

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra biofyziky

JAROSLAVA GELETIČOVÁ

**SLEDOVÁNÍ ELEKTROSTATICKÉHO
POTENCIÁLU NA POVRCHU BIOMOLEKUL**



Diplomová práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Kubala, Ph. D.

Olomouc 2013

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem vytvořila tuto diplomovou práci samostatně pod vedením Doc. RNDr. Martina Kubaly Ph. D., a že jsem v seznamu použité literatury uvedla všechny zdroje použité při zpracování práce.

V Olomouci dne 25. dubna 2013

Poděkování

Na úvod práce by autorka ráda vyjádřila poděkování následujícím lidem za spolupráci při tvorbě práce a za konzultaci výsledků: Mgr. Miroslavovi Huličiakovi z katedry biofyziky a hlavně vedoucímu práce, Doc. RNDr. Martinovi Kubalovi, Ph. D. z katedry biofyziky.

Obsah

Souhrn	4
Abstract	5
1 Úvod	6
2 Zhášení fluorescence	8
2.1 Statické zhášení fluorescence	9
2.2 Dynamické zhášení fluorescence	9
2.3 Kombinace statického a dynamického zhášení fluorescence	10
3 Mechanismy zhášení	12
4 Faktory ovlivňující zhášení fluorescence	14
4.1 Vliv teploty na zhášení fluorescence	14
4.2 Vliv elektrostatických interakcí na zhášení fluorescence	15
5 Iontová síla	17
6 Tryptofanová fluorescence	19
6.1 Spektrální posun tryptofanu	20

7	Na⁺/K⁺-ATPasa	22
7.1	Reakční cyklus	24
7.2	Struktura α podjednotky	25
7.3	Struktura podjednotky β	25
7.4	FXYP proteiny	26
8	Albumin z lidského séra (human serum albumin, HSA)	27
9	Albumin z hovězího séra (Bovine serum albumin, BSA)	29
10	Materiál a metody	31
10.1	Chemikálie	31
10.2	Příprava mutantů velkého cytoplazmatického segmentu C45 Na ⁺ /K ⁺ ATPasy	32
10.3	Postup transformace plazmidů do buněk <i>E. Coli</i>	32
10.4	Postup exprese segmentu C45	34
10.5	Vlastní měření	36
10.5.1	Měření kinetiky dohasínání fluorescence	36
10.5.2	Měření steady-state intenzity fluorescence	37
11	Výsledky	38
11.1	Vliv iontové síly na zhášení fluorescence	38
11.2	Závislost Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle	43
11.3	Doby života excitovaných stavů	47
11.4	Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle	50
11.5	Závislost poměrů bimolekulárních zhášecích konstant na iontové síle	53
12	Diskuze	57
13	Závěr	62
	Literatura	62

Apendix	66
A1.1 Měření na mikrotitračních destičkách	67
A1.2 Obecné informace	67
A1.3 Nastavení přístroje a měření fluorescence	68
A 1.4 Vliv nastavení parametru "gain" na měření	71
A 1.5 Vliv rychlosti měření na poměr signál/šum	75
A1.6 Určení korekčních koeficientů při ředění roztoku	76

Souhrn

Tato práce je zaměřena na problematiku tryptofanové fluorescence a zhášení fluorescence. Teoretická část stručně popisuje nutné teoretické základy včetně použitých proteinů. Modelovým fluoroforem je neutrální analog tryptofanu, NATA (N-acetyl-L-tryptofanamid). Modelovými proteiny pak byly HSA (albumin z lidského séra), BSA (albumin z hovězího séra) a série jednotryptofanových mutantů velkého cytoplazmatického segmentu C45 Na^+/K^+ -ATPasy.

Bližší se tato práce zabývá vlivem iontové síly na efektivitu zhášení fluorescence. Experimenty byly provedeny pro široké spektrum iontových sil (50 - 750 mM) a pro dvě odlišná zhášedla. Prvním zhášedlem byl jodidový aniont, který umožňuje sledování elektrostatických interakcí. Druhým zhášedlem byl akrylamid, jež může být použit jako reference, protože nese náboj.

Poměr bimolekulárních zhášecích konstant pro akrylamid a pro jodid nese informace o elektrostatických interakcích mezi molekulami zhášedla a fluoroforem.

Abstract

This work is focused on tryptophan fluorescence and fluorescence quenching. Theoretical part briefly describes principles including description of proteins used for experiments. Model fluorophore is neutral tryptophan analog, called NATA (N-acetyl-L-tryptophanamide). Model proteins were HSA (human serum albumin), BSA (bovine serum albumin) and series of single-tryptophan mutants of the Na^+/K^+ -ATPase.

This work studies influence of ionic strength on fluorescence quenching effectivity. Experiments were done for wide range of ionic strength and for two different quenchers. The first quencher was iodide anion, which enables measuring of electrostatic interactions. Second quencher was acrylamide, which can be used as reference, because it has no charge.

The ratio of bimolecular quenching constant for acrylamide and for iodide carries informations about electrostatic interactions between molecules of quencher and fluorophore.

Kapitola 1

Úvod

Cílem této práce je sledovat elektrostatický potenciál na povrchu biomakromolekul pomocí dynamického zhášení fluorescence. Zhášení fluorescence je obecně proces, při kterém dochází k poklesu intenzity fluorescence vlivem molekulárních interakcí. Těchto molekulárních interakcí existuje více, přičemž jednotlivé procesy probíhají odlišným mechanismem zhášení. Tyto procesy primárně dělíme na dvě skupiny - statické a dynamické zhášení. Tato práce se zaměřuje na problematiku dynamického zhášení fluorescence. Metoda zhášení fluorescence nám může poskytnout celou škálu informací o vzorku, jako je například:

- pozice fluoroforu (exponovaný na povrchu, pohřbený uvnitř)
- konformační změny
- difúze zhášedla nebo fluoroforu
- elektrostatická interakce mezi fluoroforem a zhášedlem

Poslední zmíněná charakteristika je snadno sledována nepřímou metodou s využitím parametru zvaného iontová síla. I když se vliv tohoto parametru v experimentech často zanedbává, je dokázáno, že vliv iontové síly rozhodně není zanedbatelný a ovlivňuje dokonce i rovnováhu reakce. Iontová síla popisuje, jak moc se daný roztok liší od ideálního roztoku. Popisuje také vliv iontů v rozpouštědle a je přímo úměrná koncentraci. S rostoucí iontovou silou roste i počet iontů v roztoku, což oslabuje elektrostatickou interakci (repulzi i přitahování) mezi intereagujícím párem zhášedlo-fluorofor.

Pro studium těchto interakcí jsme zvolili tryptofanovou fluorescenci. Tryptofan je označován za nepolární aminokyselinu, jejíž přirozená fluorescence je široce používaná pro studium proteinů. Tato práce se zaměřuje na fluorofory: NATA, HSA, BSA a sadu osmi

mutantů velkého cytoplazmatického segmentu C45 Na⁺/K⁺-ATPasy. Takto jsme získali širokou škálu fluoroforů s různými pozicemi tryptofanového residua, které jsme zkoumali blíže.

Cílem této práce bylo

1. Seznámit se s problematikou dynamického zhášení fluorescence a jeho využití při studiu struktury proteinů.
2. Provést měření zhášení tryptofanové fluorescence pro vybrané modelové molekuly.
3. Odhalit vliv iontové síly roztoku na účinnost zhášení fluorescence.

Kapitola 2

Zhášení fluorescence

Při procesu zhášení fluorescence pozorujeme pokles intenzity fluorescence, jež je způsoben interakcí molekul zhášedla a fluoroforu. Počátky této metody se datují do období 20. let 20. století. Tato metoda se využívá ke studiu biomakromolekul, membrán, difúze nebo pozice fluoroforu v rámci většího celku.

Zhášení fluorescence je způsobeno molekulárními interakcemi, které probíhají zejména v excitovaném stavu. Typickým příkladem těchto interakcí jsou srážky s jinými molekulami (zhášedlo) popřípadě formování komplexu v základním stavu. Podle výše uvedených interakcí dělíme zhášení fluorescence na dvě skupiny: statické a dynamické zhášení.

Statické zhášení je popsáno jako formování komplexu mezi fluoroforem a zhášedlem, přičemž tento komplex není po excitaci schopen zářivého přechodu zpět na základní hladinu. Toto formování komplexu snižuje počet molekul schopných emitovat záření a tím způsobuje pozorovaný pokles intenzity fluorescence. V případě statického zhášení není pozorován pokles doby života excitovaného stavu z toho důvodu, že fluorofor zůstává chemicky shodný, ale mění se pouze počet emitujících molekul fluoroforu.

Oproti tomu dynamické zhášení fluorescence je způsobeno druhými popsánymi interakcemi, a to srážkami molekul zhášedla s excitovaným fluoroforem. Tyto srážky způsobí deexcitaci bez vyzáření fotonu. Dynamické zhášení trvale nemění strukturu fluoroforu, ale mění dobu života excitovaného stavu. V praxi je možné pozorovat kombinaci statického a dynamického zhášení. V tomto případě emituje fluorescenci ta část molekul fluoroforu, která není v komplexu se zhášedlem, a ani nebyla zhasnuta srážkami s těmito molekulami.

2.1 Statické zhášení fluorescence

Pokud dochází k formování komplexu, který po absorpci záření není schopen emitovat foton, tak mluvíme o statickém zhášení. K intenzitě fluorescence přispívají pouze ty molekuly fluoroforu, jež nejsou vázány v komplexu. Pokud uvažujeme v souladu s [Lakowicz, J. R., 1999, str. 242], že intenzita fluorescence je přímo úměrná koncentraci fluoroforu $[F]$, můžeme psát Stern-Volmerovu rovnici ve tvaru

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_S [Q], \quad (2.1)$$

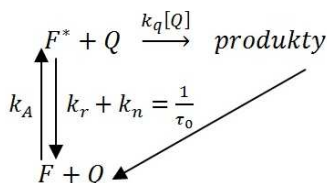
kde F_0 je intenzita fluorescence v nepřítomnosti zhášedla a platí $[F_T] = F_0$.

Ze Stern-Volmerovy rovnice plyne, že Stern-Volmerova zhášecí konstanta K_{SV} je rovna disociační konstantě K_S .

Při statickém zhášení tedy dochází k poklesu intenzity fluorescence v důsledku snížení koncentrace molekul schopných emitovat fluorescenci. Stav fluoreskujících molekul (tzn. těch, které nejsou v komplexu se zhášedlem) však zůstává nezměněn a nedochází tedy ke změně střední doby života excitovaného stavu těchto molekul ($\tau = \tau_0$).

2.2 Dynamické zhášení fluorescence

Dynamické zhášení můžeme popsat pomocí následujícího schématu:



Obrázek 1 - Schéma dynamického zhášení podle [Valeur, B., 2006, str. 73].

O dynamickém zhášení mluvíme tehdy, pokud dochází ke srážkám fluoroforu, který je v excitovaném stavu, s molekulami zhášedla a v důsledku toho přejde fluorofor zpět do základního stavu bez vyzáření fotonu. Pravděpodobnost srážek je úměrná koncentraci zhášedla $[Q]$.

Stern-Volmerova rovnice pro dynamické zhášení je podle [Lakowicz, J.R., 1999, str. 239-241] následující:

$$\frac{\Phi_0}{\Phi} = \frac{F_0}{F} = \frac{\tau_0}{\tau} = 1 + K_{SV} [Q] = 1 + k_q \tau_0 [Q]. \quad (2.2)$$

Charakteristické hodnoty bimolekulární zhasací konstanty se nacházejí v intervalu $10^9 - 10^{10} M^{-1} s^{-1}$. Nízká hodnota bimolekulární zhasací konstanty značí nepřístupnost fluoroforu. Naopak vysoké hodnoty naznačují, že dochází k vazebné interakci. Obecně platí $k_q = k_D P$, k_D je difúzní rychlostní konstanta pro bimolekulární reakce a P je efektivita zhasení. Pro případ dynamického zhasení a pro standardní zhasedla je hodnota efektivita zhasení blízká jedné.

Bimolekulární zhasací konstantu je možné svázat s molekulárními parametry pomocí Smoluchovského rovnice, která má následující tvar

$$k_q = 4\pi N_A (R_F + R_Q) (D_F + D_Q). \quad (2.3)$$

V této rovnici vystupuje Avogadrova konstanta N_A , kolizní poloměry molekul fluoroforu a zhasedla R_F, R_Q a difúzní koeficienty fluoroforu a zhasedla D_F, D_Q .

V případě samotného dynamického zhasení je Stern-Volmerův graf lineární, jeho průsečík na ose y je vždy roven jedné a jeho směrnice odpovídá Stern-Volmerově zhasací konstantě K_{SV} . Pokud jsme ale obdrželi lineární Stern-Volmerův graf, tak to nemusí znamenat, že se jedná o dynamické zhasení, protože i statické zhasení je v tomto grafu popsáno lineární závislostí. Mezi látky způsobující dynamické zhasení patří akrylamid, molekulární kyslík, jodid, oxid dusnatý a bromistanový aniont.

2.3 Kombinace statického a dynamického zhasení fluorescence

Existuje mnoho případů, kdy dochází k dynamickému zhasení během formování komplexu s tímž zhasedlem. Díky takovéto kombinaci zhasení je schopná emitovat fluorescenci jen nekomplexovaná část fluoroforu, která nebyla zhasnuta srážkami se zhasedlem.

Statické zhasení je popsáno Stern-Volmerovu rovnicí ve tvaru

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{(1 + K_S [Q])}, \quad (2.4)$$

kde K_S je Stern-Volmerova konstanta pro statické zhasení.

