ$ a $\psi = -47^\circ$, výšku závitu 0,54 nm a 3,6 aminokyselinových zbytků na jednu otáčku s pravotočivým smyslem, získáme jednu z nečastějších struktur, tzv. α -helix. Tato struktura je stabilizovaná intramolekulárními

vodíkovými můstky (W. Kabsch a C. Sander, 1983) vznikajícími mezi N–H skupinou n -tého residua a C=O skupinou $(n + 4)$ -tého residua. Druhou nejpočetnější helikální strukturou proteinů je pravotočivý 3_{10} -helix, který se vyskytuje převážně jako jediný závit spojující α -helikální úsek s následujícím strukturním motivem. (D. Voet a J.G. Voetová, 1995)

β -struktury se nazývají skládané listy či β -hřebeny. Tyto struktury jsou zpevněny vodíkovými můstky mezi vzdálenějšími residui. Skládaný list může mít dvě varianty. Paralelní skládaný list, jehož polypeptidové řetězce mají stejnou orientaci a antiparalelní skládaný list, jehož sousední polypeptidové řetězce mají orientaci navzájem opačnou. Dvě po sobě jdoucí vlákna antiparalelních struktur bývají spojena polypeptidovými úseky náhle měnícími směr – tzv. reverzními smyčkami či β -otočkami. (D. Voet a J.G. Voetová, 1995)



Obrázek 1.2. Příklady sekundární struktury proteinů. *Struktury jsou znázorněny ve tvaru „stuh“ (zeleno-žlutá barva) a rozkreslením peptidové kostry spolu s vodíkovými můstky (tyrkysová barva). A. Příklad α -helikální struktury (α podjednotka světlosběrného komplexu *Rhodospirillum rubrum*, PDB ID 1XRD (Z.Y. Wang, a kol., 2005). U peptidové kostry jsou pro představu zakresleny postranní řetězce. B. Příklad β -skládaných listů – část struktury mutanta 3C proteasy coxsackieviru B3, PDB ID 3ZZ3 (J. Tan, a kol.) V peptidové kostře jsou barevně znázorněny atomy kyslíku (červená), dusíku (modrá) a uhlíku (bílá). (Obrázky byly vytvořeny pomocí programu Swiss-PDB Viewer 4.0.).*

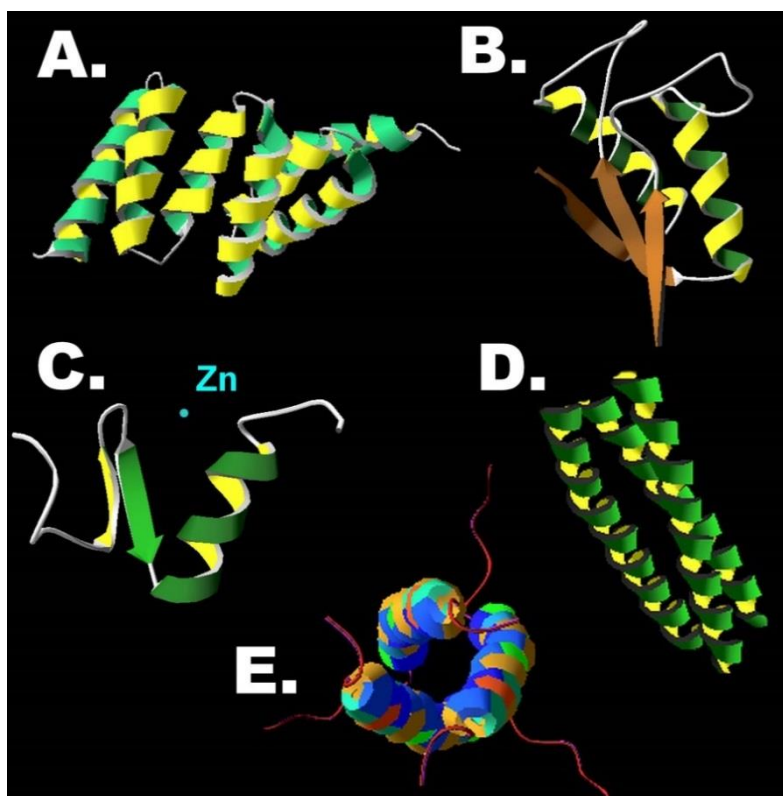
Ostatní konformace – až polovina průměrného globulárního proteinu není ani helikální konformací ani v β -struktře. Jedná se o neuspořádanou strukturu, většinou například smyčkovitého či klubkovitého charakteru, která je těžko charakterizovatelná v krystalových strukturách.

Sekundární struktury razantně měnící směr průběhu řetězce se nazývají otočky. Ty bývají často zpevněny vodíkovým můstkem mezi prvním a posledním residuem. Je-li otočka tvořena 5 aminokyselinovými zbytky, nazýváme ji α -otočka, pokud 3, jedná se o β -otočka a 2 residua tvoří γ -otočku (G.D. Rose, a kol., 1985). Jestliže je počet residuí větší, nazývá se útvar smyčka. Pokud se směr řetězce mění o 180° a sekundární struktury spolu interagují, nazývá se otočka vlásenkou. Například antiparalelní β -skládané listy jsou propojeny otočkou a tvoří tak strukturní motiv, tzv. β -vlásku (otočka může být v principu jakéhokoli typu).

Proteiny využívají jen omezené množství stále se opakujících způsobů spojování jednotlivých sekundárních struktur v tzv. *strukturní motivy* (Obrázek 1.3). Asi nejčastějším strukturním motivem je svazek dvou a více α -helixů spojených smyčkou (S. Jones, 2004) v paralelním či antiparalelním smyslu, nebo otočkou (L. Aravind, a kol., 2005). Takovéto motivy často slouží ke kontaktu mezi proteiny či mezi proteinem a nukleovou kyselinou. Příkladem může být motiv TPR (tetratricopeptide), který je tvořen dvěma antiparalelními α -helixy typicky umístěnými v pevném úhlu $\sim 34^\circ$, a který obsahují například co-chaperony (G.L. Blatch a M. Lasse, 1999). Tzv. ankyrinový motiv je jeden z nejčastěji se opakujících motivů v přírodě. Každý motiv obsahuje 30–34 aminokyselinových párů poskládaných do dvou α -helixů umístěných jeden vedle druhého těsně spojených otočkou. Celé motivy se poté paralelně spojují smyčkou (J. Li, a kol., 2006). Díky silným Van der Waalsovým silám vykazuje velkou afinitou k jiným ankyrinovým doménám (J.M. Tee a M.P. Peppelenbosch, 2010). Existují samozřejmě i motivy vzniklé spojením α -helixů a β -listů. Mezi takové motivy můžeme zařadit například tzv. TIM barel, skládající se ze série paralelních β -listů propojených α -helixy, užívaný enzymy pro vytvoření správné geometrie aktivního místa (R.K. Wierenga, 2001). Dalším motivem spojujícím větší úsek β -struktury a α -helixu jsou motivy zvané zinkové prsty, jejichž strukturu drží koordinčně vázaný atom zinku a které slouží především k vázání DNA a rozpoznávání jednotlivých bází. Klasický zástupce motivu zinkových prstů je tvořen α -helixem a β -vláskou stočenými okolo zinkového iontu (J.P. Mackay a M. Crossley, 1998). Motiv řeckého klíče je pro změnu složen pouze ze 4 speciálně poskládaných β -skládaných listů spojených smyčkami (E.G. Hutchinson a J.M. Thornton, 1993).

Zajímavým a velmi funkčním způsobem spojení α -helikálních struktur bez užití otoček je „coiled-coil“ motiv. Tanto motiv vzniká spojením 2 až 5 paralelních amfipatických α -helixů, které se stáčí jedna kolem druhé a vytváří tak superhelix. Primární struktura je typicky tvořena sadou 7 či 11 opakujících se sekvencí, které mají na pevně daných pravidelných místech apolární residua. Takovýto motiv se hojně vyskytuje například ve svalových myosinových vláknech a cytoskeletálních filamentech, či díky schopnosti rozpoznávání molekul, v transkripčních faktorech. (P. Burkhard, a kol., 2001)

Poskládáním strukturálních motivů celého proteinu získáme tzv. *terciární strukturu*, která je stabilizována především intramolekulární hydrofobní interakcí, vodíkovými či disulfidickými můstky, případně elektrostatickou interakcí nabitých skupin a stohovou interakcí aromatických residuí (více o balení proteinů v kapitole 1.2). Stejně reakce intermolekulárního charakteru potom mohou vytvářet z více peptidových řetězců (podjednotek) *strukturu kvarterní*. Spojení dvou podjednotek označujeme jako dimer, tří trimer, atd. Protein se může skládat ze stejných podjednotek, pak ho označujeme za *homomerní*, nebo z různých, pak ho označujeme jako *heteromerní*.



Obrázek 1.3. Příklady motivů sekundárních struktur. A. Krystalová struktura tetratricopeptidové domény lidské SGT, PB ID 2VYI (S. Dutta a Y.J. Tan, 2008). B. Ukázka části motivu TIM barelu. Doména neznámé funkce *Silicibacter pomeroyi* DSS-3. Nakresleno podle PDB ID 3CHV, zatím nepublikovaná práce. C. Motiv zinkového prstu koordinčně vázaného atomem zinku, PDB ID 1JN7 (K. Kowalski, a kol., 2002). D. + E. Část trimerní „coiled-coil“ domény proteinu kuřecí chrupavky, pohled ze strany a shora. Tmavě modrá barva znázorňuje hydrofobní části proteinu. PDB ID 1AQ5 (S.A. Dames, a kol., 1998). (Obrázky byly vytvořeny pomocí programu Swiss-PDB Viewer 4.0.).

1.2. Balení proteinů a denaturace

Proteiny jsou syntetizovány jako jednoduché nevětvené řetězce složené z aminokyselinových zbytků, které získají aktivní formu až po dosažení své *nativní formy*, tedy správné konformace. Jakkoli je proces balení složitý, má se za to, že veškeré informace vedoucí ke správnému zabalení jsou zakódované již v primární struktuře (C.B. Anfinsen, 1973).

Hnací silou celého balicího procesu je gradient volné energie, v jejímž minimu se nachází konečná stabilní struktura, energeticky zajištěná především hydrofobními interakcemi aminokyselinových zbytků (spolu s Van der Waalsovými silami), vznikem vodíkových vazeb a případně dalšími minoritními interakcemi, jako jsou elektrostatické síly (R.L. Baldwin, 2007). Ne vždy se však nativní forma proteinu nachází v globálním minimum, jak naznačuje například existence tzv. amyloidů. (S.W. Englander, a kol., 2007)

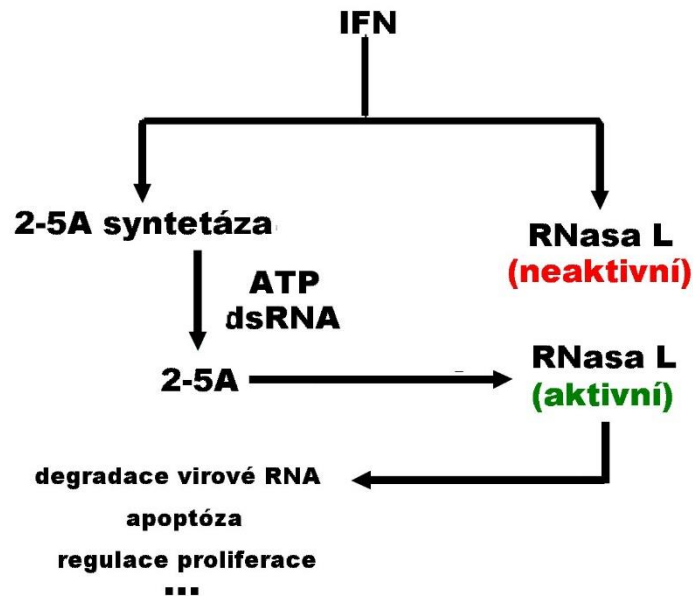
Studium a porozumění celého procesu není jednoduché, neboť intermediální struktury balení žijí velmi krátkou dobu. Jednou z metod umožňujících studium struktury velmi krátce žijících intermediátů je například metoda výměny vodíků (F.X. Schmid a R.L. Baldwin, 1979), která pracuje s faktem, že se vodíky peptidového řetězce přirozeně vyměňují s vodíky rozpouštědla a s použitím tricia tak dostaneme přirozenou a nenarušující sondu i milisekundy žijících struktur. Nejen díky této metodě se rozvinula teorie dosažení stabilní struktury nativní formy pomocí postupně a kooperativně se přemísťujících a balících se úseků proteinu (foldonů) (S.W. Englander, a kol., 2007).

Denaturace se dá definovat jako podstatná změna původně nativní struktury proteinu, která není způsobena změnou v primární struktuře. Jde o kooperativní proces, který probíhá za velmi úzkého rozsahu teploty či koncentrace denaturačního činidla. Pokud se při návratu do nativního prostředí samovolně vytvoří nativní struktura, říkáme, že denaturace je reversibilní. Pokud se tak nestane, jedná se o denuraci ireversibilní a bývá to důsledek dalších sekundárních reakcí, které následují po primární konformační změně (G. Meurant, 1968). Jednou z takových reakcí může být agregace. Agregace je proces tvoření oligomerních komplexů s vyšším obsahem β -struktur díky nesprávnému sbalení proteinů a tedy díky odhalení hydrofobního jádra každého z nich (M. Stefani, 2004)

2. Vrozený antivirový imunitní systém obratlovců

Imunitní systém je souhrn mechanismů zajišťujících obranyschopnost organismu. Imunitní odpověď může být vrozená, zajišťující prvotní detekci patogenu a následnou aktivaci druhého typu imunitní odpovědi, imunity získané (též adaptivní či specifické), která je schopná imunologické paměti.

Vrozený imunitní systém využívá skupiny proteinů tzv. *patogeny rozpoznávajících receptorů*, které rozpoznávají komponenty virů a spouští signalizační kaskádu, vedoucí k produkci množství rozličných signálních molekul (cytokinů), především pak interferonů typu I (typ I IFN). Tyto glykoproteiny (proteiny s glykosidicky navázanými cukry) se dále váží na IFN-I receptory na povrchu buněk a regulují tím expresi celé řady genů, například protein kinázy R nebo 2', 5'-oligoadenylát syntetázy, čímž zahájí eliminaci virových komponent uvnitř napadených buněk, indukují apoptózu nebo podpoří odolnost zatím neinfikovaných buněk (O. Takeuchi a S. Akira, 2009). Hlavní interferony indukovaná kaskáda reakcí vedoucí k potlačení virové infekce se nazývá dráha 2', 5'-oligoadenylátů či 2-5A/RNasa L systém (obrázek 2.1).



Obrázek 2.1. Schématický nákres 2',5'-oligoadenylátové dráhy. Interferony indukují výrobu 2-5A syntetázy a RNasy L v neaktivní monomerní formě. Při výskytu dvouvláknové RNA v buňce se spustí výroba 2-5A z ATP, které aktivují RNasu L, což vede k celé škále následných dějů (viz kapitola RNasa L).

2.1. 2', 5'-oligoadenylátová dráha

Navázání interferonů typu I na IFN- α receptory na povrchu buněk spustí tzv. JAK-STAT signalizaci. Tato dráha slouží k přenesení informace z extracelulárního prostoru přes membránu dovnitř, až ke genovým promotorům uvnitř buněčného jádra, a tím dojde ke stimulaci specifických genů –iezi nimi i genu kódujícímu 2', 5'-oligoadenylát syntetázu, jejíž struktura byla již probádána, a která je jediným známým enzymem katalyzujícím 2'-specifický nukleotidový transfer (R. Hartmann, a kol., 2003) (obrázek 2.2). Tento protein produkuje v přítomnosti dvouvláknové RNA, která se běžně v buňce mimo virovou infekci nevyskytuje, z adenosintrifosfátu krátké 5'-fosforylované, 2', 5'-vázané oligoadenyláty označované jako 2-5A či $(p_x5'A(2'p5'A)_n$; $x=1-3$; $n \geq 2$) (M. Nakanishi, a kol., 2005).

Tyto malé, alespoň trimerní molekuly, s alespoň jednou u člověka a dvěma u myši, fosforylovanými skupinami a s vysokou afinitou k RNase L (S.L. Liang, a kol., 2006) se váží především pomocí π - π stohové interakce Trp⁶⁰ a Phe¹²⁶, elektrostatické interakce Lys⁸⁹ a Arg¹⁵⁵ a vodíkových vazeb Glu¹³¹ k tzv. ankyrinové doméně RNasy L (M. Nakanishi, a kol., 2005) a způsobují tak její přechod z neaktivní (monomerní) formy do aktivní (homodimerní) formy schopné štěpení jednovláknové RNA. Regulace degradační aktivity RNasy L opačným směrem spočívá v regulaci koncentrace 2-5A pomocí proteinů 2'-fosfodiesterázy a 5'-fosfatázy.

2-5A jsou nepostradatelné, napříč savčími buňkami konzervované signální molekuly vrozeného imunitního systému, které aktivují efektivní způsob obrany v případě přítomnosti patogenu. Mají ale nevhodné farmakologické vlastnosti – jsou rychle odbouratelné, neprochází buněčnou membránou a mohou vést k apoptóze (C.S. Thakur, a kol., 2007). Právě proto se mnohé výzkumy posledních let zaměřují na nalezení efektivnější aktivační molekuly vhodné k rozvoji nových možností terapie. Byly zdokumentovány více či méně úspěšné pokusy s různými molekulami, např. (K. Nagaoka, a kol., 2010; C.S. Thakur, a kol., 2007; J.C. Verheijen, a kol., 1999), většina z nich však dosahuje menší efektivnosti aktivace a u některých může být problém s následným odbouráváním. Je tudíž ještě potřeba dalšího studia k nalezení molekuly vhodné pro klinické účely.

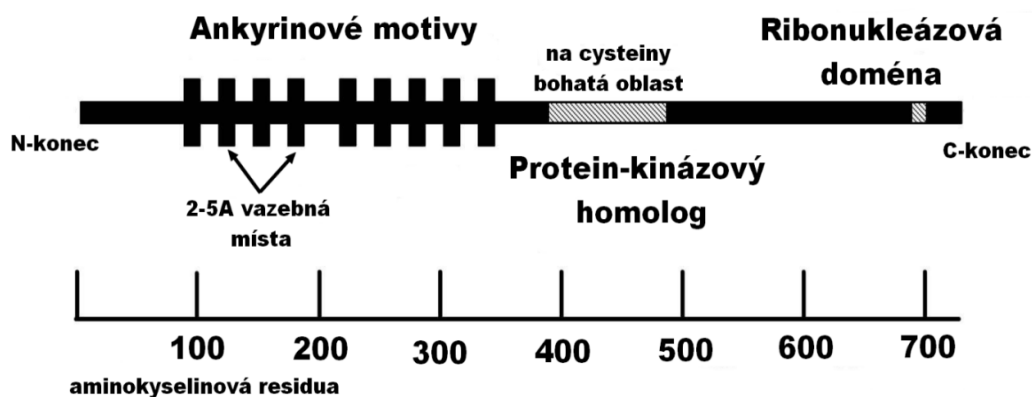


Obrázek 2.2. Struktura prasečí 2', 5'-oligoadenylát syntetázy získaná rentgenovou analýzou. Tento protein je v organismech vysoce konzervovaný, s lidskou verzí se sekvenčně shoduje ze 73 % (R. Hartmann, a kol., 2003).

2.1.1. Ribonukleáza L (RNasa L)

Ribonukleáza L je na 2', 5'-vázaných oligoadenylátech závislý enzym endoribonukleáza, který se účastní celé škály důležitých buněčných procesů, jako je antivirová aktivita, apoptóza a antiproliferace, patogeneze rakoviny prostaty, regulace translace či adipogeneze. Jde o protein, který je spolu s 2',5'-oligoadenylát syntetázou kódovaný interferony stimulovanými geny (S.L. Liang, a kol., 2006).

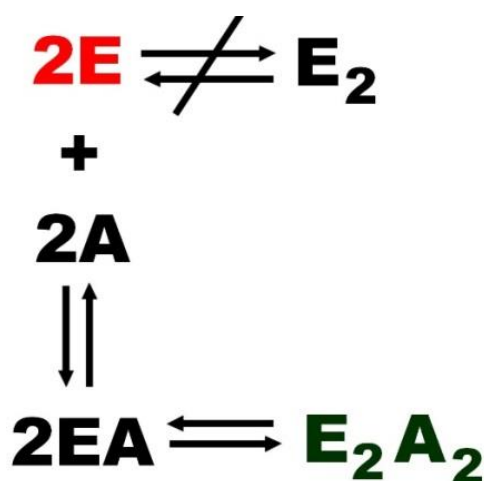
RNasa L, skládající se ze 741 aminokyselinových zbytků (B. Dong a R.H. Silverman, 1997) má velmi zajímavou strukturu (obrázek 2.3). Obecně ji můžeme rozdělit (od N-konce) na tři hlavní části – ankyrinovou doménu, zkráceně ANK (24.–335. residuum), kináze-podobnou doménu (364.–583. residuum) a ribonukleázovou doménu (584.–720. residuum) (M. Nakanishi, a kol., 2005). Zatímco nukleázová doména po aktivaci opravdu vykazuje degradační činnost, u kinázových motivů bohatých na cysteiny, které RNasa L obsahuje, kinázová aktivita pozorována nebyla. Potenciálně nejzajímavější částí se však zdá být N-konec RNasy L, tzv. ankyrinová doména, fungující jako represor nukleázové činnosti, neboť váže aktivační molekuly. V lidské RNase L je ankyrinová doména složená z 8 celých a jednoho polovičního motivu (N. Tanaka, a kol., 2005)



Obrázek 2.3. Funkční domény RNasy L. (S.L. Liang, a kol., 2006)

RNasa L se v klidovém stavu v buňce vyskytuje v neaktivní podobě ve formě monomeru. Až po navázání signálních 2', 5'-vázaných oligoadenylátů dochází ke změnám, způsobujícím vznik štěpící aktivity. Jedna z teorií průběhu aktivace předpokládá, že při absenci 2-5A nukleázová a ankyrinová doména maskují kináze-podobnou doménu. Po navázání 2-5A na ankyrinovou doménu se odkryje kináze-podobná doména, přes kterou mohou dva komplexy (RNasaL + 2-5A) vytvořit dimer spojením zřejmě někde v okolí Lys³⁹². Dojde tak ke vzniku aktivní konformace

(obrázek 2.4) (M. Nakanishi, a kol., 2004). Nedávno se po velkém úsilí podařilo zkrystalizovat lidskou ankyrinovou doménu RNasy L s i bez navázaných 2-5A a porovnáním těchto dvou struktur vyšlo najevo, že ke konformačním změnám po navázání v samotné doméně nedochází (Y. Han, a kol., 2012), nicméně konformační změny ve struktuře celé RNasy L po navázání několika různých ligandů byly prokázány spektroskopickými metodami (M. Kříž, a kol., 2012). Zároveň byl pozorován, s rostoucím časem působení aktivačních molekul či s rostoucí koncentrací RNasy L (řádově μM koncentrace) i bez přítomnosti aktivačních molekul, vznik oligomerních struktur se štěpící aktivitou (Y. Han, a kol., 2012). Takové podmínky ale nejsou fyziologické a dá se tedy předpokládat, že přirozeně proces probíhá neefektivněji již výše popsáním způsobem.



Obrázek 2.4. Schéma aktivace RNasy L za fyziologických podmínek. Dvě neaktivní monomerní formy RNasy L (označené E) se při fyziologických koncentracích samovolně v dimer nespojí (označen E_2). Po navázání aktivační molekuly (označené A) na každý z monomerů vzniknou dva komplexy monomer-aktivační molekula (označené $2EA$). Teprve tyto dva komplexy mohou vytvořit aktivní dimer (E_2A_2). (S.S. Carroll, a kol., 1997; Y. Han, a kol., 2012)

Aktivní činnost RNasy L má dalekosáhlý dopad na životnost buňky a potažmo celého organismu. Po detekování virové infekce a spuštění ribonukleázové aktivity dojde k štěpení jednovláknových RNA, čímž se eliminuje virová informace. Zvýšená exprese RNasy L však způsobí štěpení i ribozomální 18 S rRNA a činí tak buňku náchylnější k apoptóze spuštěné staurosporinem (buňky bez RNasy L nejsou schopné apoptózy indukované staurosporinem vůbec) (J.C. Castelli, a kol., 1998). To představuje další z možností obrany organismu proti virové infekci. Zároveň se ukazuje, že zvýšená koncentrace RNasy L snižuje rychlost proliferace buněk (W. Liu, a kol., 2007). Schopnost vyvolat apoptózu a zároveň snížit proliferaci buněk neodmyslitelně pojí výzkum RNasy L s výzkumem rakoviny. A nejen to – ukazuje se, že dědičná alela rakoviny prostaty 1 (HPC1) se zdá být genem RNasy L (RNASEL). Mutace v těchto místech činí buňky náchylnější k rakovině. Jeden z důvodů, proč tomu tak může být a proč se RNasa L považuje za tumorový supresor je teorie, že je rakovina prostaty úzce spojena s virovou infekcí (Y. Xiang, a kol., 2003). Kromě rakoviny je

RNasa L spojovaná s dalšími diagnózami, jako je například únavový syndrom, u kterého se pozoruje přeregulovaná aktivita 2,5A-syntetázy i RNasy L. Navíc se RNasa L objevuje v některých buňkách štěpena proteolýzou na dvě části, čímž se oddělí aktivující 2-5A vazebné místo od štěpícího C-konce (E. Demette, a kol., 2002). RNasa L je důležitá i pro kontrolu terminální diferenciaci adipocytů, ukládání lipidů a kontrolu insulinové citlivosti (O. Fabre, a kol., 2012).

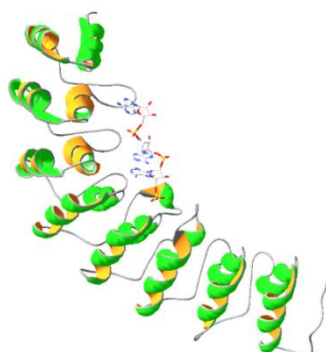
V době zadávání této práce byla známa pouze struktura ankyrinové domény lidské RNasy L s navázanými 2-5A, kterou se podařilo zkrystalizovat (N. Tanaka, a kol., 2004) (obrázek 2.7). Otázkou ovšem zůstávalo, jak moc se liší struktura aktivované a neaktivované domény a jak moc se liší struktura lidské a myší domény, případně jakou strukturu má celá RNasa L. Většina těchto otázek byla, ještě před dokončením této práce, zodpovězena úspěšným zkrystalizováním lidské ankyrinové neaktivované domény i celé lidské aktivované RNasy L (H. Huang, a kol., 2014). Myší RNasa L i její ankyrinová doména ale do dnešních dní krystalizaci odolávají a tak se zdá být metoda spektroskopických měření dobrou alternativou k ověření podobnosti struktur.



Obrázek 2.5. Celá RNasa L (dimer) z krystalové struktury. Struktura 4OAU převzata z RCSB PDB databáze (Y. Han, a kol., 2014).



Obrázek 2.6. Neaktivovaná ankyrinová doména. Struktura 4G8K převzata z RCSB PDB databáze (Y. Han, a kol., 2012).



Obrázek 2.7. Aktivovaná ankyrinová doména. Struktura 1WDY převzata z RCSB PDB databáze (N. Tanaka, a kol., 2004).

2.1.2. 2',5'-fosfodiesteráza (PDE12, 2' PDE)

Protože aktivita RNasy L je jen částečně specifická a štípe jak virovou RNA tak buněčnou, vedla by její nekontrolovaná činnost nutně k záhubě buňky, proto buňky hlídají její nukleázovou aktivitu, a to korigováním koncentrace 2-5A.

Za normálních podmínek je koncentrace 2-5A mizivá. Při interferony spuštěné signalizaci a aktivaci 2-5A dráhy vzroste koncentrace řadově na koncentraci nM a tím se aktivuje RNasa L spolu s cytosolickou 5'-fosfatázou. Ta ihned konvertuje 2-5A do méně toxické podoby 2-5A defosforylovaného jádra (A2'p5'A2'p5'A) a udržuje tak hladinu 2-5A na rozumné úrovni. Defosforylovaná jádra 2-5A neaktivují RNasu L, ale stále vykazují antivirové a anti-růstové vlastnosti, proto poté podstupují jednu ze dvou dosud známých degradačních cest. První možností je degradace pomocí extracelulárního proteinu ENPP1, druhou možností je protein z mitochondriální matrix PDE12 (J.B. Poulsen, a kol., 2011). V obou případech ale musí molekuly překonat membránu (cytoplasmatickou či vnitřní mitochondriální), proto se předpokládá, že může existovat další alternativní enzym, který tyto signální molekuly degraduje přímo v cytosolu.

PDE12 se zároveň připisuje schopnost odstraňování poly(A)-konců mitochondriální RNA štěpením jejich 3'-5' fosfodiesterových vazeb, čímž ovlivňuje proteinovou syntézu v mitochondriích (J. Rorbach, a kol., 2011).

Maximální aktivita lidského enzymu PDE 12 se objevuje při pH 8. V cytosolu se pH pohybuje kolem 7–7.4, v závislosti na buněčné fázi/růstu, pH v matrix mitochondrií je ale díky dýchacímu řetězci, pumpujícímu H⁺ do mezimembránového prostoru, vyšší a pohybuje se běžně kolem 8. Nepostradatelné pro funkci enzymu jsou Mg²⁺ ionty, naopak Cu²⁺, Ni²⁺ a Zn²⁺ enzym inhibují (J.B. Poulsen, a kol., 2012).

PDE 12 je negativní regulátor 2-5A dráhy (K. Kubota, a kol., 2004). Na jedné straně chrání buňky před nespecifickou štěpící silou RNasy L, na druhé straně však snižuje buněčnou resistenci proti infekci – jejím inhibováním je možné docílit vyšší obranyschopnosti buňky proti určitým virům (E.R. Wood, a kol., 2015). Navíc existují i 2', 5'-fosfodiesterázy zapsané přímo ve virovém kódu, které velice účinně štěpí 2-5A a brání tak nukleázové činnosti RNasy L. (E. Gusho, a kol., 2014). Inhibování 2', 5'-fosfodiesteráz se tak zdá být jasným směrem nynějších i budoucích výzkumů, neboť je výhodnější zaměřit se na podpoření vrozeného imunitního systému než na inhibování konkrétních patogenních komponent – zaprvé je tento přístup účinný proti větší škále virů, zadruhé se zvyšuje bariéra dosažení resistance proti léčbě.

3. Teorie měřících metod

3.1. Pružný (elastický) rozptyl

Narazí-li elektromagnetické pole světla na nehomogenitu o nezanedbatelné velikosti oproti jeho vlnové délce, dojde díky rozdílným dielektrickým vlastnostem okolí a objektu k rozptylu světla. Pokud se při tom změní pouze směr, nikoli energie záření, mluvíme o *elastickém rozptylu*. Pro elastický rozptyl je prostorové rozložení intenzity odraženého pole závislé na poměru velikosti částice a vlnové délky dopadajícího světla (3.1).

$$\alpha = \frac{2\pi r}{\lambda} \quad (3.1)$$

r značí poloměr nehomogenity a λ vlnovou délku světla v místě kolem nehomogenity.

Podle tohoto poměru se dále rozlišují tři různé typy elastického rozptylu. Pro případ velmi malých částic ($\alpha \leq 0,4$) má rozptýlené pole podobu pole vyzařování indukovaného dipólu (Rayleighův rozptyl). Pro větší částice se stává charakter pole složitější, neboť je třeba začít brát v úvahu vzájemnou interferenci vln z různých částí nehomogenity (Rayleighův-Debyův rozptyl, Mieův rozptyl). Pro velké nehomogenity pro zjednodušení a možnost alespoň nějakých výpočtů předpokládáme kulový tvar rozptylové částice.

3.1.1. Dynamický rozptyl

Dynamický rozptyl či fotonová korelační spektroskopie je metoda získávání informací o velmi malých objektech pomocí světla na nich elasticky rozptýleného. Přestože se jedná o elastický rozptyl (vnitřní energie rozptylujících částic se nemění), dochází u pohybujících se částic k malým změnám frekvencí způsobených většinou Dopplerovým jevem (V. Prosser, 1989). Díky Brownovu pohybu se všechny částice pohybují a na detektoru tak sledujeme fluktuující extrémní interferencí velmi blízkých frekvencí. Z korelací těchto změn se dají vypočítat některé parametry částic.

Rozptyl, jakožto náhodný proces, můžeme popsat pomocí statistických metod (V.M. Gun'ko, a kol., 2003). Základní funkcí zaváděnou pro dynamický rozptyl je autokorelační funkce, definovaná jako střední hodnota součinu veličiny ve dvou různých časech – v případě dynamického rozptylu detekujeme na detektor dopadající foton, který „autokoreluje“ s dalším opožděně dopadnuvším. Potom můžeme intenzitní autokorelační funkci $G(\tau)$ zapsat jako

$$G(\tau) = \int_0^{\infty} I(t) I(t + \tau) dt \quad (3.2)$$

Kde τ je časový rozdíl mezi prvním a opožděným signálem. Analýzou autokorelační funkce lze získat celou řadu údajů:

- Z naměřených dat lze vhodným fitováním získat difuzní koeficient D_T pro danou teplotu T . Známe-li dále viskozitu rozpouštědla η a předpokládáme-li kulový tvar neinteragujících objektů v roztoku o nízké koncentraci, můžeme ze Stokes-Einsteinovy rovnice získat hydrodynamický poloměr (= poloměr sféry, která má stejný difuzní koeficient, jako daná molekula):

$$R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_T} \quad (3.3)$$

kde k_B značí Boltzmanovu konstantu.

- Metodou kumulantů (R. Pecora, 2013) lze z autokorelační funkce získat i hodnotu tzv. polydisperzního indexu, který slouží k určení uniformity/míry heterogenity vzorku. Vzorek se považuje za monodisperzní (a tedy z tohoto pohledu vhodný ke krystalizaci) pro hodnotu polydisperzního indexu menší než 0,05, tedy pro polydisperzitu menší než 20 %. Používaný software tyto parametry vyhodnocuje automaticky (podle normy ISO 13321:1996).
- Jako jedna ze základních veličin užívaných ve fotonové korelační spektroskopii je uváděn tzv. Z-průměr (střední hodnota kumulantů), který je definován jako

$$D_Z = \frac{\sum S_i}{\sum \frac{S_i}{D_i}} \quad (3.4)$$

Kde D_Z značí Z-průměr, S_i intenzitu odraženého světla od i -té částice a D_i je průměr i -té částice. Z-průměr je porovnatelný s velikostmi naměřenými jinými metodami jen v případě, že se jedná o sférickou jednodálňní monodisperzní částici ve vhodném rozpouštědle (Malvern Instruments, 2011).

- Průměrnou statistickou hodnotu molekulární váhy proteinů můžeme vypočítat, známe-li sedimentační koeficient s a částečný specifický objem v :

$$M = \frac{sRT}{D_T(1 - \rho v)} \quad (3.5)$$

Pro ρ specifickou hustotu rozpouštědla a R plynovou konstantu.

- Z naměřených dat se dá také usoudit na přibližný tvar molekuly. Difuzní koeficient D_T je spojen s translačním koeficientem tření f_{celk}

$$f_{celk} = \frac{k_B T}{D_T} \quad (3.6)$$

Asymetrický parametr (Perrinův translační koeficient tření) f_p potom z f_{celk} získaného z měření dostaneme pomocí f_0 – translačního koeficientu tření modelového tělesa (sféra, elipsoid), který se dá dopočítat.

$$f_p = \frac{f_{celk}}{f_0} \quad (3.7)$$

Perrinův translační koeficient tření je pak spojen s poměrem os studovaného objektu p

$$p = \frac{a}{b} \quad (3.8)$$

pro a delší osu a b kratší osu různými vztahy závisujícími na předpokládaném tvaru částice (S. Hansen, 2004).