A navíc dochází i k dynamickému zhasení popsanému Stern-Volmerovou rovnicí

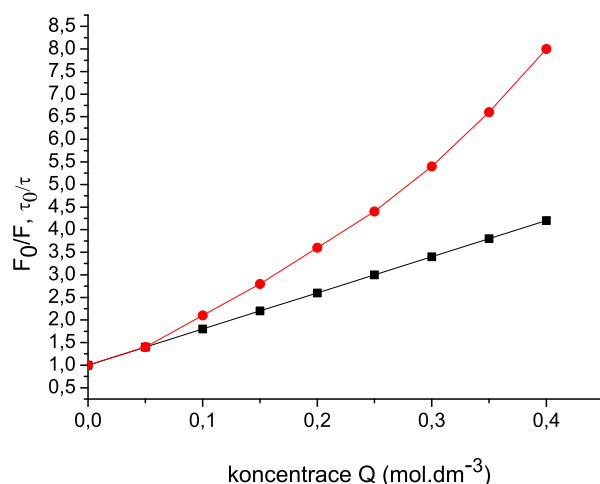
$$\frac{F'_0}{F'} = (1 + K_D [Q]), \quad (2.5)$$

K_D je Stern-Volmerova zhášecí konstanta pro dynamické zhášení.

Pro výslednou kombinaci obou zhášení dostaneme

$$\frac{F_0}{F} = (1 + K_S [Q]) (1 + K_D [Q]) = 1 + (K_D + K_S) [Q] + K_D K_S [Q]^2. \quad (2.6)$$

Současně dynamické i statické zhášení se projeví kvadratickým zakřivením Stern-Volmerova grafu směrem nahoru.



Obrázek 2 - Stern-Volmerův graf zobrazující kombinaci statického a dynamického zhášení podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 243]. Červeně je zde zobrazen poměr intenzit $\frac{F_0}{F}$ a černě je zobrazen poměr dob života excitovaného stavu $\frac{\tau_0}{\tau}$.

Lineární je potom modifikovaný Stern-Volmerův graf závislosti $\frac{(\frac{F_0}{F}-1)}{[Q]}$ na $[Q]$. V tomto případě je zhášení popsáno pomocí zdánlivé zhášecí konstanty K_{App} , která je dána rovnicí

$$K_{App} = K_D + K_S = \left(\frac{F_0}{F} - 1 \right) \frac{1}{[Q]} = (K_D + K_S) + K_D K_S [Q]. \quad (2.7)$$

Průsečík tohoto modifikovaného grafu s osou y je roven právě zdánlivé zhášecí konstantě a jeho směrnice je $K_D K_S$.

K současnému statickému a dynamickému zhášení dochází například při zhášení FAD nebo NADH adeninovou složkou. Flavinová fluorescence je zhášena oběma procesy. Vzhledem k tomu, že tyto aromatické sloučeniny mají nestabilní strukturu vlivem konjugovaného postavení vazeb, tak je komplex v základním stavu také nestabilní a výsledkem je právě kombinace statického a dynamického zhášení.

Kapitola 3

Mechanismy zhášení

Intersystémová konverze

Intersystémová konverze je obecně pojem pro nezářivý přechod mezi dvěma isoenergetickými vibračními hladinami patřícími k elektronickým stavům s různou spinovou multiplicitou. Přechod mezi stavy s rozdílnou multiplicitou je principiálně zakázaný (kvantová fyzika), ale spin-orbitální interakce (interakce mezi orbitálním magnetickým momentem a spinovým magnetickým momentem) může být dostatečně velká, aby k tomuto procesu mohlo dojít. Pravděpodobnost intersystémové konverze závisí na singletním a tripletním stavu, mezi kterými se přechod uskutečňuje. Tento mechanismus můžeme zahrnout do problematiky zhášení, jak ilustrujeme na jednoduchém příkladu. Uvažujme excitovaný fluorofor v singletním stavu a srážka se zhášedlem způsobí jeho přechod do tripletního stavu. Tripletní stav má větší dobu života excitovaného stavu než singletní stav, proto může dojít k účinnému zhášení jiným mechanismem. Často dochází k nezářivému přechodu do základního stavu a energie je přeměněna na teplo. Mezi zhášedla způsobující intersystémovou konverzi patří například molekulární kyslík a jodid.

Přenos elektronu indukovaný světlem

Tento mechanismus je častý u zhášedel bohatých na elektrony nebo naopak s nedostatkem elektronů. V případě zhášedla bohatého na elektrony dochází při reakci s excitovaným fluoroforem k přenosu elektronu na fluorofor. Vzniká tedy redukovaný fluorofor a oxidované zhášedlo. V případě zhášedla s nedostatkem elektronů proces probíhá analogicky, ale vzniká oxidovaný fluorofor a redukované zhášedlo. Tento mechanismus je častý například ve fotosyntéze (světlem indukovaná separace iontů) nebo při jiných fotochemických reakcích, popřípadě se s tímto mechanismem setkáme při zhášení antracenu diethylanilinem.

Přenos protonu indukovaný světlem

Analogicky s [Valeur, B. (2005)] budeme uvažovat pouze reakce ve vodných roztocích. Voda se díky svým amfifilním vlastnostem může chovat jako akceptor nebo jako donor protonu a tedy být kontaktu s kyselinou (voda je akceptor protonu) nebo se zásadou (voda se chová jako donor protonu). Tyto kyseliny popřípadě zásady, které jsou v kontaktu s molekulami vody pak procházejí deprotonizací nebo protonizací během excitace. Obecně jsou acidobazické vlastnosti látek v základním a excitovaném stavu různé. Tento jev je pravděpodobně způsoben redistribucí elektronové hustoty během excitace. Existují případy, kdy jsou zásady nebo kyseliny silnější v excitovaném stavu než ve stavu základním. V takových případech může dojít k přenosu protonu vlivem excitace fluoroforu.

Tvorba excimerů a exciplexů

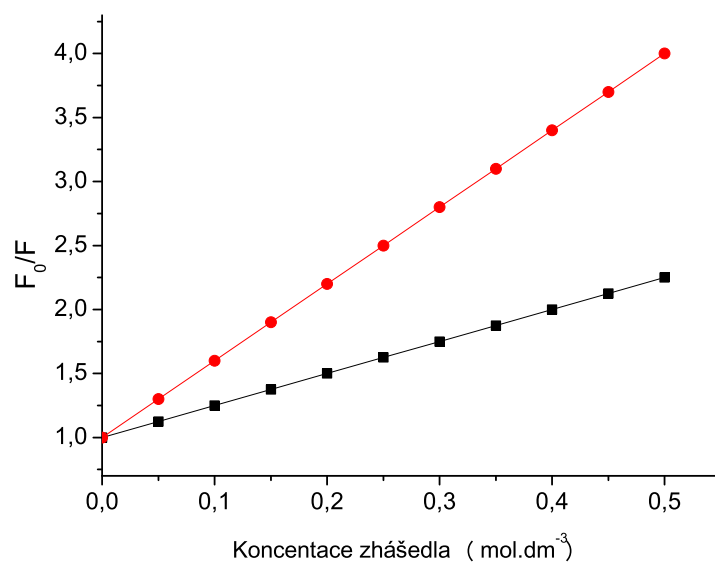
Excimery jsou excitované dimery, které mohou vznikat při srážce excitované molekuly se shodnou molekulou v základním stavu. Fluorescenční pásy excimerů jsou ve spektru posunuté k delším vlnovým délkám než pásy monomerů a neobjevují se v jejich blízkosti vibrační satelity. Exciplexy jsou pak excitované komplexy vytvořené při srážce excitované molekuly s jinou molekulou v základním stavu. Typickým příkladem je excitovaný komplex mezi antracenem a N,N-diethylanilinem. V tomto komplexu dochází navíc k přenosu elektronu z dusíku anilínu na antracen. Tvorba exciplexů a excimerů je řízena difúzí. Dále je ovlivňována koncentrací látek, teplotou a viskozitou prostředí. Například spektra exciplexů se s roztoucí polaritou prostředí posouvají do červena. Excimery i exciplexy mohou přecházet do základního stavu zářivým i nezářivým přechodem.

Kapitola 4

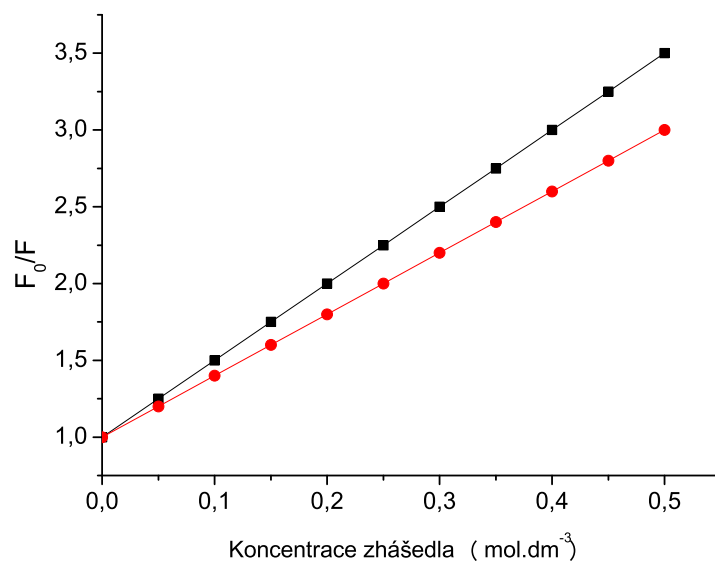
Faktory ovlivňující zhášení fluorescence

4.1 Vliv teploty na zhášení fluorescence

Vliv teploty na zhášení je výhodné sledovat pomocí změn ve Stern-Volmerově grafu.



Obrázek 3 - Vytvořeno podle [Lakowicz, J. R., 1999, str. 240]. Tento Stern-Volmerův graf zobrazuje změny efektivity dynamického zhášení vlivem teploty, přičemž červeně jsou zobrazeny hodnoty získané za zvýšené teploty.



Obrázek 4 - Tento Stern-Volmerův graf opět zobrazuje změny, ke kterým dochází u statického zhášení vlivem rostoucí teploty. Červeně jsou zobrazeny hodnoty při zvýšené teplotě. Analogický Stern-Volmerův graf je uveden v [Lakowicz, J. R., 1999, str. 240].

Zvýšení teploty způsobí zvýšení difúzních koeficientů a tedy zvýší efektivitu dynamického zhášení, které je způsobené právě srážkami molekul zhašedla s fluoroforem. V případě statického zhášení bude nárůst teploty znamenat zvýšení disociace slabě vázaného komplexu, který způsobuje zhášení. Efektivita zhášení bude tedy klesat s rostoucí teplotou.

4.2 Vliv elektrostatických interakcí na zhášení fluorescence

Minimalizace efektů elektrostatické interakce mezi molekulami zhašedla a fluoroforu se často provádí pomocí udržování vysoké iontové síly roztoku. Uvažujeme-li fluorofor navázaný na makromolekulu ve shodě s [Eftink, M. R., 1991, str. 71]. Srovnáním zhášení s nabitými nebo neutrálními zhašedly jsme schopni získat informace o elektrostatickém potenciálu v blízkosti fluoroforu. Různé hodnoty iontové síly mohou být využity k popisu vzdálenosti mezi náboji lokalizovanými v blízkosti fluoroforu a počtu těchto nábojů, jak je uvedeno v [Ando, T. a Asai, H., 1980]. Zdánlivá zhašecí konstanta je pro nabitě zhašedlo podle [Ando, T. a Asai, H., 1980] popsána rovnicí

$$\ln k_{q,elec} = \ln k_0 + \frac{z_Q z_M e_0^2}{T R_0 k_B} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) + \frac{z_Q z_M e_0^2}{k t \epsilon} \frac{1}{R_0} \left(1 - \frac{\exp\left(-\frac{R_0 - a}{\lambda}\right)}{1 + \frac{a}{\lambda}}\right), \quad (4.1)$$

kde a je nejmenší možná vzdálenost obou molekul, k_0 je zhášecí konstanta bez elektrostatických interakcí, z_M, z_Q je náboj makromolekuly a zhášedla, e_0 je elementární náboj, ϵ je dielektrická konstanta, R_0 je nejmenší interakční vzdálenost fluoroforu a zhášedla a λ je Debyeův poloměr, který je definován jako

$$\lambda = \left(\frac{1000 k T \epsilon}{8 \pi N_A e_0^2}\right) \frac{1}{\sqrt{\mu}}. \quad (4.2)$$

V této rovnici vystupuje iontová síla μ . Hodnotu iontové síly jsme schopni určit pomocí vztahu

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i r_i^2, \quad (4.3)$$

kde c_i je koncentrace daného iontu a r_i je náboj iontu. Rovnici 5.1 lze za podmínek $R_0 \approx a$ a $a \ll \lambda$ aproximovat na

$$\log k_{q,elec} \approx \log k_0 + 0,434 \frac{z_Q z_M e_0^2}{T R_0 k_B} \left(1 - \frac{1}{\epsilon}\right) + C z_Q z_M \sqrt{\mu}, \quad (4.4)$$

kde C je konstanta rovna 1,02 pro vodné roztoky při 25°C.

Rovnice 5.4 se v literatuře často označuje jako Scatchardova rovnice. Tato rovnice je odvozena pro následující podmínky: 20°C, koncentrace KI 0-5 mM, koncentrace $S_2O_3^-$ byla 10^{-4} , 10 mM ethenoadenosin fosfátový pufr o pH 7,0. Během experimentu byl pozorován nárůst iontové síly.