3.2. Nepružný (neelastický) rozptyl

Neelastickým nazýváme rozptyl světla na nehomogenitě, při kterém dojde ke změně vnitřní energie rozptylované částice. Může se jednat o rozptyl akustických fononů (Brillouinův rozptyl) nebo o rozptyl fotonů na vibračních stavech molekuly (Ramanův rozptyl)

3.2.1. Ramanova spektroskopie

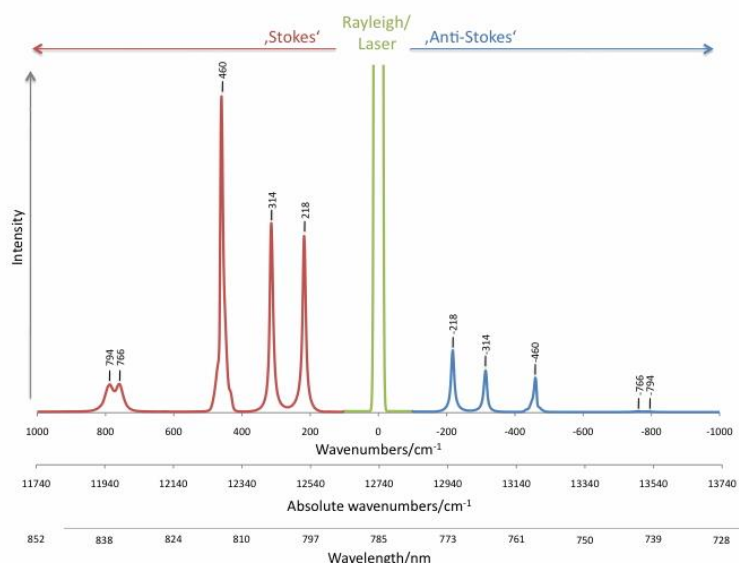
Roku 1928 oznámili C. V. Raman a K. S. Krishnan převratný objev (C.V. Raman a K.S. Krishnan, 1928), který vedl ke vzniku spektroskopické metody představující velmi perspektivní nástroj studia struktury a vlastností molekul. Spektra Ramanova rozptylu ovlivňuje jak elektronová distribuce odrážející atomové pozice (a tedy jejich vibrace), tak mezimolekulární síly a dají se tak z nich odvodit informace o konformaci i prostředí molekul. Výhodou této metody oproti jiným je fakt, že se dá použít pro pevnou, kapalnou i plynnou formu vzorku a obecně jí nevadí přítomnost vody, pro

kteřou se ve spektrech Ramanova rozptylu ukazuje pouze pás okolo 3450 cm^{-1} . (H.A. Havel, 1996)

Fyzikální jev stojící za Ramanovou spektroskopií je nepružný dvoufotonový rozptyl světla na vibračních stavech molekul s nenulovým dipólovým momentem, měnící frekvenci zlomku vyzářeného světla od dopadajícího o rozdíl energetických hladin přítomných vibračních stavů. Elektrická složka dopadajícího světla \vec{E} tedy indukuje v látce nucené kmitání a tím vznik indukovaných elektrických dipólů \vec{p}

$$\vec{p} = \vec{\alpha} \cdot \vec{E} \quad (3.9)$$

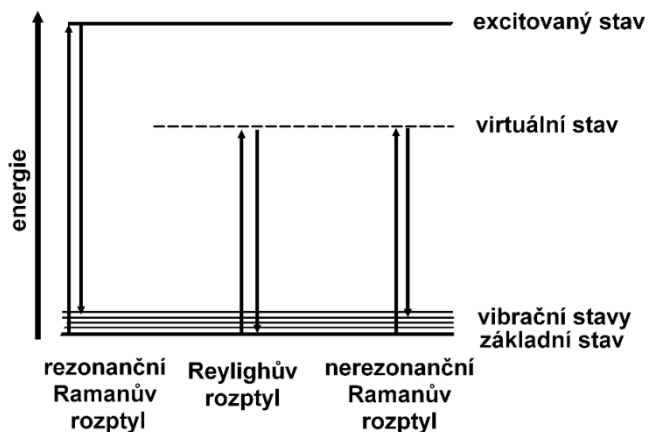
kde $\vec{\alpha}$ je tenzor polarizovatelnosti molekuly. Tenzor polarizovatelnosti je obecně funkcí jaderných souřadnic a tedy i frekvencí vibrací – pro harmonickou aproximaci se nám rozpadne na tři části závislé na třech různých frekvencích – dominantní složka na frekvenci dopadajícího záření ν_0 (Rayleighův pružný rozptyl), řádově slabší příspěvky na frekvenci $(\nu_0 + f)$ (anti-Stokesův rozptyl) a $(\nu_0 - f)$ (Stokesův rozptyl), kde f je změna frekvence způsobená daným vibračním módem (obrázek 3.1)



Obrázek 3.1. Příklad Stokesovy a anti-Stokesovy části spektra Ramanova rozptylu. Spektrum Stokesova a anti-Stokesova rozptylu je rozloženo symetricky kolem pružně odraženého záření. Intenzity Stokesova rozptylu jsou ale pro běžné podmínky z termodynamických důvodů vyšší, proto se pro většinu aplikací používá detekce této části spektra. (Obrázek převzat z <http://www.raman.de>).

Použijeme-li frekvenci dopadajícího záření dostatečně odlišnou od energie absorpce molekuly, získáme tzv. nerezonanční přiblížení. V případě, že použijeme

energii záření velmi blízkou absorpční energii některé skupiny v molekule, zesílíme tím řádově intenzitu Ramanova rozptylu týkající se této části molekuly a získáme tak její spektrum rezonančního Ramanova rozptylu (obrázek 3.2)



Obrázek 3.2. Znázornění energetických přechodů mezi různými stavy molekuly při pružném (Rayleighově) rozptylu a nerezonančním i rezonančním Ramanově rozptylu.

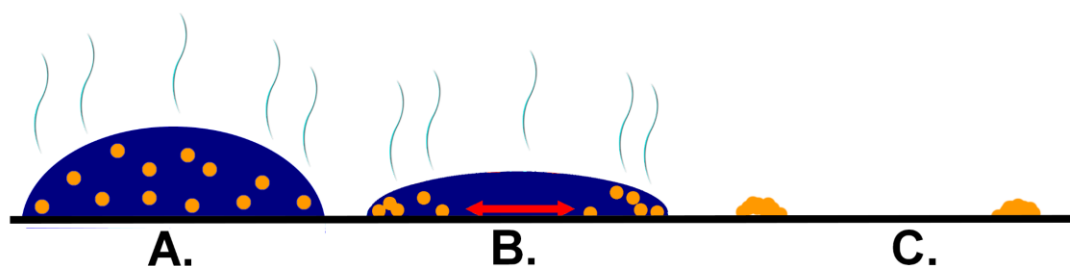
Díky zdokonalování optických filtrů, fotonových detektorů a vyvíjení nových metod měření (R.S. Das a Y.K. Agrawal, 2011) se v posledních letech řádově zvýšila citlivost detekce a zároveň se snížila potřebná koncentrace vzorku. Získané informace tak mohou být velmi detailní, za určitých okolností i srovnatelné s rozlišením rentgenové analýzy nebo NMR. (P.R. Carey, 1999).

3.2.2. Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků

DCDR, neboli Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (*drop coating deposition raman*) je metoda zesílení intenzity Ramanovského rozptylu pomocí zvýšení koncentrace vzorku odebráním rozpouštědla. Necháme-li na hladkém povrchu zaschnout kapičku vzorku v rozpouštědle, vytvoří se skvrna tvaru prstenu, (jev známý jako „kávová prstenec“) na jejímž okraji bude zakoncentrován vzorek zbavený rozpouštědla. Tento jev se stane téměř vždy, vyjma tří případů – použijeme-li superhydrofobní povrch (I.A. Larmour, a kol., 2009), pro částice eliptického tvaru (J. Vermant, 2011; P.J. Yunker, a kol., 2011), nebo použijeme-li speciální typ rozpouštědel, jako např. alkany (H. Hu a R.G. Larson, 2006) – v těchto případech po vyschnutí nezískáme skvrnu prstencového tvaru, nicméně k zakoncentrování dojde též.

Pro získání prstencové skvrny je nezbytné, aby okraj kapky přilnul k povrchu a aby bylo umožněno vypařování kapaliny z okrajových částí kapky (R.D. Deegan,

a kol., 2000). Protože rychlost vypařování na perimetru kapky je vyšší než na jejím vrchlíku, dochází k indukci toku rozpouštědla (a tedy i rozpuštěné látky) ze středu kapky radiálním směrem k jejím okrajům a následnému zakoncentrování částic na okraji (obrázek 3.3).



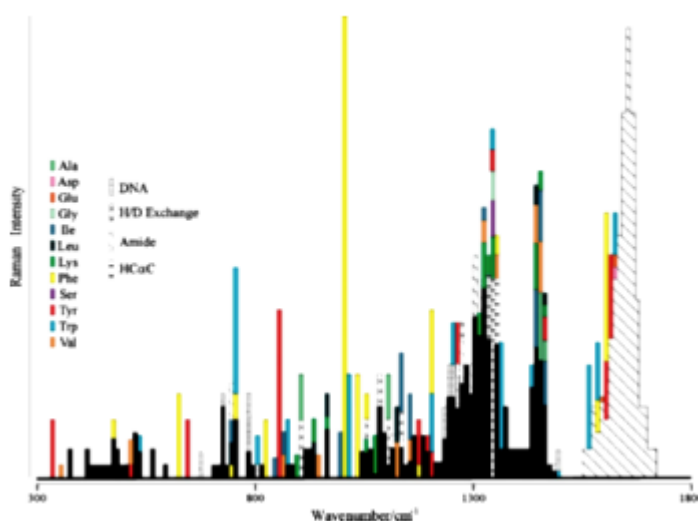
Obrázek 3.3. Kolmý průřez schematickým nákresem vypařováním kapky koloidního roztoku. *A. Rychlost vypařování rozpouštědla (tmavě modrá oblast) z kapky roztoku rozpuštěné látky (oranžová kolečka) je rychlejší u okrajů kapky u povrchu. B. Na rozdíl kapky čisté vody (která si po celou dobu zachovává stejný kontaktní úhel), udržuje si kapka suspenze po dobu vypařování konstantní perimetr – vypařované rozpouštědlo tak indukuje radiální tok ze středu kapky směrem ven (červená šipka). C. Po vypaření rozpouštědla zbude na povrchu skvrna prstencového tvaru.*

V reálném případě je vhodné započítat i viskózní chování částic a tedy i disipativní síly soustavy, které vedou k poznatku, že perimetr se ve skutečnosti nezachovává nezměněn, nýbrž se nepatrně smršťuje periodicky se opakujícím „přilepením“ okraje kapky k povrchu a plynulým smršťováním, což vysvětluje někdy pozorované soustředné kroužky v prstenci (E. Adachi, a kol., 1995). Další pozorovatelné vzory na prstenci jsou způsobené přítomností solí a jejich tvar je přímo závislý na iontové síle rozpouštědla (L. Pauchard, a kol., 1999).

3.2.3. Ramanova spektroskopie proteinů

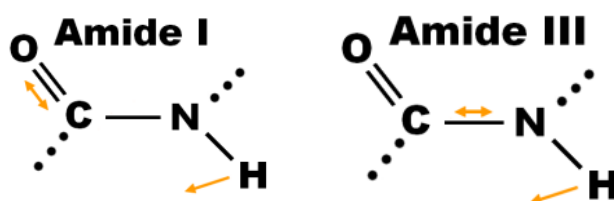
Ze spekter Ramanova rozptylu proteinů lze vyčíst ze strukturního hlediska především informace o sekundární struktuře peptidové kostry, o přítomnosti některých aminokyselin, informace o oxidaci cysteinových můstků a informaci o charakteru prostředí některých aminokyselinových zbytků, jejichž specifické znaky ve spektrech byly během posledních 30 let experimentálně stanoveny. Získání těchto poznatků je ztíženo překryvem jednotlivých vibračních pásů, jak ukazuje obrázek 3.4. Výrazně nad ostatní intenzitně vyčnívají především vibrační pásy aminokyselin s aromatickými

postranními řetězci (tj. tyrosin, tryptofan, fenylalanin) a vibrační pásy peptidové vazby (R. Tuma, 2005).



Obrázek 3.4. Graf naznačující mimo jiné překryvy pásů vibrací náležejících různým postranním řetězcům. (Obrázek převzat z (R. Tuma, 2005).)

Sekundární struktura peptidového řetězce se tradičně určuje především z polohy, tvaru a intenzity tzv. pásů amidu I a amidu III (obrázek 3.5.). Tyto silné pásy jsou citlivé k sekundární struktuře především díky prostorové elektrostatické interakci zvané TDC („transition dipole coupling“) vibračních módů peptidových vazeb. Jedná se o rezonanční interakci oscilujících dipólů blízkých aminových skupin, závisející na vzájemné orientaci a vzdálenosti. (A. Barth a C. Zscherp, 2002)



Obrázek 3.5. Schématický náčrt vibrací peptidové vazby pozorovatelných ve spektrech Ramanova rozptylu proteinů. Amid I je tvořen především valenčními vibracemi C=O vazby a deformační vibrací N–H vazby, amid III je pak dán deformační vibrací N–H vazby a valenční vibrací C–N vazby.

Amid I je velmi výrazný pás mezi 1630–1700 cm^{-1} (M. Berjot, a kol., 1987). Jak je patrné z obrázku 3.6, jeho výrazným přispívatelem je vibrace C=O vazby. Kyslík je

v tomto případě akceptorem vodíkových vazeb v sekundárních a terciárních strukturách, takže pozice pásu je silně ovlivněna prostorovým uspořádáním peptidového řetězce (R. Tuma, 2005). Podobnou vazbu ke struktuře má i amid III ($1200\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$), ten je ale ve většině případů překryt pásy jiných, silnějších vibrací. To ovšem neplatí pro UV-Resonanční Ramanovu spektroskopii, kde se pás amid III výrazně zesiluje (Schweitzer-Stenner a Reinhard, 2006).

Metody získání strukturní informace z amidu I a III jsou dobře zpracované. Často jsou založené na prokládání naměřeného spektra superpozicí spekter čistých sekundárních struktur či na dekonvoluci spektra na jednotlivé strukturní komponenty (S.U. Sane, a kol., 1999; H. Susi a D.M. Byler, 1988), prokládáním spektra lineární kombinací spekter proteinů o známé sekundární struktuře (R.W. Williams, 1983), či na pozorování frekvenčních posunů maxima pásů amidů. Více o konkrétních metodách používaných v této práci v kapitole 3.7.

Kromě pásů amid I a amid III najdeme v Ramanovských spektrech další výrazné pásy připisované konkrétním aminokyselinám (H.A. Havel, 1996).

Příkladem jsou pásy tyrosinu, kterých ve spektru nalezneme hned několik. Asi nejdůležitější jsou dva tyrosinové pásy kolem $830\text{--}850\text{ cm}^{-1}$, označované jako Fermiho rezonanční dublet. Poměr jejich intenzit závisí na stavu OH skupiny tyrosinu – chová-li se jako vodíkový akceptor, je poměr intenzit

$$\frac{I_{850}}{I_{830}} \quad (3.10)$$

větší než 2,5. Pro OH skupinu jako vodíkový donor je poměr kolem 0,3 a pro ionizovaný stav dosahuje hodnoty kolem 0,7. Výsledné pásy jsou tvořené příspěvky všech tyrosinů, tedy čím méně se jich ve struktuře nachází, tím snadněji se data interpretují.

Podobné je to s tryptofanem – ve spektru je vidět několik různých pásů určujících přítomnost tryptofanu. Mezi nimi je i Fermiho rezonanční skupina citlivá na okolí aminokyselinového zbytku. Je-li poměr intenzit

$$\frac{I_{1360}}{I_{1340}} \quad (3.11)$$

vysoký, ukazuje to na hydrofobní prostředí. Je-li nízký, nachází se tryptofan v prostředí hydrofilním (ukazuje na přítomnost vodíkových můstků). Stejně jako v případě tyrosinů i tento dublet je tvořen překryvem pásů všech tryptofanů a interpretace dat pro větší počet aminokyselinových zbytků je náročná.

Vibrace histidinu a fenylalaninu vytváří ve spektrech velký počet pásů, které jsou ale příliš nezávislé na struktuře a slouží tak pouze spíše pro identifikaci těchto aminokyselinových zbytků v peptidu.

Disulfidické (S–S) můstky jsou výrazným činitelem struktury. Slouží především k propojování různě položených cysteinových zbytků a vytváří tak spony terciární struktury. Díky vysoké polarizovatelnosti a nízkému dipólovému momentu atomů síry v disulfidické vazbě (případně C–S vazbě) pozorujeme dané pásy výrazně v Ramanově spektru, ale velmi slabě či vůbec v infračerveném spektru. Informaci o disulfidických můstcích získáme i z informace o redukované formě cysteinů, která se projevuje ve spektrech pomocí SH a CS vibrací (obecně 2500–2600 cm⁻¹ a 600–800 cm⁻¹). Informace o vodíkové vazbě SH skupiny je nicméně skryta v posunech způsobených konformací této vazby (W. Qian a S. Krimm, 1992)

3.3. Absorpce

Při průchodu světla látkou dochází díky interakcím fotonů s hmotou k pohlcení části energie záření. Pohlcená energie se pak může přeměnit na energii kinetickou (tepelnou) či se opět vyzáří (luminiscence).

K popisu jevu absorpce užíváme dvou důležitých zákonů. Lambertův zákon říká, že relativní množství absorbovaného světla je nezávislé na jeho intenzitě a každá následující vrstva absorbující látky absorbuje stejně velký zlomek právě procházejícího světla (1.14)

$$I = I_0 e^{-\beta l} \quad (3.12)$$

Pro β značí konstantu úměrnosti, l optickou dráhu světla v prostředí a I_0 počáteční intenzitu dopadajícího záření.

Beerův zákon říká, že množství absorbovaného světla je úměrné počtu absorbujících molekul v dráze procházejícího světla. Zavedením veličiny absorbance A vztahem (1.15)

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (3.13)$$

a spojením obou zákonů dohromady získáme Lambert-Beerův zákon

$$A = \varepsilon c l \quad (3.14)$$

pro ε značí molární extinkční (absorpční) koeficient, c koncentrace vzorku.

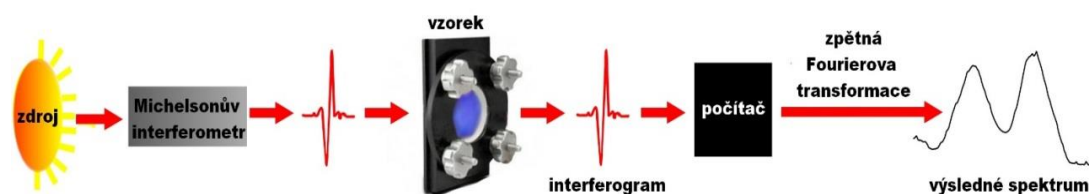
3.3.1. Infračervená spektroskopie – FTIR

FTIR je zkratka pro metodu infračervené spektroskopie využívající interference a zpětné Fourierovi transformace k získání infračerveného absorpčního či transmisního spektra.

Podstatou infračervené spektroskopie je jednofotonový děj absorpce fotonu o vhodné vlnové délce, který indukuje excitaci rotačně-vibračních stavů kovalentně vázaných atomů či celých skupin. Takovouto absorpci pozorujeme pouze pro vibrace, při kterých dochází ke změně dipólového momentu – pouze takové vibrace se projeví v infračervených absorpčních spektrech, která jsou pro každou molekulu jedinečná. Vibrační extinkční koeficienty jsou obecně nízké a zajímavé vibrační pásy bývají překryté výrazným pásem vody. Při transmisním uspořádání experimentu se proto používá poměrně vysoká koncentrace vzorku a zároveň co nejkratší optická dráha (L.K. Tamm a S.A. Tatulian, 1997).

Molekula má obecně $3n - 6$ (lineární molekula $3n - 5$) vibračních stavů, ne vždy ale odpovídá pás ve spektru jediné vibraci. Kromě pásů tzv. normálních módů se ve spektrech objevují i pásy propojení dvou a více módů.

Běžné infračervené disperzní spektrometry využívají pro měření IR spekter rozložení záření pomocí disperzní soustavy (vyrobené například ze štěrbin a optické mřížky) na jednotlivé monochromatické jednotky a zaznamenávají pokles intenzit pro každou vlnovou délku. Oproti tomu FTIR spektrometry „kódují“ informaci o spektrech pomocí interferometru do jediného interferogramu (intenzitní funkce pozice pohyblivého zrcadla), který je poté pomocí výpočetní techniky převeden zpětnou Fourierovou transformací na spektrum (intenzitní funkce vlnových délek či vlnočtů), jak ukazuje obrázek 3.6. Tento postup přináší hned několik výhod – vyšší rychlost získání spektra, přesné určení vlnových délek z pohybu zrcadla a navíc nedochází ke ztrátě intenzity světla na štěrbinách a disperzních prvcích (Barth a Andreas, 2007)



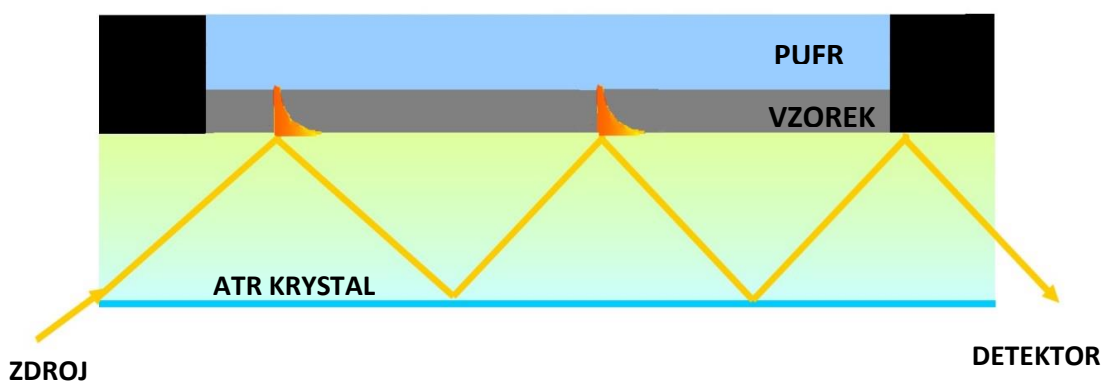
Obrázek 3.6. Schématický nákres FTIR experimentu

3.3.2. FTIR-ATR (Attenuated total reflectance)

ATR neboli zeslabený totální odraz je jednou z modifikací experimentu infračervené spektroskopie, používaný například ke studiu membránových proteinů a lipidů. Tato metoda je založena na principu vedení infračerveného světla vlnovodným krystalem (tedy materiálem s indexem lomu vyšším než je index lomu měřeného substrátu, který na krystal přiléhá). Po navázání světla dochází na rozhraní opticky hustšího prostředí (krystal) s opticky řidším (vzorek) k úplnému odrazu, při kterém proniká do opticky řidšího prostředí evanescentní vlna se stejnou frekvencí, jakou má světlo šířící se vlnovodem. Její intenzita ovšem se vzdáleností od povrchu exponenciálně klesá, proniká tak pouze do hloubek srovnatelných s vlnovou délkou. Evanescentní vlna může být vzorkem absorbována a svazek světla na výstupu potom nese informaci o studovaném infračerveném absorpčním spektru vzorku (obrázek 3.7).

Výhodou ATR oproti transmisní infračervené spektroskopii je možnost užití mírně nižší koncentrace vzorku. Na druhou stranu je třeba zajistit vytvoření vrstvy vzorku přilehlé přímo k povrchu ATR krystalu (obecněji elementu s vnitřní reflexí). Další výhodou je například možnost získání informace nejenom o sekundární struktuře, ale v případě užití polarizovaného světla i o orientaci molekul na povrchu krystalu.

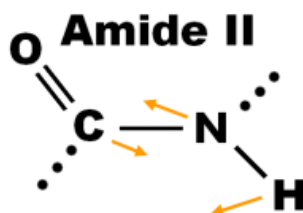
Tvar pásů získaných ATR experimenty je závislý mimo jiné i na volbě vhodných parametrů experimentu, jako je vlnová délka dopadajícího záření, indexy lomu vlnovodu i vzorku, úhel dopadu světla či míra kontaktu vzorku s krystalem a tloušťka vrstvy vzorku u povrchu. (E. Goormaghtigh, a kol., 1999) Vhodné nastavení těchto parametrů je nezbytné pro získání nezkriveného spektra.



Obrázek 3.7. Schematický náčrt ATR experimentu. Svazek světla je navázán do světlovodného krystalu o indexu lomu vyšším, než je index lomu vzorku. Na rozhraní krystal-vzorek dochází k totálnímu odrazu, při kterém do vzorku proniká evanescentní vlna. Ta může být absorbována a na detektoru tak pozorujeme absorpční spektrum.

3.3.3. Infračervená spektroskopie a sekundární struktura proteinů

Infračervená spektra proteinů obsahují obecně devět tzv. amidových pásů, které reprezentují delokalizované vibrace peptidové vazby. Některé z nich jsou velmi citlivé na sekundární strukturu proteinu a zároveň dostatečně intenzivní pro možnou analýzu – jsou to především pásy amid I a amid II. Nejlépe prozkoumaným pásem pro stanovení sekundární struktury proteinů je pás amidu I. Nachází se v rozmezí 1600–1700 cm^{-1} a reprezentuje valenční vibrace C=O, doplněné o deformační vibrace N–H a C–N vazby (obrázek 3.5). Pás amidu II (obrázek 3.8) není tak dobře prozkoumán a jeho zpracování pro určení sekundární struktury proteinů je ztíženo překryvem pásy postranních řetězců aminokyselin (H.A. Havel, 1996).



Obrázek 3.8. Schematický náčrt vibrace peptidové vazby amidu II. *Pás amid II je tvořen spřažením C–N valenčních a C–N–H deformačních vibrací.*

Pouze dvě funkční skupiny postranních řetězců absorbují na infračervených frekvencích v regionech, kde nedochází k dalšímu překryvu jinými pásy. Jsou to SH vibrace cysteinu (2550–2600 cm^{-1}) a karbonylová skupina protonovaného karboxylové skupiny (1710–1790 cm^{-1}). Všechny ostatní vibrace postranních řetězců se buď překrývají navzájem nebo s vibracemi peptidové páteře a je tedy potřeba dalších experimentů a zpracování pro získání dalších informací. (A. Barth a C. Zscherp, 2002)

3.4. Elektronový cirkulární dichroismus

Elektronový cirkulární dichroismus představuje optickou absorpční dichroickou metodu charakterizace vzorků pomocí sledování změn ve spektru kruhově polarizovaného světla. Opticky aktivní (= *chirální*) látky stáčí rovinu polarizovaného světla o určitý úhel závislý na absorbanci pravotočivé a levotočivé složky světla v daném prostředí. Je-li extinkční koeficient obou složek stejný, rovina polarizovaného světla po průchodu látkou se nezmění. Je-li různá, dojde ke vzniku elipticky polarizovaného světla.

Cirkulární dichroismus je definován jako rozdíl extinkčních koeficientů levotočivé (ozn. ϵ_L) a pravotočivé (ozn. ϵ_R) složky světla:

$$\Delta\varepsilon \equiv \varepsilon_L - \varepsilon_R \quad (3.15)$$

Přístroj používaný pro měření cirkulárního dichroismu se nazývá spektropolarimetr a měří rozdíl v absorbanci pravo- a levotočivé komponenty. Většinou se výsledky udávají v elipticitě θ ve stupních, která má vztah s cirkulárním dichroismem (S.M. Kelly, a kol., 2005) následující:

$$\theta = \tan\left(\frac{b}{a}\right)^{-1} = 32.98 \Delta A \quad (3.16)$$

pro A je absorbance definovaná vztahem (3.14), ΔA je rozdíl absorbancí levotočivé a pravotočivé složky světla, a je hlavní osa a b je vedlejší osa elipticky polarizovaného světla. Ze zavedených vzorců je zřejmé, že kladné spektrum odpovídá více absorbované levotočivé složce a záporné více absorbované pravotočivé.

Chirální centra mohou obecně vzniknout hned z několika důvodů. Jednou možností je chiralita vzniklá díky struktuře – uhlík s navázanými 4 různými substituenty nebo chiralita vzniklá disulfidickými vazbami, které jsou chirální díky dihedrálnímu úhlu mezi C–S–S–C. Další možností je navázání potenciálního chirálního centra k jinému chirálnímu centru. Poslední z možností je umístění v nesymetrickém prostředí díky prostorovému uspořádání molekuly.

3.4.1. Elektronový cirkulární dichroismus a sekundární struktura proteinů

Chirální centra proteinů, tedy jejich chromofory pro cirkulární dichroismus jsou postranní aminokyselinové řetězce (absorbují kolem 260–320 nm, tato oblast je „otiskem prstu“ pro každý protein), peptidová vazba (absorpce kolem 240 nm, daleké UV) a disulfidické můstky (slabě absorbují kolem 260 nm). U proteinů tedy závisí velikost ε_L a ε_R na jejich primární i sekundární struktuře. (S.M. Kelly, a kol., 2005)

Při určování sekundární struktury proteinů metodou cirkulárního dichroismu dosahuje určení složení α -helixů větší přesnosti než určení ostatních struktur. Helikální struktury jsou pravidelné a vykazují velmi silný CD signál, na rozdíl od různorodějších β struktur, jejichž signál v záporných částech spektra je asi třetinový. To může vést ke zkreslení výsledků v případech, kdy je v proteinu jen malé množství β struktur (L. Whitmore a B.A. Wallace, 2008).

Běžně používané metody zpracování spekter cirkulárního dichroismu zahrnují porovnávání naměřených spekter se sadou spekter známých struktur, většinou určených rentgenovou strukturní analýzou. Porovnání může probíhat různými způsoby, například metodou nejmenších čtverců (Y.H. Chen, a kol., 1974), pomocí metody singulárního rozkladu matice hodnot (W.C. Johnson, 1999) či metodou

konvexní analýzy (A. Perczel, a kol., 1992). Při zpracování dat pro tuto práci byla použita metoda neurálních sítí (viz kapitola 3.8).

3.5. Diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC)

Přestože zadání práce hovoří pouze o metodách vibrační spektroskopie, bylo vhodné pro co nejkompletnější charakterizaci vzorku zařadit i dvě nespektroskopické metody – DSC a elektroforézu (popsanou v kapitole 3.6).

DSC je účinná metoda charakterizace změn termodynamických parametrů teplotně indukovaných konformačních přechodů biologických makromolekul. Z těch se dále dá určit stabilita jednotlivých forem, teplota přechodů ale také například počet domén, ze kterých se makromolekula skládá či jaká je jejich kooperativita přechodu (K.P. Murphy a E. Freire, 1993).

Výstupem kalorimetrického měření je závislost přebytečné parciální teplotní kapacity systému za konstantního tlaku ΔC_p na teplotě, získaná měřením rozdílné teplotní absorpce pufru v komoře referenční a vzorku rozpuštěném v témže pufru v komoře měřicí. Tento rozdíl vzniká díky tomu, že vzorek absorbuje část energie kvůli konformačním změnám a kvůli nutnosti celkového přeuspořádání systému.

Takto získané ΔC_p není pouze teplotní kapacitou proteinu, ale zahrnuje v sobě i interakce proteinu s rozpouštědlem. Velkou roli hraje například změna uspořádání vodních molekul a vznik či zánik vodíkových vazeb kolem hydrofilních/hydrofobních částí proteinu (obecně vzorku) odhalených novou konformací při teplotně indukovaném přechodu. Proto pozorujeme obecně nižší ΔC_p v případě nativní formy proteinu a vyšší v případě konformace s hydrofobními částmi vystavenými polárnímu prostředí.

3.5.1. Termodynamika stability a přechodů

Parametry běžně používané pro popis stability systému jsou rovnovážná konstanta K nebo Gibbsova volná energie ΔG^0 , která se dá vyjádřit pomocí entalpie ΔH^0 , entropie S a termodynamické teploty T

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (3.17)$$

V rovnováze, kdy $\Delta G = 0$ dále platí vztah (pro R značící universální plynovou konstantu)

$$\Delta G^0(T) = -RT \ln K(T) \quad (3.18)$$

Pokud se dá libovolnou metodou určit závislost $K(T)$, můžeme pro získání termodynamických parametrů konformačního přechodu proteinu využít analýzu van't

Hoffova grafu. Nevýhodou je, že tato metoda počítá pouze s dvoustavovým přechodem (tedy nepočítá se vznikem stabilních intermediátů) a nepočítá se závislostí veličin na teplotě (tedy předpokládá $\Delta C_p = 0$). To ale není případ konformačních změn proteinů – mohou být i vícestavové a nativní forma proteinu má nižší teplotní kapacitu než forma denaturovaná, jak bylo popsáno v kapitole 3.5. Je tedy výhodné zavést upřesněný popis

$$\Delta G^0(T) = \Delta H^0(T_R) - T\Delta S^0(T_R) + \Delta C_p[(T - T_R) - T \ln(\frac{T}{T_R})] \quad (3.19)$$

kde T_R značí referenční teplotu a T teplotu, která nás zajímá. Tento model předpokládá ΔC_p konstantní na teplotě nezávislé. Odtud se dá již snadno odvodit pro dvojfázový přechod při teplotě tání T_m (G. Bruylants, a kol., 2005)

$$\Delta H^0(T) = \Delta H^0(T_m) + \Delta C_p(T - T_m) \quad (3.20)$$

$$\Delta S^0(T) = \Delta S^0(T_m) + \Delta C_p \ln(\frac{T}{T_m}) \quad (3.21)$$

Kde $\Delta H^0(T_m)$ a $\Delta S^0(T_m)$ jsou přechodové entalpie a entropie. V praxi DSC používaná metoda určení termodynamických parametrů přechodu je založena na integraci plochy pod přechodovým píkem:

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT \quad (3.22)$$

$$\Delta S = \int_{T_1}^{T_2} (C_p/T) dT \quad (3.23)$$

Entalpie získaná integrací plochy pod přechodovým pásem je daná kombinací endotermických příspěvků, jako je rozrušení vodíkových vazeb a exotermických, jako je rozlomení hydrofobních interakcí. Takto získaná entalpie se může lišit od entalpie získané z analýzy van't Hoffova grafu. Porovnáním těchto dvou hodnot (C.M. Johnson, 2013) pak můžeme určit, zda je přechod dvojfázový či nikoli.

Je-li přechod reversibilní, dovolí nám rovnovážná termodynamická analýza DSC termogramu nejen potvrdit/vyvrátit dvoustavový přechod, ale v případě více-stavové denaturace nám zároveň pomůže určit počet a termodynamické charakteristiky výrazněji populovaných intermediátorových stavů – toho lze využít při studiu multidoménných proteinů, komplexů či při studiu interakcí doména–doména. Nicméně velká část přechodů je ireversibilní (díky například agregaci, autolýze, deaminaci či jiným chemickým změnám) (B.I. Kurganov, a kol., 1997). Analýza se

pak neprovádí na základě kinetického modelu (3.24) (pro N je populace nativní formy proteinu a D je populace denaturované formy. K je rovnovážná konstanta reversibilní reakce, k je rychlostní konstanta ireversibilní reakce):



ale například pomocí modelu kinetiky ireversibilní denaturace:



(C.M. Johnson, 2013) či jiných speciálních kinetických modelů. Ireversibiliti procesu se někdy dá předejít nastavením experimentu – snížením koncentrace vzorku či zvýšením skenovací rychlosti.

3.6. Gelová elektroforéza proteinů

Elektroforéza je metoda separace molekul založená na rozdílné pohyblivosti nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli v daném prostředí. Využívá se pro separaci, detekci, čištění či kontrolu čistoty nebo charakterizaci biomolekul. Existuje mnoho elektroforetických metod volených dle požadovaného výsledku a dle typu biomolekuly.

Při pohybu nabitě částice elektrickým polem E v prostředí na ni působí hlavně dvě síly – elektrická síla působící na nabitou částici v elektrickém poli a třecí síla daná Stokesovým zákonem. Pro rychlost v takové částice o náboji q a poloměru r v prostředí o viskozitě η platí

$$v = \frac{qE}{6\pi\eta r} \quad (3.26)$$

V elektroforéze se pak často zavádí veličina zvaná elektroforetická pohyblivost μ , která je nezávislá na použitém elektrickém poli a je tedy snáze porovnatelná mezi různými experimenty (V. Prosser, 1989):

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (3.27)$$

Elektroforéza probíhá ve speciálním prostředí zvaném matrix, která pomáhá definovat rychlost pohybu proteinů a zabraňuje míchání již separovaných molekul v důsledku difuze a vzniku konvekčních proudů díky zahřívání vzorku průchodem elektrického proudu. V případě proteinů se nejčastěji používají polyakrylamidové gely, tvořící

houbovitou strukturu s velikostí pórů nastavitelnou upravením polymerizačních podmínek.

Gel vzniká kopolymerací acrylamidu a propojovacího prvku N, N-methylenbisacrylamidu. Celá reakce je katalyzovaná volnými radikály, takže je inhibovaná přítomností kyslíku. Nejčastější způsob odstartování radikálové polymerace je pomocí amonium persulfátu jako iniciátoru a N, N, N, N-tetramethylethylenediaminu (TEMED) jako katalyzátoru (J. Davey a J.M. Lord, 2003).

V této práci byla použita tzv. *diskontinuální elektroforéza* (L. Ornstein, 1964), která zajišťuje lepší zaostření výsledných zón. Toho je docíleno překrytím dělicího gelu asi centimetrovou vrstvou gelu startovního s velkými póry a použitím pufru po rozpuštění vzorku s nižším pH než je pufr v gelu a okolí (D. Voet a J.G. Voetová, 1995).

Po ukončení experimentu se výsledky dají zviditelnit dvěma způsoby – citlivnější, ale náročnější metodou pomocí stříbra, která má detekční limit asi 1 ng proteinů, nebo méně senzitivní metodou, kterou jsem ve své práci používala – metodou barvení pomocí coomassie brilliant blue R-250. Tato barva se chytá nespecificky na jakékoli proteiny a její detekční limit je mezi 10–100 ng (dle formy modří) (Gholamreza Kavooosi a S.K. Ardestani, 2012).

3.6.1. SDS PAGE

SDS PAGE (*sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis*) je elektroforetická metoda pro separaci proteinů podle jejich molekulární hmotnosti. Před samotnou elektroforézou je protein denaturován a vystaven redukujícímu prostředí, takže pohyb při následné elektroforéze není ovlivněn jeho konformací.

Technika je prováděna v polyakrylamidovém gelu ve vzorkovém pufru obsahujícím dodecylsulfát sodný (SDS). Jedná se o záporně nabitý detergent, který nejenže proteiny pomáhá denaturovat, ale zároveň je obaluje v poměru asi 1,4 g SDS na 1 g proteinu (J.A. Reynolds a C. Tanford, 1970) a udává jim tak záporný náboj úměrný jejich hmotnosti, nezávislý na izoelektrickém bodu jednotlivých molekul. Dále se do vzorkového pufru může přidat disulfidové můstky redukující činidlo či bromfenolová modř pro zviditelnění průběhu elektroforézy. Pro zhodnocení výsledků se běžně používá referenční sada proteinů o známé hmotnosti. Přesnost určení molekulové hmotnosti pomocí SDS-PAGE je odhadována na 5–10 % (D. Voet a J.G. Voetová, 1995).

3.7. Způsoby zpracování dat

3.7.1. Neuronové sítě

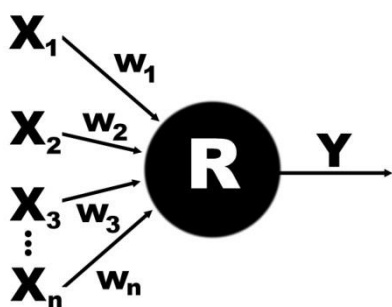
Sekundární struktura proteinu z měření cirkulárního dichroismu byla získána dekonvolucí naměřených spekter na spektra známých struktur pomocí umělých neuronových sítí za použití programu CDNN 2.1. (Dr. Gerald Böhm, 1997).

Umělé neuronové sítě byly původně vytvořené ve snaze pochopit lépe funkci biologických neuronálních sítí (mozku). Jedná se tedy o umělou konstrukci schopnou výpočtů, učení se, pamatování a optimalizaci podobným způsobem, jako to umí lidský mozek. V nejjobecnější představě se jedná o soubor výpočetních jednotek – umělých neuronů propojených systémem spojů, které mohou vznikat v závislosti na procesu učení – umělé dendrity a axony (B. Cheng a D.M. Titterington, 1994). Každý z p spojů má svoji určitou váhu w_i , která udává důležitost daného vstupu X_i . Do každého neuronu vstupuje neomezené množství vstupů, ale vychází vždy jen jeden výstup Y .

$$Y = R + \sum_i^p w_i X_i \quad (3.28)$$

Každý umělý neuron disponuje tzv. prahem R . Neuron se stává aktivním (přenáší informaci dále) pouze ve chvíli, kdy

$$\sum_i^p w_i X_i > R \quad (3.29)$$



Obrázek 3.9. Schematický náčrt výpočetní jednotky umělých neuronových sítí. Každá jednotka spojuje libovolné množství vstupů, ale vytváří výstup pouze jeden. Ten může dále sloužit jako vstup pro další jednotky – v dobré analogii s biologickými neuronovými sítěmi.

3.7.2. Určení sekundární struktury z am

Pro určení sekundární struktury proteinů z amidových pásů získaných Ramanovou a infračervenou spektroskopií byly použity dvě různé metody implementované Dr. Kopeckým z MFF UK (V. Kopecký., a kol., 2001) popsané níže v této kapitole. Před použitím procedur však bylo třeba naměřená spektra nejprve vhodně upravit.

V případě spekter Ramanova rozptylu proteinu rozpuštěného v pufru bylo třeba odečíst spektrum samotného pufru a skla a následně odečíst fluorescenční pozadí pomocí polynomu 3. až 5. stupně, dle potřeby (viz popis úpravy dat u každého měření). Pro tento účel bylo vhodné nejprve prohlédnout spektrum daného proteinu změřené pomocí DCDR, neboť u takového nebylo třeba odečítat pufr, sklo ani fluorescenční pozadí a porovnáním s ním bylo možné správněji určit průběh pozadí proteinu měřeného v pufru. Pro správný odečet a vyhovění požadavkům níže popsané procedury LSA bylo třeba dosáhnout odečtem pufru a pozadí pokud možno linearitu oblasti $1730\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$ a toho, aby extrapolace této pomyslné lineární závislosti nebyla příliš vzdálena od spektra v oblasti $1500\text{--}1520\text{ cm}^{-1}$ (tato vzdálenost závisí na intenzitě Trp pásu na 1555 cm^{-1} a pásu CH_2 vibrací mezi $1440\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$). Celé spektrum pak muselo být v oblasti 1750 cm^{-1} sesazeno na nulu (R.W. Williams, 1986) Dále byla data mírně vyhlazena Savitzky-Golayovou metodou (A. Savitzky a M.J.E. Golay, 1964), která využívá pro vyhlazení digitálního spektra fitování úseků po sobě jdoucích naměřených bodů polynomy nízkého stupně (v případě této práce jsem používala polynom 2. stupně) pomocí metody nejmenších čtverců a zvyšuje tak poměr signál/šum, aniž by docházelo k zásadním deformacím spektra. Stupeň vyhlazení závisí mimo jiné na počtu použitých bodů v aproximačním intervalu $2M+1$, přičemž počet M uvádíme u každého spektra zvlášť. Pro spektra měřená metodou DCDR nebylo třeba žádných výše popsaných kroků, kromě sesazení spektra v 1750 cm^{-1} na nulovou intenzitu a odečtu spektra podložní destičky, která ale výrazně do spekter proteinu v této oblasti nezasahovala. Dalším, již společným krokem, pro všechny metody měření Ramanových spekter bylo normování intenzity pásu amidu I.

Pro spektra infračervené spektroskopie zpracování sestávalo z odečtu spektra pufru a vodních par tak, aby bylo okolí pásů amid I a amid II pokud možno lineární (dle standardního algoritmu Dousseau *et al.*, 1989). Dále bylo spektrum v oblasti kolem 1750 cm^{-1} sesazeno na nulu a pás amid I byl znormován na hodnotu 1.

Metoda označovaná dále jako LSA (*least-squares analysis*) zahrnuje fitování pásu amidu I nebo III příslušnými pásy 16 referenčních proteinů, od kterých jsou známé krystalové struktury, pomocí metody nejmenších čtverců (R.W. Williams, 1986). Tato metoda rozpoznává β -listy, β -otočky a α -helixy, které v případě analýzy pásu amid I dále dělí na uspořádané a neuspořádané. α -helixy uspořádané značí dlouhé úseky dobře definovaných α -helixů, jak jsou popsány v kapitole 1.1. Neuspořádané α -helixy jsou potom kratší struktury většinou na koncích delších úseků, do kterých se řadí α -helixy, které již nemají dobře definované vodíkové vazby typické pro α -helikální strukturu nebo 3_{10} -helix (R.W. Williams, 1986; M. Levitt, J. Greer, 1977)

Označíme-li $n \times p$ matici n referenčních spekter o p vlnočtech jako matici A a jako vektor b označíme analyzované spektrum, potom řešením soustavy rovnic

$$Ax \cong b \quad (3.30)$$

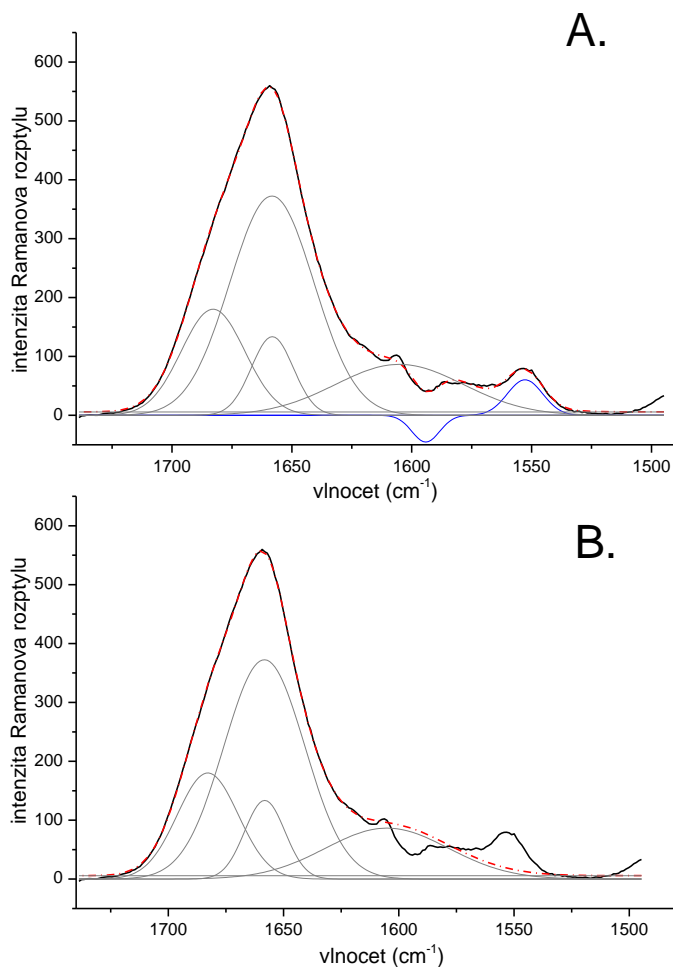
získáme vektor x , který dále užijeme pro získání zastoupení sekundárních struktur v analyzovaném spektru (3.31), předpokládáme-li matici F jako matici $m \times n$, obsahující m tříd sekundárních struktur n referenčních spekter a vektor f vektor dimenze m , který obsahuje zastoupení jednotlivých sekundárních struktur v analyzovaném spektru

$$f = Fx \quad (3.31)$$

Při zpracování pásu amidu I touto metodou je doporučen odečet postranních pásů (příslušejících Phe, Trp, Tyr). Při zpracování jsme vyzkoušeli jak postranní pásy zanechat, tak je odečíst. Protože jsme pozorovali po jejich odečtení větší přesnost fitu než při fitování neupraveného pásů amid I, u všech zde uváděných výsledků bylo odečtení postranních pásů provedeno (viz graf 3.1). Pro fitování pásu amidu III se žádné odečty postranních pásů neprováděly.

Přestože odečet pozadí, jak je výše popsán, je věci částečně subjektivní, nemají drobné odchylky velký vliv na výsledek. Větší pozornost je třeba věnovat správné kalibraci vlnočtové osy, jejíž chyba může vnést do výsledku velké nepřesnosti.

Chyba udávaná spolu s výsledky je chyba získaná tzv. „one out“ testem. Ze souboru používaných 16 referenčních spekter bylo vždy jedno vyňato a jeho struktura byla určena pomocí ostatních. Ta poté byla porovnána s výsledky analýzy krystalové struktury a tak bylo určeno, o kolik se od ní metoda LAS odchyluje.



Graf 3.1. Příklad odečtu postranních pásů amidu I dialyzované ankyrinové domény RNasy L. Černá čára udává původní naměřená data. V programu Grams byly nalezeny pásy ve tvaru kombinovaných Gaussovských a Lorentzovských křivek, které nejlépe aproximovaly průběh spektra a jejich lineární kombinace poté byla automaticky nafitována na spektrum naměřené. Již optimalizované pásy jsou vykresleny nepřerušovanou šedou čarou, optimalizovaná aproximace je znázorněna přerušovanou červenou. A. Spektrum rozložené na komponenty s modře vyznačenými pásy, které je možné ze spektra odečíst, aniž by se změnil tvar amidu I. B. Po odečtení modrých pásů. Výsledná červená přerušovaná křivka byla po znormování analyzována níže popsányými procedurami.

Metoda označovaná jako RIP (*Reference Intensity Profiles*) rozkládá pás amidu I na referenční spektra čistých sekundárních struktur (M. Berjot, a kol., 1987). Tato referenční spektra byla získána z 25 spekter proteinů, jejichž struktura byla známá z rentgenové analýzy. Byly použity dvě varianty procedury RIP. Procedura RIP3, která rozpoznává tři typy sekundární struktury (α -helix, β -list a neuspořádanou strukturu) a RIP4, která α -helikální strukturu považuje za lineární kombinaci dvou odlišných

skupin α -helixů. Toto rozdělení je však pouze matematickou konstrukcí a již autoři tvrdí, že nebyla nalezena korelace mezi tímto rozdělením a výše zavedeným rozdělením α -helixů na uspořádané a neuspořádané, jako je tomu v metodě LSA. Reálný strukturní význam má pouze součet obou příspěvků a proto ve výsledcích udávám pouze ten. RIP4 je vhodná především v případě studia proteinů s vysokým zastoupením α -helixů s posunutým pásem amid I k nižším vlnočtům.

Analýza probíhá lineární metodou nejmenších čtverců dle vztahu

$$A_{0,i}^P \approx \sum_{j=1}^5 c_j R_i^j \quad (3.32)$$

kde $A_{0,i}^P$ značí matici znormovaného naměřeného spektra sesazeného na 1700 cm^{-1} na 0 a matice R_i^j je matice intenzit referenčních profilů. První čtyři profily odpovídají třídám sekundárních struktur (α -helix₁, α -helix₂, β -list a neuspořádaná struktura), pátý profil odpovídá referenčním hodnotám pozadí. Označíme-li si c'_j jako koeficient odečtu pozadí $-k$, můžeme získat složení sekundárních struktur naměřeného spektra c_j jako

$$c_j = \frac{c'_j}{(1+k)} \quad (3.33)$$

Při zpracování spekter vzorku rozpuštěného v pufru je možné vzít v potaz i spektrum rozpouštědla, jímž se dají fitovaná data v průběhu výpočtu korigovat. Zařízeno je to přidáním dalšího intenzitního referenčního profilu a to profilu pufru. Potom se v sumě (3.32) nesčítá do 5, ale do 6 - první čtyři profily odpovídají třídám sekundárních struktur, 5. náleží referenčním hodnotám pozadí a 6. je intenzitní profil rozpouštědla. Označíme-li c'_6 jako koeficient odečtu rozpouštědla s , můžeme pro celkové zastoupení sekundárních struktur c_j v naměřeném spektru psát

$$c_j = \frac{c'_j}{(1+k-s)} \quad (3.34)$$

Rovnice (3.33) a (3.34) zajišťují, že součet procentuálního zastoupení sekundárních struktur bude vždy 100 %. Narozdíl od metody LSA se tedy nedá spolehlivost fitování určit z celkově nerozpoznaných struktur. Chyby uváděné v tabulkách s výsledky jsou opět určený "one out" testem popsáným výše.

3.7.3. Faktorová analýza

Faktorová analýza je statistická metoda, která dovoluje mnohodomenzionální problém rozložit na několik méně-dimenzionálních problémů (S. Pack, 1991). Předpokládáme při tom, že vstupující proměnné lze vyjádřit jako lineární kombinaci konečného malého počtu skrytých faktorů a jediného faktoru chybového (3.39). Jedná se vlastně o úlohu hledání vlastních čísel a vlastních vektorů matice problému – k tomuto účelu existuje hned několik metod, v této práci jsem používala metodu SVD (*singular value decomposition*) implementovanou v programu *FA8ASC* (J. Bok, 2003, rev. 2007).

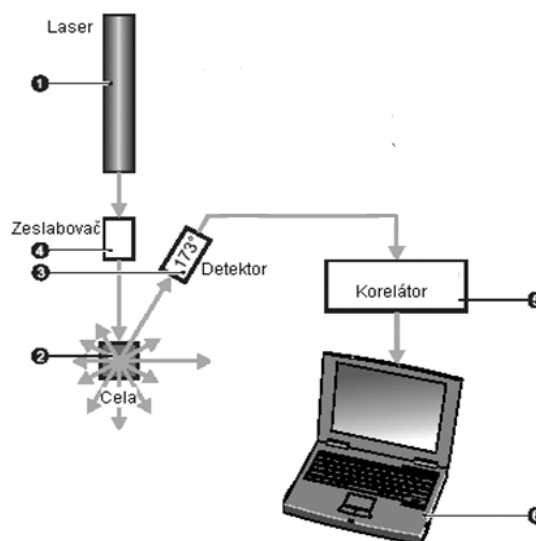
$$Y_i(\lambda_k) = \sum_{j=1}^N S_j V_{ij} U_j(\lambda_k) \quad (3.35)$$

Zvolíme-li si za matici $Y_i(\lambda_k)$ sadu naměřených spekter Y_i v závislosti na vlnových délkách λ_k , potom provedením SVD získáme unitární matici ortonormálních subspekter $U_j(\lambda_k)$, relativní reprezentaci subspektra U_j ve spektru Y_i v průběhu změn určitého parametru (např. teploty) V_{ij} a matici singulárních hodnot udávající statistickou váhu každého subspektra S_j .

4. Uspořádání měřících aparatur

4.1. Aparatura pro měření dynamického rozptylu

Měření probíhalo na přístroji *Zetasizer Nano ZS* od firmy Malvern (obrázek 4.1) Vzorek, který je vložen ve speciální kyvetě (křemenná kyveta 3×3 mm, typ 105.251-QS od firmy Hellma) uvnitř cely (2), je osvětlen laserem 633 nm (1). Rozptýlené záření je zachyceno detektorem (3), který je umístěn pod úhlem 173° vzhledem k procházejícímu paprsku, jedná se tedy o detekci v uspořádání zpětného rozptylu. Důležitým prvkem sestavy je atenuátor (4), který koriguje intenzitu světla dopadajícího do cely podle intenzity rozptýleného světla dopadajícího na detektor tak, aby nedošlo k jeho zahlcení. Data sebraná detektorem dále zpracovává digitální korelátor (5), který porovnává změny intenzit v čase a vytváří tak korelační funkci. Ta je hlavním výstupem měření, který je dále zpracováván příslušným softwarem (6). Ke zpracování dat byl použit *Zetasizer Software* dodaný výrobcem.



Obrázek 4.1. Schematický náčrt aparatury pro měření dynamického rozptylu. Převzato z (Malvern Instruments, 2007)

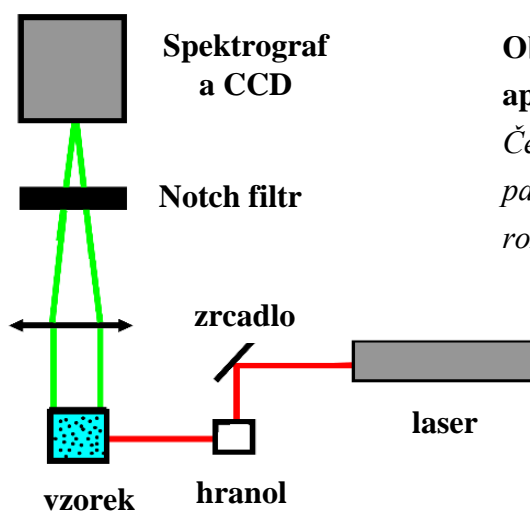
Před každým měřením bylo třeba vzorek zbavit prachu a nečistot filtrováním, podrobněji je o této problematice pojednáno u každého měření zvlášť.

4.2. Aparatury pro měření Ramanova rozptylu

4.2.1. Ramanův spektrometr s pravoúhlou geometrií

Měření Ramanova rozptylu proteinů v roztoku byla prováděna na modulárním Ramanově spektrometru využívajícím pravoúhlé geometrie (obrázek 4.2). Excitaci zajišťoval pevnolátkový Nd:YVO₄ laser *Verdi 2* (Coherent) o vlnové délce 532,16 nm. Ramanovsky rozptýlené záření ze vzorku bylo propuštěno holografickým filtrem, soustředěno na vstupní štěrbinu spektrografu *Spex 270M* (Jobin-Yvon) s mřížkou 1200 nebo 1800 vrypů/cm a detekováno dusíkem chlazeným CCD detektorem Princeton Instruments o velikosti 1340×100 pixelů. Rayleighův rozptyl byl blokován holografickým pásmovým filtrem. Vlnočtové škály výsledných spekter byly při každém měření kalibrovány pomocí spektrálních čar neonové výbojky a programu

NeokalSpex2 (J. Bok, 2007). Pro měření byly použity kapilární mikrokyvety vyrobené v dílnách MFF UK.



Obrázek 4.2. Schematický náčrt aparatury Ramanova rozptylu. Červená linie značí excitační paprsek, zelená potom Ramanovsky rozptýlené světlo.

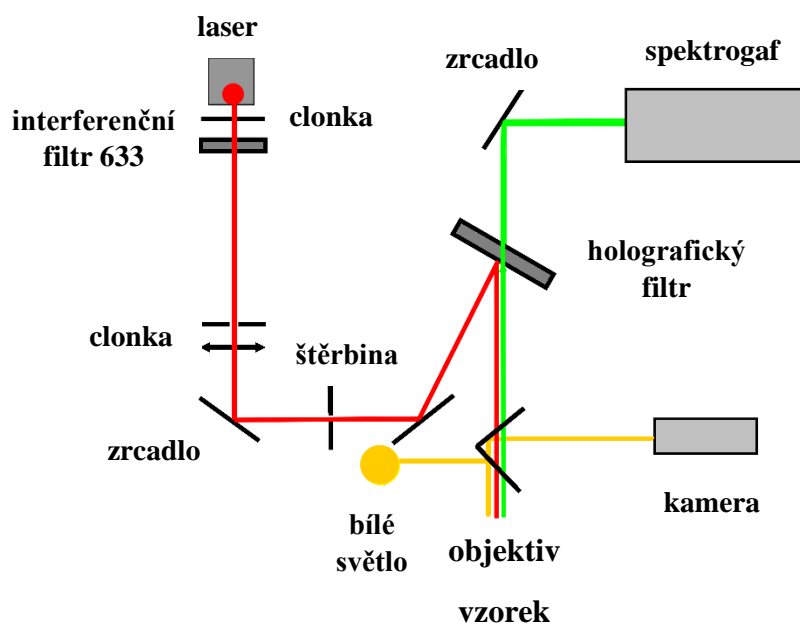
4.2.2. Konfokální Ramanův mikrospektrometr

Pro Ramanovu mikroskopii byl používán konfokální mikroskop LabRam HR800 s mikroskopem *Olympus BX40* od firmy Horiba Jobin Yvon. Tento přístroj používá pro excitaci He–Ne 20mW laser s excitační vlnovou délkou 632.816 nm.

Laserový paprsek (obrázek 4.3) prochází přes sadu zrcadel a filtrů (včetně interferenčního filtru pro odstranění vedlejších plasmových linií laseru), až je čočkou zaostřen na štěrbinu. Poté je odražen a prochází dvěma holografickými HR800 Super-notch pásmovými filtry směrem ke vzorku pod mikroskopem BX 40 s vyměnitelnými objektivy a vestavěnou kamerou. Záření od vzorku prochází nazpět objektivem, dále přes pásmový filtr, kterým Ramanovsky rozptýlené světlo prochází (a excitační linie Rayleighova rozptylu je plně odfiltrována) směrem k nastavitelné konfokální cloně a vstupní štěrbině asymetrického spektrografu s Czerny-Turnerovým uspořádáním. Ve spektrografu se dají zvolit dvě mřížky se 600 a 1800 vrypů/mm. Ze spektrografu je výstup zobrazován na dusíkem chlazený CCD detektor o velikosti 1024×256 pixelů. Zvětšení obrazu je dáno zvětšením objektivu násobeným koeficientem 1,4. Před měřeními byla kontrolována kalibrace dle polohy nejsilnější čáry Ramanova spektra křemíku, který je standardně na 520,7 cm^{-1} .

Vzorek je možné snímat i klasickou zobrazovací kamerou díky dvěma děličům svazku 50/50, z nichž jeden přivádí bílé světlo ze zdroje na vzorek a druhý ze vzorku do kamery. Toho se dá s výhodou využít při výběru, kontrole a zaostření místa snímání.

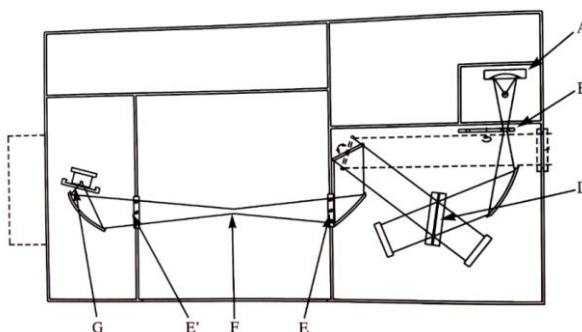
Pro měření DCDR spekter byla použita destička z leštěné oceli pokrytá tenkou vrstvou teflonu SpectRIM™ (Tienta Sciences).



Obrázek 4.3. Schematický nákras aparatury konfokálního Ramanova mikrospektrometru. Červený paprsek znázorňuje budící laserový svazek putující aparaturou směrem ke vzorku. Zelený paprsek udává trasu Ramanovsky rozptýleného světla a žlutá linie značí bílé světlo zobrazující vzorek na kameru.

4.3. Aparatura FTIR spektrometru

Pro měření FTIR spekter a FTIR-ATR byl použit infračervený spektrometr *Vector 33* od firmy Bruker (obrázek 4.4).



Obrázek 4.4. Schematický nákras použitého FTIR spektrometru. Podrobnější popis následuje v textu pod obrázkem.

Jedná se o FTIR spektrometr dovolující sběr dat ve střední a blízké infračervené oblasti. Infračervené záření je emitováno na vzduchu žhaveným a globarem (A).

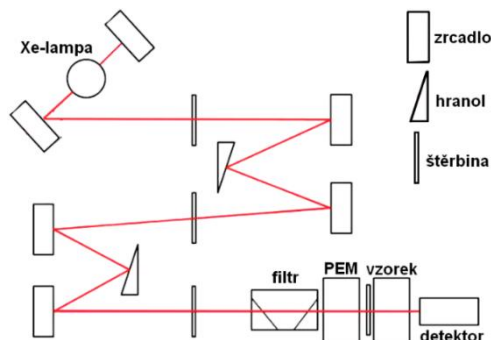
Pomocí zrcadla umístěného za globarem je záření fokusováno přes nastavitelnou aperturu (B) do prostoru interferometru v uspořádání ROCKSOLID™. Dále použitá spektrální oblast záření je definovaná děličem svazku z KBr (D), na který světlo dopadá pod úhlem 30°. Svazek z interferometru je znovu fokusován přes okénko (E) do měřicí komory přímo do oblasti vzorku (F). Odtud pokračuje s interferenčně zakódovanou informací přes druhé okénko (E') do detektoru (G) a k dalšímu zpracování do počítače. Při měření jsme používali dva detektory – MCT (Mercury Cadmium Tellurid) fotokonduktivní detektor chlazený tekutým dusíkem, který se vyznačuje rychlou odezvou a vysokou citlivostí; a DTGS (Deuteraterovaný Tri Glycine Sulfátový pyroelektrický detektor, méně citlivý než MCT detektor. Software použitý pro nastavení přístroje, kontrolu měření a zobrazení naměřených dat byl *OPUS* – software dodaný výrobcem.

Pro měření infračervených spekter byla používána skládací kalciumfluoridová kyveta od Chevtchenko Optics s optickou dráhou 6 μm. Při teplotních měřeních byla kyveta vložena do teplotní cely BioJack™ (BioTools) spojené s externí teplotní lázní Neslab RTE7 od Thermo Scientific.

Pro měření FTIR-ATR byl použit nástavec v horizontálním jednodrazovém ATR uspořádání užívající diamant MIRacle™ AG od firmy PIKE Technologies.

4.4. Aparatura pro měření elektronového cirkulárního dichroismu

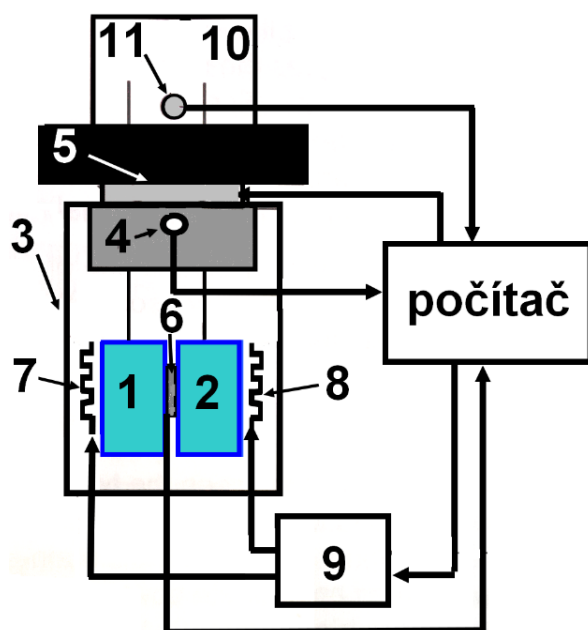
CD spektra byla měřena spektropolarimetrem *Jasco J-815* na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (obrázek 4.5). Jako zdroj záření slouží vzduchem chlazená 150 W xenonová lampa produkující záření v oblasti UV i viditelného záření (163–900 nm). Záření je spektrálně rozloženo a polarizováno odrazem pod Brewsterovým úhlem na dvojitém hranolovém monochromátoru. Konečná polarizace je doladěna průchodem polarizačním filtrem. Lineárně polarizované světlo je dále modulováno střídavě na pravo- a levo-točivé cirkulárně polarizované pomocí fotoelastického modulátoru (PEM). Po průchodu chirálním vzorkem dojde z důvodu různé absorpce pro obě polarizace k modulaci intenzity, která je zaznamenávána fotonásobičem a tento signál je dále zpracováván počítačem.



Obrázek 4.5. Schematický náčrt použitého CD spektropolarimetru.

4.5. Aparatura pro kalorimetrická měření

Pro kalorimetrické měření byl použit přístroj *Nano-Differential Scanning Calorimeter II* od firmy Calorimetry Sciences Corp. (CSC). Jedná se o skenovací kalorimetr schopný určovat teplotní kapacitu tekutých vzorků v širokém teplotním rozmezí (obrázek 4.6).



Obrázek 4.6. Schematický náčrt aparatury pro skenovací diferenciální kalorimetrii. Podrobný popis a vysvětlení značek následuje v textu pod obrázkem.

Ke kontrole teplotních změn měřících komor (1 a 2) slouží teplotní cely (3), které jsou chlazeny/zahřívány konstantní rychlostí. Celý proces je řízen počítačem, který porovnává hodnoty z platinového odporového teploměru (4) uvnitř kalorimetrického bloku s teoretickými hodnotami a podle toho nastavuje proud na Peltierově článku (5). Přes digitálně/analogový převodník tak má počítač přímou lineární kontrolu teploty cely. Maximální rychlost ohřevu jsou $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ za minutu. Jako senzory teplotních rozdílů jsou využívány polovodičové termoelektrické baterie (6) a jejichž signál je amplifikován a veden do kontrolní jednotky v počítači. Rozdíl teplot obou kalorimetrických komor se udržuje téměř nulový pomocí elektrických topných těles (7 a 8), která jsou v kontaktu přímo s komorami a jsou kontrolovány zpětným algoritmem a kompenzačními můstky (9).

Před měření je nastavený dostatečný přetlak, aby nedocházelo k vytváření bublin/varu při zahřívání na vysoké teploty. Tlak je nastavován manostatem (10) a v komoře měřen piezoelektrickým senzorem (11). Přetlak kolem 3 atmosfér bývá dostačující pro vodné roztoky a byl použit i pro měření během naší práce.

4.6. Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza probíhala ve vertikálním uspořádání (obrázek 4.7) na systému *Mini-Protean® 3 Cell* od firmy BIO-RAD. 10% gely pro SDS-PAGE byly připraveny standardní procedurou (U.K. LAEMMLI, 1970). 10% separační gel byl připraven smícháním následujících komponent:

2,5 ml 30% akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) + 1,87 ml 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) + 75 μ l 10% SDS + 3 ml H₂O + 45 μ l 10% persulfátu amonného + 4,5 μ l TEMED.

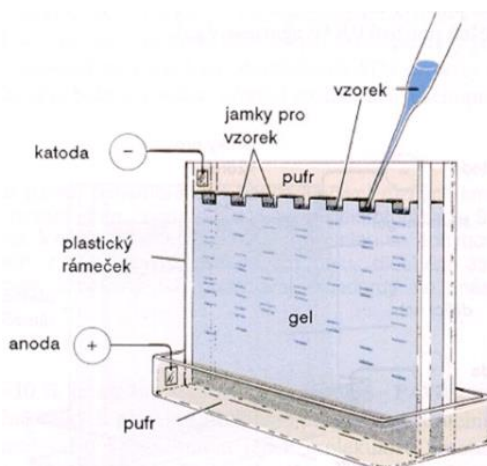
Po zatuhnutí byl tento gel převrstven 5 % startovacím gelem připraveným smícháním složek:

0,5 ml 30% akrylamid/bisakrylamid (37,5:1) + 0,93 ml 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) + 37,5 μ l 10% SDS + 2,25 ml H₂O + 45 μ l 10% persulfátu amonného + 4,5 μ l TEMED.

Jako elektrodový pufr byl použit 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glycin, 0,1 % SDS, vzorkový pufr se skládal z 60 mM Tris-HCl (pH 6,8), 25 % glycerol, 2 % SDS, 14,4 mM β -merkaptoetanol, 0,1 % bromfenolová modř.

Po proběhnutí experimentu byl výsledný gel obarven barvicím roztokem modři Coomassie R-250, 45 % MeOH, 10 % ledové kyseliny octové a odbarven odbarvovacím roztokem 10 % MeOH, 10 % ledové kyseliny octové.

Jako standardy byly použity proteinové mixy od Serva Electrophoresis, cat. No. 39209 Protein MIX 5 (6 500 Da trypsinový inhibitor z hovězích plic, 12 500 Da cytochrom C, 21 000 Da sojový tripsinový inhibitor) a cat. No. 39208 Protein MIX 4 (29 000 Da karbonová anhydráza, 45 000 Da vaječný albumin, 67 000 Da hovězí albumin, 97 400 Da fosforyláza).



Obrázek 4.7. Experimentální uspořádání elektroforézy. (Převzato z (D. Voet a J.G. Voetová, 1995).)

5. Výsledky měření

Měření probíhalo na třech různých vzorcích připravených Dr. J. Snášelem na ÚOCHB AV ČR. Konkrétně se jednalo o myší ankyrinovou doménu RNasy L (kapitola 2.1.1), C-terminální část lidské fosfodiesterázy 12 a následně celou lidskou fosfodiesterázu 12 (kapitola 2.1.2). Všechny tři zorky byly pokaždé i s příslušnými pufrý převezeny na MFF UK a bez zamražení co nejrychleji (v rámci dní) přeměřeny, aby se co nejvíce zamezilo možnosti degradace potenciálně nestabilních vzorků. Původní zásobní roztoky proteinů i s příslušnými pufrý byly uchovávány v lednici při 4°C a byla odebírána pouze množství potřebná pro aktuální měření.

Jako první bylo třeba ve všech případech zjistit, jak je protein stabilní a ověřit jeho čistotu a velikost. K tomu posloužil dynamický rozptyl, v případě nejistoty ohledně čistoty vzorku byla jako doplňující metoda provedena SDS gelová elektroforéza. Následně byl vzorek podroben studiu pomocí infračervené spektroskopie, Ramanovy spektroskopie a spektroskopie elektronového cirkulárního dichroismu, z jejichž analýzy se dají získat informace o struktuře proteinů. Doplňující informace o proteinu byla v jednom případě zjištěna i pomocí mikrokolorimetrie.

Na počátku každé podkapitolky se v odstavci s názvem „Primární sekvence“ nachází analýza primární sekvence provedená pomocí webového nástroje *ProtParam* (G. E., a kol., 2005) na stránkách *ExpPASy* (www.expasy.org).

5.1. Myší ankyrinová doména RNasy L

Jak bylo uvedeno ve druhé kapitole, o struktuře lidské RNasy L se toho ví již relativně dosti. Nicméně, při vývoji léčiv se často jako modelový systém používají myši a proto je vhodné znát strukturní podobnosti těchto dvou enzymů. Protože se ankyrinová doména zdá být důležitou regulační oblastí RNasy L, zaměřila se první část této práce právě na ni.

5.1.1. Příprava vzorku

Vzorek byl připraven Dr. Snášelem na ÚOCHB AV ČR pomocí myší cDNA knihovny. Z ní byl pomocí vhodně navržených primerů a metody PCR vyklonován úsek zahrnující gen pro ankyrinovou doménu RNasy L. Ten byl poté vložen do vektoru pET 15b (Novagen), naštěpeného pomocí restrikčních endonukleáz NdeI a HindIII (New England Biolabs), který slouží pro expresi rekombinantních proteinů s His₆-kotvou na N-konci a vpraven do produkčních buněk BL21(DE3) kmene bakterií *Escherichia coli*. Bakterie byly kultivovány při 30 °C 12 hodin v Luria-Bertani médiu a poté byl přidán induktor isopropyl thiogalactopyranosid (IPTG) v koncentraci 1mM a teplota snížena na 20 °C po dobu 24 hodin. Napěstované bakterie byly centrifugovány při 5 000 g. Pelet bakterií byl rozsuspendován v pufru (20 mM Tris,

pH 7,4, 500 mM NaCl), byl přidán lysozym pro degradaci buněčných stěn, následovala krátká a intenzivní sonikace a centrifugace při 20 000 g. Supernatant se nanasle na afinitní kolonu s náplní Talon (Clontech), která obsahovala navázané kobaltové částice a elucí gradientem imidazolu se získal rekombinantní protein s His₆-kotvou v dostatečné čistotě na spektroskopická měření. His₆-kotva je projektovaná tak, aby se dala proteolyticky odstranit pomocí thrombinu, nicméně u tohoto vzorku se její odstranění nezdařilo. To může být způsobeno prostorovým „zabalením“ kotvy uvnitř proteinové struktury.

Vzorek byl dodán v koncentraci 2,5 mg/ml a 5 mg/ml v pufru 20 mM Tris + 50 mM NaCl, pH 7,4. Koncentrace proteinu byla stanovena metodou dle Bradforda (Bradford, 1976). Na dně dodaných plastových mikrozkuvek se vzorky se však záhy vytvořil bílý precipitát. Protože nebylo zřejmé, zda vzorek snese zamražení či jak je v čase stabilní, část vzorku byla na zkoušku zamrazena a část vzorku uchována v lednici při 4 °C.

5.1.2. Primární sekvence vzorku ankyrinové domény

```

      10           20           30           40           50           60
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH METPDYNTPO GGTPSAGSQR TVVEDDSSLI KAVQKGDVVR
      70           80           90           100          110          120
VQQLLEKGDAD ANACEDTWGW TPLHNAVQAG RVDIVNLLLS HGADPHRRKK NGATPFIIAG
      130          140          150          160          170          180
IQGDVKLLEI LLSCGADVNE CDENGFTAFM EAAERGNAAE LRFLFAKGAN VNLRRQTTKD
      190          200          210          220          230          240
KRRLKQGGAT ALMSAAEKGH LEVLRILLND MKAEVDARDN MGRNALIRTL LNWDCEENVEE
      250          260          270          280          290          300
ITSILIQHGA DVNVRGERGK TPLIAAVERK HTGLVQMLLS REGINIDARD NEGKTALLIA
      310          320
VDKQLKEIVQ LLEKGDADK DDLVW

```

Jednotlivá písmena značí zkratky aminokyselinových zbytků, čísla udávají pořadí aminokyseliny směrem od jejího N-konce. Tučně vyznačená část na počátku značí histidinovou kotvu se štěpícím místem pro thrombin, která nepatří k nativní sekvenci proteinu a která pomáhá při afinitní purifikaci.

Celkový počet aminokyselinových zbytků (i s histidinovou kotvou) je 325, celková molekulová váha činí 35 508,2 Da (z toho 2 181,3 Da tvoří kotva), teoretické pI je 6,23. Počet jednotlivých aminokyselinových zbytků v řetězci a jejich celkové procentuální zastoupení udává Tabulka 5.1. Z té mimo jiné vyplývá, že celkový počet kladně nabitých aminokyselin je 40, záporně nabitých 45. Předpokládaný poločas

života proteinu v produkovaných buňkách *E. coli* udávaný programem ProtParam je 10 hodin.