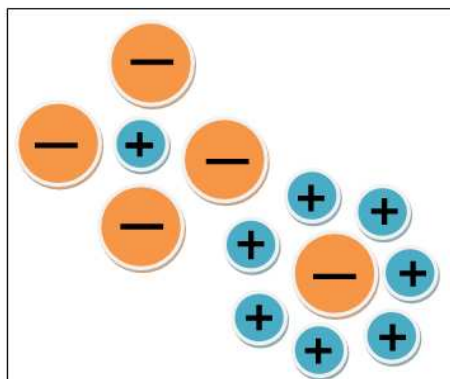
Kapitola 5

Iontová síla

Jedná se o parametr roztoku, který charakterizuje průměrnou elektrostatickou interakci mezi ionty v elektrolytu. Počátky teorie elektrolytických roztoků byla zpracována Peterem Debyem a Erichem Hückelem v 20. letech 20. století. Původní poznatky o odchylkách chování elektrolytů od chování ideálních roztoků byly publikovány v [Debye, P., Hückel E., 1923] a dnes jsou známy jako Debye-Hückelova teorie. Jedná se o však o velmi jednoduchý model elektrolytu a současně se jedná o linearizaci Boltzmanova modelu. Hlavním přínosem této teorie je Debye-Hückelův limitní zákon. Ten se uvádí ve tvaru:

$$\log \gamma_{\pm} = -0.509 |Z^+ Z^-| \sqrt{I},$$

kde γ_{\pm} je střední aktivitní koeficient, I je iontová síla, Z^+ , Z^- jsou náboje iontů a hodnota $-0,509$ je numerická konstanta odpovídající vodnému roztoku při $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Iontová síla blízce souvisí s molární koncentrací (molaritou) a indikuje tzv. efektivní náboj, jímž je iont stíněn, popřípadě stabilizován pomocí ostatních iontů (tento jev se také nazývá iontová atmosféra).



Obrázek 5 - Model iontové atmosféry. Každý iont je ve svém okolí obklopen několika dalšími ionty opačného náboje.

Iontová síla má důležitou roli v Debye-Hückelově teorii, protože udává, jak moc se chování daného elektrolytu odchyluje od ideálního roztoku (nejčastěji iontového). Iontová síla byla původně definována jako:

$$I = \frac{1}{2} \sum_J \frac{m_J}{m^\phi} z_J^2,$$

kde m^J je molalita iontu, m^ϕ je standardní molalita a z_J je nábojové číslo daného iontu (bezrozměrná veličina udávající násobek elementárního náboje).

Dnes je iontová síla častěji určována podle následujícího vztahu, uvedeno v [Tinoco, I., 1985]:

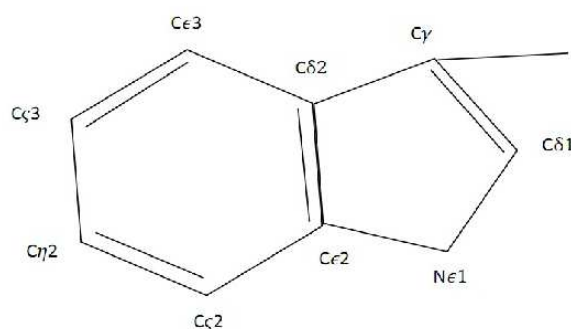
$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2,$$

kde c_i je koncentrace daného iontu a z_i je náboj iontu. V našem případě pro výpočet iontové síly budeme užívat poslední zmíněný vztah. Více informací o Debye-Hückelově teorii nebo iontové síle je v [Atkins, P. W., 1998] nebo [Wright, M. R., 2007].

Kapitola 6

Tryptofanová fluorescence

Tryptofanová fluorescence je velmi rozšířenou metodou studia proteinů. Velkou výhodou této metody je, že využívá přirozené fluorescence aminokyseliny tryptofanu (Trp). V proteinech jsou schopné poskytovat fluorescenční signál i aminokyseliny fenylalanin (Phe) a tyrosin (Tyr). Jednotlivá emisní spektra těchto aminokyselin se však překrývají. Pokud ale vzorek osvětlujeme v rozmezí 295 - 305 nm, tak selektivně excitujeme pouze tryptofan. Tato aminokyselina je kódována pouze jedním kodonem v genetickém kódu, což způsobuje její nižší zastoupení v rámci peptidového řetězce. Nicméně tryptofan přináší další výhody oproti tyrosinu nebo fenylalaninu, a to že fluorescenční parametry tryptofanové fluorescence jsou závislé na prostředí, ve kterém se daný protein nalézá.



Obrázek 6 - Obrázek skupiny indolyl, která je obsažena v aminokyselině tryptofanu. Je zde zobrazeno označení jednotlivých uhlíků v rámci cyklů.

Hlavním důvodem této citlivosti k okolnímu prostředí je rozsáhlá redistribuce elektronové hustoty v rámci asymetrického indolového cyklu tryptofanového residua po absorpci

fotonu, jak uvádí [Reshetnyak, Y., on-line]. Tento efekt není pozorován u tyrosinu a fenylalaninu z důvodu, že postranní řetězce těchto aminokyselin obsahují pouze symetrické kruhy. Obrázek indolového kruhu z tryptofanového residua je uveden výše.

Studie pomocí kvantové mechaniky ukázaly, že největší úbytek elektronové hustoty v rámci indolového kruhu je pozorován u dusíku N ϵ 1 a uhlíku C γ , přičemž tato elektronová hustota je během excitace rozložena mezi atomy C ϵ 3, C ζ 2, C δ 2. Tyto změny v elektronové hustotě vedou ke snížení dipólového momentu v excitovaném stavu oproti stavu základnímu. Změna dipólového momentu dále vede ke vzniku lokální nerovnováhy v prostředí, které obklopuje tryptofanové residuum. Během doby života excitovaného stavu může dojít k mnoha kombinacím specifických a univerzálních interakcí, které závisí na fyzikálních a strukturních vlastnostech prostředí tryptofanových residuí v proteinech. Může docházet i ke zhášení indolu, jak popisuje [Eftink, M. R. a Ghiron, C. A., 1976]. Emisní spektra jsou široce používána pro studium struktury proteinů a jejich konformace. Tvar a pozice maxima těchto spekter jsou parametry, které závisí na energetickém rozdílu mezi základním a excitovaným stavem. Prostedí tryptofanu ovlivňuje tento energetický rozdíl, což se projeví v emisním spektru.

6.1 Spektrální posun tryptofanu

Změna v redistribuci elektronové hustoty na indolovém kruhu je závislá na chemických vlastnostech, polaritě a flexibilitě prostředí, jak popisuje [Reshetnyak, Y., on-line]. Jak již bylo uvedeno výše, změna ve spektru souvisí se specifickými nebo obecnými interakcemi v excitovaném stavu. Mezi tyto obecné interakce patří dipól-dipólová relaxace nebo reorientace proteinových skupin nebo molekul solventu okolo tryptofanového residua. Tento proces se odehrává ve vodných roztocích v časové škále do deseti pikosekund.

Tyto interakce hrají důležitou roli při posunu emisních spekter do oblasti delších vlnových délek. Posun spektra ve škále vlnočtů (vlnových čísel) závisí na několika faktorech:

- rozdíl dipólových momentů excitovaného a základního stavu
- permitivita prostředí, index lomu prostředí
- rychlost dipólové relaxace tryptofanu obklopeného dielektrikem

Tento posun může být popsán pomocí Lippertovy rovnice, uvedené v [Valeur, B. 2002, strana 211] jako:

$$\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f = \frac{2}{hc} (\mu_e - \mu_g)^2 a^{-3} \Delta f + \text{konstanta},$$

kde a je poloměr kavity, ve které je molekula solutu, Δf je orientační polarizibilita, μ_e a μ_g jsou dipólové momenty, h je Planckova konstanta, c je rychlost světla a $\bar{\nu}_a - \bar{\nu}_f$ je spektrální posun.

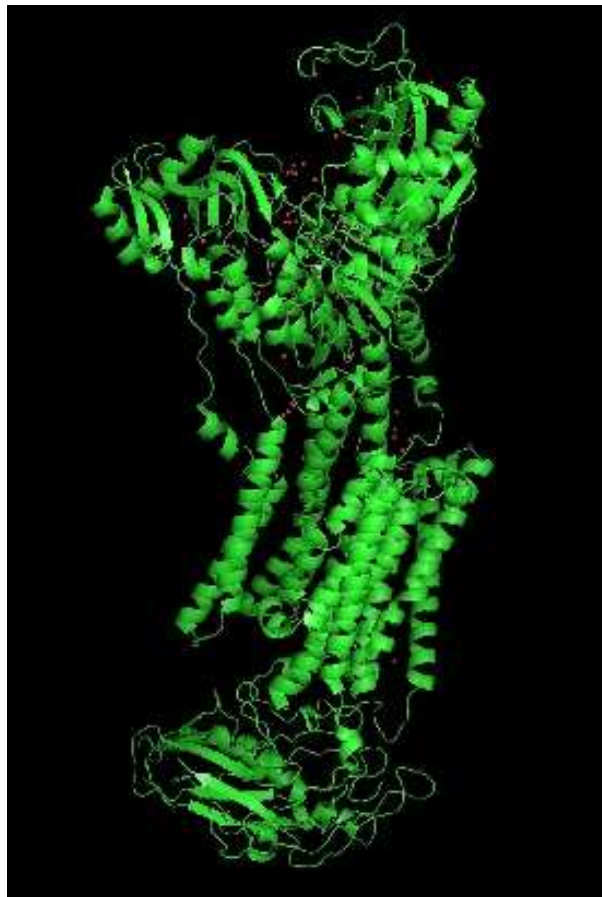
Posun spektra nemůže být popisován pouze jako efekt solventu, na který můžeme nahlížet jako na médium se specifickými vlastnostmi (elektrická polarizibilita, molekulární polarizibilita). Ve skutečnosti fluorofory tvoří vlastní specifické interakce s molekulami solventu ve svém blízkém okolí. Tyto specifické interakce mohou zahrnovat tvorbu slabých vodíkových vazeb v excitovaném stavu nebo přenos náboje a projevují se v emisních spektrech. Posun spektra tryptofanu diskutuje například [Mach, H. a Middauch, R., 1994] a nebo [Edelhoch, H., 1967].

Závislost spektrálního posunu na polaritě prostředí popřípadě v závislosti na pozici tryptofanového residua je často studovaným tématem. Na polaritu prostředí nahlíží [Vivian, J. T a Callis, P. R., 2001] jako na dvě možné situace. První situací je polarizace molekul vody nabitým a polárním proteinem. Druhou situací je elektronická polarizace tryptofanových kruhů elektrickým polem obou prostředí - molekul vody a proteinu v okolí tohoto residua. Obě tyto situace poskytují různý typ interakce. V prvním případě jsou molekuly vody v okolí tryptofanového residua vzdálené 15-25 angströmů a tyto molekuly vody způsobí posun hlavního píku spektra o 5-10 nm. V druhém případě interakce roste, protože závisí na změně dipólového momentu během excitace. Změna tohoto dipólového momentu roste vlivem pole okolo tryptofanového residua, což se projeví rudým posunem spektra.

Kapitola 7

Na^+/K^+ -ATPasa

Na^+/K^+ -ATPasa je nejstarší identifikovaná adenosin trifosfatásovou (ATPásovou) iontovou pumpou. Byla objevena v roce 1957 dánským vědcem jménem Jens Christian Skou a v roce 1997 byla za tento objev udělena Nobelova cena.



Obrázek 7 - Struktura Na^+/K^+ -ATPasy získaná pomocí programu PyMOL. Zdrojová struktura 2ZXE byla získána z www.pdb.org. Uložení v membráně je uvedené například

v [Goodsell, D. (on line)].

Na^+/K^+ ATPasa nebo také Na^+/K^+ pumpa je jedním z významných transmembránových proteinů v buňkách. Tento protein patří do rodiny ATPás P-typu, a to z důvodu vlastní autofosforylační a autodefosorylační funkce. Biologická funkce a obecná struktura je uvedena například v [Alberts, B. 2008, str. 661-663].

Jedná se primárně o Na^+ pumpu vzhledem k tomu, že K^+ iont může být optimálně nahrazen jinými monovalentními ionty (včetně Na^+ iontu) nebo organickými kationty, jak uvádí [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F. (2011)]. Oproti tomu Na^+ iont může být pouze částečně nahrazen H^+ nebo Li^+ ionty. Blíže se selektivitou Na^+/K^+ -pumpy zabývá [Ratheal, I. M. a kolektiv, 2010]. Klidový potenciál na plazmatické membráně je pak dán konduktancí (vodivostí) membrány pro K^+ ionty, a to z důvodu disipace K^+ iontů transportovaných přes K^+ -kanál.

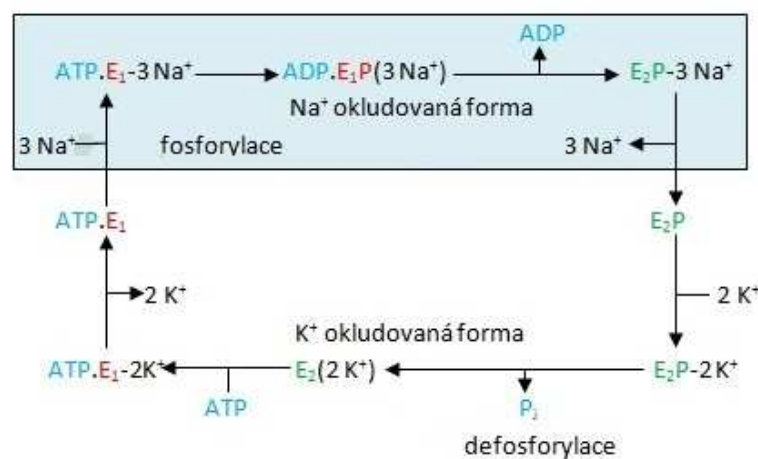
Gradients Na^+ a K^+ jsou tvořeny a zachovávány pomocí Na^+/K^+ -ATPasy. Tyto gradienty jsou následně využity pro mnoho různých dějů - jako je například tvorba akčního potenciálu podél nervu nebo jako zdroj energie pro další sekundární aktivní transport. Na^+/K^+ -ATPasa je exprimována ve všech zvířecích buňkách a tento proces je přísně regulován.

Struktura Na^+/K^+ -ATPasy podle [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011] obsahuje dvě podjednotky (α a β) a pomocnou regulační podjednotku (někdy označovanou jako podjednotka γ). Katalytická podjednotka, podjednotka α , obsahuje okolo 1 000 residuí, oproti tomu podjednotka β je vysoce glykosylovaná a obsahuje cca 300 residuí. Poslední část tohoto proteinu, tkáňově specifická pomocná regulační podjednotka, jež je složena z FXYD proteinů, a obsahuje pouze 70-180 residuí. U člověka má podjednotka α čtyři isoformy, podjednotka β existuje ve třech isoformách a bylo objeveno sedm isoform FXYD proteinů. Vzhledem k této rozmanitosti je možné získat velký počet variant celého komplexu Na^+/K^+ -ATPasy, což komplikuje její studium.

Na^+/K^+ -ATPasa je cílem pro kardiotonické steroidy (CTS) nebo glykosidy jako je například digoxin. Vazebné místo pro CTS je vysoce konzervovaná sekvence, která má pravděpodobně fundamentální význam při regulaci fyziologických procesů. Novější studie navrhují existenci velkých signálních komplexů regulovaných CTS, přičemž tyto komplexy jsou tvořené Na^+/K^+ -ATPasou a dalšími proteiny, jako je například IP3 (inositol trifosfátový) receptor nebo Src kináza (zkratka pro sarcoma, jedná se o enzym tyrosin-protein kinázu). Dále má Na^+/K^+ -ATPasa klíčovou roli při srůstání buněk a je považována za důležitý cíl pro terapeutika. Tento transportní proteinový komplex je stěžejní pro regulaci buněčné homeostázy.

7.1 Reakční cyklus

Reakční cyklus ATPás P-typu je vyjádřen pomocí Post-Albersova schématu (viz. [Post, R. L., Hegyvary, C. a Kume, S., 1972] nebo [Albers, R. W., 1967]), což je jinak označované jako E1/E2 teorie. Podle [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011] při stavu E1 má transmembránové vazebné místo pro kationty s vysokou afinitou k Na^+ iontům a je otevřená směrem k cytoplazmě. Oproti tomu E2 stav má nízkou afinitu k Na^+ ale vysokou afinitu k K^+ . Tato konformace je otevřená směrem k extracelulárnímu prostoru. Předpokládáme systém obsahující dvoje hradla - jedna hradla jsou na cytoplazmatické straně a druhá na extracelulární straně. Obě hradla se musí otvírat s přesnou koordinací a reakční cyklus musí obsahovat krok, kdy jsou obě hradla uzavřená a transmembránová vazebná místa pro kationty jsou nepřístupná z obou stran membrány (tzv. okludovaný stav). Během reakčního cyklu dochází k autofosforylaci a autodefosforylaci aspartátu v katalytické podjednotce enzymu. Cytoplazmatická hradla se uzavřou po navázání tří Na^+ iontů a jsou uzavřena přenosem fosforylové skupiny na aspartát (přepnutí do E1P stavu). Vazba Na^+ iontů je ve stavu E1P okludovaná, což se označuje jako E1P[3Na⁺]. Během přepnutí do E2P stavu se otvírají hradla na extracelulární straně membrány a tři Na^+ ionty jsou následně uvolněny. Potom jsou vazebná místa zaplněna dvěma K^+ ionty a dochází k antiportu. Extracelulární hradla se uzavírají po hydrolýze aspartylfosfátu. Vrátka zůstávají uzavřená v E2.2K⁺. Tento stav je stabilní, proto je přepnutí do E1 stavu velmi pomalé. Poslední popsany krok probíhá bez spotřeby ATP. Celý proces je uveden na obrázku níže.



Obrázek 8 - Post-Albersovo schéma funkce Na^+/K^+ -ATPasy. Část uvedená na pravé straně tohoto schématu odpovídá transportu do extracelulárního prostoru. Druhá část,

uvedená vlevo, odpovídá transportu do intracelulárního prostoru (popřípadě do cytoplazmy). Uvedené Post-Albersovo schéma bylo vytvořeno podle [Dempski, R.E., Friedrich, T. a Bamberg E., 2009]. Navázání třech atomů Na^+ na enzym v konformaci E1 s navázaným ATP způsobí uzavření hradel (v obrázku znázorněno vlevo nahoře). Následně enzym přechází do okludovaného stavu, uvolňuje se ADP a enzym přechází do fosforylovaného E2 stavu včetně navázaných atomů Na^+ (v obrázku vpravo nahoře). Tyto atomy jsou následně uvolněny do intracelulárního prostoru. Dále dochází k vazbě dvou K^+ atomů na fosforylovaný enzym ve stavu E2 (v obrázku vpravo dole). V dalším kroku se enzym defosforyluje a přechází do E2 okludované formy. Vazbou ATP se enzym navrací do E1 stavu (v obrázku vlevo dole) a uvolňuje K^+ atomy do extracelulárního prostoru. Enzym ve stavu E1 s navázaným ATP je pak schopen opět vázat Na^+ ionty a celý cyklus se opakuje.

7.2 Struktura α podjednotky

Tato podjednotka je také nazývána katalytickou podjednotkou, a to vzhledem k její funkci. Tato podjednotka je sestavena ze tří cytoplazmatických domén a deseti transmembránových helixů (M1 - M10). Cytoplazmatické domény se označují jako: pomocná podjednotka (A jako actuator), nukleotidová vazebná doména (N) a fosforylační doména (P). Doména A je podle [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011] tvořena segmentem C23, nalézá se mezi transmembránovými helixy M2 a M3. Velký cytoplazmatický segment C45 je tvořen P a N doménou, což odpovídá cca 40% hmoty celé podjednotky α . Segment C45 se nalézá v uzavřené konformaci za přítomnosti Mg^{2+} nebo Mg-ATP. Pokud je ale ATP přidán v nepřítomnosti Mg^{2+} , tak dochází ke konformační změně a segment zaujme otevřenou konformaci, jak popisuje [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011]. Nativní C45 segment obsahuje 2 tryptofanová residua v pozicích 385 a 411. Transmembránové helixy M4 - M6 a M8 koordinují transportované kationty. Helixy M7 - M10 mají specifickou funkci a procházejí velkou škálou přeskupení. Vazebné místo pro K^+ je méně specifické než pro Na^+ .

7.3 Struktura podjednotky β

Primární role podjednotky β je molekulární chaperon, jak uvádí [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius, F., 2011]. Asociace podjednotky β s nově syntetizovanými molekulami

usnadňuje jejich směřování a inzerci do plazmatické membrány, zatímco uděluje konformační stabilitu α podjednotky, jak popisuje [Geering, K., 2008]. Podjednotka β také moduluje funkční vlastnosti celého enzymu, včetně afinity vazby kationtů nebo okluze K^+ . Podjednotka β obsahuje N-koncovou cytoplazmatickou doménu dlouhou cca 30 residuí, jeden transmembránový helix lokalizovaný ve žlábkku mezi helixy M7 a M10 podjednotky α a mezi velkou extracelulární doménou (ektodoména). Ektodoména obsahuje okolo 240 residuí, které pokrývají celý extracelulární povrch podjednotky α . Pro cytoplazmatickou doménu zatím nebyl vytvořen atomární model. Extracelulární doména je tvořena pokriveným antiparalelním β skládaným listem. Hlavní část podjednotky β podle [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011] je tvarově podobná ahezním molekulám jako je například nektin, přičemž tvar, do kterého je tato část složena, je stabilizován třemi disulfidickými vazbami.

Transmembránový helix podjednotky β je skoro paralelní s M7 helixem podjednotky α . Podle [Toyoshima, C., Kanai, R. a Cornelius F., 2011] je tento helix tvořen několika kontakty mezi M7 a M10 helixy pomocí klastrů s aromatickými rezidui. Dále na extracelulární straně membrány má podjednotka β komplexní interakce s L7/8 smyčkou. Interakce komplexu α - β pravděpodobně vysvětluje roli podjednotky β při kinetice pumpy.

7.4 FXYD proteiny

Tyto proteiny jsou tkáňově specifické reagulátory Na^+/K^+ -ATPasy, které moduluji kinetické vlastnosti této pumpy, a to pomocí úpravy afinit Na^+ , K^+ a ATP. V [Toyoshima, C., Kanai, I. R. a Cornelius F. (2011)] se uvádí, že FXYD proteiny jsou tvořeny jedním transmembránovým helixem, cytoplazmatickou částí s místem fosforylace (FXYD 1, FXYD 10), extracelulární částí na N-konci, jež obsahuje FXYD(Y) motiv. Tento motiv je lokalizován před transmembránovým helixem a začíná aminokyselinou Phe 12, která ukotvuje segment do podjednotky β pomocí stacking interakce s Phe 187 z této podjednotky. FXYD(Y) motiv se zdá být důležitý pro stabilizaci α - β -FXYD interakce. FXYD proteiny ovlivňují Na^+/K^+ vazbu a kinetické vlastnosti pumpy.

Kapitola 8

Albumin z lidského séra (human serum albumin, HSA)



Obrázek 9 - Obrázek struktury albuminu z lidského séra. Obrázek byl pořízen na základě struktury 1E78 z www.pdb.org a pomocí programu PyMOL.

Jedná se o protein, jež je nejvíce procentuálně zastoupen v lidské krevní plazmě. Tento protein je monomerní a má mnoho významných biologických funkcí. Molekulová hmotnost albuminu z lidského séra je 67 kDa a poločas rozpadu je okolo 20 dní.

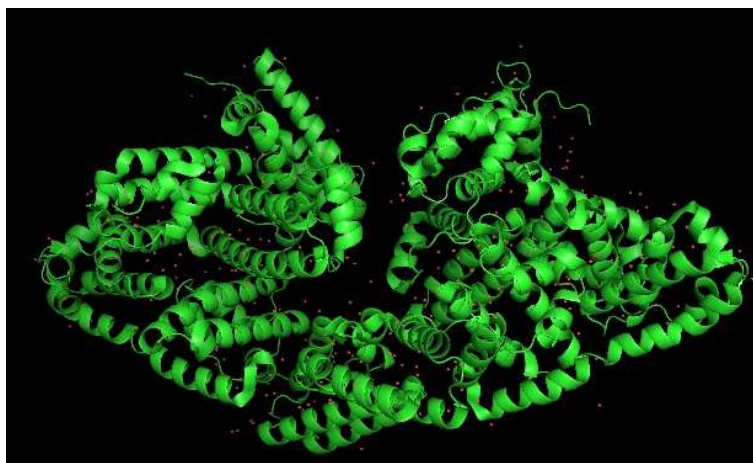
Albumin z lidského séra je syntetizován v játrech jako preproalbumin, na jehož N-konci je specifická peptidová sekvence. Tato sekvence je odštěpena před transportem nascentního proteinu z hrubého endoplazmatického retikula. Proalbumin (produkt po odštěpení sekvence na N-konci) je transportován do vezikul Golgiho aparátu. Zde je protein dále štěpen na konečný produkt, který je sekretován do cytosolu.

Mezi biologické funkce tohoto proteinu patří zachovávání osmotického tlaku, transport hormonů (často thyroidní hormony nebo hormony rozpustné v tucích), transport volných mastných kyselin do jater a myocytů, transport léčiv a zachovávání konstantního pH.

Albuminy ze séra obecně podléhají pomalým neenzymatickým glykosylacím, jak je popsáno například v [Day, J. F., Thorpe, S. R. a Baynes, J. W., 1979]. Tyto glykosylace potencionálně mění biologickou aktivitu a funkci celé skupiny albuminů. Zmíněné glykosylace jsou nejčastěji tvořeny pomocí tvorby Shiffovy báze mezi ϵ -amino skupinou lysinového (nebo argininového) residua a molekulou glukózy, která je také přirozeně obsažena v krevním séru. Tato reakce může být inhibována některými antioxidanty. Albuminy ze séra obsahují několik lysinových nebo argininových residuí, ale jen některé podléhají glykosylačním reakcím. I když k těmto glykosylacím dochází přirozeně, tak zvýšená hladina glykoalbuminu je projevem onemocnění cukrovkou (diabetes mellitus), jak uvádí [Iberg N. a Flückinger R., 1986].

Kapitola 9

Albumin z hovězího séra (Bovine serum albumin, BSA)



Obrázek 10 - Obrázek struktury albuminu z hovězího séra. Obrázek byl pořízen na základě struktury 4F5S z www.pdb.org a pomocí programu PyMOL.

Typický zástupce ze skupiny sérových albuminů. [Huang X. B., Kim H.-Y. a Dass Ch., 2004] popisuje velkou strukturní i funkční podobnost mezi BSA a HSA. Sekvenční podobnost mezi oběma zmíněnými proteiny je asi 76 %. Pro fluorescenční techniky je významným rozdílem, že HSA obsahuje pouze jedno tryptofanové residuum, přičemž ve struktuře BSA nalezneme tato residua dvě.

Albumin z hovězího séra je také označován jako frakce V. Toto označení vyplývá z Edwin Cohnovy purifikační metody aplikované na plasmatické proteiny, kde BSA je eluován jako pátá frakce. Více informací o Edwin Cohnově metodě purifikace je uvedeno v [Cohn, E. J., 1925].