Tabulka 5.1. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v myši ankyrinové doméně RNasy L s histidinovou kotvou. Červená barva vyznačuje pro strukturu důležité cysteinové zbytky. Modrá barva zvýrazňuje zbytky s aromatickým kruhem, které vytváří v Ramanových spektrech výrazné pásy.

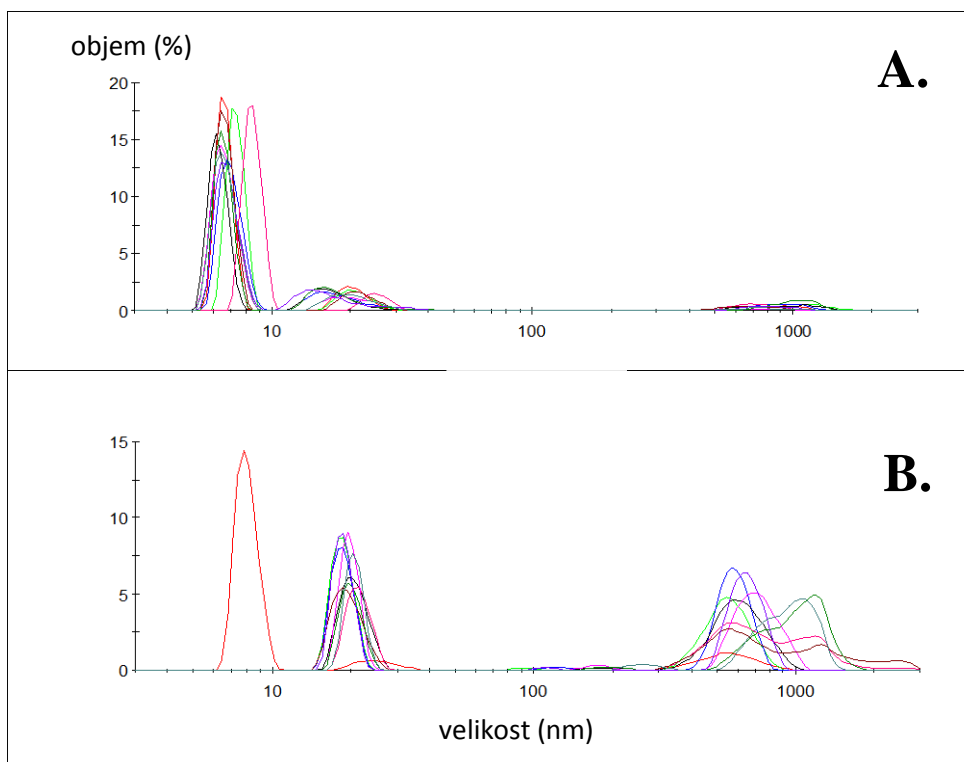
residuum	počet	procent	residuum	počet	procent
Ala (A)	32	9.8%	Gln (Q)	13	4.0%
Arg (R)	21	6.5%	Glu (E)	22	6.8%
Asn (N)	18	5.5%	Gly (G)	29	8.9%
Asp (D)	23	7.1%	His (H)	13	4.0%
Cys (C)	5	1.5%	Ile (I)	16	4.9%
Leu (L)	36	11.1%	Ser (S)	14	4.3%
Lys (K)	19	5.8%	Thr (T)	16	4.9%
Met (M)	7	2.2%	Trp (W)	4	1.2%
Phe (F)	5	1.5%	Tyr (Y)	1	0.3%
Pro (P)	8	2.5%	Val (V)	23	7.1%

5.1.3. Dynamický rozptyl

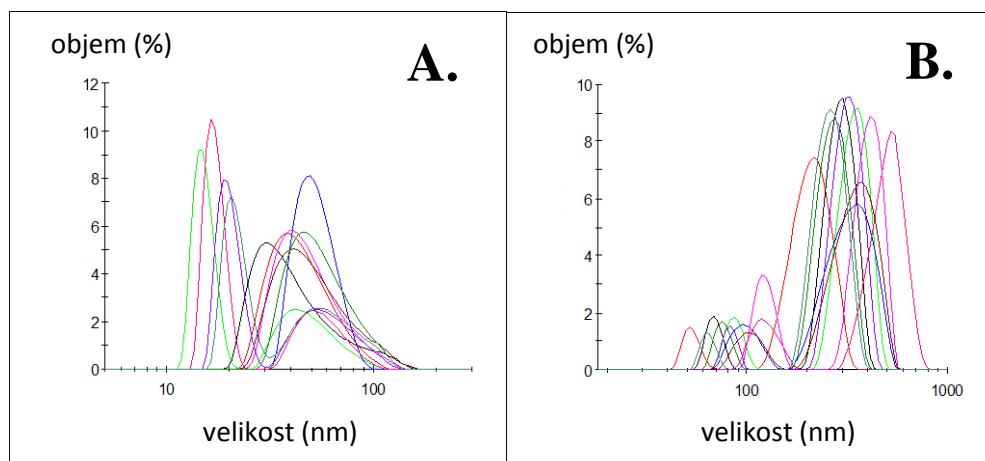
Pro určení stability, velikosti a polydisperzity vzorku byl nejprve změřen dynamický rozptyl. 100 μ l vzorku o koncentraci 1 mg/ml bylo 2 \times za sebou přefiltrováno centrifugačním filtrem ULTRA FREE-MC od Milliporu (filtr z duraporu UFC 30V00) s velikost pórů 0,1 μ m. Během přípravy vzorku byly všechny nástroje (pipety, špičky, kyveta) ofukovány stlačeným vzduchem, aby se maximálně zamezilo kontaminaci vzorku prachovými částicemi. Měření probíhalo při 20 °C s 5 minutami ustálení vzorku před měřením a sběrem dat každých 2 a čtvrt minuty.

Pro porovnání vlivu zamražení na stabilitu vzorku bylo měření provedeno pro vzorek uchovávaný pouze při 4 °C a pro vzorek původně zamražený. Jak je patrné z rozložení velikosti částic v závislosti na objemu ze vzorku, který zaujímají (graf 5.1) i z programem vypočtených Z-průměrů (viz kapitola 3.1.1, vzorec 3.4), vzorek v obou případech obsahoval velké množství na protein příliš velkých částic, které naznačovalo, že je vzorek buď znečištěn prachovými částicemi, nebo prochází značnou agregací. I přes to byl softwarem nalezen, v případě vzorku původně nezamraženého, pás odpovídající proteinu o molekulární hmotnosti 301 kDa (podle kapitoly 5.1.2 to značí tvorbu 9-merů) s relativní polydisperzitou 10 %, což znamená vysoce monodisperzní protein, který tvořil 81 % objemu celého polydisperzního

vzorku. V případě vzorku zamraženého nebyl nalezen žádný pás odpovídající proteinu a vzorek byl vyhodnocen jako 100 % polydisperzní.

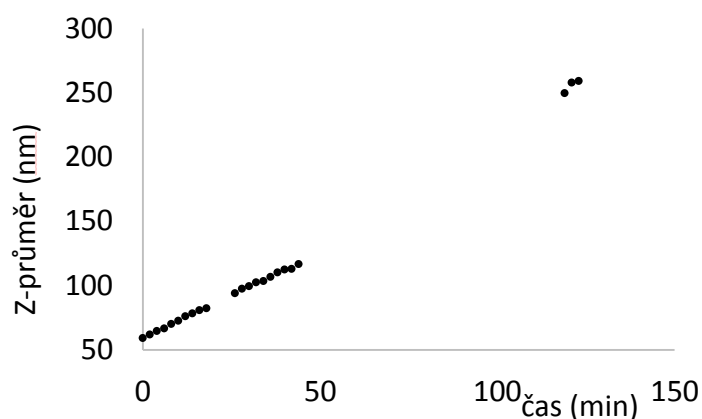


Graf 5.1. Rozložení velikosti částic v závislosti na jejich objemu po filtrování filtrem s póry 0,1 μm . A. Vzorek uchovávan při 4 $^{\circ}\text{C}$. B. Vzorek uchovávan v zamražené formě. (Grafy jsou přímým výstupem programu Zetasizer Software)



Graf 5.2. Rozložení velikosti částic v závislosti na jejich objemu po filtrování filtrem s póry 0,02 μm . A. Vzorek uchovávan při 4 $^{\circ}\text{C}$. B. Vzorek uchovávan v zamražené formě. (Grafy jsou přímým výstupem programu Zetasizer Software)

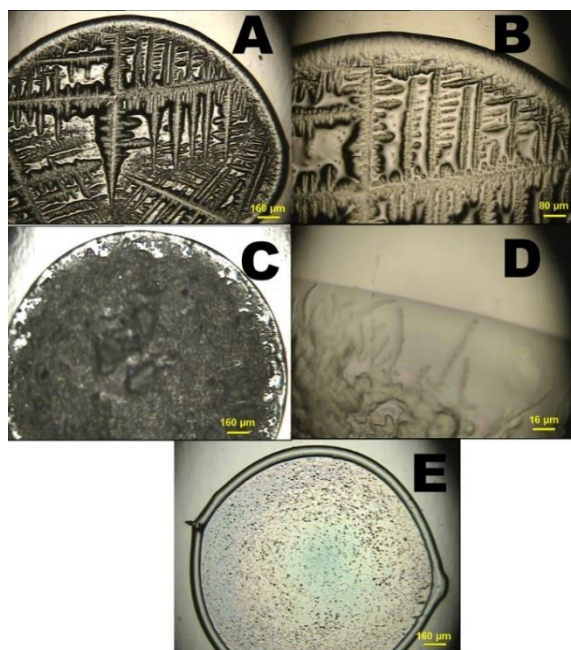
Vzorek byl opět 2× přefiltrován stříkačkovým filtrem Anatop s velikostí pórů 0,02 μm a měření bylo provedeno znovu. Z výsledných grafů (graf 5.2) v porovnání s grafy předchozími (graf 5.1) je zřejmé, že i přes přefiltrování vzorku přes filtr s menšími póry se distribuce částic posunula směrem k vyšším hodnotám. Ani v jednom z obou případů nebyl rozpoznán žádný pás patřící proteinu. Polydisperzita byla určena jako 100%. Z těchto měření vyplývá jednoznačný závěr, že vzorek je v čase při pokojové teplotě nestabilní a agreguje (graf 5.3). Zamrazování navíc agregaci urychluje.



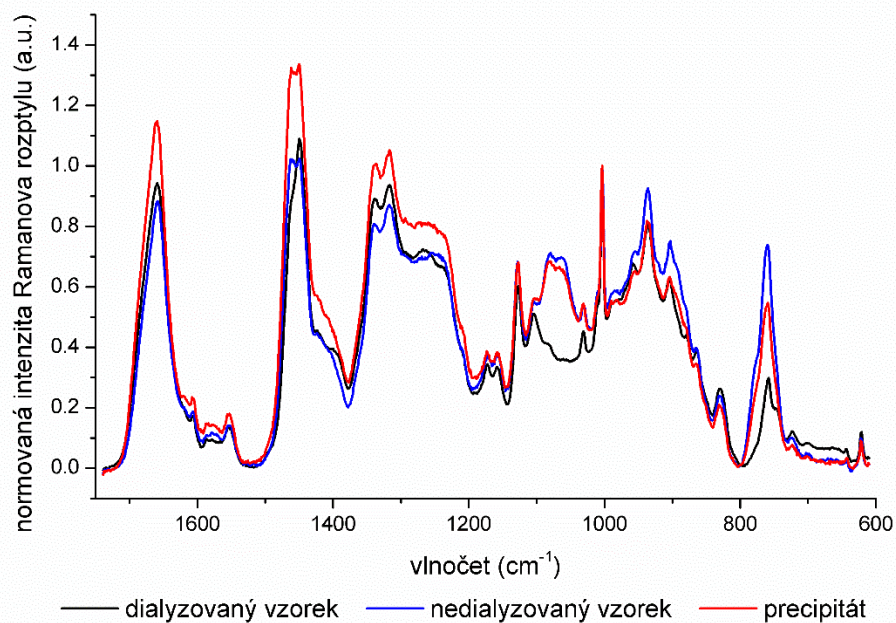
Graf 5.3: Vývoj Z-průměru ankyrinové domény myší RNasy L v čase. Data jsou ukázána pro vzorek uchovávaný při 4 °C po filtraci filtrem s póry 0,02 μm .

5.1.4. Ramanova spektroskopie

Přestože dynamický rozptyl ukázal, že vzorek je velmi nestabilní a agreguje ve velké oligomery v časovém horizontu desítek minut až hodin, proběhl souběžně první pokus o náhled do struktury proteinu pomocí Ramanovy spektroskopie. Byla zvolena metoda Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (viz kapitola 3.2.2) za užití konfokálního Ramanova mikrospektrometru (viz kapitola 4.2.2). Pro porovnání byl vzorek prozkoumán ve třech formách (obrázek 5.1) – vzorek v pufru o koncentraci 2,5 mg/ml, precipitát a vzorek o koncentraci 2,5mg/ml zbavený pufru – dialyzovaný. Dialýza probíhala oproti deionizované vodě přes filtr VSWP O1300 od firmy Millipore s velikostí pórů 0,025 μm po dobu 20 minut. Pro toto měření byla použita mřížka s 600 vrypů/mm, střed spektra zobrazený mřížkou na CCD čip byl nastaven na 1200 cm^{-1} a velikost konfokální štěrbině na 400 μm . Doba expozice byla 10 s, přičemž spektra se akumulovala 120×. Následné zpracování dat zahrnovalo odečet lineárního pozadí a pro snazší porovnání byla všechna spektra znormována na pás Phe 1003 cm^{-1} .



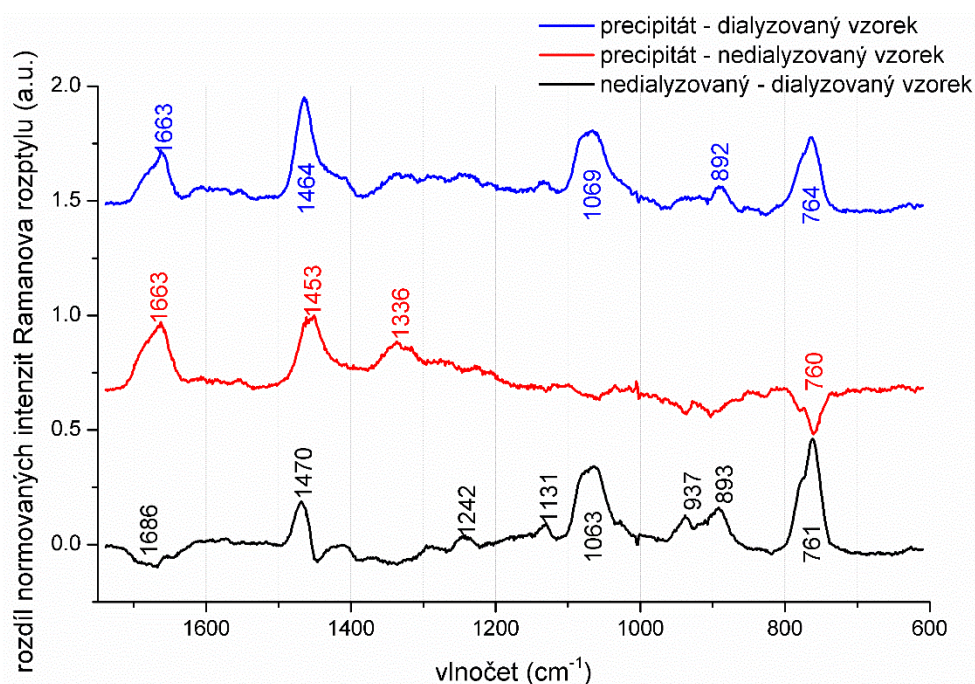
Obrázek 5.1. Fotografie prstenců vzorků myší ankyrinové domény RNasy L připravených metodou kapkově nanášených povlaků. A, B) Nodialyzovaný vzorek při zvětšení $5\times$ a $10\times$. Uvnitř prstence jsou patrné krystaly soli. C, D) Precipitát zvětšen $5\times$ a $50\times$. Uvnitř prstence jsou natolik vysoké útvary, že již rozostřují obraz. E) Dialyzovaný vzorek zvětšen $5\times$. Uvnitř prstence se nenachází krystaly soli a okraj prstence tvořený proteinem je zcela hladký.



Graf 5.4. Porovnání DCDR spekter vzorku myší ankyrinové domény RNasy L. Kapkově nanášený povlak byl vytvořen z dialyzovaného vzorku bez pufru, nedialyzovaného vzorku v pufru a precipitátu v pufru.

Již na první pohled je z grafu 5.4 patrné, že přítomnost pufru ve vysychajícím vzorku způsobuje změny ve spektru. Tyto změny mohou být způsobeny přítomností složek pufru v zakoncentrovaném proteinu nebo změnou konformace proteinu při zasychání v přítomnosti pufru a bez něj. (Přestože v ideálním případě by měl být pufr od proteinu oddělen díky metodě kapkově nanášených povrchů, v praxi se dá předpokládat, že se mohou ve spektru objevovat i pásy pufru). S velkou pravděpodobností jde v našem případě o kombinaci obou těchto jevů.

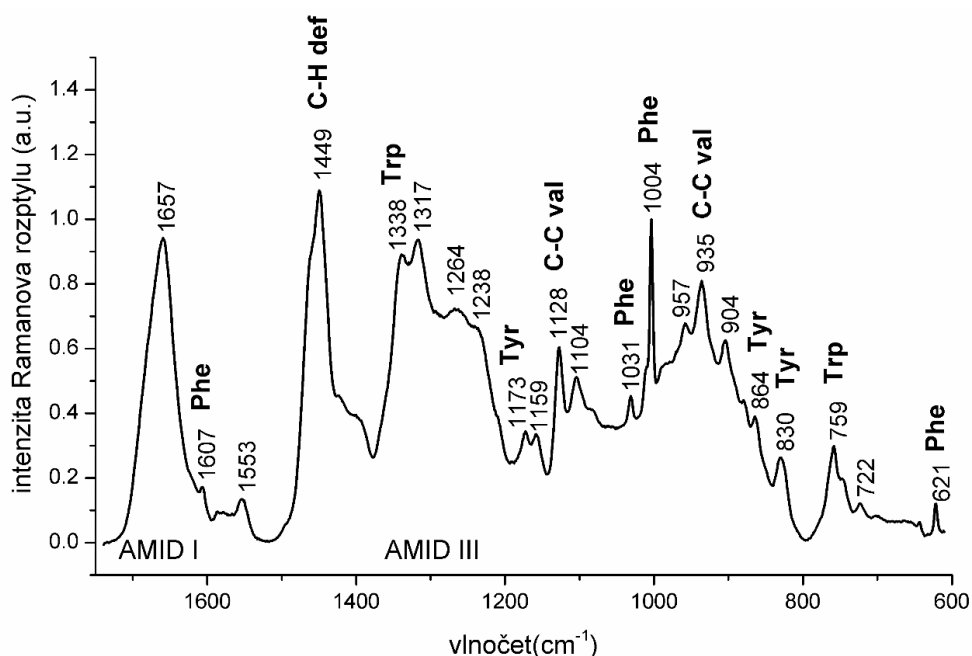
To, že v našich vzorcích připravených metodou kapkově nanášených povrchů přece jenom vidíme i vibrace patřící pufru je patrné z rozdílů spekter vynesných v grafu 5.5. Předpokládejme, že po dialýze v dialyzovaném vzorku už opravdu vibrace pufru nevidíme. Při pohledu na rozdíl spekter vzorku dialyzovaného a nedialyzovaného vidíme výrazný široký pás mezi 1100 a 1000 cm^{-1} s vrcholem v 1063 cm^{-1} . Tento pás vidíme i v rozdílovém spektru precipitátu a dialyzovaného vzorku, tedy opět tam, kde bychom čekali pás od pufru, pokud by se tam nějaký měl vyskytovat. Jak bylo napsáno v kapitole 5.1.1, pro měření byl použit pufr 20mM Tris + 50mM NaCl. Tris, svým systematickým názvem 2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol, obsahuje hned tři satureované primární alkoholové skupiny, jejichž C–O valenčním vibracím patří silné pásy v oblasti 1090–1000 cm^{-1} . Druhý slabší pás se vyskytuje mezi 900–800 cm^{-1} díky C–C–O valenčním vibracím. I tento pás je vidět v obou výše zmíněných případech. Ani jeden z těchto pásů nevidíme v rozdílu spekter precipitátu a nedialyzovaného vzorku, neboť v obou se pufr může vyskytovat a proto se pásy odečtou.



Graf 5.5. Rozdíl DCDR spekter vzorku myši ankyrinové domény RNasy L.

Kromě toho je ovšem z grafu 5.5 po bližším prozkoumání patrná další skutečnost – z rozdílu spektra precipitátu a nedialyzovaného vzorku můžeme rovnou pozorovat oblasti, ve kterých může docházet díky precipitaci ke změnám. Je to především nárůst v oblasti pásu amidu I na 1663 cm^{-1} , který odpovídá nárůstu množství β -skládaných listů případně neuspořádané struktury, dále nárůst intenzity pásu okolo 1453 cm^{-1} (odpovídajícímu oblasti C–H deformačních vibrací) a konečně poklesu pásu kolem 760 cm^{-1} . Tento pás u proteinů souvisí s dýchacími vibracemi Trp. Jeho intenzita klesá při vystavení Trp dříve hluboko zanořených v hydrofobní struktuře proteinu hydrofilnímu prostředí, například při změně terciární struktury (E. Li-Chan, a kol., 2011). V tomto případě ale vzhledem k průběhu jeho intenzity v dalších rozdílových spektrech, se spíše zdá, že je Trp-pás překryt pásem pufru a opravdový vývoj Trp spolehlivě nevidíme.

Porovnáním rozdílového spektra precipitátu s dialyzovaným vzorkem a nedialyzovaného vzorku s dialyzovaným můžeme vyřadit pásy pravděpodobně patřící pufru – jsou to výše popsané pásy. Poté je ale z rozdílu spektra nedialyzovaného a dialyzovaného vzorku zřejmé, že nestačí pufr pouze odečíst. Přítomnost pufru na destičce způsobuje změny v některých vibracích čistého proteinu, i když v tomto případě pouze nepatrné. Proto jsem se pro další rozbor spektra Ramanova rozptylu ankyrinové domény (graf 5.6) rozhodla použít pouze vzorek dialyzovaný, který není ovlivněn přítomností pufru.



Graf 5.6. DCDR spektrum dialyzovaného vzorku myši ankyrinové domény RNasy L.

V grafu 5.6 jsou popsány typické pásy vibrací proteinů (G. Socrates, 2001; R. Tuma, 2005), patřící převážně peptidové páteři a vibracím aminokyselinových zbytků s aromatickým kruhem v postranním řetězci. Dle polohy pásu amidu I se dá odhadovat složení sekundární struktury v blízkých poměrech α -helixů a β -skládaných listů. Z poměru tyrozinových pásů Fermiho rezonančního dubletu dle vzorce (3.10), který vychází 1,5, vyplývá, že jediný tyrosin se zřejmě chová jako donor i akceptor vodíkových vazeb a tudíž nebude zanořen uvnitř struktury proteinu. Pás Trp na 1360 cm^{-1} není pozorovatelný (což se stává často), nicméně se dá se usoudit, že poměr intenzit Trp dubletu (3.11) bude malý. To naznačuje vystavení tryptofanů hydrofilnímu prostředí, neboť to znamená, že se účastní tvorby vodíkových můstků.

Pro všechna tři naměřená spektra bylo spočítáno zastoupení jednotlivých motivů v sekundární struktuře (pro popis úpravy spekter a popis procedur – viz kapitola 3.7.2) pomocí tří dříve popsaných metod LSA, RIP3 a RIP4 pro zpracování pásu amidu I a metody LSA pro zpracování pásu amid III. Výsledky jsou zapsány v tabulce 5.2, 5.3 a 5.4.

Tabulky 5.2, 5.3, 5.4. Výsledky rozboru sekundární struktury myší ANK domény myší RNasy L ze spekter Ramanova rozptylu získaných metodou DCDR ze tří různých modifikací vzorku – vzorek dialyzovaný, vzorek v pufru a precipitát.

Tabulka 5.2. ANK doména myší RNasy L – dialyzovaná (DCDR)				
Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix (celkem)	35 ± 5	32 ± 3	37 ± 3	46 ± 5
α -helix (uspořádaný)	18 ± 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	17 ± 4	—	—	—
β -listy	32 ± 4	30 ± 3	29 ± 3	29 ± 6
β -otočky	18 ± 2	—	—	17 ± 5
neuspořádaný	12 ± 2	38 ± 3	35 ± 3	7 ± 4
celkem rozpoznáno	97	100	100	100
nerozpoznáno	3	0	0	0

Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	38 \pm 5	37 \pm 3	39 \pm 3	43 \pm 5
α -helix (uspořádaný)	20 \pm 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	18 \pm 4	—	—	—
β -listy	29 \pm 4	27 \pm 3	25 \pm 3	32 \pm 6
β -otočky	18 \pm 2	—	—	18 \pm 5
neuspořádaný	13 \pm 2	39 \pm 3	35 \pm 3	7 \pm 4
celkem rozpoznáno	97	100	100	100
nerozpoznáno	3	0	0	0

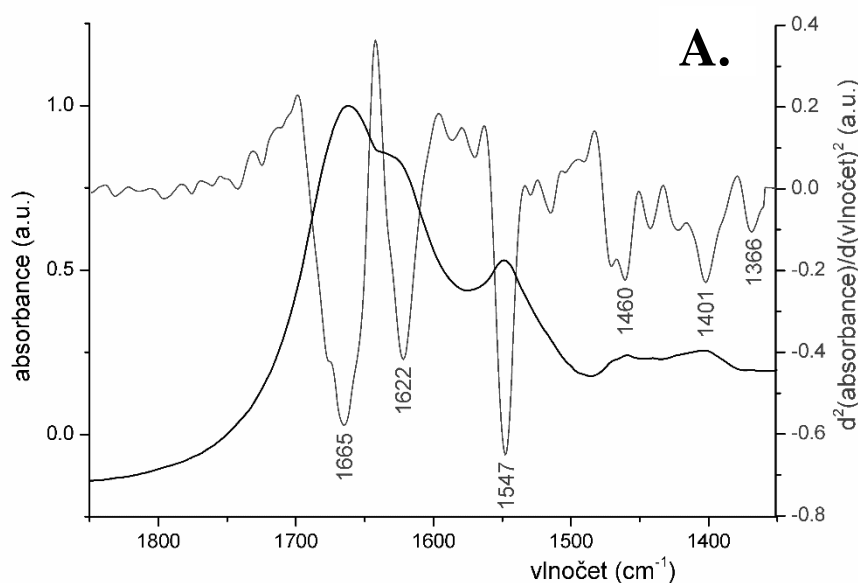
Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	34 \pm 5	25 \pm 3	30 \pm 3	44 \pm 5
α -helix (uspořádaný)	18 \pm 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	16 \pm 4	—	—	—
β -listy	34 \pm 4	31 \pm 3	29 \pm 3	30 \pm 6
β -otočky	18 \pm 2	—	—	18 \pm 5
neuspořádaný	12 \pm 2	45 \pm 3	40 \pm 3	7 \pm 4
celkem rozpoznáno	98	100	100	100
nerozpoznáno	2	0	0	0

Podle počtu procent nerozpoznané struktury můžeme usoudit, že metoda LSA byla velice úspěšná (za rozumný se dá pokládat fit, který nerozpozná až 10 % struktury). Na výsledky se dá tedy s velkou přesností spolehnout a při porovnání výsledků této metody pro všechny tři typy přípravy vzorku pro DCDR měření vidíme, že se v rámci svých chyb shodují. Shoda v rámci chyb panuje i mezi ostatními způsoby fitování. Horší shodu (hlavně v určení α -helixů) s ostatními metodami vykazuje metoda LSA aplikovaná na pás amidu III.

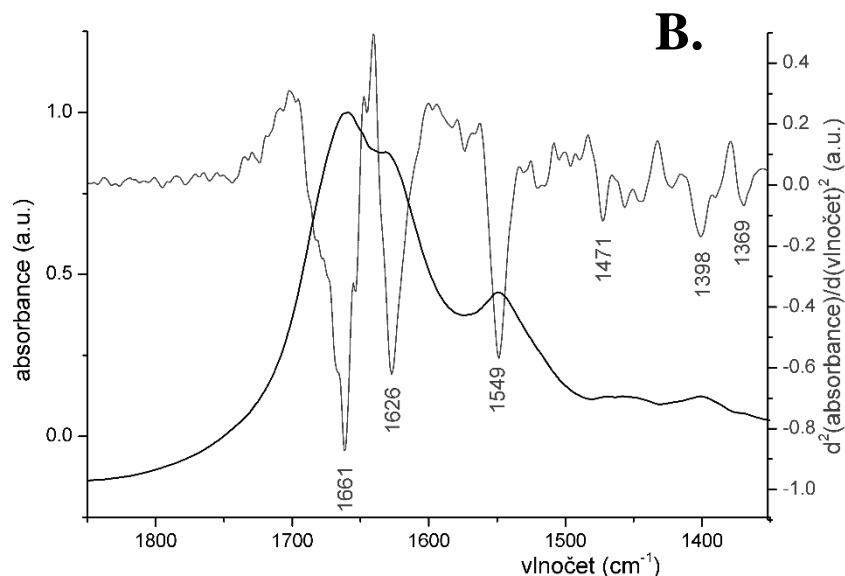
Struktura je tedy z asi 35 % tvořena α -helixy a kolem 30 % β -skládanými listy, necelých 20 % tvoří β -otočky a zbytek neuspořádaná struktura, bez ohledu na variantu přípravy měřeného vzorku. Přítomnost α -helixů v takové míře by mohla naznačovat, že velká nestabilita proteinu a jeho ochota velmi rychle se „srážet“ nesouvisí s denaturací a se změnami v sekundární struktuře s ní spojenými (viz tabulka 5.2 a 5.4), ale spíše s vysokou afinitou ankyrinových domén k jiným ankyrinovým doménám (viz kapitola 1.1), což by mohlo vést k vysrážení vzorku při většinovém zachování sekundární struktury.

5.1.5. Infračervená spektroskopie

Zároveň s měřeními Ramanova rozptylu proběhla i měření FTIR spekter myší ANK domény RNasy L, a to za pokojové teploty ve třech různých „koncentracích“ – 2.5 mg/ml, 5 mg/ml a precipitát. Měření probíhalo na přístroji VECTOR 33 popsaném v kapitole 4.3. Pro toto měření byl použit MCT detektor chlazený dusíkem, rozsah sběru spektra byl nastaven na 600–4000 cm^{-1} , rozlišení 2 cm^{-1} , počet skenů 4000 a rychlost skenování 35,0 kHz. Stroj byl po celou dobu měření profukován sušeným vzduchem. Před měřením byla atmosféra ve vzorkovém prostoru ponechána po dobu 10 minut k ustálení (k odstranění vlhkosti profukováním). Původně byla k měření vyzkoušena CaF_2 -kyveta s pevnou optickou dráhou od firmy Graseby-Specac s Mylarovou distanční vložkou o tloušťce 6 μm , ta byla ale záhy z praktických důvodů vyměněna za rozkládací CaF_2 -kyvetu se zabroušeným vzorkovým prostorem s optickou dráhou 6 μm od Chevtchenko Optics. Každé měření proběhlo při zadaných podmínkách nejprve pro pufr a poté pro samotný vzorek proteinu v pufru rozpuštěný. Následně byl pufr od vzorku odečten pomocí programu *Grams* (Thermo Galactic) a byla provedena druhá derivace spektra s vyhlazením pomocí Savitzky-Golayova filtru (viz kapitola 3.7.2) s polynomem 2. stupně přes 19 bodů



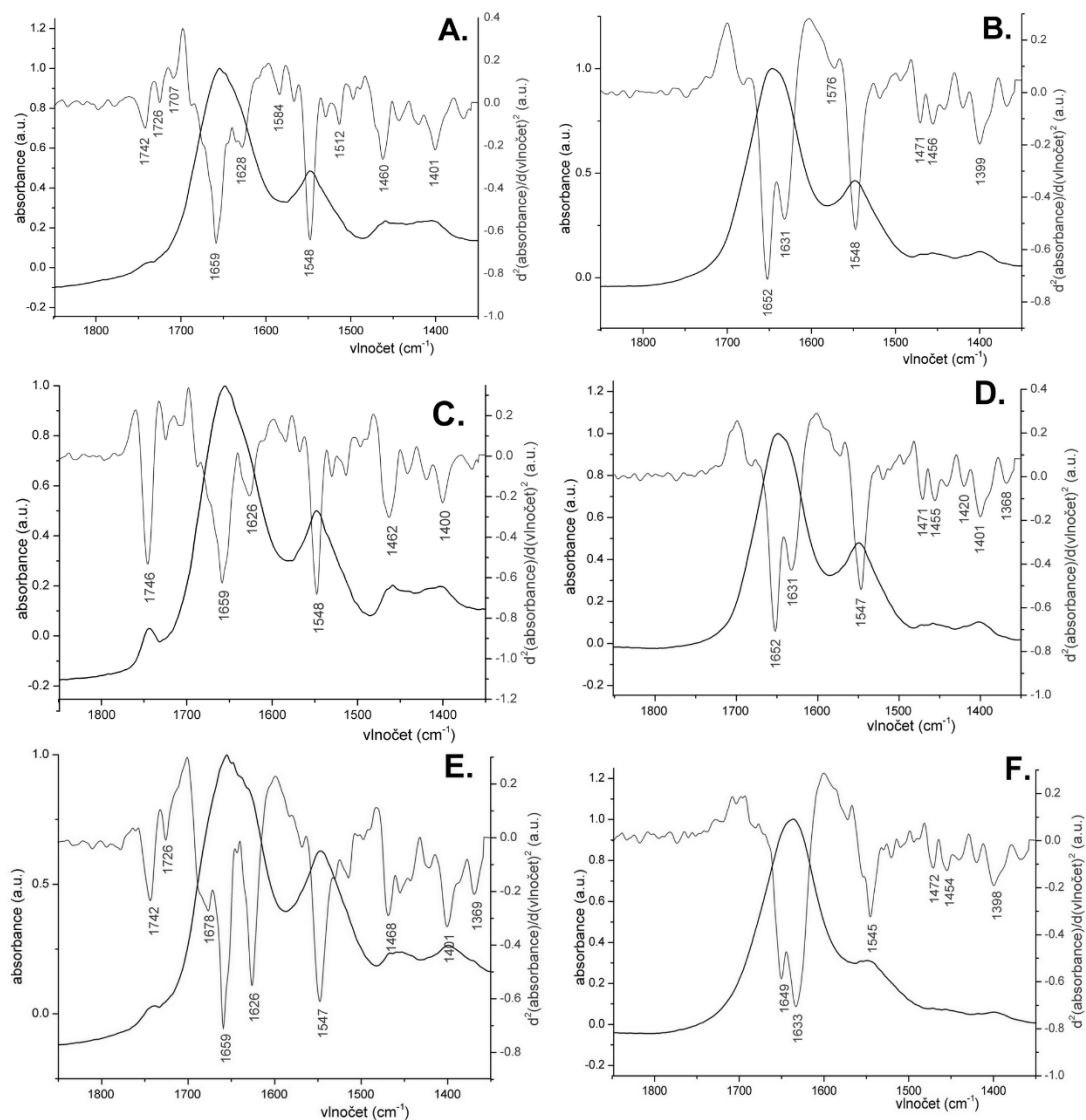
Graf 5.7. A) Infračervená absorpční spektra ANK domény myší RNasy L ve dvou různých koncentracích. Koncentrace proteinu 5 mg/ml. Černá křivka znázorňuje naměřená infračervená spektra, šedá odpovídá jejich druhé derivaci.



Graf 5.7. B) Infračervená absorpční spektra ANK domény myší RNasy L ve dvou různých koncentracích. Koncentrace 2,5 mg/ml. Černá křivka znázorňuje naměřená infračervená spektra, šedá odpovídá jejich druhé derivaci.

Z grafu 5.7 je patrné, že koncentrace 2,5 mg/ml je pro měření již dostatečná, některé vibrace jsou ale díky nižší koncentraci hůře pozorovatelné. Koncentrace 5 mg/ml tak poskytuje spektrum informačně bohatší. Zároveň je v obou případech z výrazného pásu kolem 1625 patrné, že vzorek oligomerizuje – vytváří se mezimolekulární β -skládané listy (Barth, 2007).

Jak již bylo popsáno v kapitole o měření dynamického rozptylu, vzorek ANK domény se velmi rychle srážel. V zásobních mikrozkušavkách bylo dokonce možné na dně nalézt bílý precipitát. Proto bylo provedeno měření infračervené absorbance tří forem vzorku o koncentraci 5 mg/ml. Jako první byl vzorek odebrán z čiré části zásobního roztoku v mikrozkušavce, dále byl odebrán precipitát a nakonec byl odebrán vzorek z mikrozkušavky těsně po protřepání. Všechny tyto případy byly proměřeny FTIR spektroskopii v transmisním i ATR uspořádání. Výsledná zpracovaná data jsou vykreslena v grafech 5.8. Nastavení přístroje bylo stejné, jak je popsáno na začátku této kapitoly.



Graf 5.8. Spektra myši ANK domény RNasy L získané transmisí FTIR metodou a ATR-FTIR metodou. *A)* Vzorek odebraný z nerozmíchané čiré části ze zásobní zkumavky změřen v transmisním módu. *B)* Vzorek popsán v *A* změřen ATR metodou. *C)* Vzorek odebraný ze zásobní zkumavky po protřepání změřen transmisí. *D)* Vzorek popsán v *C*. změřen ATR metodou. *E)* Pracipitát změřen v transmisí. *F)* Vzorek popsán v *E* změřen ATR metodou. Černá křivka znázorňuje změřená infračervená spektra, šedá odpovídá jejich druhé derivaci.