Prekurzorový protein pro BSA má délku 607 aminokyselin a na svém N-konci má 18 residuí dlouhý signální peptid, jež je odštěpen během sekrece. Z tohoto produktu je dále odštěpena sekvence čtyř aminokyselin, přičemž vzniká konečný produkt obsahující 583 aminokyselin.

Molekulová hmotnost tohoto proteinu je 66 463 Da. Izoelektrický bod ve vodném prostředí, při 25°C je u pH 4,7, jak uvádí [Ge, S. a kolektiv, 1998]. Tento protein má široké aplikace v biochemických metodách analýzy jako je například ELISA (Enzyme-Linked Immunosorben Assay) nebo imunoblotting (otisky gelu z elektroforézy na membránu a následná detekce). Je také často používán jako koncentrační standard.

Kapitola 10

Materiál a metody

10.1 Chemikálie

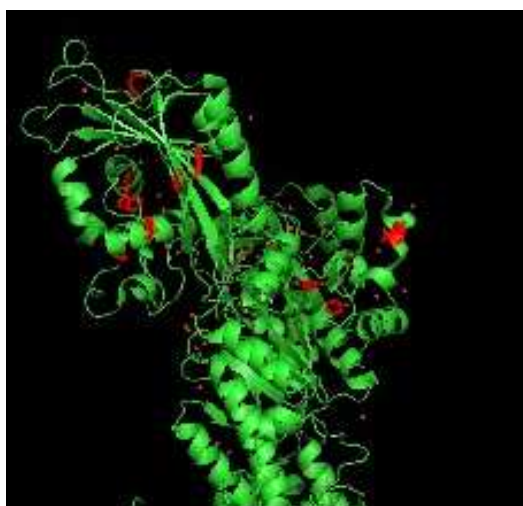
Prvním fluoroforem byl albumin z lidského séra (HSA, human serum albumin, Sigma) ve vodě o celkové koncentraci $20 \mu\text{M}$ a druhým albumin z hovězího séra (BSA, bovine serum albumin, Sigma). Jako další fluorofor byl používán N-acetyl-L-tryptofanamid (NATA, Sigma) ve vodném roztoku o koncentraci $750 \mu\text{M}$. Dalšími použitými fluorofory byly mutanti Na^+/K^+ ATPasy (Na^+/K^+ pumpa). Detailnější popis a postup generování mutantů bude uveden dále v této práci. Koncentrace těchto mutantů byly určeny pomocí metody Bradfordové a jsou uvedené v tabulce níže.

Jako zhášedlo byl použit roztok KI (Lachema) ve vodě nejčastěji o koncentraci zásobního roztoku 1 M a vodný roztok akrylamidu (Biorad) o koncentraci 1 M. K roztoku KI byl podle [Zelent, B. a kolektiv, 1998] přidán vodný roztok thiosíranu disodného $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (Sigma Aldrich) o koncentraci 1 mM, aby bylo zabráněno tvorbě aniontů I_3^- , které by mohly experiment ovlivnit.

Pro udržení stálého pH byl použit pufr 20 mM Tris-HCl, pH 7,4. Experimentálně byla hodnota pH ověřena pomocí pH-metru (typ pH 330i, WTW, Německo). Pro vytvoření pufrů o různých iontových silách byl použit 1 M roztok NaCl (Lachema). Postup byl následující: 1 M roztok NaCl byl naředěn daným množstvím pufru, přičemž jsme získali řadu pufrů o iontové síle v rozmezí 50 - 750 mM.

10.2 Příprava mutantů velkého cytoplazmatického segmentu C45 Na⁺/K⁺ ATPasy

Námi použitý set mutantů obsahuje několik jedno tryptofanových mutantů s následujícím označením: W385, V426W a F683W. Jak bylo uvedeno v teoretické části této práce, tak segment C45 v nativním stavu obsahuje dvě tryptofanová residua. Prvním krokem je tedy odstranění jednoho nebo obou těchto residuí. Tímto získáme dva jednotryptofanové mutanty označované jako WT-W385F, WT-W411F a jeden dvojitý mutant WT-W385FW411F. Dvojitý mutant je označován jako TL (tryptophanless, bez tryptofanu) a je výchozím genetickým konstruktem pro celou řadu dalších mutantů, jež je možné získat místně specifickou mutagenézí. V našem případě tímto procesem získáme mutanty F426W, F683W. Detailnější informace jsou uvedeny v [Grycova, L. a kolektiv (2009)] a [Kubala, M. a kolektiv (2009)].



Obrázek 11 - Obrázek rozmístění jednotlivých residuí, jež jsou mutovány ve velkém cytoplazmatickém segmentu C45. Obrázek byl pořízen pomocí programu PyMOL, na základě struktury s označením 2ZXE ze stránek www.pdb.org.

10.3 Postup transformace plazmidů do buněk *E. Coli*

Na přípravu daného počtu misek potřebujeme stejný počet poměrných částí buněk (často po 10 μ l roztoku) Rosseta LB médium (Luria Bertani medium). LB médium je složené z 10 g peptone z kaseinu, 5 g kvasinkový extrakt Servabacter a 10 g NaCl na jeden litr roztoku, přičemž pH má být 7,4.

Postup:

1. Necháme plazmidy 30 minut při pokojové teplotě (plazmidy se skladují při teplotě - 20 °C) a potom je položíme do ledové lázně.
2. Buňky stále chladíme v ledové lázni a rozdělíme je do daného počtu alikvótů v odpovídajících nádobách.
3. Do nádob s buňkami přidáme plazmidy.
4. Chladíme na ledu po dobu 30 minut.
5. Inkubujeme 45 sekund směs plazmidů a buněk ve vodní lázni o teplotě 42 °C.
6. Provedeme opakované zchlazení v ledové lázni nejméně po dobu 2 minut.
7. Do každé nádobky přidáme 250 μ l LB média.
8. Následně necháme roztoky dobře promíchat 1 hodinu na orbitální třepačce při teplotě 37 °C. Rychlost třepání nastavíme v rozmezí 180-200 RPM.
9. Obsah nádob odstředíme na centrifuze (2 minuty, 4000 RPM). Zachováme 50 - 100 μ l peletu (v závislosti na velikosti použitých misek), kterým naočkujeme připravené misky.

Příprava misek:

1. Připravíme dostatečné množství LA média. LA médium je složeno z LB média a agaru.
2. Médium necháme sterilizovat a po vychladnutí přidáme antibiotikum kanamycin (finální koncentrace byla 30 μ g/ml).
3. Takto upravené LA médium rozlijeme do připravených sterilních misek a počkáme, dokud neztuhne.
4. Nanese buňky pomocí plastových tyčinek.
5. Necháme buňky inkubovat přes noc při teplotě 37 °C.

Pokud byl proces transformace úspěšný, tak by se měly na agarovém médiu objevit kolonie rezistentní proti selekčnímu markeru - v našem případě jsou buňky rezistentní proti antibiotiku kanamycinu.

10.4 Postup exprese segmentu C45

Postup exprese daného segmentu spolu s purifikací rozdělíme do pěti kroků z důvodu zachování přehlednosti celého procesu. Uvedme zde také soupis nutných pufrů a enzymů pro celou proceduru s výjimkou složení LB média, které je již uvedeno výše v této práci:

- Purifikační pufr - 10 mM TRIS, 10 mM NaCl, pH 8,8.
- Promývací pufr - 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, 10 mM imidazol, pH 7,6.
- Eluční pufr - 500 mM imidazol, pH 7,6.
- Dialyzační pufr - 20 mM TRIS, 140 mM NaCl, pH 7,6.
- Inhibitory proteáz - jednotlivé inhibitory přidáváme do 10 ml roztoku dialyzačního pufru.
 - 15 mg lysozymu.
 - 26 mg PMSF (fenylmetylsulfonyl fluorid).
 - 10 μ l leupeptinu o koncentraci 2 mg/ml.
 - 4 μ l pepstatinu o koncentraci 5 mg/ml.
 - 10 μ l DTT (dithiothreitol) o koncentraci 1 M.
 - 15 μ l EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, etylendiamintetraoctová kyselina) o koncentraci 100 mM.

krok 1

1. Nejprve připravíme roztok LB média. Příslušné objemy odlijeme do připravených baněk a necháme sterilizovat.
2. Vybranou kolonii z misek dáme do 4 ml roztoku LB média. Postup provedeme pro každou misku s různým typem transformovaných buněk.
3. Přidáme antibiotikum kanamycin (finální roztok má koncentraci 30 μ g/ml).
4. Necháme růst za stálého míchání přes noc (13-16 hodin) na orbitální třepače (180 RPM) při teplotě 37 °C.

krok 2

1. Všechny roztoky přepipetujeme do 200 ml LB média a přidáme kanamycin.
2. Roztok promícháme na shakeru (180 RPM, 37 °C).
3. Každých 30 minut měříme absorbanci proti standardu (samotné LB médium) na vlnové délce 600 nm.
4. Jakmile je hodnota absorbance v rozmezí 0,6 - 0,8 (což nastane přibližně po 2 nebo 2,5 hodinách), tak indukujeme expresi pomocí 200 μ l IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosid) o koncentraci 100 mg/ml.
5. Směs necháme míchat na orbitální třepačce po dobu 24 hodin a při teplotě 17 °C.

krok 3

- Buňky z předchozího kroku odstředíme na centrifuze - 25 minut při 5000 RCF.

Takto připravené buňky lze po tomto kroku zamrazit na teplotu -20 °C a uchovat je tak pro pozdější použití. Další možností je pokračovat v postupu krokem 4, tedy purifikací.

krok 4

1. Nejprve připravíme afinitní kolonu se stacionární fází (6 ml Talon Metal Affinity Resin, obsahuje Co^{2+} ionty).
2. Kolonu nejprve promyjeme 200 ml dialyzačního pufru a dáme celou soustavu včetně kolony vychladit do lednice.
3. Rozmrazíme buňky z kroku 3 (v případě skladování). Buňky smícháme s 10 ml purifikačního pufru a inhibitory proteáz.
4. Provedeme rozbití buněk. V našem případě jsme použili sonikaci na 30% výkonu, po dobu 30 sekund (30 sekund sonikace, 30 sekund vypnutý přístroj...) a trojnásobné opakování sonikační sekvence. Po celou dobu vzorky chladíme v ledové lázni.
5. Následně provedeme centrifugaci - 25 minut, 15000 RCF.

6. Supernatant po centrifugaci přelijeme na připravenou kolonu a necháme 1 hodinu reagovat. Během této doby opatrně roztok promícháváme s 15 minutovým intervalem.
7. Kolonu prolijeme 40 ml promývacího pufru.
8. Provedeme eluci pomocí elučního pufru. Přidáme 2 ml elučního pufru, necháme 30 minut reagovat a následně sbíráme eluát do připravených mikrozkuhavek (eppendorfky). Promytí elučním pufrem provedeme pro každý buněčný roztok 3x. Získáme tak sadu 3 eluátů s různou koncentrací námi požadovaného proteinu (označení 1.-3. eluce).
9. Eluátem o objemu 2 ml naplníme dialyzační střívko a ponoříme jej do 1 litru dialyzačního pufru (složení je uvedené na začátku této kapitoly), přičemž 30 minut pufr mícháme. Následně vyjmeme střívko a vložíme ho do dalšího litru dialyzačního pufru. Dialýzu necháme probíhat přes noc v chladničce.

krok 5

- Provedeme elektroforézu na polyakryamidovém gelu a přibližné stanovení koncentrace proteinu metodou Bradfordové.

10.5 Vlastní měření

Tato práce nejčastěji používá titrační experimenty ke studiu parametrů ovlivňujících zhášení. Pro většinu experimentů byly použity mikrotitrační destičky s 384 jamkami, které jsou vhodné pro měření v UV oblasti spektra.

10.5.1 Měření kinetiky dohasínání fluorescence

Pro měření kinetiky dohasínání fluorescence byl použit spektrofotometr pro časově korelované čítání fotonů FluoTime 200 (PicoQuant GmbH, Německo) včetně příslušejícího měřicího softwaru PicoHarp 300. Jako světelný zdroj pro excitaci NATA, HSA, BSA a sady mutantů byla použita dioda pro UV oblast o vlnové délce 298 nm. Experimenty byly prováděny za různých teplot. Pro všechna měření bylo zachováno nastavení frekvence

excitačních pulzů 10 MHz, časové rozlišení 16 ps na kanál. V případě všech fluoroforů byly použity obě štěrbinové s šířkou 16 nm a vlnová délka emise byla 350 nm. Měření bylo ukončeno uplynutím zadaného časového intervalu nebo dosažením 10000 fotonů v jednom z kanálů. Funkce přístrojové odezvy (IRF - instrument response function) byla v případě excitace světlem o vlnové délce 298 nm pomocí roztoku Ludoxu. Všechna měření byla provedena v křemenných kyvetách s optickou dráhou 3 mm.

Naměřené kinetiky dohasínání byly vyhodnoceny pomocí softwaru PicoQuant FluoFit (verze 4.2.1.). Tento program umožňuje fitování naměřené kinetiky dohasínání fluorescence multiexponenciální funkcí, která má obecný tvar

$$F(t) = \int_t^{-\infty} IRF(t') \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{t-t'}{\tau_i}} dt', \quad (10.1)$$

kde $IRF(t')$ je funkce přístrojové odezvy, A_i jsou amplitudy jednotlivých komponent a τ_i jsou střední doby života excitovaných stavů jednotlivých komponent.

Při této analýze kinetiky dohasínání byly sledovány parametry redukovaný χ_R^2 , náhodilost rozložení residuí a autokorelační funkce. V případě χ_R^2 byla požadována jeho hodnota blízká jedné.

Pro určení bimolekulární zhášecí konstanty byly použity intenzitně vážené doby života excitovaného stavu zjištěné pomocí metody TCSPC.