Tabulka 5.5. Výsledky analýzy sekundárních struktur metodou LSA z naměřených transmisních FTIR a ATR-FTIR spekter vzorků myši ANK domény RNasy L. Vzorek 1 byl odebrán ze zásobní zkumavky, která byla před tím rozmíchána. Vzorek 2 byl odebrán z ustálené zásobní zkumavky z čiré části nad usazeným precipitátem. Vzorek 3 značí precipitát. Vzorek 4 odpovídá vzorku o koncentraci 2,5 mg/ml a vzorek 5 měl koncentraci 5 mg/ml. (Odpovídající FTIR spektra jsou prezentována v grafech 5.7. a 5.8.)

Data získaná transmisní metodou FTIR spektroskopie					
Typ sekundární struktury	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3	vzorek 4	vzorek 5
α -helix celkem	37 ± 10	34 ± 10	31 ± 10	28 ± 10	29 ± 10
β -listy	11 ± 9	14 ± 9	23 ± 9	22 ± 9	24 ± 9
β -otočky	14 ± 4	13 ± 4	10 ± 4	12 ± 4	11 ± 4
β -ohyb	13 ± 4	14 ± 4	17 ± 4	17 ± 4	18 ± 4
ostatní	34 ± 6	33 ± 6	29 ± 6	31 ± 6	30 ± 6
celkem rozpoznáno	108	108	110	109	110
nerozpoznáno	8	8	10	9	10
Data získaná metodou ATR-FTIR spektroskopie					
Typ sekundární struktury	vzorek 1	vzorek 2	vzorek 3		
α -helix celkem	20 ± 10	18 ± 10	11 ± 10		
β -listy	31 ± 9	35 ± 9	38 ± 9		
β -otočky	16 ± 4	16 ± 4	15 ± 4		
β -ohyb	12 ± 4	12 ± 4	12 ± 4		
ostatní	30 ± 6	30 ± 6	26 ± 6		
celkem rozpoznáno	109	110	102		
nerozpoznáno	9	10	2		

Spektra zobrazená v grafu 5.8 se na první pohled příliš neliší. Největší změnu můžeme pozorovat u pásu kolem 1745 cm^{-1} , který s přibývajícím koncentrací precipitátu roste a který by mohl odpovídat valenčním vibracím COOH (L.K. Tamm a S.A. Tatulian, 1997). Stejně tak první dvě spektra měřená metodou ATR jsou si velmi podobná. Spektrum precipitátu se od nich ale liší. Může to být způsobeno metodou měření, která je dominantně citlivá k vrstvičce proteinů v kontaktu s diamantovým hranolem. V případě precipitátu, obsahujícího velké oligomery se jistě vrstva tvořila jinak než v případě vzorků ostatních.

Tabulka 5.5 ukazuje výsledky analýzy sekundárních struktur provedené metodou LSA na výše uvedených datech. Výsledky podporují pozorování z grafů 5.8. Všechny struktury (kromě spekter ATR-FTIR precipitátu, zřejmě z důvodu popsaného výše) se

v rámci svých chyb shodují. Výsledky transmisního FTIR experimentu však vykazují menší poměr β -listů než experimenty ATR-FTIR či DCDR. Zdá se, že vzorek ANK domény při styku s povrchem mění strukturu ve prospěch β -listů.

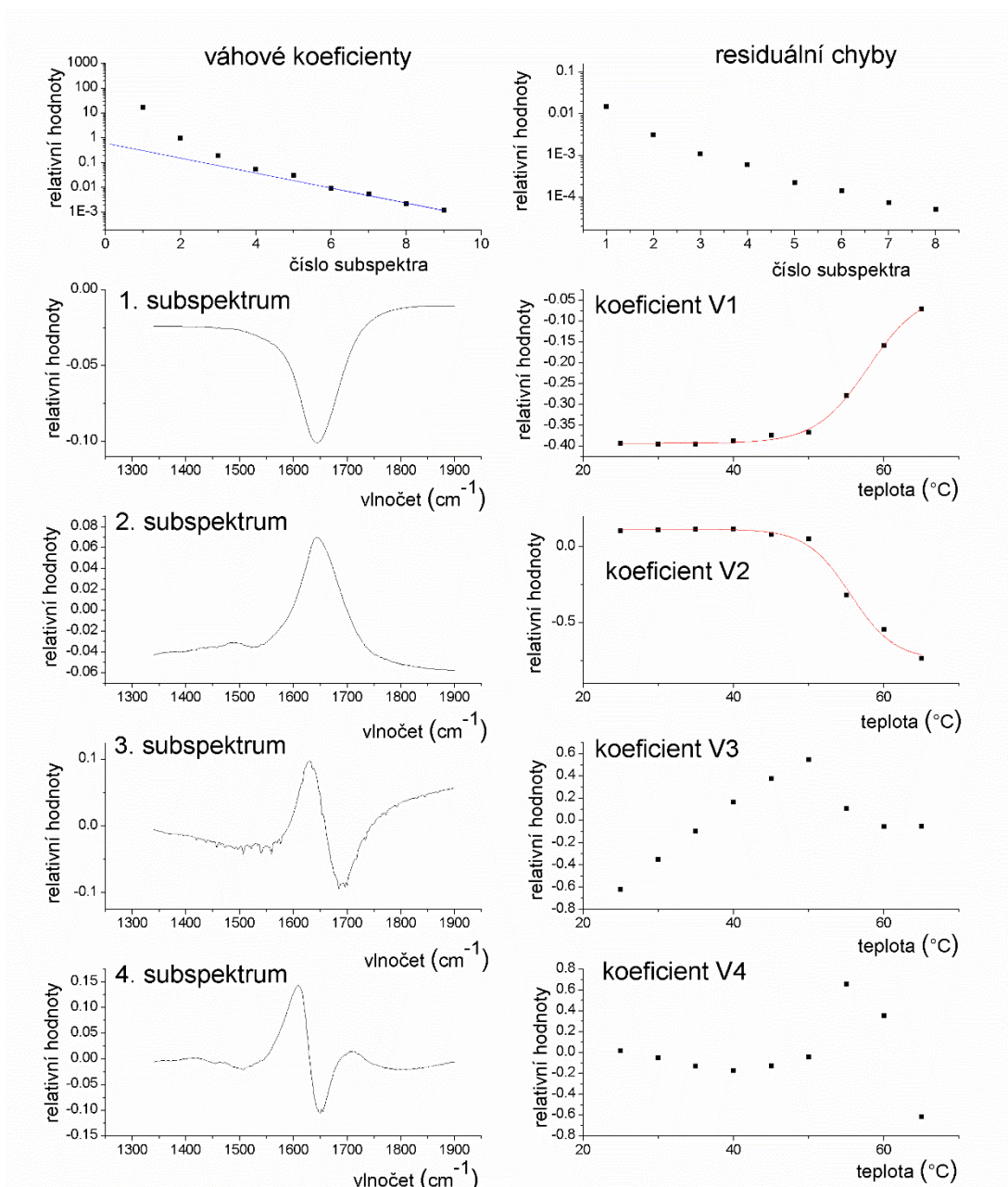
Rovněž byla proměřena pomocí infračervené spektroskopie teplotní závislost ankyrinové domény RNasy L. Bylo užito podobného přístrojového nastavení jako v předchozím případě, tedy MCT detektor, sběr spektra $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, rozlišení 2 cm^{-1} , počet skenů 1000 a rychlost skenování $35,0\text{ kHz}$. Teplota vzorku byla zvyšována z 25 °C na 50 °C krokem 5 °C za 15 minut. Stejným způsobem byl změřen i pufr. Zpracování dat faktorovou analýzou (viz kapitola 3.7.3) bylo provedeno na dvou sadách dat. Zaprvé na sadě dat bez odečteného pufru (abychom u oligomerizovaného vzorku vyloučili chybný odečet pufru, spoléhající se přitom na senzitivitu faktorové analýzy), zadruhé na sadě dat s odečteným pufrem a vodními párami. Grafy 5.9 a 5.10 ukazují výsledky faktorové analýzy – pro přehlednost je v části „váhové koeficienty“ modře vyznačeno lineární proložení a extrapolace bodů, které se již blíží svým informačním obsahem šumu. V případě vzorku s neodečteným pufrem považujeme za podstatné první tři, maximálně čtyři, dimenze. V případě vzorku s odečteným pufrem první dvě dimenze mají výraznější vliv, pouze šum se projeví někde kolem dimenze páté. V obou případech ve výsledcích vykresluji pouze první čtyři dimenze, ve kterých je teplotní přechod již patrný.

V případě výsledků faktorové analýzy dat bez odečteného pufru (graf 5.9) se zdají být první dvě dimenze silně ovlivněny pufrem. pK_a konstanta Tris pufru s rostoucí teplotou klesá a je tedy možné jisté změny ve spektrech pozorovat.

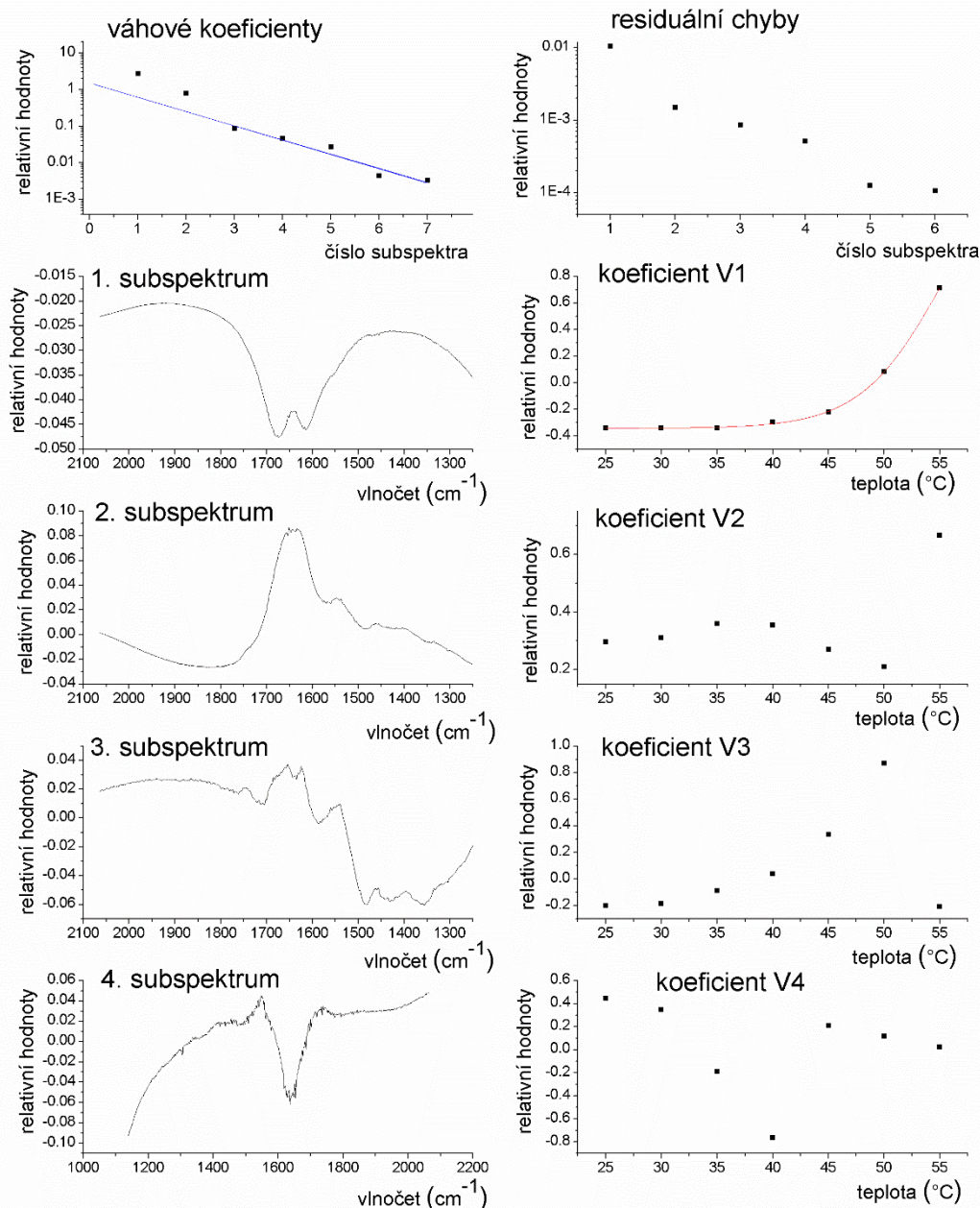
Teplota přechodů ve všech případech byla určena pomocí proložení koeficientů V_i Boltzmanovou sigmoidou ve tvaru

$$y = A_2 + \frac{(A_1 - A_2)}{\left(1 + \exp\left(\frac{x - x_0}{dx}\right)\right)} \quad (5.1)$$

kde x_0 je hledaný inflexní bod odpovídající teplotě přechodu. V případě prvního subspektra grafu 5.9 vyšla jeho hodnota jako $(57,9 \pm 0,5)\text{ °C}$, zatímco v případě druhého $(55,6 \pm 0,7)\text{ °C}$. S ohledem na patrné změny v dalších subspektrech je předpokládána teplota přechodu přibližně okolo 55 °C .



Graf 5.9. Výsledky faktorové analýzy teplotní závislosti myši ankyrinové domény RNasy L bez odečteného pufru a vodních par. Červená křivka ukazuje sigmoidální fit koeficientů V , modrá pak odpovídá lineárnímu fitu váhových koeficientů subspekter nižší důležitosti.



Graf 5.10. Výsledky faktorové analýzy teplotní závislosti myší ankyrinové domény RNasy L s odečtenou teplotní závislostí pufru a s odečteným spektrem vodních par. Červená křivka ukazuje sigmoidální fit koeficientů V , modrá pak odpovídá lineárnímu fitu váhových koeficientů subspekter nižší důležitosti.

Výsledky faktorové analýzy dat s odečteným pufrům (graf 5.10) lépe vykreslují změny týkající se amidových pásů. Sigmoidální fit koeficientů V prvního subspektra ukazuje teplotu přechodu ($55,2 \pm 1,4$) °C, což se shoduje s teplotou přechodu určenou z faktorové analýzy dat bez odečteného pufru. I v tomto případě je ale potřeba mít na

paměti teplotní závislost pK_a konstanty pufru, čímž během zvyšování teploty docházelo ke změně pH a denaturační přechod tak bude výsledkem změny obou faktorů – teploty a pH.

5.2. C-terminální část fosfodiesterázy 12

Fosfodiesteráza 12 (PDE12) je dalším z farmakologického hlediska velmi zajímavým enzymem imunitní odpovědi obratlovců na virovou infekci. Pro efektivní navrhování případných inhibitorů je velmi užitečné znát co možná nejvíce informací o její struktuře a stabilitě. V této kapitole budu pojednávat o charakterizaci C-terminální části PDE12, která vykazuje endonukleázovou, exonukleázovou a fosfatázovou aktivitu (T. Kohno, a kol., 2010).

5.2.1. Příprava vzorku

Vzorek byl připraven Dr. Snášelem na ÚOCHB AV ČR. Gen pro zkrácenou sekvenci lidské PDE 12 byl získán namnožením RNA ze 10^6 buněk CCRF-CEM buněčné linie (buněčná nádorová linie lidské akutní lymfoblastické leukemie). Genetická informace byla nejdříve reverzní transkripcí s pomocí oligodT15 primeru (Promega) přepsána z RNA do DNA. DNA byla metodou PCR namnožena se specifickými primery. Inset byl vložen do vektoru pET 28b (Novagen), naštěpeného pomocí restričních endonukleáz NdeI and BamHI (New England Biolabs), který byl použit pro expresi rekombinantního proteinu s His₆-kotvou na N-konci a vpraven do produkčních buněk BL21(DE3) kmene bakterií *Escherichia coli*. Bakterie byly kultivovány při 30 °C 12 hodin v Luria-Bertani médiu a poté byl přidán induktor isopropyl thiogalactopyranosid (IPTG) v koncentraci 1 mM a teplota byla snížena na 20 °C po dobu 24 hodin. Napěstované bakterie byly centrifugovány při 5 000 g. Pelet bakterií byl resuspendován v pufru (20 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl), byl přidán lysozym pro degradaci buněčných stěn, následovala krátká a intenzivní sonikace a centrifugace při 20 000 g. Supernatant se nanesl na afinitní kolonu s náplní Talon (Clontech), která obsahovala navázané kobaltové částice, a elucí gradientem imidazolu se získal rekombinantní protein s His₆-kotvou. Finální čistící krok byl proveden gelovou filtrací na koloně Superdex-200 (GE Healthcare Life Sciences) v pufru 20 mM Tris, pH 7,4, 100 mM NaCl, 5 mM merkptoethanol.

Vzorek byl dodán v koncentraci 2 mg/ml v pufru 20 mM Tris + 100 mM NaCl + 5 mM merkptoethanol, pH 7,4. Tato koncentrace je pro měření Ramanových spekter v roztoku a pro měření FTIR spekter nízká, proto byl vzorek před těmito měřeními dle potřeby zakoncentrován pomocí Amicon[®] Ultra Centrifugal Filtres 4 ml, Ultracel[®] – 30K.

5.2.2. Primární sekvence C-terminální části lidské PDE 12

10 20 30 40 50 60
MGSSHHHHH S SGLVPRGSH EAGPGTCTFD HRHLYTKKVT EDALIRTVSY NILADTYAQT

70 80 90 100 110 120
EFSRTVLYPY CAPYALELDY RQNLIQKELT GYNADVICLQ EVDRAVFSDS LVPALAEAFGL

130 140 150 160 170 180
EGVFRIKQHE GLATFYRKSK FSLLSQHDIS FYEALES DPL HKELLEKLVL YPSAQEKVLQ

190 200 210 220 230 240
RSSVLQVSVL QSTKDSSKRI CVANTHLYWH PKGGYIRLIQ MAVALAHIRH VSCDLYPGIP

250 260 270 280 290 300
VIFCGDFNST PSTGMYHFVI NGSIPEDHED WASNGEEERC NMSLTHFFKL KSACGEPAYT

310 320 330 340 350
NYVGGFHGCL DYIFIDLNAL EVEQVIPLPS HEEVTTHQAL PSVSHPSDHI ALVCDLKWK

Tučně vyznačená část na počátku značí histidinovou kotvu, která nepatří k nativní sekvenci proteinu a která pomáhá purifikaci.

Celkový počet aminokyselinových zbytků (i s histidinovou kotvou) je 359, celková váha činí 40 475,8 Da a teoretické pI je 5,97. Počet jednotlivých aminokyselinových zbytků v řetězci a jejich celkové procentuální zastoupení udává Tabulka 5.6.

Z té mimo jiné vyplývá, že celkový počet kladně nabitých aminokyselin je 29, záporně nabitých 42. Předpokládaný poločas života proteinu v buňkách *E. coli* udávaný programem ProtParam je 10 hodin. Jak dále z primární struktury vyplývá, obsahuje tato část proteinu hodně cysteinových zbytků. Aby se zabránilo vzniku nespecifických disulfidických můstků, byl přidán do pufru merkaptoetanol, který udržuje Cys v redukované formě.

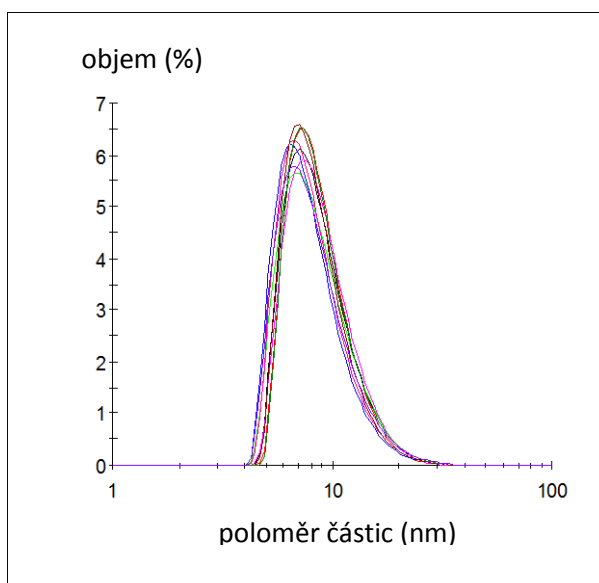
Tabulka 5.6. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v lidské C-terminální části fosfodiesterázy 12 s histidinovou kotvou. Červená barva vyznačuje pro strukturu důležité cysteinové zbytky, modrá barva odpovídá aminokyselinám s aromatickým kruhem, které vytváří v Ramanových spektrech výrazné pásy.

residuum	počet	procent	residuum	počet	procent
Ala (A)	23	6.4%	Gln (Q)	13	3.6%
Arg (R)	13	3.6%	Glu (E)	24	6.7%
Asn (N)	10	2.8%	Gly (G)	20	5.6%
Asp (D)	18	5.0%	His (H)	24	6.7%
Cys (C)	10	2.8%	Ile (I)	18	5.0%
Leu (L)	38	10.6%	Ser (S)	32	8.9%
Lys (K)	16	4.5%	Thr (T)	18	5.0%
Met (M)	4	1.1%	Trp (W)	3	0.8%
Phe (F)	15	4.2%	Tyr (Y)	18	5.0%
Pro (P)	17	4.7%	Val (V)	25	7.0%

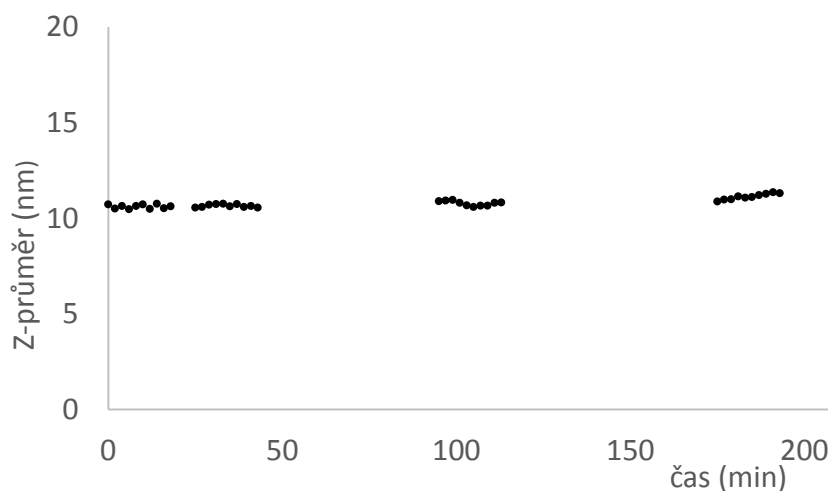
5.2.3. Dynamický rozptyl

Vzorek o koncentraci 0,5 mg/ml byl 2× přefiltrován centrifugačním filtrem Ultra Free-MC od Milliporu (filtr z duraporu UFC 30V00) s velikostí pórů 0,1 µm. Protože se při kontrolním měření ukázala být tato filtrace nedostatečná, byl následně použit stříkačkový filtr Anotop 10 s velikostí pórů 0,02 µm. V následujících 3,5 hodinách byly provedeny 4 sady měření po deseti skenech pro určení velikosti částic, čistoty a stability vzorku v čase.

Výsledné grafy 5.11. a 5.12. ukazují, že vzorek je minimálně v kratších časových intervalech (v řádu hodin) velikostně stabilní. Jeho průměrná molekulová váha je touto metodou odhadována na 981 kDa, což může ukazovat na tvorbu stabilně velkých oligomerů (25-mery) o Z-průměru ($11,30 \pm 5,62$) nm. Dále z měření vyplývá, že vzorek je polydisperzní a tedy nevhodný pro případnou krystalizaci a s největší pravděpodobností obsahuje nečistoty a agregované celky. Nicméně v některých případech program odhalil i pás, který by mohl patřit proteinům o velikostech mezi asi 25–75 kDa (odpovídající přítomnosti monomerů). Pro ověření čistoty byla následně provedena gelová SDS elektroforéza (viz kapitola 5.2.4).



Graf 5.11. Ukázka stability C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 v průběhu 3,5 hodiny po filtrování filtrem s póry 0,02 μm . Pro přehlednost je v grafu vykreslen zhruba každý pátý běh. (Graf je přímým výstupem programu Zetasizer Software)

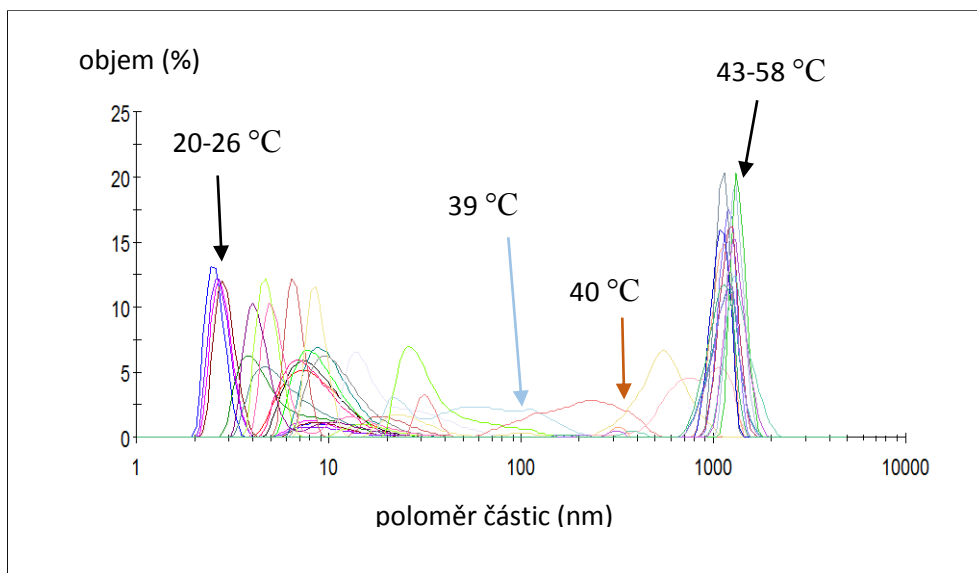


Graf 5.12. Vývoj Z-průměru C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 v čase. Data jsou ukázána pro vzorek uchovávaný při 4 °C po filtraci filtrem s póry 0,02 μm .

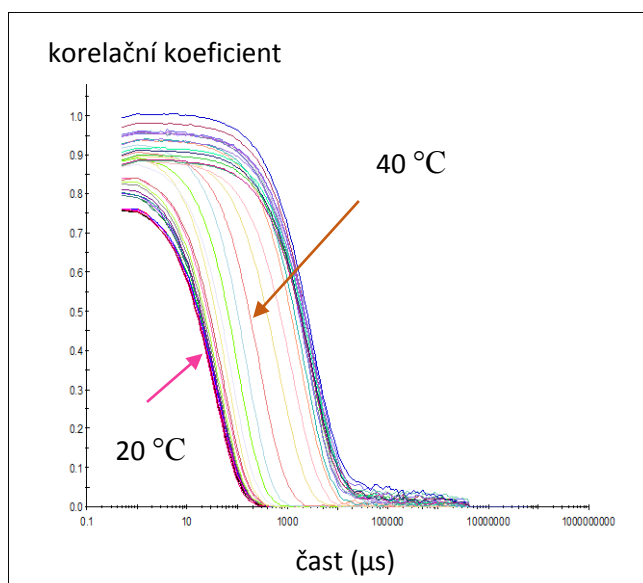
Po ověření stability proteinu v časové škále rozumné pro provedení dalších měření byl tentýž vzorek v měřící kyvetě zakápnut minerálním olejem a bylo spuštěno měření dynamického rozptylu v závislosti na změně teploty. Teplota se plynule měnila krokem 1 °C za 7 minut od 20 °C do 58 °C, kdy se vzorek stal z důvodu precipitace dále neměřitelným.

Mezi 20 °C a 26 °C se protein choval stabilně. V naměřených datech byl rozpoznán pás zřejmě náležící proteinu, jehož molekulová váha byla odhadnuta mezi

30 a 45 kDa (odpovídá téměř přesně monomeru C-terminální části lidské PDE 12) a jeho relativní polydisperzita na 12 %, tedy vysoce monodisperzní pás. Odhadovaný objem tohoto protein v celkovém vzorku je 82 %. Po překročení 26 °C začíná docházet k prvním změnám, jejichž vrchol nastává mezi 39 a 40 °C, jak vyplývá z grafu 5.13. a 5.14.

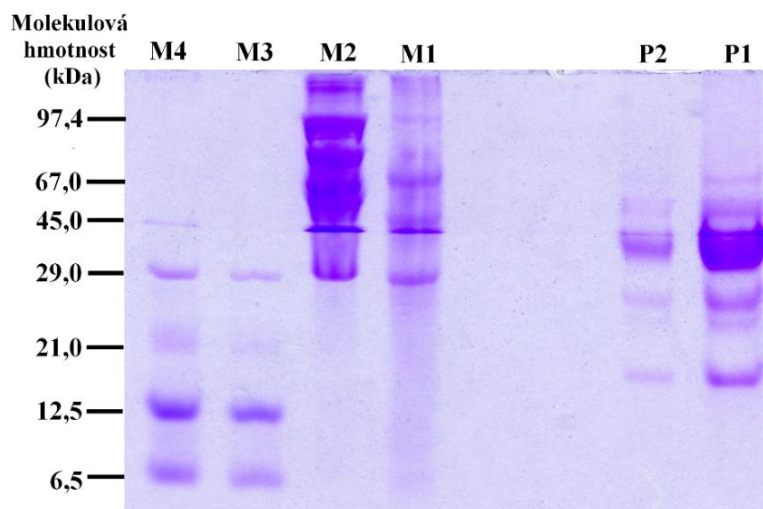


Graf 5.13. Teplotní denaturace C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 měřená dynamickým rozptylem. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty/jejich rozmezí. (Graf je přímým výstupem programu Zetasizer Software)



Graf 5.14. Teplotní denaturace C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 měřená dynamickým rozptylem ukázána v korelogramech. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty. (Graf je přímým výstupem programu Zetasizer Software)

5.2.4. Gelová SDS elektroforéza



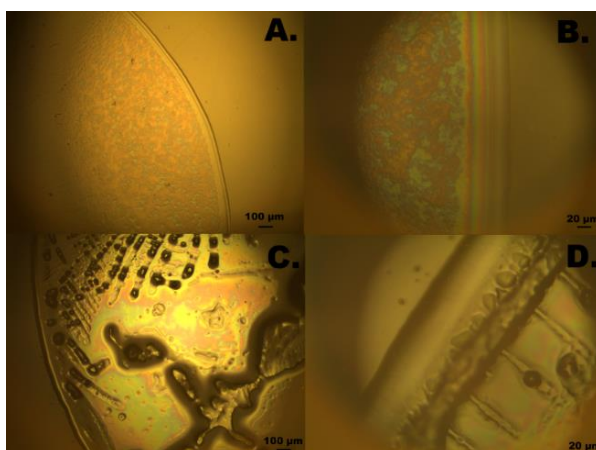
Obrázek 5.2. Gel SDS-PAGE C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12. *M₄: standard – 10 μ l 1 mg/ml Protein Mix 5, M₃: standard – 5 μ l 1 mg/ml Protein Mix 5, M₂: standard – 10 μ l 1 mg/ml Protein Mix 4, M₁: standard – 5 μ l 1 mg/ml Protein Mix 4, P₂: vzorek – 2 μ l 2 mg/ml PDE12, P₁: vzorek – 10 μ l 2 mg/ml PDE12.*

10% gel pro SDS-PAGE byl připraveny standardní procedurou (viz kapitola 4.6) Z výsledného gelu (obrázek 5.2) vyplývá, že je ve vzorku více různých komponent o různých hmotnostech. Největší populace je tvořena částicemi o hmotnosti 29–45 kDa, což přibližně odpovídá monomeru PDE12. S ohledem na příměsi se však vzorek nedá považovat za čistý, neboť obsahuje oproti předpokládanému proteinu větší i menší proteinové příměsi a nebyl tudíž dostatečně purifikován.

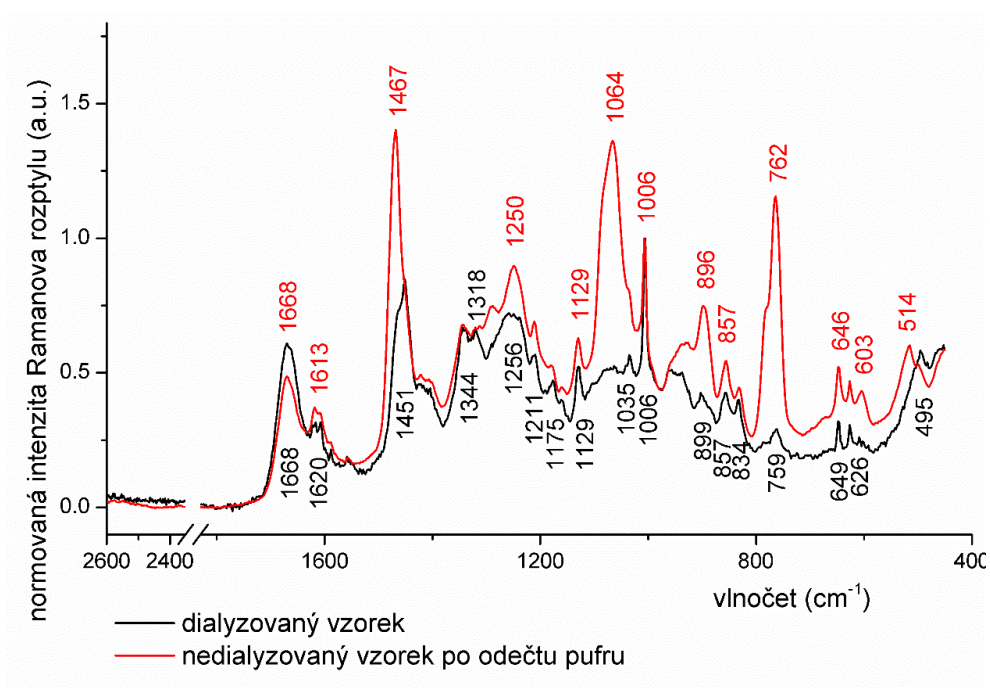
5.2.5. Ramanova spektroskopie

Jako první byla zvolena metoda Ramanovy spektroskopie kapkově nanášených povlaků (kapitola 3.2.2) měřená pomocí konfokálního Ramanova mikrospektrometru (viz kapitola 4.2.2). Mimo jiné proto, že při této metodě nebývá problém se zvýšeným pozadím a informace o tvaru spektra se pak dají využít pro správný odečet pozadí spektra Ramanova rozptylu vzorku rozpuštěného v pufru.

Při měření byla použita mřížka s 300 vrypů/mm s nastavením středu spektra na $1635,65 \text{ cm}^{-1}$, akviziční čas 10 s s opakováním 120 \times . Pro porovnání byla změřena spektra dialyzovaného (dialýza proběhla stejným způsobem, jako je popsáno v kapitole 5.1.4.) a nedialyzovaného vzorku o původních koncentracích 1 mg/ml.



Obrázek 5.3. Fotografie prstenců vzorků C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 připravených metodou kapkově nanášených povlaků. A/B) Dialyzovaný vzorek zvětšen 10×/50×. Vnitřek prstence je „čistý“. C/D) Nedialyzovaný vzorek zvětšený 10×/50×. Uvnitř prstence jsou patrné stopy krystalků purfu

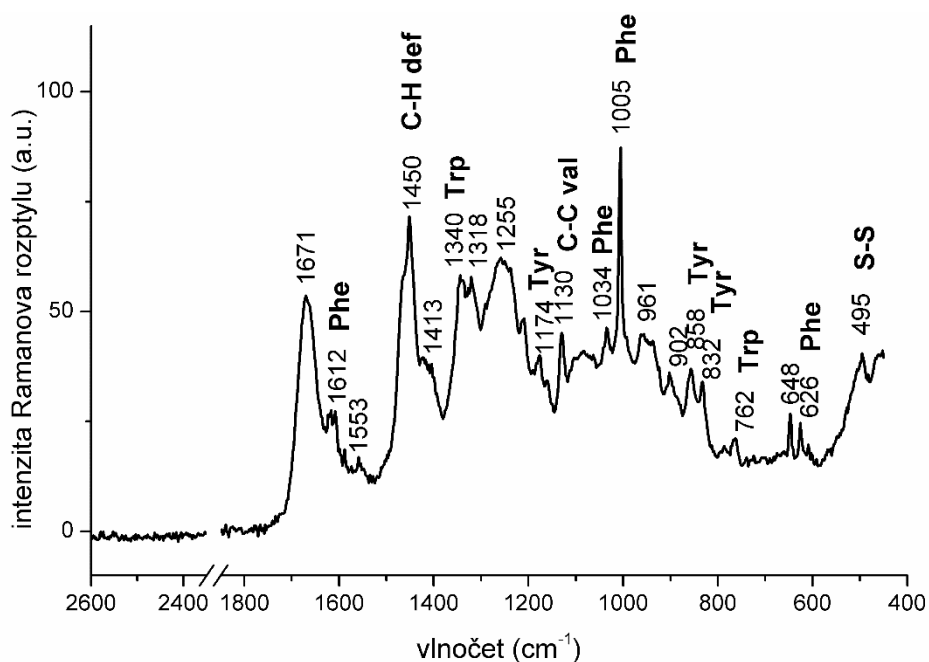


Graf 5.15. Porovnání dialyzovaného a nedialyzovaného vzorku PDE 12. Data jsou normována na pás 1006 cm^{-1} (Phe).

Dříve, než bude detailněji rozebráno konkrétní spektrum části PDE 12, zastavím se opět u vlivu dialýzy na spektra. Graf 5.15 ukazuje spektrum dialyzovaného vzorku a spektrum nedialyzovaného vzorku s odečteným spektrem zkrystalizovaného purfu. V obou případech bylo odečteno i spektrum DCDR substrátu (další úpravy pozadí nebylo třeba). Ve spektru nedialyzovaného vzorku vidíme i přes odečet purfu

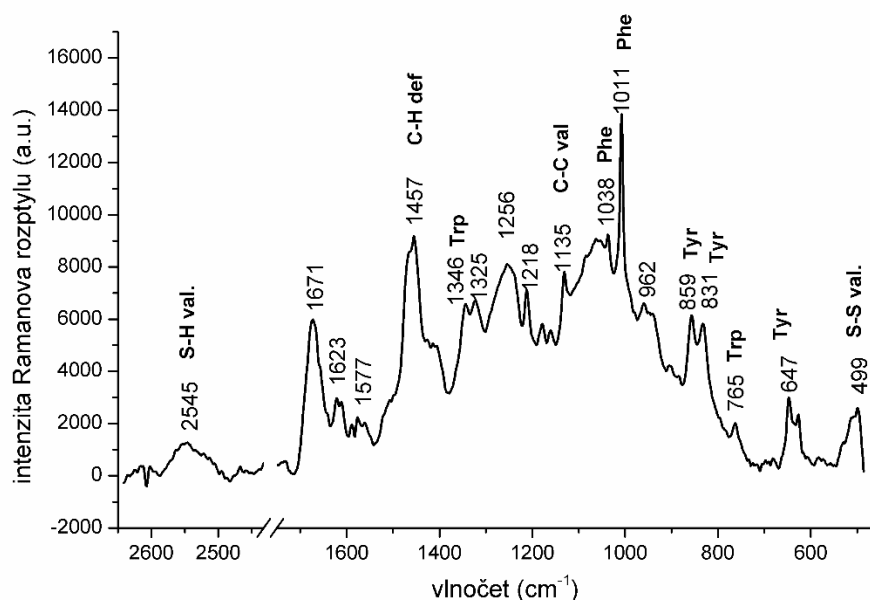
výrazný překryv proteinových pásů pásy pufru. Problém může být v tom, co považujeme za spektrum pufru. Díky principu vzniku „kávových skvrn“ dochází k nerovnoměrnému rozložení složek vzorku na podložce (podle tvaru, velikosti, ...). Samotný pufr se ale skládá ze tří různých složek. Jeho spektrum bylo změřeno z náhodného místa dostatečně vzdáleného od okraje, kde se již nenachází deponovaný protein. Může se tak stát, že od vzorku proteinu byla odečítána část pufru, která se v jeho přímém okolí nenachází, neboť je uložena ve vnitřní části prstence a naopak to, co protein opravdu ovlivňuje neodečítáme. Z těchto rozdílů je vidět ještě výrazněji než v kapitole 5.1.4, že pokud se chceme efektivně vyvarovat vlivu pufru na spektra naměřená pomocí DCDR metody, je třeba pufr odstranit pomocí dialýzy, nikoli pouze odečtem naměřeného spektra.

Ne vždy je ovšem dialýza vhodná. Například v tomto případě by se mohlo zdát nevhodné zbavit vzorek pufru s merkaptetanolem, který by měl zabránit vzniku nespecifických S–S můstků. Jak vyplývá z grafu 5.15, tato obava je bezpředmětná, jelikož v obou případech vidíme výrazný pás okolo 500 cm^{-1} , značící přítomnost S–S můstků (H.E. Van Wart, a kol., 1973) a naopak nevidíme žádné pásy v okolí 2500 cm^{-1} , kde bychom čekali pásy S–H vibrací (W. Qian a S. Krimm, 1992). V tomto případě se tedy při měření metodou DCDR nepodařilo udržet S–S můstky redukované. To bude s největší pravděpodobností zapříčiněno vysokou nestálostí merkaptetanolu, který je těkavý (kapitola 5.3.1) a již před přípravou vzorku pro DCDR měření jeho koncentrace v pufru mohla být nižší, než bylo předpokládáno. Dále, vzhledem k metodě přípravy kapkově nanášeného povlaků, se dá předpokládat, že merkaptetanol během zasychání vyprchá a vytvoří se tak prostor pro tvorbu S–S můstků.



Graf 5.16: DCDR spektrum dialyzované C-terminální části lidské PDE 12.

Spektrum dialyzovaného vzorku C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 (graf 5.16.) nebylo kromě odečtu spektra DCDR substrátu třeba dále nijak upravovat. Poloha pásu amidu I na 1671 cm^{-1} předběžně ukazuje na strukturu s dominancí β -skládaných listů a neuspořádaného klubka (podrobnější analýza viz dále). Jak bylo popsáno výše, nepřítomnost S–H vibrací a naopak přítomnost S–S můstků naznačuje, že všechny cysteiny jsou společně pevně propojeny. Z poměru tyrosinových dýchacích vibrací (3.10), který vychází téměř přesně 1, se vzhledem k velkému počtu tyrosinů ve vzorku (18 tyrosinů, viz tabulka 5.6) dá těžko určit prostředí, v jakém se vyskytují. Z takto vyrovnaného poměru se dá předpokládat, že část jich bude zanořena ve struktuře a část bude vystavena na povrchu proteinu. Díky nezřetelnému pásu na 1360 cm^{-1} můžeme předpokládat poměr tryptofanových pásů (3.11) též velmi nízký, značící, že 3 přítomné Trp se s největší pravděpodobností účastní vodíkových vazeb a jsou tedy vystaveny hydrofilnímu prostředí.



Graf 5.17: Spektrum Ramanova rozptylu C-terminální části lidské PDE 12 v pufru.

Pro porovnání rozdílů ve struktuře proteinu zakoncentrovaného metodou DCDR a proteinu ve vodném rozpouštědle byl rovněž změřen Ramanův rozptyl proteinu v pufru na aparatuře popsané v kapitole 4.2.1 (graf 5.17). Vzorek o koncentraci $15,6\text{ mg/ml}$ rozpuštěný v pufru dodaném se vzorkem (viz kapitola 5.2.1) byl vpraven do kapilární mikrokyvety a umístěn vhodným způsobem do aparatury do cesty laseru. Výkon laseru byl nastaven na $0,5\text{ W}$, použitá mřížka měla 1200 vrypů/mm . Čas expozice byl nastaven na 5 vteřin , akvizice $120\times$ a celkem se výsledek nasčítal ze 6 spekter. Stejným způsobem bylo změřeno i spektrum pufru, které poté bylo od spektra

proteinu odečteno. Protože i po odečtení pufru ve spektru zůstávalo vysoké fluorescenční pozadí, bylo toto odečteno pomocí polynomu 3. stupně. Spektrum bylo poté vyhlazeno Savitzky-Golayovým filtrem s polynomem 2. stupně přes bodů 15.

Při porovnání s grafem 5.16 je na první pohled zřejmé, že pozice pásu amidu I se nezměnila, nicméně některé vibrační pásy se lehce posunuly. Zásadní změna nastává v oblasti S–H vibrací na 2545 cm^{-1} . Protože je vzorek rozpuštěn v pufru, kde je zřejmě ještě dostatek merkaptoetanolu, drží se alespoň část Cys v redukované formě. Porovnáním struktury proteinu měřeného pomocí DCDR a měřeného v kapiláře tedy bude zřejmě možné odhadnout, zda mají nescifické S–S můstky výrazný vliv na sekundární strukturu PDE 12. Podíl pásů Tyr dubletu je opět v obou případech roven jedné, tedy vliv přítomnosti disulfidických můstků zřejmě není signifikantní.

Jak již bylo uvedeno výše, DCDR spektrum nedialyzovaného vzorku je plně překryto pásy pufru, a proto byla provedena analýza sekundární struktury pouze na vzorku dialyzovaném a vzorku změřeném v kapiláře.

Tabulka odhadu obsahu sekundárních struktur 5.7 pro vzorek měřený metodou DCDR ukazuje opět shodu metod v rámci chyb. Jako v případě RNasy L, i tady je metoda využívající k analýze amidu III lehce nadsazená v případě α -helixů, u ostatních struktur se s dalšími procedurami shoduje téměř přesně. V případě vzorku měřeného v pufru v kapiláře (tabulka 5.8) pozorujeme lehký nárůst struktur β -skládaných listů, za stálého zastoupení α -helixů, které se shoduje s daty získanými pomocí DCDR. V případě obou měřících metod určila procedura LSA méně β -listů než metody RIP, v případě Ramanova spektra proteinu v pufru i méně neuspořádaných struktur a β -otoček. Tato nesrovnalost může být způsobena odečtem pufru — metoda RIP používá pro protein měřený v pufru korekci pro odečet pozadí (umožňuje zahrnout spektrum rozpouštědla do fitovacích bází), zatímco metoda LSA nikoli (viz kapitola 3.7.2)

Tabulky 5.7, 5.8. Výsledky rozboru sekundární struktury C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 ze spektra Ramanova rozptylu získaného metodou DCDR ze vzorku dialyzovaného a ze spektra Ramanova rozptylu vzorku rozpuštěného v pufru a měřeného v kapiláře.

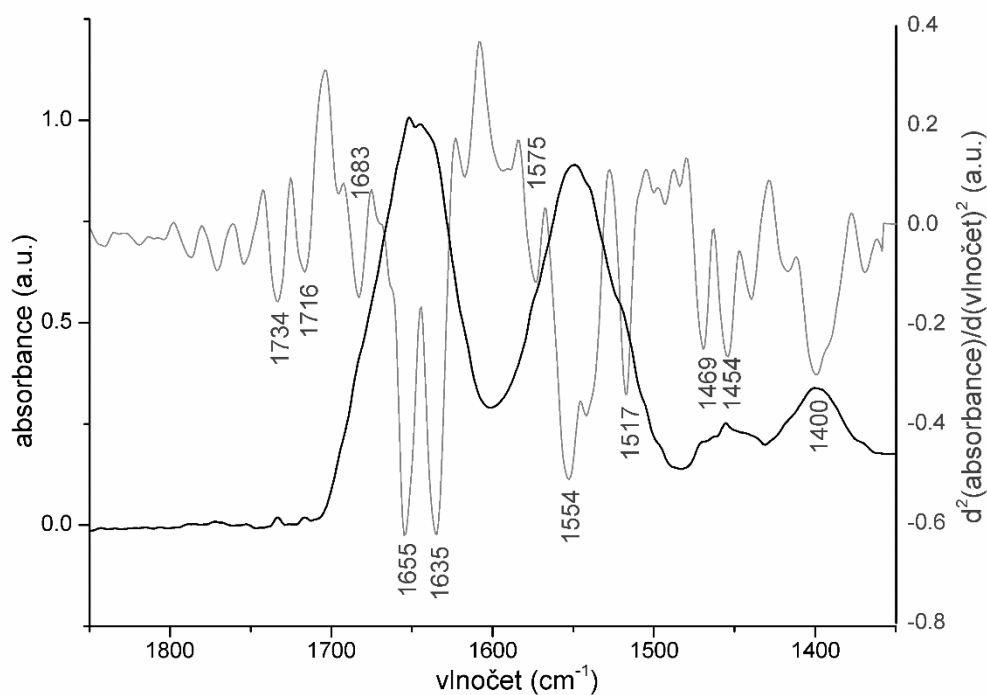
Tabulka 5.7. Struktura C-terminální části lidské PDE 12 stanovaná pomocí DCDR spektroskopie dialyzovaného vzorku				
Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	22 ± 5	23 ± 3	23 ± 3	33 ± 5
α -helix (uspořádaný)	14 ± 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	9 ± 4	—	—	—
β -listy	41 ± 4	48 ± 3	48 ± 3	38 ± 6
β -otočky	18 ± 2	—	—	20 ± 5
neuspořádaný	10 ± 2	29 ± 3	29 ± 3	8 ± 4
celkem rozpoznáno	91	100	100	100
nerozpoznáno	9	0	0	0

Tabulka 5.8. Struktura C-terminální části lidské PDE 12 měřená v pufru v kapiláře				
Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	25 ± 5	25 ± 3	25 ± 3	24 ± 5
α -helix (uspořádaný)	20 ± 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	4 ± 4	—	—	—
β -listy	42 ± 4	59 ± 3	58 ± 3	49 ± 6
β -otočky	16 ± 2	—	—	18 ± 5
neuspořádaný	8 ± 2	17 ± 3	17 ± 3	10 ± 4
celkem rozpoznáno	91	100	100	100
nerozpoznáno	9	0	0	0

5.2.6. Infračervená spektroskopie

Před měřením spekter infračervené spektroskopie byl vzorek zakoncentrován (viz kapitola 5.2.1) na koncentraci 15,6 mg/ml. Tato koncentrace byla ověřena Bradfordovou metodou (Bradford, 1976). K měření spekter byl použit přístroj VECTOR 33 popsáný v kapitole 4.3. s MCT detektorem a KBr děličem svazku. Rozsah měřeného spektra byl nastaven na 600–4000 cm^{-1} , rozlišení 2 cm^{-1} a rychlost

skanování na 35 kHz. Počet skenů byl nastaven na 5 000. (Tedy velmi podobné nastavení jako v předchozích případech.) S tímto nastavením byl změřen protein, pufr i vodní páry. Data byla zpracována odečtem spektra pufru (dle standardního algoritmu Dousseau *et al.*, 1989) a vodních par od spektra proteinu a následně byly spočteny druhé derivace, které byly vyhlazeny metodou Savitzky-Golayovou (viz kapitola 3.7.2) polynomem druhého stupně přes interval bodů 19.



Graf 5.18. Infračervená absorpční spektrum C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12. Černá křivka odpovídá infračervenému spektru proteinu, šedá pak značí druhé derivace.

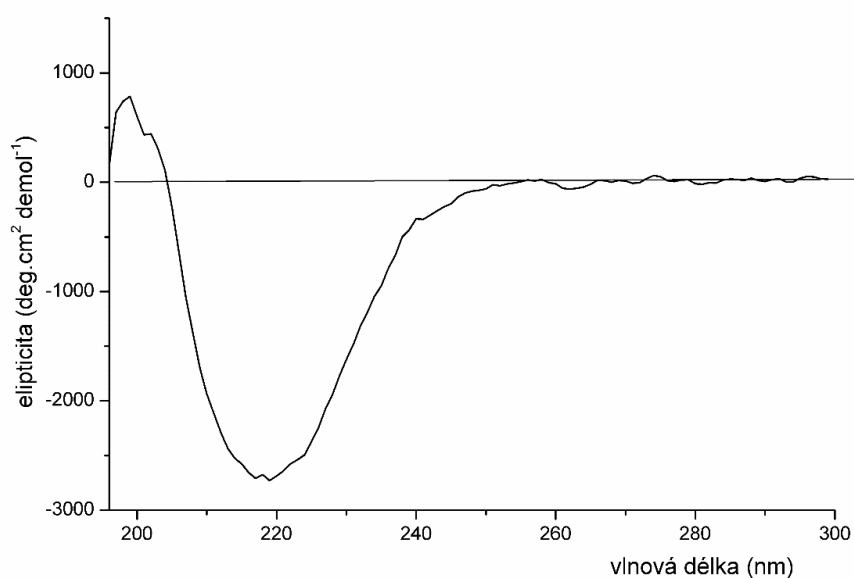
Z tohoto spektra (graf 5.18) byla pomocí procedury LAS (kapitola 3.7.2) spočtena sekundární struktura (tabulka 5.9). Z množství nerozpoznaných struktur se však dá usoudit, že se proceduře nepovedlo naměřené spektrum spolehlivě nafilovat a struktury tak správně rozeznat. Tento výpočet proto není příliš věrohodný. Samotný tvar spektra – poměr pásů amidu I a amidu II naznačuje možnou přítomnost mezimolekulárních komplexů, což je případ, pro který nejsou postupy pro vyhodnocování sekundárních struktur vytvořeny.

Tabulka 5.9: Odhad sekundární struktury C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 získaná metodou LSA z infračerveného absorpčního spektra.

α -helix (%)	β -listy (%)	β -otočky (%)	β -ohyb (%)	ostatní (%)	celkem rozpoznáno (%)	nerozpoznáno (%)
38 ± 10	26 ± 9	11 ± 4	14 ± 4	26 ± 6	115	15

5.2.7. Elektronový cirkulární dichroismus

Jako další metoda určení sekundární struktury C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 byl využit elektronový cirkulární dichroismus. Tato měření byla provedena za pomoci Dr. Bednárové na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Měření vzorku o koncentraci 0,113 mg/ml probíhalo na přístroji JASCO J-815 (kapitola 4.4.) v rozmezí vlnových délek 195–300 nm.



Graf 5.19: Graf cirkulárního dichroismu C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12.

Data byla zpracována pomocí neuronových sítí (kapitola 3.7.1) programem CDNN 2.1 (Dr. Gerald Böhm, 1997). Při zpracování se však nepodařilo nalézt složení sekundárních struktur, zřejmě z důvodu vysoké agregace či denaturace vzorku, což je ve shodě s poznatky s infračervené spektroskopie (viz kapitola 5.2.6).

5.3. Kompletní lidská fosfodiesteráza 12

Po charakterizaci C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 byla dalším logickým krokem charakterizace celého enzymu.

5.3.1. Příprava vzorku

Vzorek byl připraven Dr. J. Snášelem na ÚOCHB AV ČR. Gen pro kompletní sekvenci lidské fosfodiesterázy 12 byl získán namnožením RNA z 10^6 buněk CCRF-CEM buněčné linie (*buněčná nádorová linie* lidské akutní lymfoblastické leukemie). Genetická informace byla nejdříve reverzní transkripcí s pomocí oligodT₁₅ primeru (Promega) přepsána z RNA do DNA. DNA byla metodou PCR namnožena se specifickými primery. Insert byl vložen do vektoru pET 28b (Novagen), naštěpeného pomocí restričních endonukleáz NdeI and BamHI (New England Biolabs), který byl použit pro expresi rekombinantního proteinu s His₆-kotvou na N-konci a vpraven do produkčních buněk BL21(DE3) kmene bakterií *Escherichia coli*. Bakterie byly kultivovány při 30 °C 12 hodin v Luria-Bertani médiu a poté byl přidán induktor isopropyl thiogalactopyranosid (IPTG) v koncentraci 1 mM a teplota snížena na 20 °C po dobu 24 hodin. Napěstované bakterie byly centrifugovány při 5 000 g. Pelet bakterií byl resuspendován v pufru (20 mM Tris, pH 7,4, 500 mM NaCl), byl přidán lysozym pro degradaci buněčných stěn, následovala krátká a intenzivní sonikace a centrifugace při 20 000 g. Supernatant se nanasl na afinitní kolonu s náplní Talon (Clontech), která obsahovala navázané kobaltové částice, a elucí gradientem imidazolu se získal rekombinantní protein s His₆-kotvou v dostatečné čistotě pro spektroskopická měření.

Vzorek byl dodán v koncentraci 0.25 mg/ml v pufru 20 mM Tris + 100 mM NaCl + 5 mM merkaptoetanol, pH 7,4. Tato koncentrace je pro měření Ramanových spekter v roztoku a pro měření FTIR spekter příliš nízká, proto byl vzorek před těmito měřeními dle potřeby zakoncentrován pomocí Amicon[®] Ultra Centrifugal Filtres 4 ml, Ultracel[®] – 30K na koncentraci 8,6 mg/ml.

Merkaptoetanol je těkavá látka a velmi rychle z pufru vyprchává – při pokojové teplotě a pH 7,5 se jeho koncentrace snižuje na polovinu za pouhých 10 hodin – se snižující se teplotou je životnost delší (R. Stevens, a kol., 1983). I přes uchovávání proteinu i pufru při 4 °C bylo potřeba v průběhu měření vzorku pufr několikrát připravit znovu a obnovit tak koncentraci merkaptoetanolu, neboť bez jeho přítomnosti se vzorek začal reversibilně srážet.

5.3.2. Primární sekvence kompletní lidské fosfodiesterázy 12

```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MWRLPGARAA LRVIRTAVEK LSRAEAGSQT AAGAMERAVV

      70      80      90      100     110     120
RCVPSEPKLS LSFALADGSH KNMQRDQSEP LGRVLSRIAT NALKGHAKAA AAKKSRKSRP

      130     140     150     160     170     180
NASGGAACSG PGPEPAVFCE PVVKLYYREE AVAEDVLNVD AWQDGAVLQI GDVKYKVERN

      190     200     210     220     230     240
PPAFTELQLP RYIMAGFPVC PKLSLEFGDP ASSLFRWYKE AKPGAAEPEV GVPSSLSPSS

      250     260     270     280     290     300
PSSSWTETDV EERVYTPSNA DIGLRLKLHC TPGDGQRFQH SRELESVCVV EAGPGTCTFD

      310     320     330     340     350     360
HRHLYTKKVT EDALIRTVSY NILADTYAQT EFSRTVLYPY CAPYALELDY RQNLIQKELT

      370     380     390     400     410     420
GYNADVICLQ EVDRAVFSDS LVPALAEAFGL EGVFRIKQHE GLATFYRKSQ FSLLSQHDIS

      430     440     450     460     470     480
FYEALES DPL HKELLEKLV L YPSAQEKVLQ RSSLVQLQSVL QSTKDSSKRI CVANTHLYWH

      490     500     510     520     530     540
PKGGYIRLIQ MAVALAHIRH VSCDLYPGIP VIFCGDFNST PSTGMYHFVI NGSIPEDHED

      550     560     570     580     590     600
WASNGEEERC NMSLTHFFKL KSACGEPAYT NYVGGFHGCL DYIFIDLNAL EVEQVIPLPS

      610     620
HEEVTTHQAL PSVSHPSDHI ALVCDLKWK

```

Tučně vyznačená část na počátku značí histidinovou kotvu, která nepatří k nativní sekvenci proteinu a která pomáhá purifikaci.

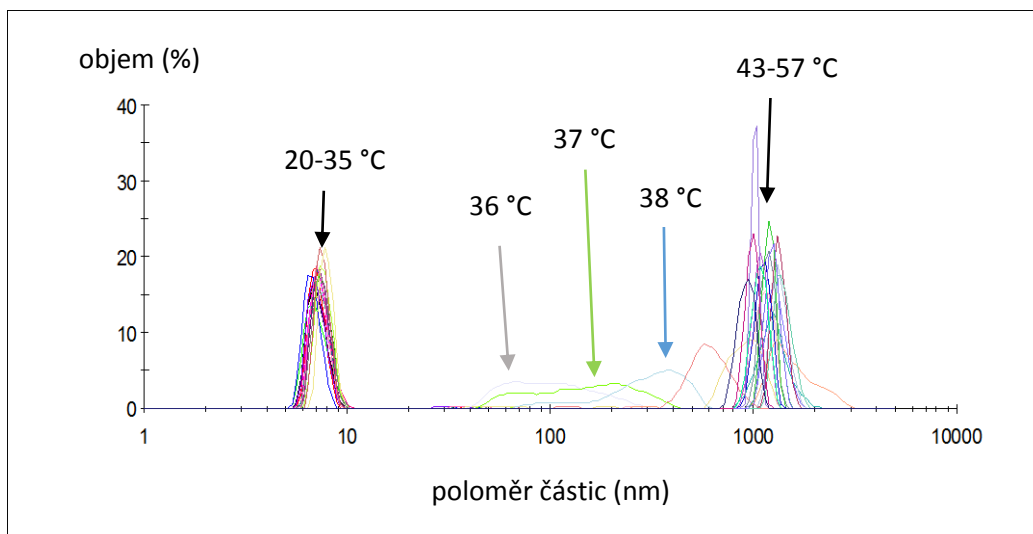
Celkový počet aminokyselinových zbytků (i s histidinovou kotvou) je 629, celková váha činí 69 514,8 Da (z toho 2 181,3 Da tvoří His-kotva) a teoretické pI 6,34. Počet jednotlivých aminokyselinových zbytků v řetězci a jejich celkové procentuální zastoupení udává Tabulka 5.10. Z té mimo jiné vyplývá, že celkový počet kladně nabitých aminokyselin je 64, záporně nabitých 73. Předpokládaný poločas životnosti v *E. coli* udávaný ProtParamem je 10 hodin. Celý protein si drží podobné procento zastoupení cysteinů a z tohoto důvodu byl zachován stejný pufr, jako v případě C-terminální části (viz kapitola 5.2).

Tabulka 5.10. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v lidské fosfodiesteráze 12 s histidinovou kotvou. Červená barva vyznačuje pro strukturu důležité cysteinové zbytky, modrá barva zvýrazňuje zbytky s aromatickým kruhem v postranním řetězci, které vytváří v Ramanových spektrech výrazné pásy.

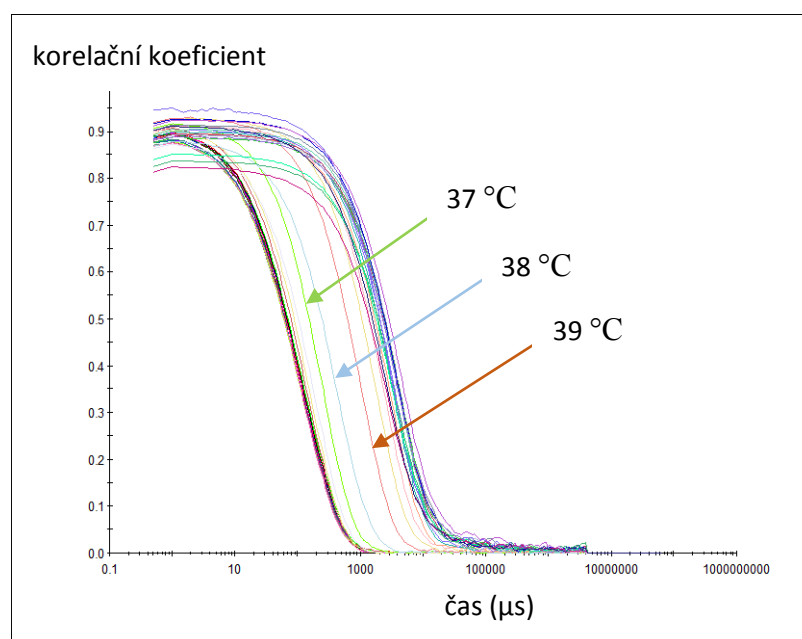
residuum	počet	procent	residuum	počet	procent
Ala (A)	57	9.1%	Gln (Q)	20	3.2%
Arg (R)	33	5.2%	Glu (E)	45	7.2%
Asn (N)	16	2.5%	Gly (G)	40	6.4%
Asp (D)	28	4.5%	His (H)	28	4.5%
Cys (C)	16	2.5%	Ile (I)	23	3.7%
Leu (L)	60	9.5%	Ser (S)	58	9.2%
Lys (K)	31	4.9%	Thr (T)	26	4.1%
Met (M)	8	1.3%	Trp (W)	7	1.1%
Phe (F)	22	3.5%	Tyr (Y)	24	3.8%
Pro (P)	39	6.2%	Val (V)	48	7.6%

5.3.3. Dynamický rozptyl

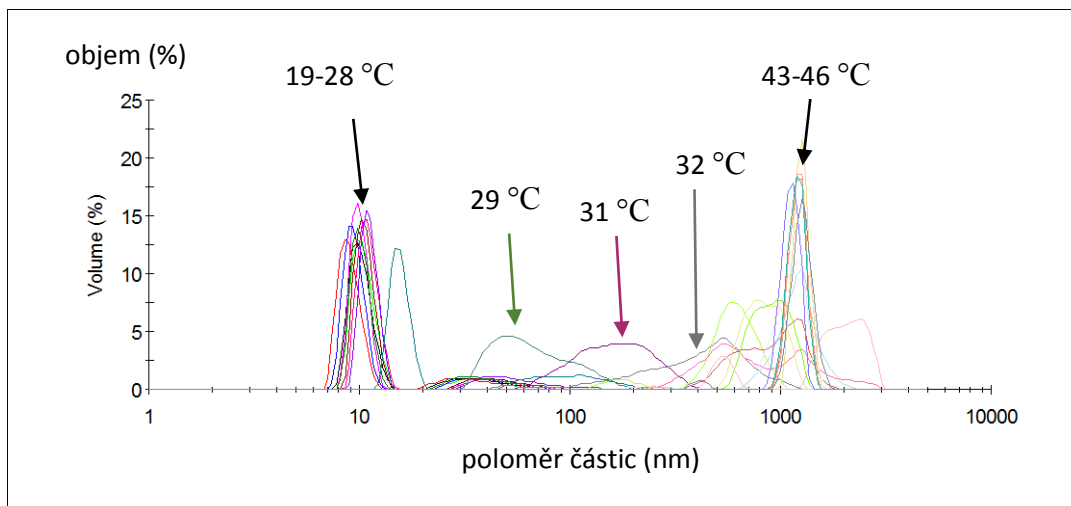
První měření dynamického rozptylu proběhlo na vzorku, jak byl dodán – s originálním pufrem a při koncentraci 0,25 mg/ml. Před měřením byl vzorek 2× přefiltrován centrifugačním filtrem Ultrafree[®]-MC od Millipore s objemem 0,5 ml a velikostí pórů 0,1 µm s Low Binding Durapore[®] Membrane, (kat. číslo UFC30VV00). Měřením vývoje velikosti částic dynamickým rozptylem v čase se vzorek ukázal být minimálně v řádu hodin stabilní (viz například graf 5.24.) Byl proto podroben měření závislosti velikosti částic na teplotě. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut, počáteční teplota byla nastavena na 20 °C, konečná teplota byla při kompletním vysrážení vzorku 57 °C (vzorek se stal dále neměřitelným). Výsledné grafy jsou označeny čísly 5.20., korelogramy číslem 5.21.



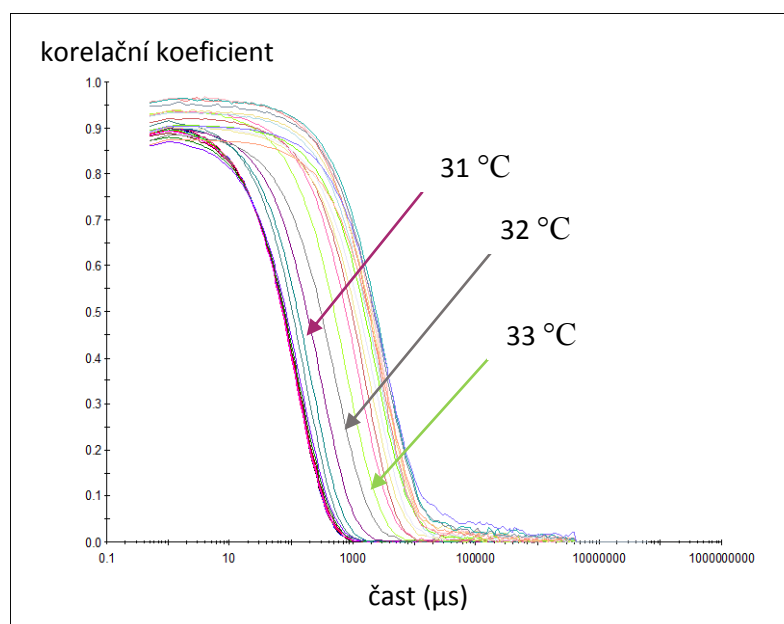
Graf 5.20. Teplotní denaturace lidské fosfodiesterázy 12 v pufru s nižším obsahem merkaptoetanolu měřená dynamickým rozptylem. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty/jejich rozmezí. (Graf je přímým výstupem programu Zetasizer Software)



Graf 5.21. Teplotní denaturace lidské fosfodiesterázy 12 v pufru s nižším obsahem merkaptoetanolu měřená dynamickým rozptylem ukázána v korelogramech. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty/jejich rozmezí. (Grafy jsou přímým výstupem programu Zetasizer Software)



Obrázek 5.22. Teplotní denaturace lidské fosfodiesterázy 12 v pufru s vyšším obsahem merkaptóetanolu měřená dynamickým rozptylem. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty/jejich rozmezí.

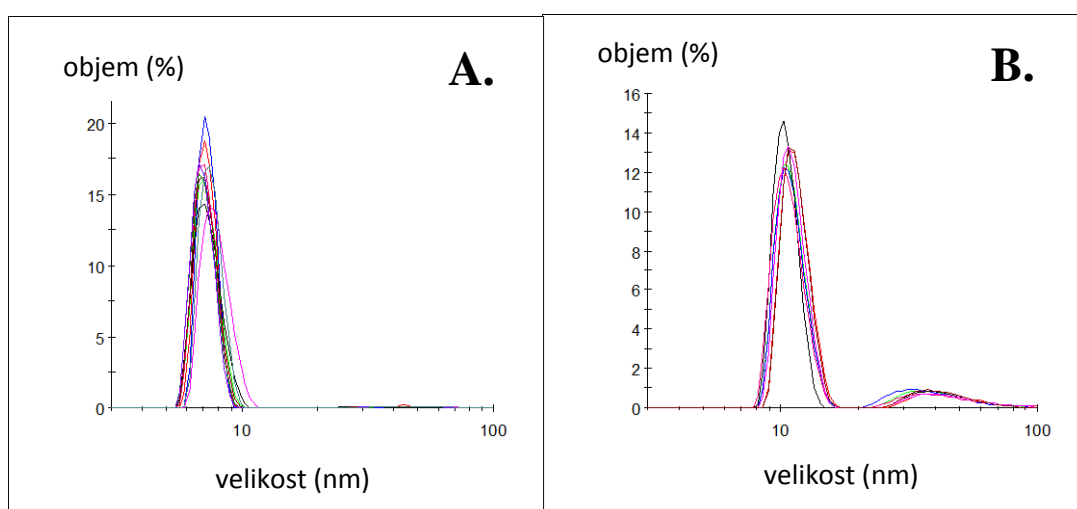


Obrázek 5.23. Teplotní denaturace lidské fosfodiesterázy 12 v pufru s vyšším obsahem merkaptóetanolu měřená dynamickým rozptylem ukázána v korelogramech. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí 1 °C za 7 minut. Pro přehlednost jsou uvedeny pouze některé teploty/jejich rozmezí.

Z grafu je patrné, že vzorek zůstává relativně stabilní až do teploty 35 °C a teprve od 36 °C začíná docházet k výrazným změnám velikosti proteinu způsobeným teplotní denaturací (agregací). Celé měření bylo zopakováno znovu po výměně starého pufru za nově připravený s čerstvě přidaným merkaptóetanolem. Filtrování i postup měření zůstal nezměněn. Graf 5.22 a 5.23 ukazuje výsledná spektra. Z nich je zřejmé, že

přítomnost merkptoetanolu činí vzorek, díky lepší redukci možných S–S můstků, méně stabilním, neboť teplota denaturace se snížila přibližně o 7 °C.

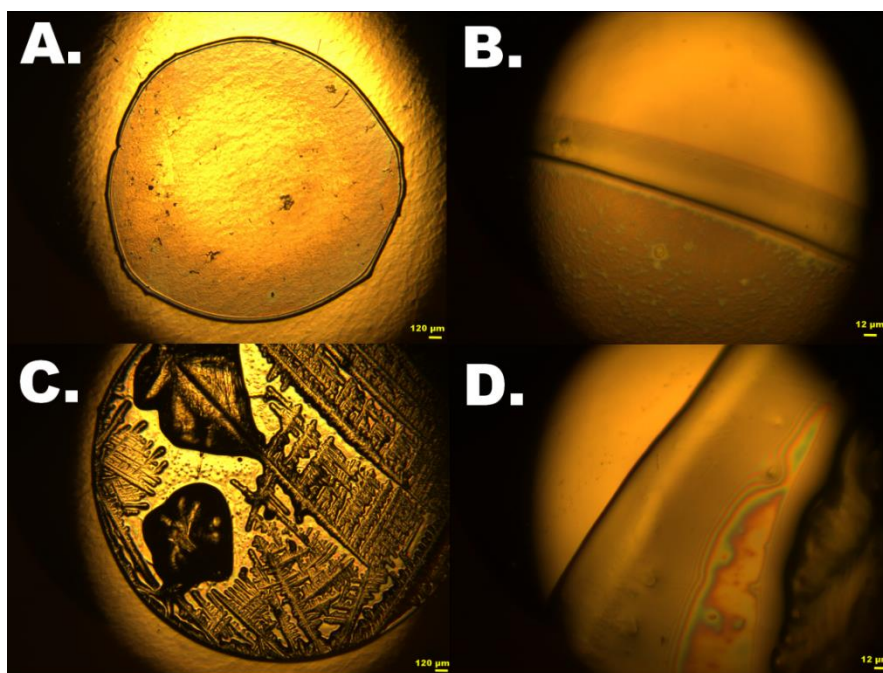
Rozdíl je patrný i z měření časové stability (grafy 5.24). Zatímco v pufru s nižší koncentrací merkptoetanolu se zdá být rozdělení velikosti částic podle objemu z celkového vzorku homogennější, po obnovení koncentrace merkptoetanolu se zvýší podíl částic s větší velikostí. To může být například způsobeno odhalením některých hydrofobních částí proteinu díky rozrušení S–S můstků a vznikem následných oligomerů. To by ovšem znamenalo, že merkptoetanol, ovlivňuje výraznějším způsobem konformaci molekuly.