10.5.2 Měření steady-state intenzity fluorescence

Pro měření steady-state intenzit byl použit automatický spektrometr pro měření na mikrotitračních destičkách Synergy MX (BioTek Instruments, USA). Pro všechny fluorofory byla použita mikrotitrační destička s 384 jamkami o obsahu 100 μ l, která je určena pro měření v UV oblasti spektra. Vlnová délka excitace byla 298 nm a vlnová délka emise byla 350 nm, přičemž šířka spektrálního pásu byla 9 nm. Rychlost snímání byla vždy nastavena jako 30 záblesků na jamku a pozice optiky při snímání byla ve spodu destičky. Nastavení parametru "gain" bylo 50 a 100, v závislosti na intenzitě signálu. Více informací o měření na tomto přístroji je uvedeno v apendixu této práce.

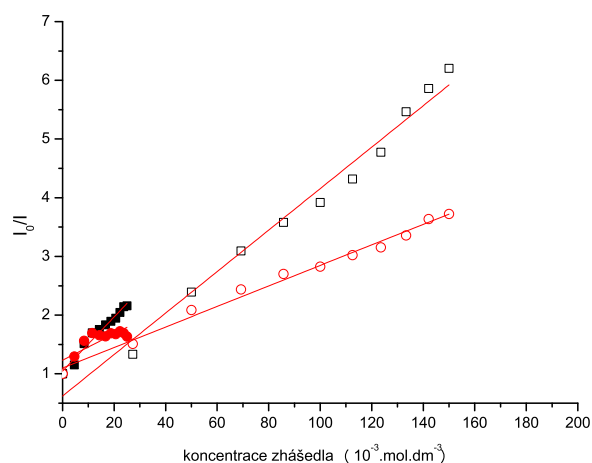
Kapitola 11

Výsledky

Absorpční spektra použitých zhášedel jsou uvedena v [Geletičová, J. (2011)]. Tato spektra dokazují, že použitá zhášedla neabsorbují ve sledované oblasti.

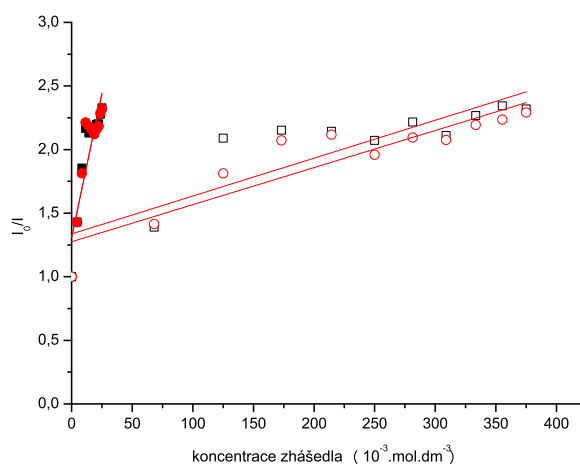
11.1 Vliv iontové síly na zhášení fluorescence

Pro zjištění vlivu iontové síly použijeme Stern-Volmerovy grafy. Jedná se o jednoduchou závislost poměru intenzit se zhášedlem ku intenzitě bez zhášedla v závislosti na koncentraci zhášedla. Stern-Volmerův graf je lineární pro dynamické zhášení, jak je uvedeno v teoretické části této práce. Jako zhášedlo byl použit akrylamid a KI, přičemž obě zhášedla způsobují dynamické zhášení fluorescence.

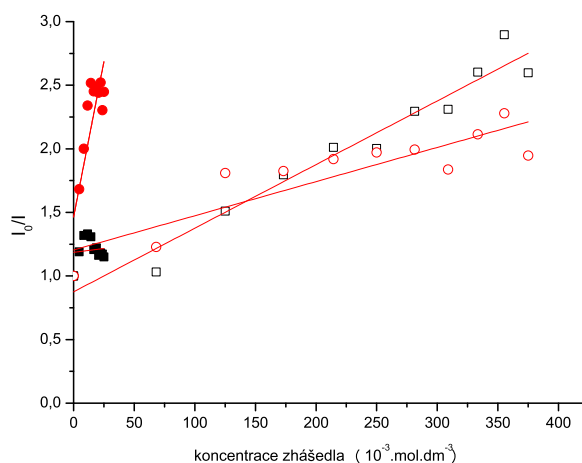


Obrázek 12 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení NATA pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 300 mM.

V obrázku 12 je vidět, že pro nízké i vysoké hodnoty iontové hodnoty iontové síly má zhášení akrylamidem přibližně stejnou směrnici.

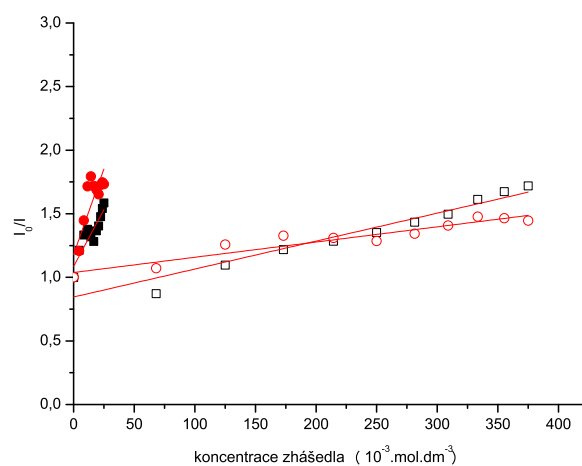


Obrázek 13 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení HSA pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 750 mM.

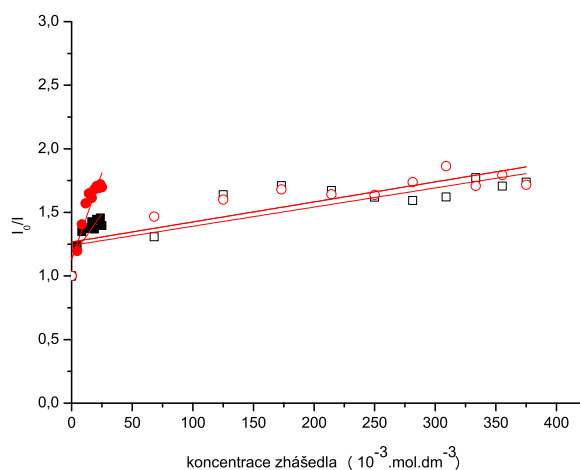


Obrázek 14 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení BSA pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 750 mM.

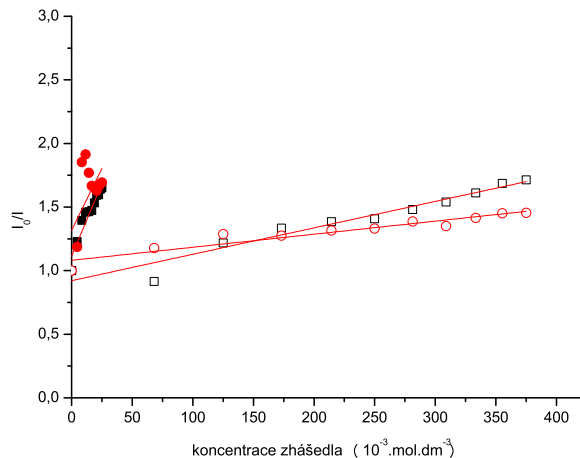
Oba uvedené obrázky ukazují velký rozdíl v trendech při nízkých a vysokých iontových silách.



Obrázek 15 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení mutantu s označením V426W pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 750 mM.



Obrázek 16 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení mutantu s označením W385 pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 750 mM.



Obrázek 17 - Stern-Volmerovy grafy pro zhášení mutantu s označením V683W pomocí akrylamidu (černě) a pomocí KI (červeně). Konstantní iontová síla v případě plných symbolů byla 50 mM a v případě prázdných symbolů byla iontová síla udržována na 750 mM.

Trendy při nízkých iontových silách jsou odlišné oproti trendům při vysoké iontové síle. Tato změna ve směrniciích může být důsledkem poklesu efektivity zhášení.

Následující tabulka zobrazuje vybrané hodnoty Stern-Volmerových zhasécích konstant při nízké a vysoké iontové síle pro všechny studované fluorofory.

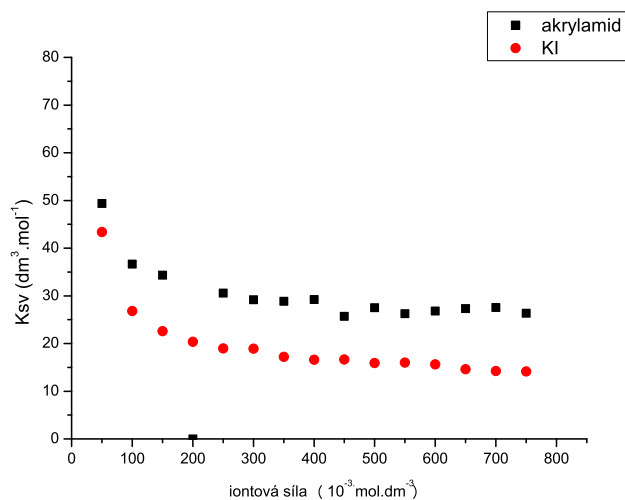
	NATA	HSA	BSA	V426F	W385	F683W
150 mM KI	43,39	34,71	24,58	34,40	13,59	6,36
150 mM akrylamid	34,36	25,01	13,57	20,90	8,44	6,29
750 mM KI	14,17	3,85	4,57	3,95	13,28	1,55
750 mM akrylamid	26,34	4,97	3,36	3,95	3,98	1,50

Tabulka 1 - Tabulka Stern-Volmerových konstant pro NATA, HSA, BSA a mutanty V426F, W385, F683W. Uvedené hodnoty Stern-Volmerových konstant jsou uvedeny v jednotkách $\text{dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$.

Z uvedené tabulky je vidět, že iontová síla ovlivňuje účinnost zhasení pro všechny studované systémy. A proto jsme se rozhodli proměřit podrobněji závislost efektivity zhasení fluorescence na iontové síle, viz. následující kapitola.

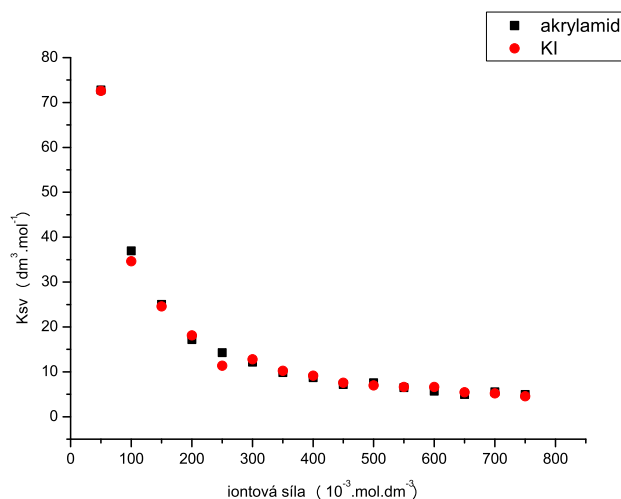
11.2 Závislost Stern-Volmerovy zhašecí konstanty na iontové síle

Závislost Stern-Volmerových zhašecích konstant na iontové síle nese informaci o efektivitě zhašení. Pokud je tato závislost rostoucí, dochází ke zvýšení efektivitě zhašení. Pokud má tato závislost klesající trend, je možné mluvit o snižování efektivitě.

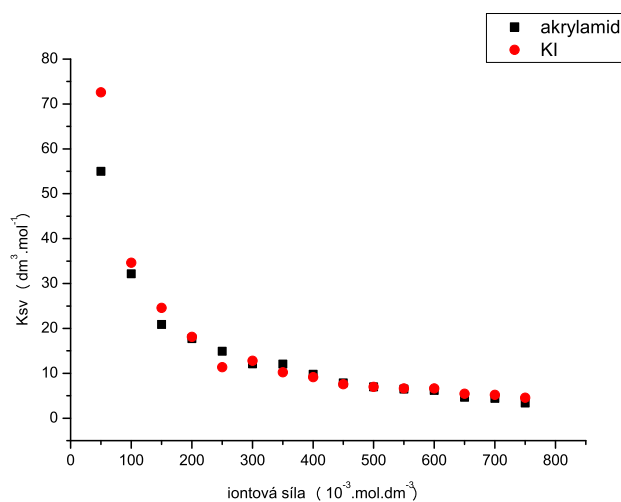


Obrázek 18 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhašecí konstanty na iontové síle pro NATA.

Obrázek 18 zobrazuje pokles efektivitě zhašení pro obě zhašedla. Je možné pozorovat rozdílnou efektivitu zhašení pro akrylamid a pro KI s rostoucí iontovou silou. Akrylamid se při vyšších hodnotách iontové síly stává účinnějším zhašedlem než KI.

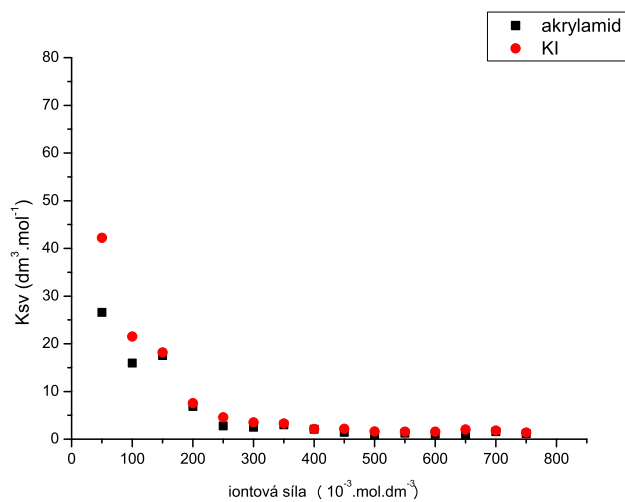


Obrázek 19 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle pro HSA.

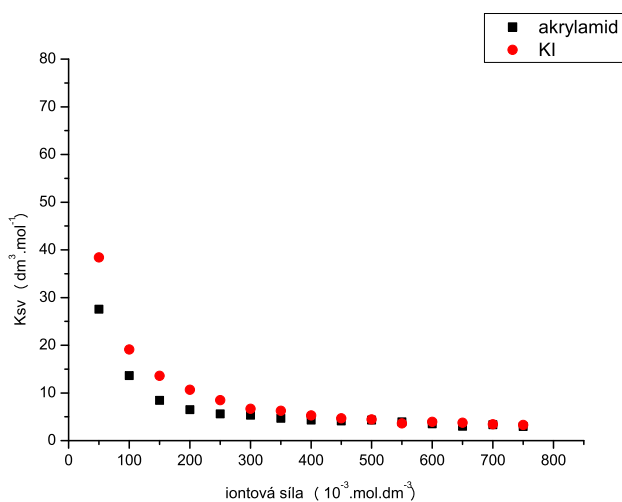


Obrázek 20 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle pro BSA.

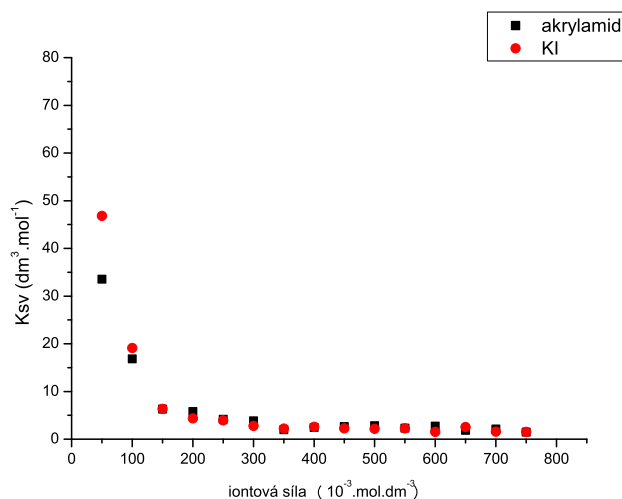
Po zkoumání modelového fluoroforu jsme se zaměřili na studium proteinů. Zde je možné pozorovat pokles efektivity zhášení pro obě zhášedla.



Obrázek 21 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle pro mutant s označením V426W.



Obrázek 22 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle pro W385.



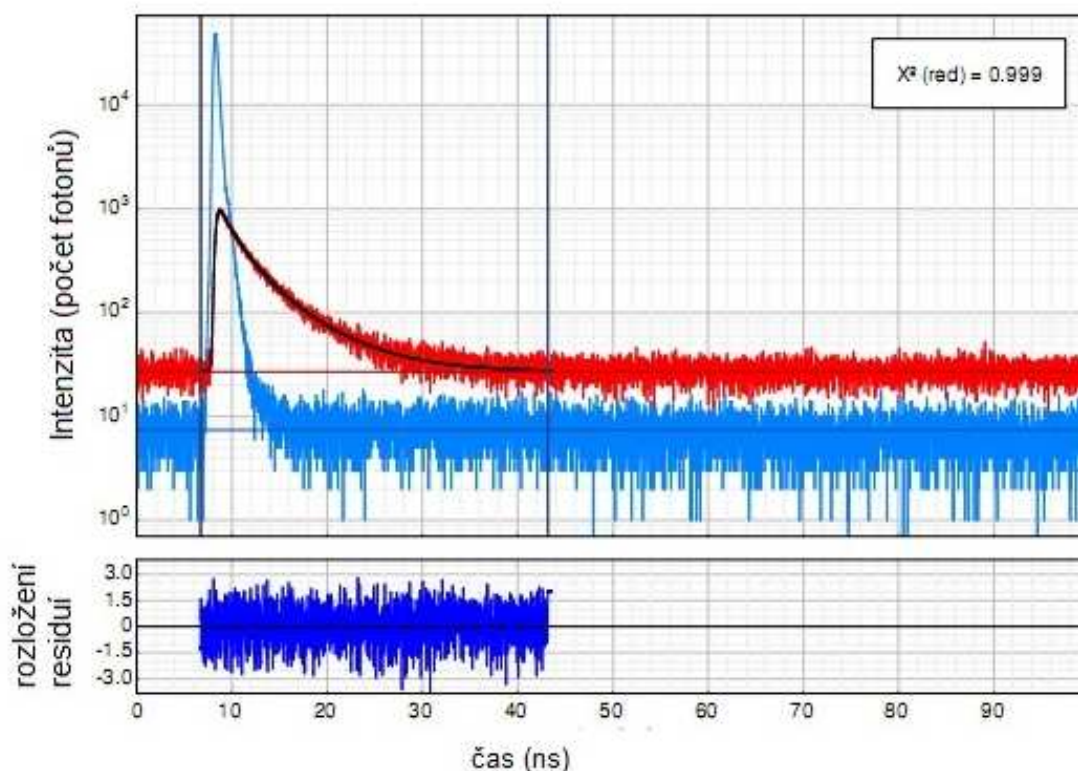
Obrázek 23 - Graf závislosti Stern-Volmerovy zhášecí konstanty na iontové síle pro F683W.

Ve všech případech jsme pozorovali pokles Stern-Volmerovy zhášecí konstanty s rostoucí iontovou silou. Tento pokles efektivity je nejvýznamnější v intervalu iontové síly 0-150 mM. U zhášení NATA jsme pozorovali pokles efektivity zhášení u obou zhášedel, přičemž k poklesu efektivity došlo pravděpodobně jiným typem intrakce.

11.3 Doby života excitovaných stavů

Hodnoty středních dob života excitovaných stavů jsou nutné pro určení bimolekulární zhášecí konstanty. Bimolekulární zhášecí konstanta je jedním z významných parametrů zhášení fluorescence, které podávají informaci o efektivitě zhášení. Doby života excitovaných stavů také poskytují informace o stavu fluoroforu, v případě proteinů poskytují informace o komformaci fluoroforu.

Pro všechny studované fluorofory byl vyhovující tří-exponenciální model.



Obrázek 24 - Graf křivky dohasínání fluorescence pro mutant s označením F683W a pro 450 mM konstantní iontovou sílu. Hodnota χ^2 je blízká jedné, což vypovídá o dobré shodě experimentu s tří-exponenciálním modelem. V dolní části je uveden graf rozložení residuí pro tří-exponenciální dohasínání fluorescence.

	NATA	HSA	V426W	W385	F683W
τ_1	1,07	7,23	2,79	2,01	5,65
τ_2	2,99	3,76	6,50	5,20	2,10
τ_3	0,03	0,28	0,56	24,11	0,57
A_1	310	3541	495	833	359
A_2	7999	3999	389	313	664
A_3	4967	1674	343	1147	476
τ_{iw}	2,91	5,88	4,97	4,72	3,94
χ^2	0,97	1,01	0,99	0,95	1,00

Tabulka 2 - Tabulka dob života excitovaných stavů, středních dob života excitovaných stavů, jednotlivých amplitud a χ^2 pro všechny použité fluorofory. Všechny hodnoty dob života jsou uvedeny v jednotkách 10^{-9} s. Hodnota τ_m je intenzitně vážená střední doba života excitovaných stavů. Pro zjištění dob života excitovaných stavů byl použit tří-exponenciální model. Uvedené hodnoty dob života excitovaného stavu byly určeny pro iontovou sílu 450 mM.

Pro úplnost uvedeme hodnoty středních dob života excitovaných stavů pro použité fluorofory.

iontová síla (mM)	NATA	HSA	V426W	W385	F683W
50	3,15	6,14	5,07	4,78	3,98
100	3,04	6,10	5,00	4,72	4,00
150	2,99	6,01	4,96	4,78	3,92
200	2,96	5,97	4,96	4,78	3,96
250	2,95	5,99	5,10	4,74	3,83
300	2,95	5,95	4,85	4,83	4,00
350	2,95	5,90	4,89	4,76	3,91
400	2,97	5,90	4,95	4,79	3,90
450	2,91	5,88	4,97	4,72	3,94
500	2,94	5,88	4,92	4,72	3,91
550	2,91	5,88	4,84	4,74	3,95
600	2,92	5,85	5,02	4,77	4,01
650	2,90	5,85	5,06	4,77	3,84
700	2,88	5,83	4,95	4,76	3,93
750	2,87	5,81	4,74	4,77	3,87

Tabulka 3 - Tabulka intenzitně vážených středních dob života excitovaných stavů

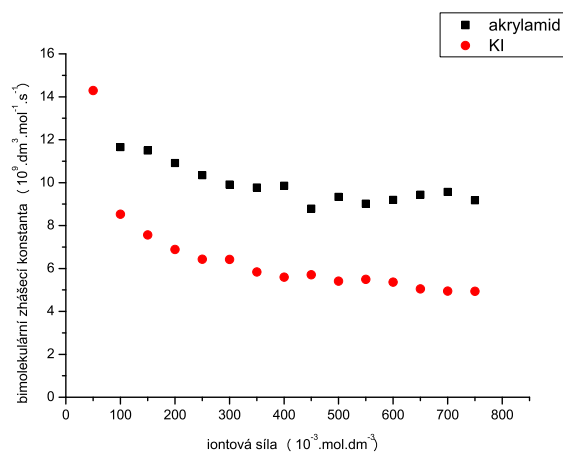
pro všechny použité fluorofory. Všechny hodnoty jsou uvedeny v jednotkách 10^{-9} s. Pro zjištění dob života excitovaných stavů byl použit tří-exponenciální model.

Jak je vidět, střední doby života excitovaných stavů pro NATA, HSA a BSA systematicky klesají. V případě NATA tento pokles střední doby života excitovaného stavu může být spojen s navázáním iontu. V případě HSA a BSA může být pokles středních dob života excitovaného stavu vysvětlen konformační změnou nebo navázáním iontu.

Z uvedené tabulky vyplývá, že rostoucí iontová síla neovlivňuje konformaci proteinu u série mutantů Na^+/K^+ -ATPasy. Tato konformační změna by se projevila změnou doby života excitovaného stavu fluoroforů.

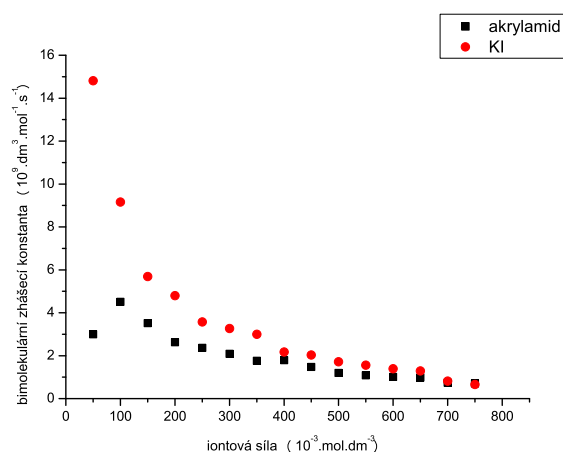
11.4 Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle

Bimolekulární zhášecí konstanta naruší Stern-Volmerovy konstanty obsahuje informace o stavu fluoroforu (difúzní koeficient, konformace proteinu, přístupnost fluoroforu).

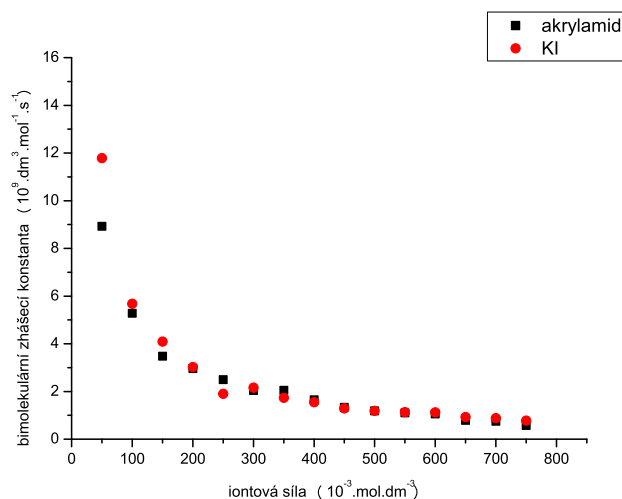


Obrázek 25 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro NATA.

Obrázek 25 zobrazuje pokles bimolekulární zhášecí konstanty pro NATA s rostoucí iontovou silou. K poklesu této zhášecí konstanty dochází pro obě zhášedla. Pokles zhášecí konstanty pro akrylamid je menší než u KI.

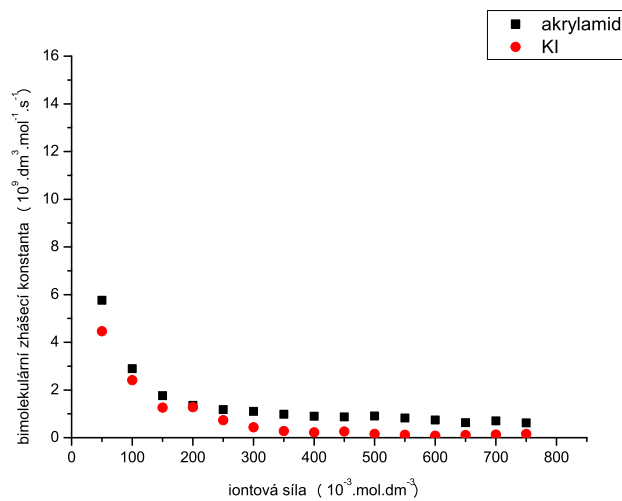


Obrázek 26 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro HSA.