Obrázek 5.24. Ukázka stability lidské fosfodiesterázy 12 v průběhu 0,5 hodiny po filtrování filtrem s póry 0,1 μm při pokojové teplotě. A) Vzorek rozpuštěn v pufru s nižším obsahem merkptoetanu. B) Vzorek v nově připraveném pufru s obnovenou koncentrací merkptoetanolu. (Grafy jsou přímým výstupem programu Zetasizer Software)

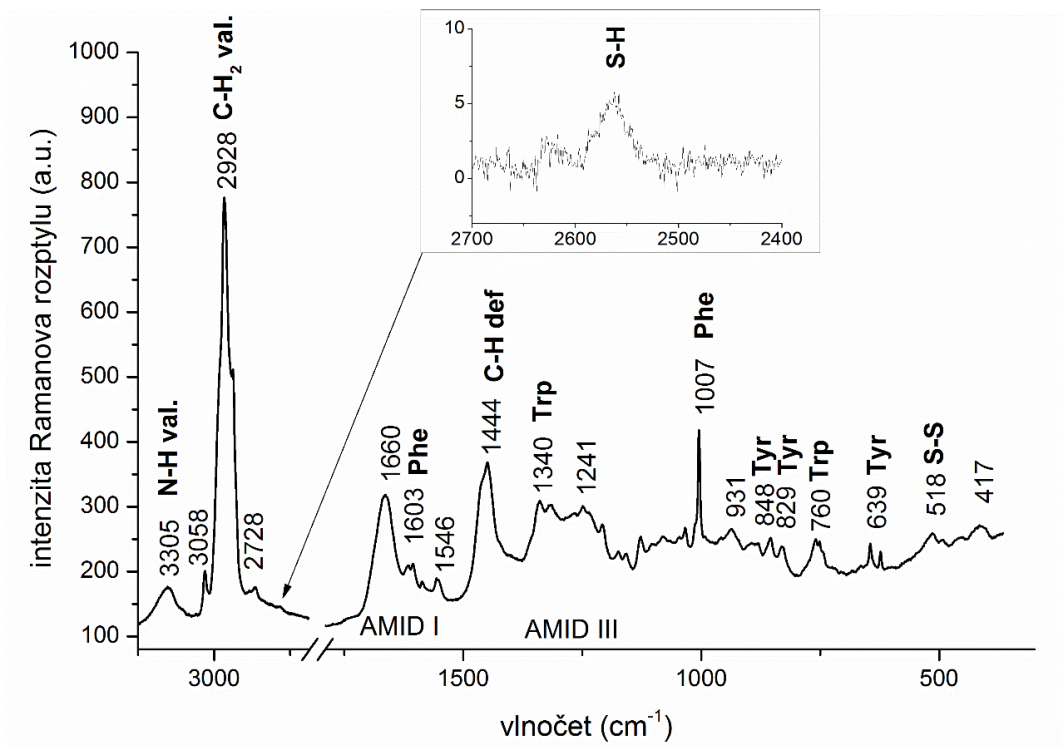
5.3.4. Ramanova spektroskopie

Ze stejného důvodu jako v případě C-terminální části fosfodiesterázy 12 (viz kapitola 5.2.5) byla jako první metoda zvolena Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (kapitola 3.2.2), kdy jsme měření prováděli pomocí konfokálního Ramanova mikrospektrometru (viz kapitola 4.2.2). Povlak vzorku byl připraven ve dvou variantách (obrázek 5.4) – ze vzorku původně rozředěného v pufru (nedialyzovaného) a ze vzorku dialyzovaného stejným postupem, jako je popsáno v kapitole 5.1.4.

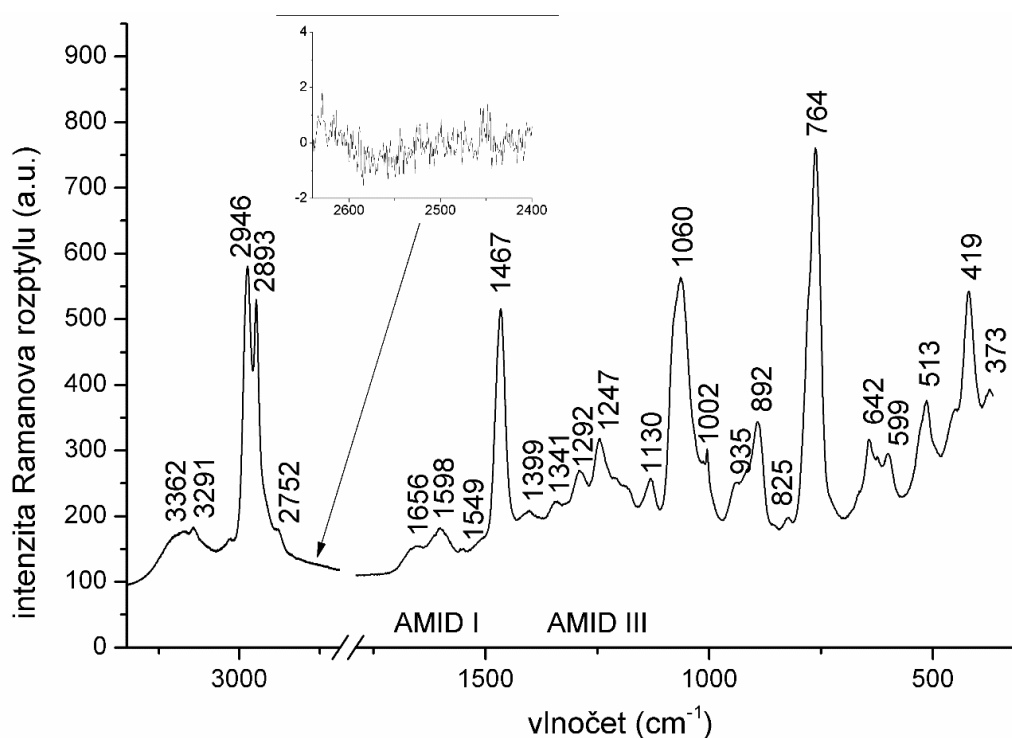


Obrázek 5.4. Fotografie DCDR prstýnků vzorků lidské fosfodiesterázy 12 připravených metodou kapkově nanášených povrchů. A/B) Dialyzovaný vzorek zvětšen 5×/50×. Vnitřek prstence je relativně „čistý“. C/D) Nedyzovaný vzorek zvětšený 5×/50×. Uvnitř prstence jsou patrné krystaly pufru a okraj je značně širší a částečně narušený krystaly pufru a solí.

Měření probíhalo s mřížkou 600 vrypů/mm s nastaveným středem spektra na $1249,9\text{ cm}^{-1}$ na CCD detektor. Doba akvizice byla 10 s a měření bylo opakováno 120×. Porovnáním spektra vzorku dialyzovaného (graf 5.25) a nedyzovaného (graf 5.26) opět vidíme silný překryv pásů proteinu pásy pufru – a opět se ukazuje, že je lepší vzorek před měřením dialyzovat. V tomto případě pro nedyzovaný vzorek není možné ani čistě rozeznat pás amidu I. Zajímavá je však v tomto případě oblast S–H vibrací. Zatímco u dialyzovaného vzorku se velmi slabý pás S–H vibrací kolem 2562 cm^{-1} nachází, u nedyzovaného vzorku není žádný patrný. Původní předpoklad byl obrácený – dialyzovaný vzorek byl zbaven merkaptetanolu a tedy silně redukčního prostředí mnohem dříve, než začal zasychat na destičce. Vysvětlením by mohl být fakt, že celý protein obsahuje některé přirozeně redukované cysteiny, nebo některé Cys nemohou být ze sterických důvodů provázány S–S můstky a v nedyzovaném vzorku pás není patrný jenom díky tomu, že je překryt pozadím od pufru.



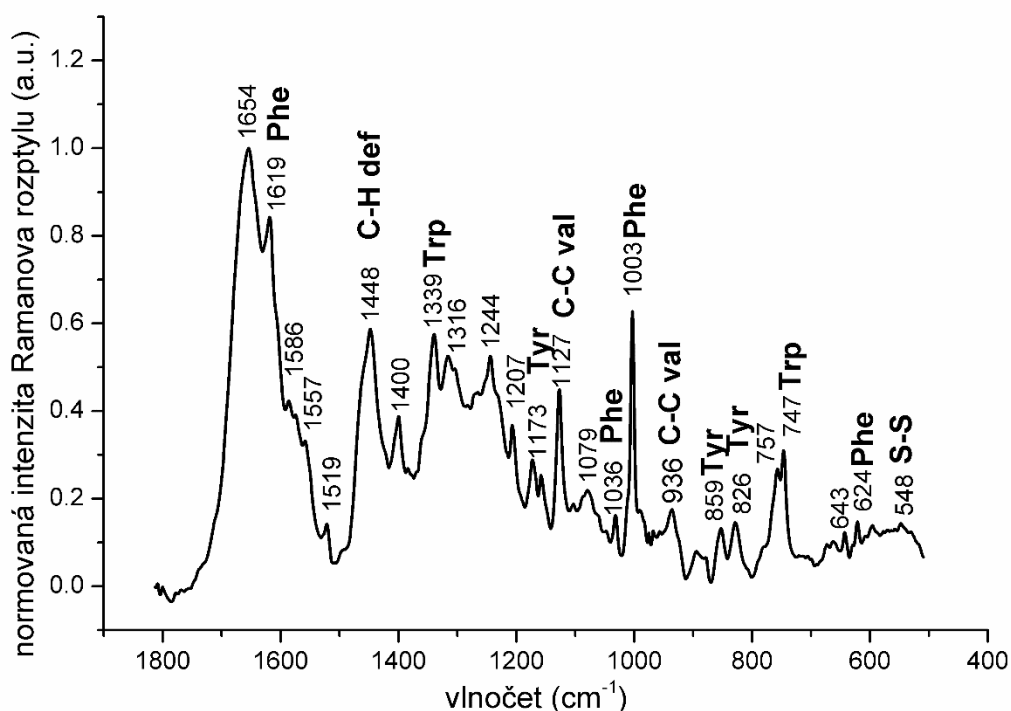
Graf 5.25: Spektrum dialyzovaného vzorku lidské fosfodiesterázy 12 měřené metodou DCDR.



Graf 5.26: Spektrum nedialyzovaného vzorku lidské fosfodiesterázy 12 měřené metodou DCDR.

Poloha pásu amidu I dialyzovaného vzorku naznačuje, že by ve struktuře měly převažovat β -skládané listy, případně neuspořádaná struktura (Tuma, 2005), což

následně potvrdila i bližší analýza sekundární struktury. Stejně jako u C-terminální části lidské fosfodiesterázy i u celého proteinu je poměr tyrosinových pásů (3.10) blízký jedné, ale vzhledem k množství tyrosinů v protein obsažených (viz kapitola 5.3.2) se z tohoto čísla nedá nic bližšího určit. Pro tryptofanový dublet poměr pásu na první pohled určit nelze, neboť pás 1360 cm^{-1} není pozorovatelný. Protože se ale úbočí pásu 1340 cm^{-1} ukázalo být ne zcela hladké, druhá derivace přece jenom objevila další pás na 1360 cm^{-1} , který můžeme přiřadit Trp. Podle vzorce (3.11) je potom zřejmé, že přestože nejsme schopni určit konkrétní hodnotu, poměr bude nízký (maximálně 0,79, spíš méně) a většina tryptofanů se tedy bude podílet na tvorbě vodíkových můstků v hydrofilním prostředí. (E. Li-Chan, a kol., 2011).



Graf 5.27: Spektrum Ramanova rozptylu lidské fosfodiesterázy 12 měřené ve formě roztoku (po odečtu spektra pufru i skla).

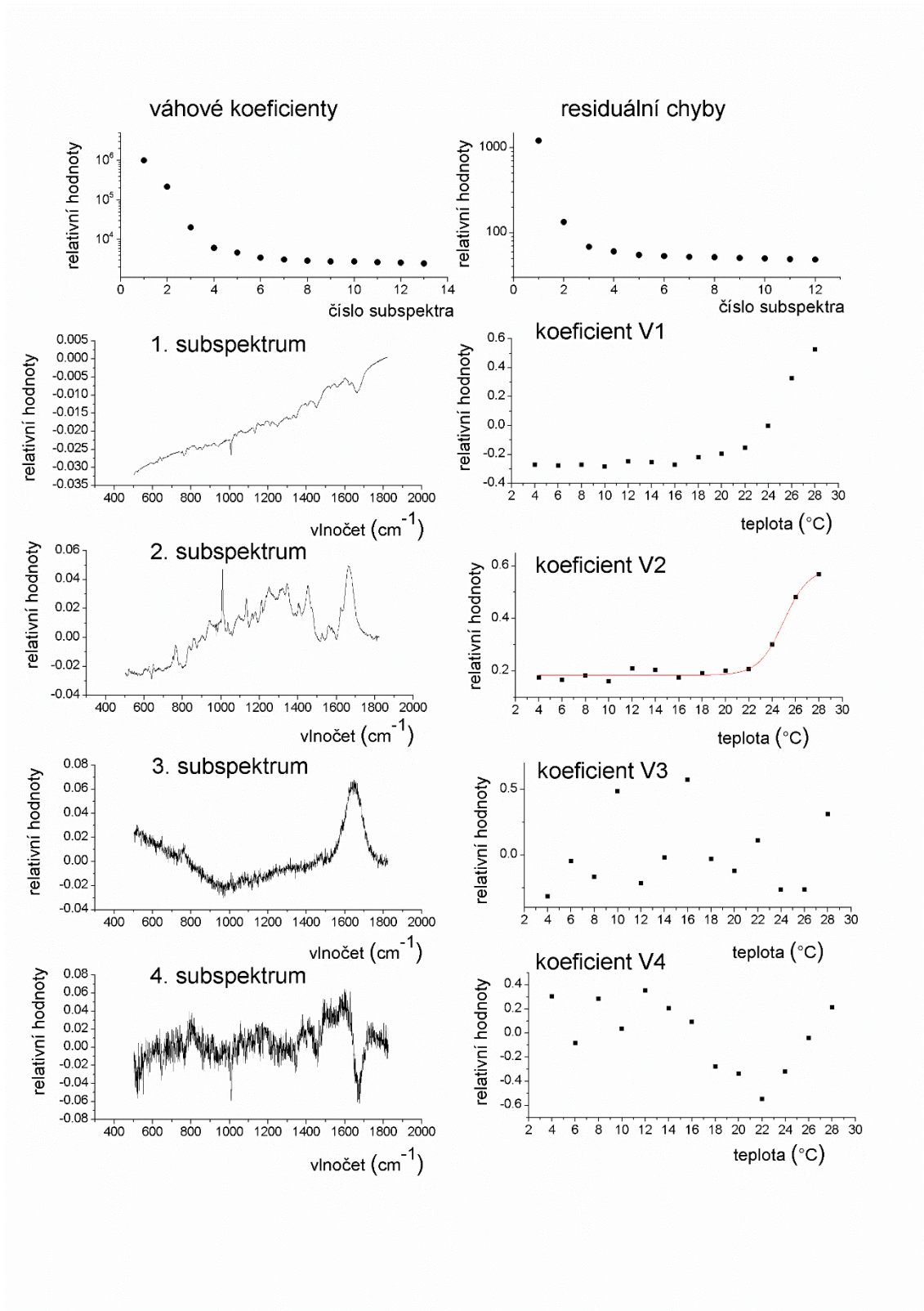
Pro možnost porovnání struktur vzorku v roztoku a DCDR vzorku, bylo provedeno měření Ramanova rozptylu i pro vzorek v kapalně formě, tj. rozpuštěný v pufru (graf 5.27) Dodaná koncentrace proteinu byla ale pro měření Ramanova rozptylu příliš nízká, proto byl vzorek před tímto měřením zakoncentrován (viz kapitola 5.3.1) na 8,6 mg/ml. Použitá mřížka spektrometru měla 1800 vrypů/mm. Při měření byl výkon laseru nastaven na 1 W. Před začátkem měření byl vzorek nechán několik desítek minut v laserovém svazku, aby se co nejvíce vybělilo fluorescenční pozadí. Aby mělo spektrum co nejlepší poměr signál/šum, bylo měření prováděno s akviziční dobou 10 s, akumulací 180× a výsledné spektrum se získalo součtem 26 takovýchto spekter. Stejným způsobem jako spektrum proteinu bylo změřeno

i spektrum pufru a skla. Následná úprava spektra probíhala dle popisu v kapitole 3.7.2. Použitý polynom pro sesazení pozadí byl 4. stupně, polynom pro Savitského-Golayův filtr byl 2. stupně přes 9 bodů spektra

Poloha maxima pásu amidu I ukazuje na velké množství α -helixů v sekundární struktuře. Ve spektru (graf 5.27) je vidět zřetelněji než v grafu 5.25 pás Trp na 1360 cm^{-1} , který je stále zanořen v pásech nižších vlnočtů, nicméně podporuje výsledek získaný z předchozího spektra pomocí druhé derivace. Podíl pásu dle vztahu (3.11) vychází méně než 0,6 a vede tak ke stejnému závěru – velká část Trp se nachází v hydrofilním prostředí (tedy na povrchu proteinu). Poměr pásů Tyr dubletu podle vztahu (3.10) je blízký jedné a tedy ani tady nepozorujeme zásadní rozdíl od spektra získaného DCDR. Rozdíl však nalezneme v intenzitě pásu Trp okolo 750 cm^{-1} , která je ve spektru proteinu v roztoku $3\times$ nižší než ve spektru získaného pomocí DCDR spektroskopie. Podle (E. Li-Chan, a kol., 2011) je tento pokles intenzity vázán na možnou změnu struktury způsobující vystavení větší části tryptofanů hydrofilnímu prostředí. Je otázka, zda se jedná skutečně o změnu struktury nebo obecně zvýšení hydrofilicity prostředí.

Protože je vzorek v rozumných časových škálách stabilní, mělo smysl změřit i teplotní závislost spekter Ramanova rozptylu, ze kterých by měla být pomocí faktorové analýzy (viz kapitola 3.7.3) zjistitelná teplota denaturace. Měření proběhlo opět na Ramanově spektrometru popsaném v kapitole 4.2.1. Použita byla stejná koncentrace jako pro měření Ramanova rozptylu proteinu v roztoku, tedy $8,6\text{ mg/ml}$. Použitá byla opět mřížka s 1800 vryp/mm , výkon laseru byl 1 W a vzorek byl na počátku měření rovněž ponechán několik desítek minut v dráze laseru k „vybělení“ fluorescenčního pozadí. Expoziční doba sběru spektra byla 10 s , akumulace $18\times$, na jednu teplotu bylo výsledné spektrum sečteno ze dvou takovýchto spekter. Pro každou teplotu zvlášť bylo změřeno i kalibrační spektrum neonové výbojky (viz kapitola 4.2.1). Teplotní lázeň byla nastavena na počáteční $4\text{ }^\circ\text{C}$, následně se teplota zvyšovala o $2\text{ }^\circ\text{C}$ za 9 minut , během kterých proběhlo ustálení teploty, změřeno spektra proteinu i měření kalibračního spektra neonové výbojky. Teplotní závislost pufru byla změřena stejným způsobem. U spektra skla nebyla zásadní teplotní závislost předpokládána, a proto bylo odečteno pouze sklo za pokojové teploty. Následné zpracování dat pro faktorovou analýzu sestávalo (po odečtení spekter pufru a skla) pouze ze sesazení všech spekter v 1800 cm^{-1} na 0, aby se pokud možná co nejvíce dimenzí popisující spektrální změny zachovalo. Byly provedeny i výpočty na sadách spekter upravených různým odečtem pozadí, nicméně se ukázalo, že každá arbitrární úprava přidává do výpočtů chyby a proto zde prezentuji pouze nejpresnější metodu založenou na co nejmenším zasahování do naměřených dat. Faktorová analýza byla provedena na sadě spekter změřených v teplotním rozsahu od $4\text{ }^\circ\text{C}$ do $32\text{ }^\circ\text{C}$, neboť poté došlo k vysrážení vzorku.

Z výsledků faktorové analýzy (graf 5.28.) vyplývá, že jako významné změny přispívají pouze první 3 dimenze, čtvrtá a všechny další obsahují převážně šum. První a nejvýznamněji přispívající dimenze zachycuje především změny pozadí. Z váhových koeficientů vyplývá, že i pozadí prochází jistou dvoustavovou změnou, jakýmsi „táním“ s teplotou přechodu jen o 0,4 °C vyšší, než je teplota přechodu určená pro protein – to může naznačovat souvislost s nárůstem Rayleighova rozptylu způsobenou zvýšenou přítomností proteinových oligomerů ve vzorku. Druhá dimenze přináší strukturním změnám proteinu. Váhové koeficienty vytváří sigmoidální křivku typickou pro přechod systému z jednoho stavu do druhého, který je charakterizován určitou teplotou přechodu, v tomto případě teplotou denaturace. Tuto teplotu jsem určila jako inflexní bod proložené Boltzmanovy sigmoidální křivky dané předpisem (5.1). Proložení bodů křivkou je vykresleno v grafu 5.25 ve výsledcích faktorové analýzy. Inflexní bod a tedy teplota přechodu byla určena na $(25,0 \pm 0,2)$ °C. Chyba je udána pouze jako chyba fitu. Následující faktorové dimenze patří změnám spektra pufru, které se očividně nepodařilo úplně při odečtu teplotní závislosti pufru eliminovat. Vzhledem k průběhu váhových koeficientů je ale nepravděpodobné, že jsou tyto změny signifikantně závislé na teplotě a může se jednat pouze o nesrovnalosti dané manuálním odečtem spektra pufru. Jak bylo řečeno výše, další dimenze obsahují již pouze šum.



Graf 5.28. Výsledné grafy faktorové analýzy teplotní závislosti spekter Ramanova rozptylu lidské fosfodiesterázy 12. Červenou plnou čarou je znázorněno proložení dat Boltzmanovou sigmoidální křivkou, jejíž inflexní bod udává teplotu denaturace.

Stejně jako u předchozích vzorků, i u celé lidské fosfodiesterázy 12 byla provedena analýza sekundárních struktur z naměřených spekter (viz tabulka 5.11 a 5.12). Pro analýzu jsem použila DCDR spektra dialyzované fosfodiesterázy 12 a spektra získaná měřením Ramanova rozptylu PDE 12 v roztoku. Data byla upravena dle popisu výše uvedeného ve shodě s kapitolou 3.7.2.

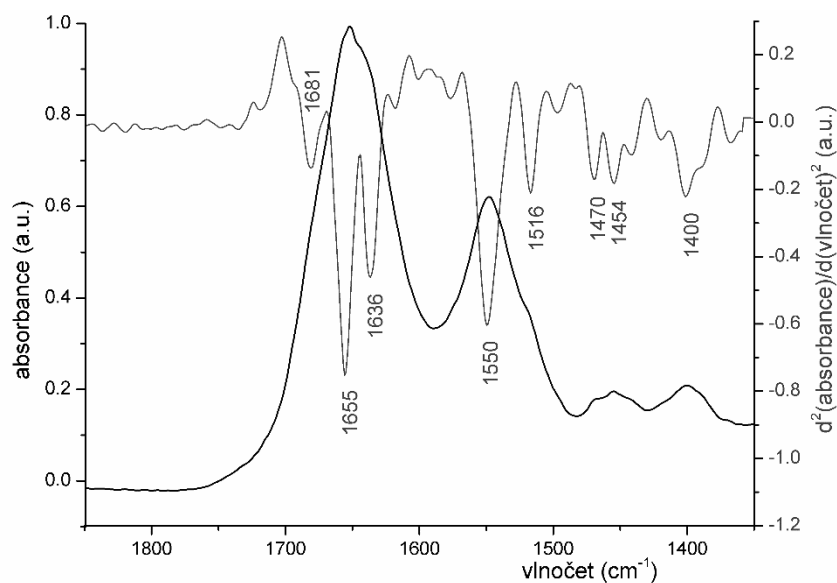
Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	29 \pm 5	29 \pm 3	32 \pm 3	37 \pm 5
α -helix (uspořádaný)	15 \pm 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	14 \pm 4	—	—	—
β -listy	40 \pm 4	38 \pm 3	38 \pm 3	38 \pm 6
β -otočky	19 \pm 2	—	—	18 \pm 5
neuspořádaný	11 \pm 2	33 \pm 3	30 \pm 3	8 \pm 4
celkem rozpoznáno	99	100	100	100
nerozpoznáno	1	0	0	0

Typ sekundární struktury	amid I			amid III
	LSA (%)	RIP3 (%)	RIP4 (%)	LSA (%)
α -helix celkem	31 \pm 5	30 \pm 3	21 \pm 3	38 \pm 5
α -helix (uspořádaný)	24 \pm 4	—	—	—
α -helix (neuspořádaný)	7 \pm 4	—	—	—
β -listy	33 \pm 4	38 \pm 3	46 \pm 3	36 \pm 6
β -otočky	15 \pm 2	—	—	17 \pm 5
neuspořádaný	8 \pm 2	32,7 \pm 2,6	33 \pm 3	9 \pm 4
celkem rozpoznáno	86	100	100	100
nerozpoznáno	14	0	0	0

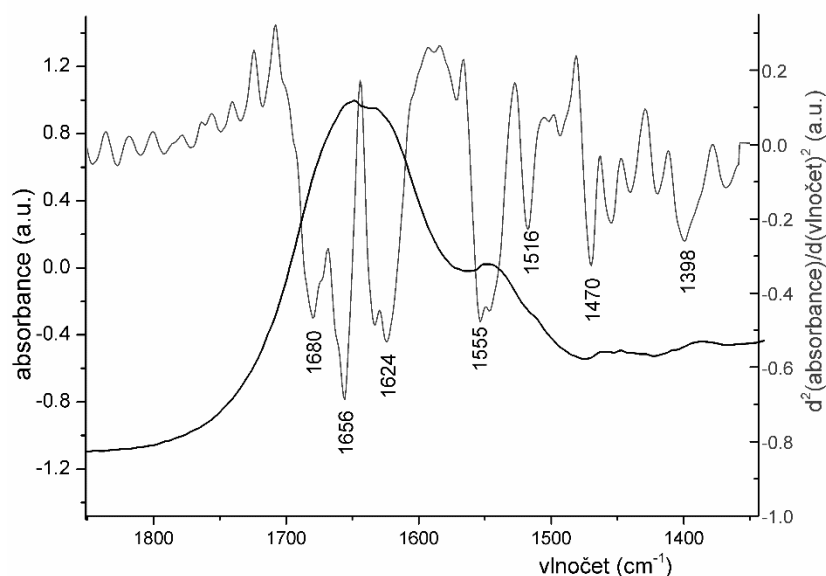
Sekundární struktury odhadnuté všemi čtyřmi metodami z dialyzovaného DCDR vzorku se v rámci chyb shodují. Největší podíl na struktuře mají β -skládané listy, kterých je ve struktuře až 40 %, α -helixů je zhruba o 10 % méně, a o 30 % se dělí β -otočky a neuspořádaná strukutra. Poměr zastoupení sekundárních struktur se nezměnil ani u vzorku rozpuštěného v pufru, všechny výsledky se v rámci chyb shodují. Výjimku tvoří výsledek udávaný metodou RIP4, která, jak se zdá, v tomto případě neumí analyzované spektrum spolehlivě nafitovat.

5.3.5. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektra kompletní lidské fosfodiesterázy 12 o koncentraci 8,6 mg/ml byla naměřena pomocí spektrometru VECTOR 33 popsaném v kapitole 4.3., postupně s užitím dvou detektorů. Nejprve byl použit DTGS detektor, později MCT detektor. Vstupní apertura v prvním případě byla nastavena na 3 mm, ve druhém případě na 1,7 mm. Ostatní nastavení měření zůstalo stejné: tj., měřeno v rozsahu $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, rozlišení 2 cm^{-1} , počet skenů 4000, rychlost skenování 7,5 kHz. Výsledná spektra pro oblast pásů amidu I a II ukazují grafy 5.29 a 5.30.



Graf 5.29. Infračervená absorpční spektra kompletní lidské PDE 12 měřená pomocí DTGS detektoru.



Graf 5.30. Infračervená absorpční spektra kompletní lidské PDE 12 měřená pomocí MCT detektoru.

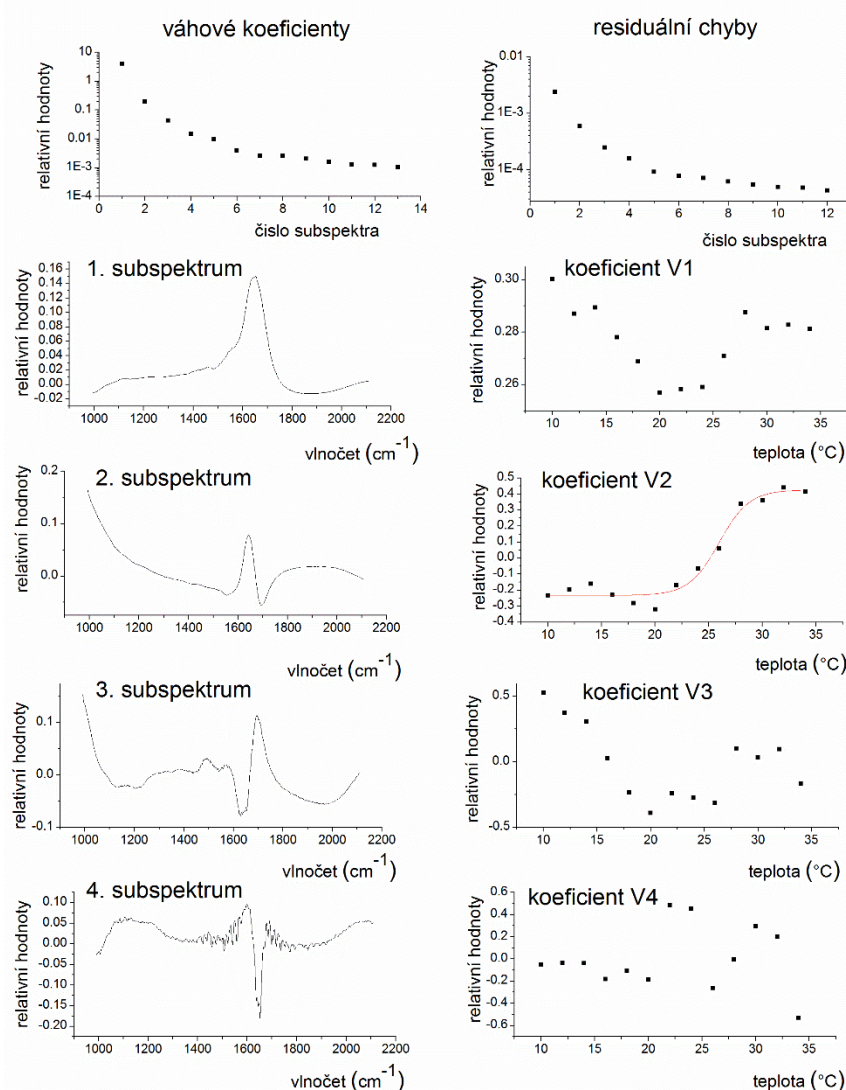
Již na první pohled je patrné, že se tato dvě spektra výrazně liší (hlavně v pásu amid II). Při bližší analýze pásu amidu I procedurou LSA (viz kapitola 3.7.2) zjistíme, že zastoupení sekundárních struktur se v rámci chyb shoduje v obou případech (tabulka 5.13) ale pouze v případě měření detektorem DTGS se podařilo fitování provést dostatečně spolehlivě (procedura nerozpoznala pouze 4 % struktur, zatímco ve spektru měřeném MCT detektorem nerozpoznala 14 %. To už je za rozumnou hranici spolehlivého fitu). To může být způsobeno dvěma důvody. Zaprvé detektor MCT je citlivější a vykazuje tedy nestabilnější pozadí než detektor DTGS. To může hrát roli především při odečtu spektra pufru a vodních par. Zadruhé měření pomocí MCT detektoru bylo prováděno po 10 dnech od měření detektorem DTGS. Vzhledem k vysoké těkavosti merkaptetanolu se mohlo stát, že se během této doby výrazně snížila jeho koncentrace v pufru a došlo tak ke vzniku méně redukujícího prostředí, podporujícího vznik cysteinových můstků a následný vznik oligomerů, které učinily spektrum pro proceduru hůře fitovatelné (již na první pohled bylo patrné větší zakalení vzorku). Toto vysvětlení je mnohem pravděpodobnější, neboť v druhé derivaci spektra je patrný vznik pásu na 1622 cm^{-1} , který odpovídá mezimolekárním β -skládaným listům (Bart a Zscherp, 2002). Před dalšími měřeními byl proto připraven nový pufr s čerstvě přidaným merkaptoetanolem a byla tak pro další měření obnovena jeho koncentrace.

Tabulka 5.13. Odhad sekundárních struktur kompletní lidské PDE 12 získaný z infračervených absorpčních spekter analýzou pásu amidu I a II metodou LSA. Výsledky jsou udané pro měření dvěma různými detektory s odstupem 10 dní.

Změřené spektrum (DTGS detektor)						
α -helix (%)	β -listy (%)	β -otočky (%)	β -ohyb (%)	ostatní (%)	celkem rozpoznáno (%)	nerozpoznáno (%)
28 ± 10	22 ± 9	11 ± 4	19 ± 4	25 ± 6	104	4
Změřené spektrum po 10 dnech (MCT detektor)						
α -helix (%)	β -listy (%)	β -otočky (%)	β -ohyb (%)	ostatní (%)	celkem rozpoznáno (%)	nerozpoznáno (%)
27 ± 10	27 ± 9	10 ± 4	19 ± 4	30 ± 6	114	14

Po přípravě nového pufru (o stejném složení jako pufr předchozí s čerstvým merkaptoetanolem) a jeho výměně byl vzorek zakoncentrován (kapitola 5.3.1) na 6,0 mg/ml (ověřeno Bradfordovou metodou (Bradford, 1976)). Takto nově připravený

vzorek byl podroben teplotní denaturaci sledované pomocí infračervené spektroskopie opět na přístroji VECTOR 33 popsaném v kapitole 4.3. Pro měření byl stanoven rozsah $600\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$, rozlišení 4 cm^{-1} , počet skenů 740 a rychlost skenu 35 kHz. Počáteční teplota byla $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, konečná $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zvyšování teploty probíhalo rychlostí $2\text{ }^{\circ}\text{C}$ za 9 minut, tedy stejnou rychlostí, jakou probíhalo zvyšování teploty při měřeních Ramanovou spektroskopií. Dá se tedy předpokládat podobný výsledek pro teplotu denuračního přechodu. Za stejných podmínek jako byl měřen protein, byl poté změřen i pufr. Zásadní teplotní závislost par nebyla nepředpokládána a pro odečet bylo užito spektra vodních par měřených při pokojové teplotě. Výsledná data byla podrobena faktorové analýze, výsledky ukazuje graf 5.31.

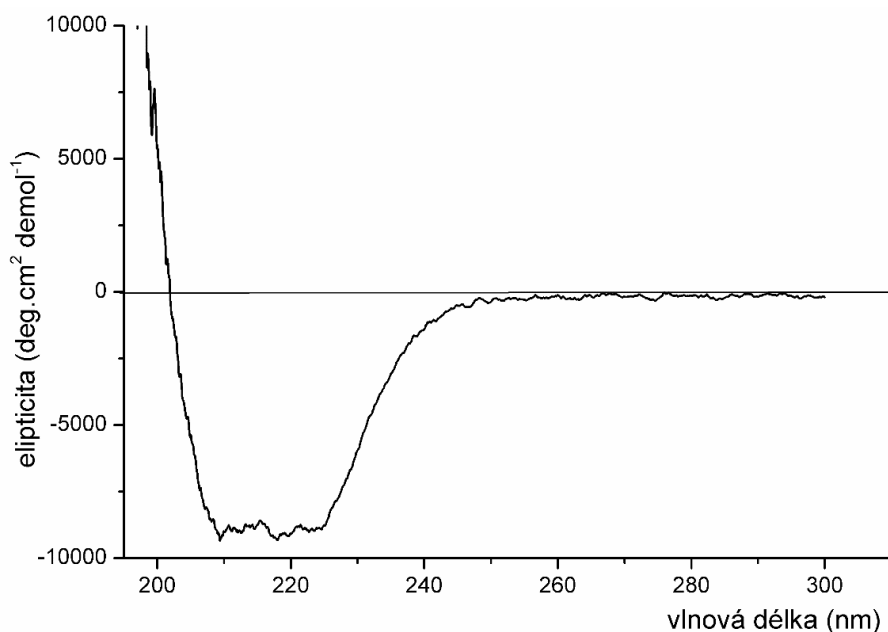


Graf 5.31. Výsledky faktorové analýzy teplotní závislosti infračervených spekter kompletní PDE 12. Červená křivka ukazuje sigmoidální fit koeficientu V2.

Výrazně k teplotním změnám přispívají hlavně první 3 faktory. Z toho první dimenze zřejmě reflektuje změny dané odečtem pufru a možná teplotní závislostí pufru samotného, podstatné změny v amidových pásech pozorujeme v subspektru číslo 2. Jeho váhové koeficienty závislé na teplotě byly proloženy sigmoidální křivkou (5.1) a byla určena teplota denaturace (jako inflexní bod této křivky), která v tomto případě činí $(25,7 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$.

5.3.6. Elektronový cirkulární dichroismus

Elektronový cirkulární dichroismus kompletní lidské fosfodiesterázy 12 byl změřen a zpracován za pomoci Dr. Bednárové na Ústavu organické chemie a biochemie. Měření vzorku o koncentraci 0,156 mg/ml probíhalo na přístroji JASCO J-815 (kapitola 4.4.) v rozmezí vlnových délek 195–300 nm.



Graf 5.32: Spektrum elektronového cirkulárního dichroismu kompletní lidské fosfodiesterázy 12.

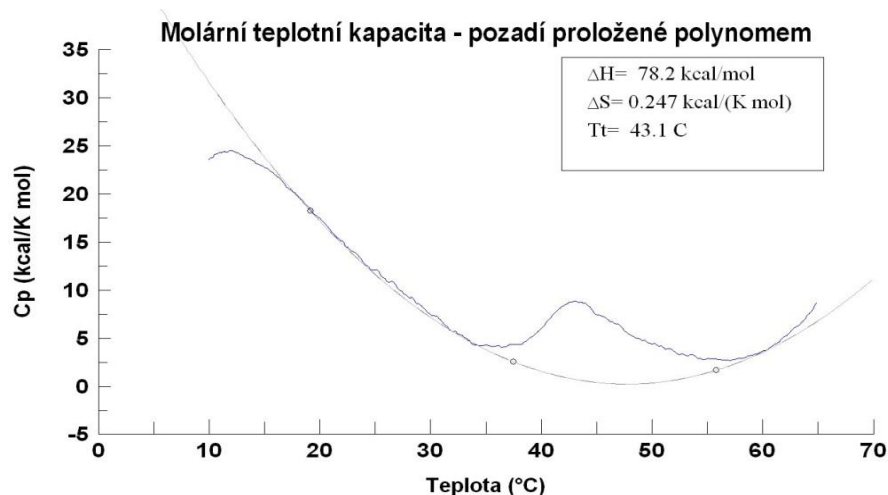
Data byla zpracována pomocí neuronových sítí (kapitola 3.7.1) programem CDNN 2.1 (Dr. Gerald Böhm, 1997). Složení struktury bylo vyhodnoceno pro tři různé oblasti vlnových délek (200–260 nm, 205–260 nm a 210–260 nm). Jako výsledné zastoupení struktur zde uvádím výsledky získané pro největší rozsah vlnových délek 200–260 nm, chybu jsem určila jako směrodatnou odchylku zpracování dat na všech třech intervalech.

Tabulka 5.14. Odhad sekundárních struktur kompletní lidské fosfodiesterázy 12 získaný z měření elektronového cirkulárního dichroismu.

α -helix	(29,3 \pm 0,4) %
antiparalelní β -listy	(9,7 \pm 0,4)%
paralelní β -listy	(10,0 \pm 0,2)%
β -otočky	(17,5 \pm 0,2)%
neuspořádaná struktura	(35,9 \pm 0,4)%
celkem rozpoznáno	100,3%

5.3.7. Skenovací diferenciální kalorimetrie

Měření probíhalo na aparatuře popsané v kapitole 4.4. Koncentrace vzorku byla 0,2 mg/ml, pufr byl použit nově připravený jeden den před měřením (20 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM merkptoethanol pH 7,4). Krok změn teploty byl nastaven na 1 °C za minutu v rozsahu teplot 5–80 °C.



Graf 5.33. Molární teplotní kapacita kompletní lidské fosfodiesterázy 12 získaná z kalorimetrického měření s vypočtenými parametry. (Graf je výstupem programu CPCALC a nebylo možné jej nijak upravovat.)

Z kalorimetrického měření vychází teplota přechodu 43,1 °C. (Vzhledem k tvaru křivky nemá smysl přikládat důležitost dalším vypočteným parametrům. Pro jejich přesnější hodnotu by bylo třeba měření zopakovat s vyšší koncentrací vzorku, přičemž další, větší množství vzorku nebylo k dispozici).

Závěr a diskuze

Všechny tři vzorky obou výše zmíněných proteinů 2',5'-oligoadenylátové dráhy byly podrobeny spektroskopickým měřením za účelem co nejpodrobnější strukturní charakterizace. Při zadávání této práce byla známá pouze struktura lidské ankyrinové domény s navázanými 2', 5' vázanými oligoadenyláty, kterou se podařila zkrystalizovat (N. Tanaka, a kol., 2004). Přestože myší ankyrinovou doménu se dodnes zkrystalizovat nepodařilo, existují díky homologii myší a lidské ankyrinové domény RNasy L, která činí mezi residui 21–305 lidské a 21–304 myší RNasy L 65,6 % sekvenční identity, modely myší ankyrinové domény vázající 2-5A (M. Nakanishi, a kol., 2005). Ještě v průběhu analyzování prvního vzorku, ankyrinové domény myší RNasy L, se objevila publikace o zkrystalizování lidské ankyrinové domény bez aktivační molekuly (Y. Han, a kol., 2012), následovaná za nějaký čas krystalizací celé lidské RNasy L (Y. Han, a kol., 2014).

Vzorek myší ankyrinové domény RNasy L byl nejprve podroben měření dynamického rozptylu, které mělo pomoci určit vhodnost vzorku ke krystalizačním pokusům a určit jeho stabilitu v čase. Tato měření však ukázala, že vzorek je ke krystalizaci nevhodný a navíc, že se v časovém horizontu desítek minut vytváří obrovské oligomery – vzorek precipitoval a v čase byl obecně velmi nestabilní. Při měření Ramanova rozptylu myší ankyrinové domény bylo ukázáno, že na rozdíl od lidské fosfodiesterázy 12 nemá na naměřená spektra pomocí DCDR přítomnost pufru zásadní vliv. Ze strukturních analýz Ramanových spekter vyplynulo, že forma precipitující vykazuje stejné strukturní složení jako forma rozpustná (asi 35 % α -helixů, kolem 30 % β -skládaných listů a necelých 20 % tvoří β -otočky, zbytek připadá na neuspořádanou strukturu). Tvrzení o shodném složení zastoupení sekundárních struktur v různých formách vzorku podpořila i metoda infračervené spektroskopie. UDCDR spektroskopie a ATR-FTIR spektroskopie pozorujeme vyšší podíl β -listů než v případě transmisní FTIR spektroskopie, což může ukazovat na to, že ANK doména při styku s povrchem mění svoji strukturu.

Fakt, že dvě metody nezávisle na sobě prokázaly, že sekundární struktura vzorku precipitovaného a vzorku rozpustného je stejná, může naznačovat, že k precipitaci nedochází díky denaturaci, ale díky vysoké afinitě ankyrinových domén k sobě samým (viz kapitola 1.1). Druhou variantou je samozřejmě možnost, že celý vzorek byl v denaturovaném stavu již od samého začátku.

Byla vyzkoušena i závislost infračervených spekter na teplotě za účelem prozkoumání teploty denaturačního přechodu. Data byla zpracována pomocí faktorové analýzy a to dvěma způsoby. Zprvce byla zpracována data s odečteným pufrem a párami, zadruhé bez jejich odečtení. V obou případech se nepodařilo data rozložit

faktorovou analýzou na méně problémů nižších dimenzí s výrazně odlišnými váhovými koeficienty. Nebyly tedy nalezeny faktory ovlivňující teplotní závislost spekter podstatně více než ostatní. Po zpracování dat se ukázalo, že teplota (55 ± 1) °C je teplotou tání jakéhosi dvoustavového přechodu, nicméně s jistotou se nedá tvrdit, že se jedná o teplotu denaturace ankyrinové domény (vzhledem k tvaru příslušných subspekter i vzhledem k nízkým rozdílům váhových koeficientů). Takovýto nevýrazný průběh teplotní denaturace může být způsoben tím, že oligomery jsou extrémně stabilní, případně, že oligomerní stav je již blízký stavu denaturovanému, takže k žádným příliš velkým změnám nedošlo.

Teorii od začátku denaturovaného vzorku potvrzuje i porovnání výsledků analýzy krystalové struktury lidské ankyrinové domény RNasy L (bez navázaných aktivačních molekul) s výsledky ze spektroskopických měření. Z krystalové struktury ankyrinové domény (4G8K z RCSB PDB (Y. Han, a kol., 2012)) vyplývá složení s podstatně vyšším obsahem α -helixů (50 %), nižším obsahem β -listů (2 %) a dále obsahující smyčky vázané vodíkovými můstky (21 %) a neuspořádanou strukturu (24 %).

Ankyrinovou doménu se tedy nepodařilo připravit v dostatečně stabilní formě, což znemožnilo další detailnější spektroskopické studie – např. studie vazby ligandů. Vzhledem k problémům se stabilitou vzorku, který se srážel v obrovské oligomery v časovém horizontu hodin (kapitola 5.1.3, např. graf 5.3) a faktu, že struktura lidské RNasy L byla již vyřešena, bylo po prvotních měřeních od charakterizace ankyrinové domény RNasy L upuštěno a pozornost byla zaměřena na lidskou fosfodiesterázu 12.

Ta byla nejprve charakterizována v podobě C-terminálního konce. Dynamický rozptyl ukázal, že vzorek je v čase stabilní, a tak byla dynamickým rozptylem pozorována teplotní denaturace. Při zvyšování teploty 1 °C za 7 minut se dá teplota největších strukturních změn (denaturace) určit jako teplota kolem 39 °C. Kromě stability a teploty denaturace však dynamický rozptyl dále ukázal nehomogenitu vzorku. Dalo se tedy předpokládat, že je vzorek špatně purifikovaný a obsahuje další, větší i menší proteinové molekuly, což se potvrdilo provedenou SDS-elektroforézou.

DCCR spektra dialyzovaného i nedialyzovaného vzorku upozornila na důležitý fakt. Merkptoetanol, přidaný do pufru pro redukci nespécifických S–S můstků, je těkavá látka a s časem vyprchává a tudíž při vysychání DCCR vzorku nedokáže udržet S–S můstky redukované – předpokládané S–H vibrace se tak v DCCR spektrech vůbec nepodařilo pozorovat. Ramanova spektroskopie proteinu v roztoku ve shodném pufru ale S–H vibrace poměrně jasně ukázala. Problém tedy není v samotném pufru, nicméně může být v principu přípravy vzorku pro metodu DCCR, která spoléhá na oddělení měřeného proteinu od složek pufru. Při tom je více než pravděpodobné, že došlo k odpaření merkptoetanolu. Výhodou této metody je nepřítomnost fluorescenčního pozadí, nevýhodou je ovšem ztráta pufrém definovaného prostředí.

Kromě nepřítomnosti S–H vibrací v obou DCDR spektrech (dialyzovaného i nedialyzovaného vzorku), bylo zřejmé, že v případě nedialyzovaného vzorku jsou vibrace proteinu překryty vibracemi pufru – výše uvedené „oddělení vzorku od pufru“ tedy zdaleka není dokonalé. Jak se ukázalo, situaci nelze řešit prostým odečtem spektra pufru. Ten se totiž skládá z více různých složek, které mohou zkrystalizovat na různých částech destičky. Je tedy těžko k určení, jaké spektrum je vhodné odečítat. Navíc byl pozorován lehký posun některých vibrací v případě přípravy kapkově nanášených povlaků proteinu rozpuštěného v pufru a proteinu zbaveném pufru (dialyzovaném). Pro strukturní analýzu byly dále použity pouze vzorky dialyzované.

Je pravděpodobné, že díky rozdílnému zastoupení vzniklých S–S můstků pozorujeme ve struktuře rozdílné složení struktur vzorku měřeného ve vodném roztoku a vyschlého vzorku zkoumaného metodou DCDR spektroskopie. Zatímco v prvním případě struktura obsahuje asi 25 % α -helixů a necelých 60 % β -listů, vzorek bez pufru připravený metodou kapkově nanášených povrchů vykazuje asi 22 % α -helixů a necelých 50 % β -listů, tedy přibližně o 10 % více neuspořádané struktury. Pomocí infračervené spektroskopie se nepodařilo naměřit spektrum, které by byla procedura LSA schopná s dostatečnou přesností rozpoznat. Stejná situace nastala i u výsledků elektronového cirkulárního dichroismu – neuronové sítě nebyly schopné s dostatečnou spolehlivostí složení sekundární struktury odhadnout.

Vzhledem k výše zmíněným výsledkům se dá předpokládat, že C-terminální část lidské fosfodiesterázy 12 tvoří blíže nedefinované (strukturně heterogenní) oligomery, které znesnadňují analýzu struktury. V charakterizaci se tedy přešlo ke kompletní lidské fosfodiesteráze 12.

Dynamický rozptyl ukázal, že kompletní PDE 12 je v čase stabilní, nicméně tvoří populaci různě velkých oligomerů (až $\sim 10^8$ kDa). Byla provedena teplotní denaturace sledovaná dynamickým rozptylem. Ta proběhla pro dva různé případy, vždy s rychlostí ohřevu 1 °C za 7 minut – pro vzorek v pufru s nedefinovaným množstvím merkaptóetanolu (pufr dodaný se vzorkem) a v pufru připraveném čerstvě před měřením. Zatímco denaturační přechod v pufru s nižším obsahem merkaptóetanolu proběhl přibližně při 37 °C, v pufru s obnovenou koncentrací merkaptóetanolu to bylo při 31 °C. Z toho vyplývá, že vznik nespécifických S–S můstků v nepřítomnosti merkaptóetanolu stabilizuje celou strukturu a zvyšuje tak teplotu přechodu.

DCDR spektroskopie opět ukázala velký překryv spektra proteinu se spektrem pufru v případě nedialyzovaného vzorku. Navíc v tomto případě byly S–H vibrace patrné u vzorku dialyzovaného, nikoli však u vzorku nedialyzovaného (u nedialyzovaného vzorku nejsou vidět jednoduše pro to, že pozadí dané pufrům je pro takto slabé vibrace příliš vysoké). Jedním z možných vysvětlení je, že protein není schopen ze strukturního hlediska (z důvodů sterického bránění) uzavřít všechny S–H skupiny do formy S–S můstků. Strukturní analýza spekter získaných DCDR metodou

i metodou klasického Ramanova rozptylu ukazuje na shodnou strukturu (v rámci chyb) v obou těchto případech. Celkem se tedy v proteinu vyskytuje přibližně 30 % α -helixů, kolem 40 % β -listů a asi 30 % neuspořádaných struktur spolu s β -otočkami. Výsledky pro α -helix byly podpořeny i výsledky z měření infračervených spekter, v případě β -listů však z IR spektroskopie vyplynulo zastoupení o 10 % nižší (ve prospěch neuspořádaných struktur a β -otoček). Výsledky strukturní analýzy proteinu pomocí elektronového cirkulárního dichroismu v rámci svých chyb podpořily výsledky infračervené spektroskopie – tedy zastoupení 29 % α -helixů, kolem 20 % β -listů a asi 36 % neuspořádaných struktur, k tomu 18 % β -otoček. (V případě infračervené spektroskopie bylo oproti elektronovému cirkulárnímu dichroismu procento neuspořádaných struktur o něco vyšší v neprospěch zastoupení β -otoček).

Byla provedena teplotní denaturace sledovaná jak spektroskopii Ramanova rozptylu, tak infračervenou spektroskopii. V prvním případě byla po zpracování faktorovou analýzou stanovena teplota denuračního přechodu na $(25,0 \pm 0,2) ^\circ\text{C}$, ve druhém případě na $(25,7 \pm 0,4) ^\circ\text{C}$. Protože obě metody byly nastaveny tak, aby zvyšování teploty probíhalo stále stejným krokem $2 ^\circ\text{C}$ za 9 minut, je shoda teplot předpokládána. Oproti dynamickému rozptylu jsou určené teploty denaturace o několik stupňů nižší, přestože rychlost ohřevu je v tomto případě vyšší. Při porovnávání těchto výsledků je však nutné si uvědomit, že teplota přechodu sledovaná dynamickým rozptylem udává teplotu přechodu změn převážně v terciární a kvartérní struktuře. Údaje získané z Ramanova rozptylu či infračervené spektroskopie sledují hlavně změny v sekundární struktuře. Z výsledků je tedy patrné, že při $25 ^\circ\text{C}$ dochází k denuračním změnám v sekundární struktuře, které vedou při teplotě kolem $31 ^\circ\text{C}$ ke změnám ve struktuře terciární/kvartérní – ke vzniku oligomerů a precipitátů. Je dobré si ale dále uvědomit, že u dynamického rozptylu nebyl definován rigorózní postup získání teploty denaturace – hodnoty zde uváděné jsou pouze jakési odhady teploty, při které pozorujeme nejrychlejší změny ve velikosti částic. Navíc, jak bylo ukázáno u dynamického rozptylu, rychlost oligomerizace je závislá na koncentraci merkaptóetanolu, který se v daném čase nedá spolehlivě definovat a mohla se od měření dynamického rozptylu lehce lišit.

Teplota ireverzibilního přechodu určená kalorimetrií je rovna $43,1 ^\circ\text{C}$. Tato teplota je vyšší než u dosud zmíněných metod. Důvodem je nejrychlejší krok ohřev ($1 ^\circ\text{C}$ za minutu) a zřejmě opět roli bude hrát těžko předvídatelné množství merkaptóetanolu v pufru, který byl jeden den starý. Jeho koncentrace byla tedy jistě nižší než u čerstvě připraveného pufru při měření dynamického rozptylu s vyšším obsahem merkaptóetanolu. Kalorimetrie navíc udává teplotu přechodu systému jako celku – započítává se do ní energie potřebná pro přeuspořádání proteinu ale i pufru v okolí denaturovaných částí. Může proto být vyšší, než teplota přechodu určená výše zmíněnými metodami.

Při sepisování této práce se v RCSB PDB objevilo ohlášení úspěšně zkrystalizované lidské fosfodiesterázy 12, jejíž struktura byla deponovaná a zveřejněná, přestože práce ještě nebyla publikována (PDB ID 4ZKF; Kim, S.Y. a kol., 2015). Porovnáním struktury získané rentgenovou analýzou (19 % α -helixů, 5 % helixu 3_{10} , 4 % helixu π , kolem 27,5 % β -listů, 10 % otoček, 11 % ohybů a 1,5 % β -můstků) s výsledky této práce vidíme shodu v rámci chyb s daty naměřenými FTIR spektroskopii, nicméně elektronový cirkulární dichroismus a Ramanova spektroskopie jsou těmto výsledkům též blízké. Protože výsledky nebyly ještě publikovány, nedá se soudit, čím může být tento nesoulad způsoben. Svou roli ve složení sekundárních struktur ale rozhodně může hrát přítomnost dvojmocného iontu magnesia, který byl při krystalizaci použit jako ligand a který je i v živých soustavách nezbytnou složkou pro správně fungující enzym

Tato práce prezentuje pokus o charakterizaci celkem tří vzorků – ankyrinové domény myši RNasy L, C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 a kompletní lidské fosfodiesterázy 12, na kterých demonstruje techniky (nejen) vibrační spektroskopie použitelné pro charakterizaci proteinů a popisuje některé užívané metody zpracování takto získaných dat. Ukazuje se, že vzorky považované za stabilní a vhodné k pokročilejším pokusům, jako je například vazba ligandů, stabilními vůbec být nemusí (viz ANK doména RNasy L) a že i vzorky přečištěné dle užívaných protokolů nemusí odpovídat předpokládané čistotě (viz C-terminální část lidské fosfodiesterázy), což může bránit krystalizačním pokusům i dalším experimentům. Na druhou stranu, na kompletní lidské PDE 12 bylo ukázáno, že spektroskopické metody a použité procedury zpracování dat jsou schopné vzorek charakterizovat i ze strukturního hlediska poměrně spolehlivě.

Literatura

- Adachi, E., Dimitrov, A. S. a Nagayama, K.: Stripe Patterns Formed on a Glass Surface during Droplet Evaporation. 1995, *Langmuir*, 11(4):1057-1060.
- Anfinsen, Ch. B: Principles that Govern the Folding of Protein Chains. 1973, *Science*, 181(4096):223-230.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S. a kol.: The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. 2005, *FEMS Microbiology Reviews*, 29(2):231-62.
- Baldwin, R. L.: Energetics of protein folding. 2007, *Journal of Molecular Biology*, 371(2):283-301.
- Barth, A.: Infrared spectroscopy of proteins. 2007, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9):1073-1101.
- Barth, A., a Zscherp, C.: What vibrations tell us about proteins. 2002, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35(4):369-430.
- Berjot, M., Marx, J. a Alix A. J. P.: Determination of the secondary structure of proteins from the Raman amide I band: The reference intensity profiles method. 1987, *Journal of Raman Spectroscopy*, 18(4):289-300.
- Blatch, G. L., a Lassel, M.: The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. 1999, *Bioessays*, 21(11):932-9.
- Bradford, M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72** (1976) 248-254.
- Bruylants, G., Wouters, J. a Michaux, C.: Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. 2005, *Current Medicinal Chemistry*, 12(17):2011-20.
- Burkhard, P., Stetefeld, J. a Strelkov, S. V.: Coiled coils: a highly versatile protein folding motif. 2001, *Trends in Cell Biology*, 11(2):82-88.
- Carey, P. R.: Raman spectroscopy, the sleeping giant in structural biology, awakes. 1999, *Journal of Biological Chemistry*, 274(38):26625-8.
- Carroll, S. S., Cole, J. L., Viscount, J. G. T. a kol.: Activation of RNase L by 2',5'-Oligoadenylates. 1997, *Journal of Biological Chemistry*, 272(31).
- Castelli, J. C., Hassel, B. A, Maran, A. a kol.: The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. 1998, *Cell Death & Differentiation*, 5(4):313-20.
- Chen, Y. H., Yang, J. T. a Chau, K. H.: Determination of the helix and beta form of proteins in aqueous solution by circular dichroism. 1974, *Biochemistry*, 13(16):3350-9.
- Cheng, B., a Titterington, D. M.: Neural Networks: A Review from a Statistical Perspective. 1994, *Statistical Science*, (1):2-30.
- Corey, R. B., a Pauling, L.: Fundamental Dimensions of Polypeptide Chains. 1953, *Proceedings of Royal Society of Lond B*, Volume 141(902):10-20.
- Dames, S. A., Kammerer, R. A., Wiltscheck, R. a kol.: NMR structure of a parallel homotrimeric coiled coil. 1998, *Nature Structural Biology*, 5(8):687-91.

- Das, R. S., a Agrawal, Y. K.: Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications. 2011, *Vibrational Spectroscopy*, 57(2):163-176.
- Davey, J., a Lord, J. M.: *Essential Cell Biology Vol 1: Cell Structure*. 2003: OUP Oxford.
- Deegan, R. D., Bakajin, O., Dupont, T. F. a kol.: Contact line deposits in an evaporating drop. 2000, *Physical Review E*, 62(1):756-765.
- Demettre, E., Bastide, L., D'Haese, A. a kol.: Ribonuclease L proteolysis in peripheral blood mononuclear cells of chronic fatigue syndrome patients. 2002, *Journal of Biological Chemistry*, 277(38):35746-51.
- Dong, B., a Silverman, R. H.: A Bipartite Model of 2-5A-dependent RNase L. 1997, *Journal of Biological Chemistry*, 272(35):22236-22242.
- Dousseau, F., Therrien, M., Pézolet, M.: On the spectral subtraction of water from FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. 1989, *Applied Spectroscopy* 43, 538–542.
- Dutta, S. a Tan, Y. J.: Structural and functional characterization of human SGT and its interaction with Vpu of the human immunodeficiency virus type 1. 2008, *Biochemistry*, 47(38):10123-31.
- Englander, S. W., Mayne, L. a Krishna, M. M.: Protein folding and misfolding: mechanism and principles. 2007, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 40(4):287-326.
- Fabre, O., Salehzada, T., Lambert, K. a kol.: RNase L controls terminal adipocyte differentiation, lipids storage and insulin sensitivity via CHOP10 mRNA regulation. 2012, *Cell Death & Differentiation*, 19(9):1470-1481.
- Gholamreza, K., a Ardestani, S. K.: *Gel Electrophoresis of Protein - From Basic Science to Practical Approach*. 2012, *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*.
- Goormaghtigh, E., Raussens, V. a Ruyschaert, J. M.: Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. 1999, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1422(2):105-85.
- Gun'ko, V. M., Klyueva, A. V., Levchuk, Y. N. a kol.: Photon correlation spectroscopy investigations of proteins. 2003, *Advances in Colloid and Interface Science*, 105(1–3):201-328.
- Gusho, E., Zhang, R., Jha, B. K. a kol.: Murine AKAP7 has a 2',5'-phosphodiesterase domain that can complement an inactive murine coronavirus ns2 gene. 2014, *MBio*, 5(4):e01312-14.
- Han, Y., Donovan, J., Rath, S. a kol.: Structure of human RNase L reveals the basis for regulated RNA decay in the IFN response. 2014, *Science*, 343(6176):1244-8.
- Han, Y., Whitney, G., Donovan, J. a kol.: Innate immune messenger 2-5A tethers human RNase L into active high-order complexes. 2012, *Cell Reports*, 2(4):902-13.
- Hansen, S.: Translational friction coefficients for cylinders of arbitrary axial ratios estimated by Monte Carlo simulation. 2004, *The Journal of Chemical Physics*, 121(18):9111-5.
- Hartmann, R., Justesen, J., Sarkar, S. N. a kol.: Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. 2003, *Molecular Cell*, 12(5):1173-85.

- Havel, H. A.: Spectroscopic methods for determining protein structure in solution. 1996. United States of America: VCH Publishers, Inc.
- Hu, H., a Larson, R. G.: Marangoni Effect Reverses Coffee-Ring Depositions. 2006, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14):7090-7094.
- Huang, H., Zeqiraj, E., Dong, B. a kol.: Dimeric structure of pseudokinase RNase L bound to 2-5A reveals a basis for interferon-induced antiviral activity. 2014, *Molecular Cell*, 53(2):221-34.
- Hutchinson, E. G., a Thornton, J. M.: The Greek key motif: extraction, classification and analysis. 1993, *Protein engineering*, 6(3):233-45.
- Johnson, C. M.: Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. 2013, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2):100-9.
- Johnson, W. C.: Analyzing protein circular dichroism spectra for accurate secondary structures. 1999, *Proteins*, 35(3):307-12.
- Jones, S.: An overview of the basic helix-loop-helix proteins. 2004, *Genome Biology*, 5(6):226-226.
- Kabsch, W., a Sander, C.: Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. 1983, *Biopolymers*, 22(12):2577-637.
- Kelly, S. M., Jess, T. J. a Price, N. C.: How to study proteins by circular dichroism. 2005, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1751(2):119-39.
- Kleywegt, G. J., a Jones, T. A.: Phi/Psi-chology: Ramachandran revisited. 1996, *Structure*, 4(12):1395-1400.
- Kopecký, V., Bok, J. a Hofbauerová, K.: Vibrational Spectroscopy Toolbox: determination of the secondary structure of proteins. 2001.
- Kowalski, K., Liew, C. K., Matthews, J. M. a kol.: Characterization of the conserved interaction between GATA and FOG family proteins. 2002, *Journal of Biological Chemistry*, 277(38):35720-9.
- Kříž, M., Snášel, J., Kopecký Jr, V. a kol.: Structural changes of human RNase L upon homodimerization investigated by Raman spectroscopy. 2012, *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1824(9):1039-1044.
- Kubota, K., Nakahara, K., Ohtsuka, T. a kol.: Identification of 2'-Phosphodiesterase, Which Plays a Role in the 2-5A System Regulated by Interferon. 2004, *Journal of Biological Chemistry*, 279(36):37832-37841.
- Kurganov, B. I., Lyubarev, A. E., Sanchez-Ruiz, J. M. a kol.: Analysis of differential scanning calorimetry data for proteins Criteria of validity of one-step mechanism of irreversible protein denaturation. 1997, *Biophysical Chemistry*, 69(2-3):125-135.
- Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. 1970, *Nature*, 227:680-685.
- Larmour, I. A., Gray, J. P. E. D a Beil, S. E. J.: Universal Raman enhancement by solvent removal. 2009, *Spectroscopy Europe*, 21(3).
- Levitt, M. a Greer, J.: Automatic Identification of Secondary Structure in Globular Proteins. 1997, *Journal of Molecular Biology*, 114:181-293.
- Li, J., Mahajan, A. a Tsai, M. D.: Ankyrin repeat: a unique motif mediating protein-protein interactions. 2006, *Biochemistry*, 45(51):15168-78.

- Liang, S. L., Quirk, D. a Zhou, A.: RNase L: its biological roles and regulation. 2006, *IUBMB Life*, 58(9):508-14.
- Liu, W., Liang, S. L., Liu, H. a kol.: Tumour suppressor function of RNase L in a mouse model. 2007, *European Journal of Cancer*, 43(1):202-9.
- MacArthur, M. W., a Thornton, J. M.: Deviations from Planarity of the Peptide Bond in Peptides and Proteins. 1996, *Journal of Molecular Biology*, 264(5):1180-1195.
- Mackay, J. P., a Crossley, M.: Zinc fingers are sticking together. 1998, *Trends in Biochemical Sciences*, 23(1):1-4.
- Malvern Instruments: Dynamic light scattering: Common terms defined. 2011
- Malvern Instruments: Zetasizer Nano - Příručka pro uživatele. 2007
- Meurant, G.: *Advances in protein chemistry*. 1968: Elsevier Science.
- Murphy, K. P., a Freire, E.: Structural energetics of protein stability and folding cooperativity. 1993, *Pure and Applied Chemistry*., 65(9):1939-1946.
- Nagaoka, K., Kitamura, Y., Ueno, Y. a kol.: 5'-O-dephosphorylated 2',5'-oligoadenylate (2-5A) with 8-methyladenosine at the 2'-terminus activates human RNase L. 2010, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 20(3):1186-8
- Nakanishi, M., Tanaka, N., Mizutani, Y. a kol.: Functional characterization of 2',5'-linked oligoadenylate binding determinant of human RNase L. 2005, *Journal of Biological Chemistry*, 280(50):41694-9.
- Nakanishi, M., Yoshimura, A., Ishida, N. a kol.: Contribution of Tyr712 and Phe716 to the activity of human RNase L. 2004, *European Journal of Biochemistry*, 271(13):2737-44.
- Ornstein, L.: Disc electrophoresis. I. Background and theory. 1964, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121:321-49.
- Pack, S.: *Factor analysis in chemistry*, (2nd edition). E. R. Malinowski, Wiley-Interscience. 1991, *Journal of Chemometrics*, 5(6):545-545.
- Pauchard, L., Parrisé, F. a Allain, C.: Influence of salt content on crack patterns formed through colloidal suspension desiccation. 1999, *Physical Review E*, 59(3):3737-3740.
- Pecora, R.: *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*. 2013, Springer.
- Perczel, A., Park, K. a Fasman, G. D.: Analysis of the circular dichroism spectrum of proteins using the convex constraint algorithm: a practical guide. 1992, *Analytical Biochemistry*, 203(1):83-93.
- Poulsen, J. B., Andersen, K. R., Kjær, K. H. a kol.: Characterization of human phosphodiesterase 12 and identification of a novel 2'-5' oligoadenylate nuclease – The ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1. 2012, *Biochimie*, 94(5):1098-1107.
- Poulsen, J. B., Andersen, K. R., Kjær, K. H. a kol.: Human 2'-phosphodiesterase localizes to the mitochondrial matrix with a putative function in mitochondrial RNA turnover. 2011, *Nucleic Acids Research*, 39(9):3754-3770.
- Prosser, V.: *Experimentální metody biofyziky*. 1989: Academia.
- Qian, W., a Krimm, S.: Conformation dependence of the SH and CS stretch frequencies of the cysteine residue. 1992, *Biopolymers*, 32(11):1503-1518.

- Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. a Sasisekharan, V.: Stereochemistry of polypeptide chain configurations. 1963, *Journal of Molecular Biology*, 7:95-9.
- Raman, C.V., a Krishnan, K. S.: A new type of Secondary Radiation. 1928, *Nature*, 121:501-502.
- Reynolds, J. A., a Tanford, Ch.: The Gross Conformation of Protein-Sodium Dodecyl Sulfate Complexes. 1970, *Journal of Biological Chemistry*, 245(19):5161-5165.
- Rorbach, J., Nicholls, T. J., a Minczuk, M.: PDE12 removes mitochondrial RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria. 2011, *Nucleic Acids Research*, 39(17):7750-63.
- Rose, G. D., Gierasch, L. M. a Smith, J. A.: Turns in peptides and proteins. 1985, *Advances in Protein Chemistry*, 37:1-109.
- Sane, S. U., Cramer, S. M. a Przybycien, T. M.: A Holistic Approach to Protein Secondary Structure Characterization Using Amide I Band Raman Spectroscopy. 1999, *Analytical Biochemistry*, 269(2):255-272.
- Savitzky, A., a Golay, M. J. E.: Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. 1964, *Analytical Chemistry*, 36(8):1627-1639.
- Schmid, F. X., a Baldwin, R. L.: Detection of an early intermediate in the folding of ribonuclease A by protection of amide protons against exchange. 1979, *Journal of Molecular Biology*, 135(1):199-215.
- Schulz, G.E., a Schirmer, R. H.: *Principles of Protein Structure*. 2013: Springer New York.
- Schweitzer-Stenner, a Reinhard: Advances in vibrational spectroscopy as a sensitive probe of peptide and protein structure: A critical review. 2006, *Vibrational Spectroscopy*, 42(1):98-117.
- Stefani, M.: Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. 2004, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(1):5-25.
- Susi, H., a Byler, D. M.: Fourier Deconvolution of the Amide I Raman Band of Proteins as Related to Conformation. 1988, *Applied Spectroscopy*, 42(5):819-826.
- Takeuchi, O., a Akira, S.: Innate immunity to virus infection. 2009, *Immunological Reviews*, 227(1):75-86.
- Tamm, L. K., a Tatulian, S. A.: Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers. 1997, *Quarterly Reviews of Biophysics*, 30(4):365-429.
- Tan, J., Anand, K., Mesters, J. R. a kol.: Peptidic Alpha, Beta-Unsaturated Ethyl Esters as Inhibitors of the 3C Protease of Coxsackie Virus B3: Crystal Structures, Antiviral Activities, and Resistance Mutations. To be published.
- Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y. a kol.: Molecular basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by the N-terminal ankyrin repeat domain of human ribonuclease L. 2005, *Nucleic Acids Symposium Series: Oxford*, (49):323-4.
- Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y. a kol.: Structural basis for recognition of 2',5'-linked oligoadenylates by human ribonuclease L. 2004, *The EMBO Journal*, 23(20):3929-3938.
- Tee, J. M., a Peppelenbosch, M. P.: Anchoring skeletal muscle development and disease: the role of ankyrin repeat domain containing proteins in muscle

- physiology. 2010, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(4):318-30.
- Thakur, C. S., Jha, B. K., Dong, B. a kol.: Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity. 2007, *PNAS, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 104(23):9585-90.
- Tuma, R.: Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies. 2005, *Journal of Raman Spectroscopy*, 36(4):307–319.
- Verheijen, J. C., van der Marel, G. A., van Boom, J. H. a kol.: 2',5'-Oligoadenylate-peptide nucleic acids (2–5A-PNAs) activate RNase L. 1999, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 7(3):449-455.
- Vermant, J.: Fluid mechanics: When shape matters. 2011, *Nature*, 476(7360):286-287.
- Vitagliano, L., Berisio, R., Mastrangelo, A. a kol.: Preferred proline puckerings in cis and trans peptide groups: Implications for collagen stability. 2001, *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 10(12):2627-2632.
- Voet, D., a Voetová, J. G.: *Biochemie*. 1995. A.K.a kol., transl. Praha: Victoria Publishing a.s.
- Wang, Z. Y., Gokan, K., Kobayashi, M. a kol.: Solution structures of the core light-harvesting alpha and beta polypeptides from *Rhodospirillum rubrum*: implications for the pigment-protein and protein-protein interactions. 2005, *Journal of Molecular Biology*, 347(2):465-77.
- Whitmore, L., a Wallace, B. A.: Protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopy: methods and reference databases. 2008, *Biopolymers*, 89(5):392-400.
- Wierenga, R. K.: The TIM-barrel fold: a versatile framework for efficient enzymes. 2001, *FEBS Letters*, 492(3):193-198.
- Williams, R. W.: Protein secondary structure analysis using Raman amide I and amide III spectra. 1986, *Methods in Enzymology*, 130:311-31.
- Williams, R. W.: Estimation of protein secondary structure from the laser Raman amide I spectrum. 1983, *Journal of Molecular Biology*, 166(4):581-603.
- Wood, E. R., Bledsoe, R., Chai, J. a kol.: The Role of Phosphodiesterase 12 (PDE12) as a Negative Regulator of the Innate Immune Response and the Discovery of Antiviral Inhibitors. 2015, *Journal of Biological Chemistry*.
- Xiang, Y., Wang, Z., Murakami, J. a kol.: Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. 2003, *Cancer Research*, 63(20):6795-801.
- Yunker, P. J., Still, T., Lohr, M. A. a kol.: Suppression of the coffee-ring effect by shape-dependent capillary interactions. 2011, *Nature*, 476(7360):308-311.

Seznam tabulek

Tabulka 5.1. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v myší ankyrinové doméně RNasy L s histidinovou kotvou.

Tabulky 5.2, 5.3, 5.4. Výsledky rozboru sekundární struktury myší ANK domény myší RNasy L ze spekter Ramanova rozptylu získaných metodou DCDR ze tří různých modifikací vzorku – vzorek dialyzovaný, vzorek v pufru a precipitát.

Tabulka 5.5. Výsledky analýzy sekundárních struktur metodou LSA z naměřených transmisních FTIR a ATR-FTIR spekter vzorků myší ANK domény RNasy L.

Tabulka 5.6. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v lidské C-terminální části fosfodiesterázy 12 s histidinovou kotvou.

Tabulky 5.7, 5.8. Výsledky rozboru sekundární struktury C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 ze spektra Ramanova rozptylu získaného metodou DCDR ze vzorku dialyzovaného a ze spektra Ramanova rozptylu vzorku rozpuštěného v pufru a měřeného v kapiláře.

Tabulka 5.9: Odhad sekundární struktury C-terminální části lidské fosfodiesterázy 12 získaná metodou LSA z infračerveného absorpčního

Tabulka 5.10. Početní a procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselinových zbytků v lidské fosfodiesteráze 12 s histidinovou kotvou.

Tabulka 5.11. Odhad sekundární struktury lidské PDE 12 z DCDR spekter dialyzovaného vzorku.

Tabulka 5.12. Odhad struktury lidské PDE 12 měřené v roztoku.

Tabulka 5.13. Odhad sekundárních struktur kompletní lidské fosfodiesterázy 12 získaný z infračervených absorpčních spekter analýzou pásů amidu I a II metodou LSA.

Tabulka 5.14. Odhad sekundárních struktur kompletní lidské fosfodiesterázy 12 získaný z měření elektronového cirkulárního dichroismu.

Seznam použitých zkratek

2-5A	2', 5'-vázané oligoadenyláty
RNasa L	Ribonukleáza L
ANK	ankyrinová doména
IFN	interferon
ATP	Adenosintrifosfát
PDE	fosfodiesteráza
RTG	rentgenové záření
NMR	nukleární magnetická rezonance
DCDR	Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (<i>drop coating deposition raman</i>)
UV	ultrafialové záření
IR	infračervené záření
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (<i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>)
ATR	zeslabený úplný odraz (<i>attenuated total reflectance</i>)
CD	elektronový cirkulární dichroismus
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
SDS PAGE	gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsíranu sodného (<i>sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
RIP	analýza pomocí referenčních profilů (<i>reference intensity profile</i>)
LSA	analýza metodou nejmenších čtverců (<i>least-squares analysis</i>)
SVD	rozklad do singulárních čísel (<i>singular value decomposition</i>)
MCT	Mercury Cadmium Telluridový fotokonduktivní detector
DTGS	Deuteraterovaný Tri Glycine sulfátový pyroelektrický detector
PCR	polymerázová řetězová reakce
Tris	Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol
TEMED	Tetramethylethylenediamine