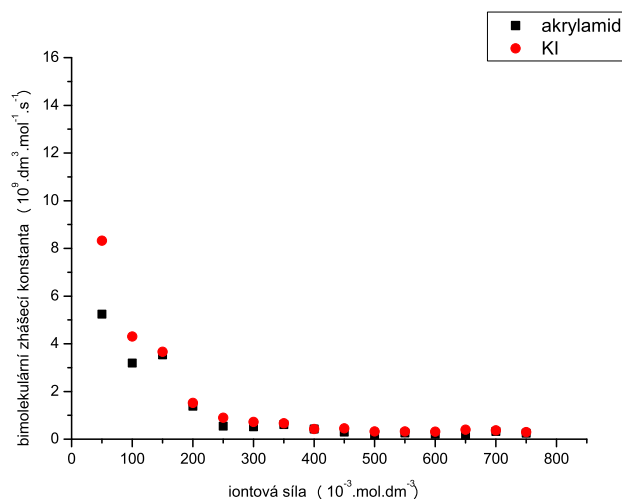


Obrázek 27 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro BSA.

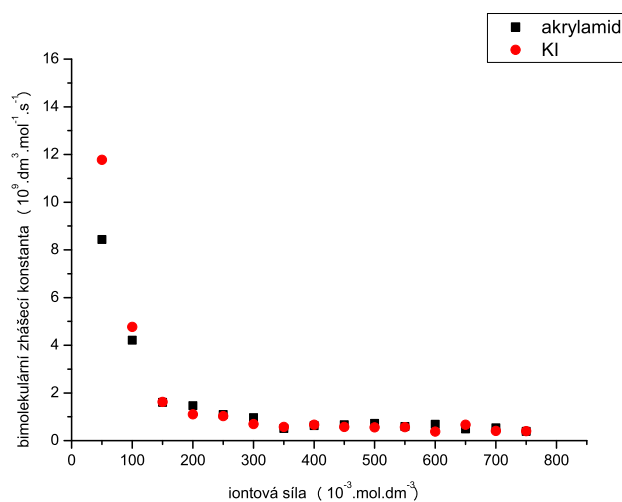
I v případě HSA a BSA dochází k poklesu bimolekulární zhášecí konstanty s rostoucí iontovou silou. V případě HSA je při nízké iontové síle efektivnější zhášedlo akrylamid. Rozdíl v efektivitě zhášení HSA pro jednotlivá zhášedla je zanedbatelný.



Obrázek 28 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro mutant s označením W385.



Obrázek 29 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro mutant s označením V426W.



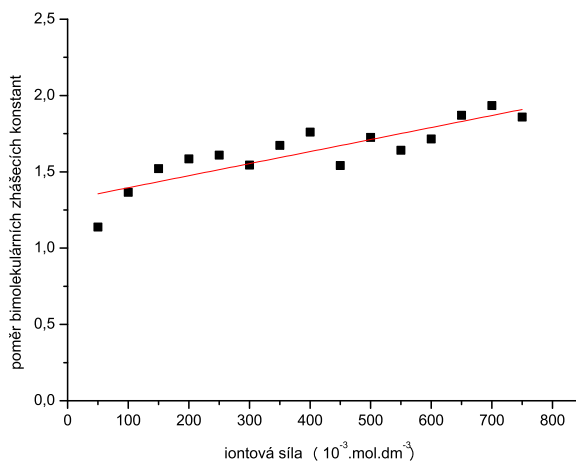
Obrázek 30 - Závislost bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro mutant s označením F683W.

Ve všech výše uvedených závislostech pozorujeme významný pokles hodnot bimolekulární zhášecí konstanty pro obě zhášedla s rostoucí iontovou silou. Pokles Stern-Volmerových zhášecích konstant je pro sérii mutantů podobný pro obě zhášedla.

11.5 Závislost poměrů bimolekulárních zhášecích konstant na iontové síle

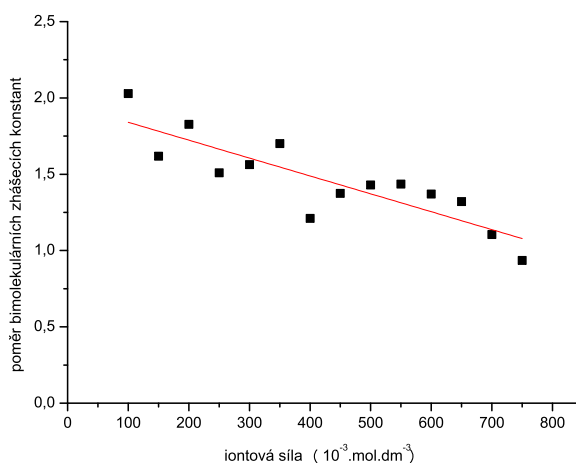
Poměry bimolekulárních zhášecích konstant pro KI a pro akrylamid mohou vypovídat o tom, které zhášení je efektivnější. Poměr těchto zhášecích konstant je uvažován jako bimolekulární zhášecí konstanta pro jodid dělená bimolekulární zhášecí konstantou pro akrylamid.

Vzhledem k tomu, že rostoucí iontová síla oslabuje vliv elektrostatických interakcí, a to jen v případě zhášení jodidem, tak sledováním směrnice trendu můžeme určit, zda-li v případě interakce jodidu s fluoroforem dochází k elektrostatické atrakci či repulzi.



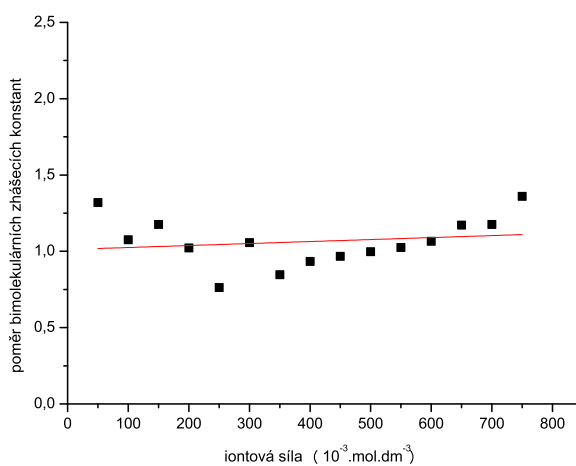
Obrázek 31 - Graf závislosti poměrů bimolekulárních zhášecích konstant pro NATA.

Poměry bimolekulárních zhášecích konstant pro NATA vykazují rostoucí trend. Tento nárůst může vypovídat o oslabení repulze vlivem rostoucí iontové síly.



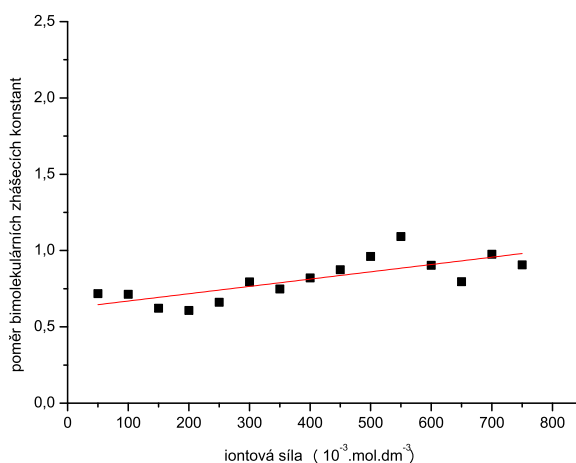
Obrázek 32 - Graf závislosti poměrů bimolekulárních zhašecích konstant na iontové síle pro HSA.

V obrázku 32 pro albumin z lidského séra jsme pozorovali pokles poměrů bimolekulárních zhašecích konstant s rostoucí iontovou silou. Tento pokles může být vysvětlen zeslabením přitahování zhašedla k fluoroforu.



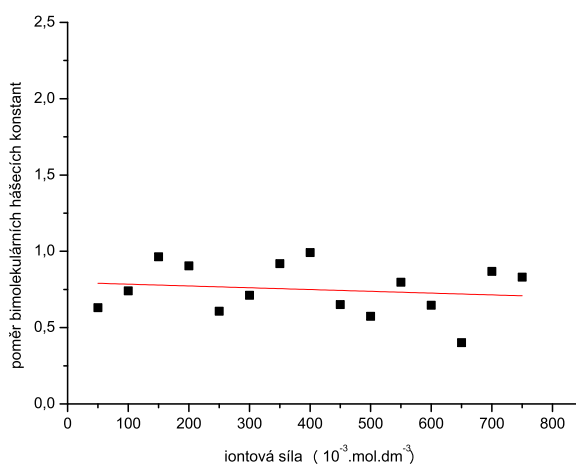
Obrázek 33 - Graf závislosti poměrů bimolekulárních zhašecích konstant na iontové síle pro BSA.

Albumin z hovězího séra vykazuje v této závislosti bimolekulární zhašecí konstanty na iontové síle konstantní trend, oproti HSA.



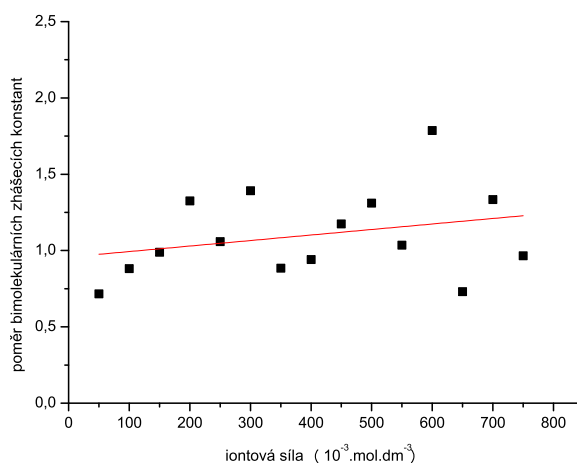
Obrázek 34 - Graf závislosti poměrů bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro mutant W385.

Residuum s označením W385 vykazuje nárůst poměrů bimolekulárních zhášecích konstant. Z této skutečnosti vyplývá, že jodidový aniont je s rostoucí iontovou silou silnějším zhášedlem než akrylamid. Může tedy docházet k slabému oslabení repulze.



Obrázek 35 - Graf závislosti poměrů bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro V426W.

Graf pro residuum V426F vykazuje konstantní efektivitu zhášení, nicméně data jsou zatížena vysokou úrovní šumu.



Obrázek 36 - Graf závislosti poměrů bimolekulární zhášecí konstanty na iontové síle pro F683W.

Poslední zkoumaný fluorofor vykazuje opět slabý nárůst. Tento nárůst je podobný jako v případě W385. V tomto případě pravděpodobně dochází k oslabení repulze mezi fluoroforem a jodidem.

Kapitola 12

Diskuze

Již od 50. let 20. století je známo, že vliv protiiontů v roztocích není zanedbatelný. Tímto tématem se mimo jiné zabývali například [Millis, R., 1957] a [Stokes, R. H., 1957]. Dnes je iontová síla často opomíjeným parametrem. Tato práce tento parametr s výhodou využívá a pomocí něj získává informace o elektrostatických interakcích.

Efektivita zhášení fluorescence závisí na difúzních koeficientech obou molekul, přístupnosti fluoroforu a elektrostatických interakcích v případě nabitých molekul (kladně i záporně). Pracovali jsme s hypotézou, že při zhášení pomocí akrylamidu můžeme odhalit vliv difúzních koeficientů a přístupnosti fluoroforu. Oproti tomu při zhášení pomocí KI můžeme odhalit vliv elektrostatických interakcí. Rostoucí iontová síla by měla oslabovat vliv elektrostatických interakcí (repulzi i přitahování). Molekuly zhášedla a ionty spolu soutěží, v důsledku čehož se méně molekul zhášedla dostane do blízkosti fluoroforu, jež jsou schopny efektivně zhášet. Dále jsou molekuly iontů přitahovány k protiiontům, což může dále oslabovat efektivitu zhášení. V případě nenabitého zhášedla je zeslabování omezeno na kompetici mezi molekulami.

Určené hodnoty bimolekulárních zhášecích konstant korespondují s hodnotami uvedenými v literatuře, a to při vyšších iontových silách. Tyto hodnoty pro NATA jsou uvedené například v [Valeur, B., 2006]. Tato shoda při vyšších iontových silách může být způsobená nekovalentními interakcemi.

Hodnoty dob života určené pomocí TCSPC metody se shodují s hodnotami uvedenými v [Szabo, A. G a Rayner D. M., 1980], [Mishra a kolektiv, 2005], [Grycova, L. a kolektiv, 2009] a [Tayeh, N., Rungassamy, T. a Albani, J. R., 2009].

Vliv iontové síly - NATA

Naše experimenty překvapivě ukázaly, že iontová síla ovlivňuje zhášení i v jednoduchém modelovém případě zhášení NATA akrylamidem. Jelikož akrylamid je neutrální molekula, je zřejmé, že iontová síla má vliv kromě elektrostatických interakcí i na jiné faktory ovlivňující účinnost zhášení a některé z nich se nám podařilo identifikovat.

Doba života excitovaného stavu vymezuje časový interval, ve kterém může srážka zhásedla s fluoroforem efektivně způsobit zhášení fluorescence. Naše měření ukázala, že v případě NATA dochází ke zkracování střední doby života excitovaného stavu s rostoucí iontovou silou. Tato změna je cca 10 % pro námi proměřovaný rozsah iontové síly, proto tento efekt plně nevysvětluje pokles efektivity zhášení.

Změna doby života excitovaného stavu NATA je pravděpodobně způsobena vazbou sodných iontů. Navázání sodného iontu místo protonu může mít za následek pokles difúzního koeficientu NATA, tento efekt však nedokážeme přesně kvantifikovat.

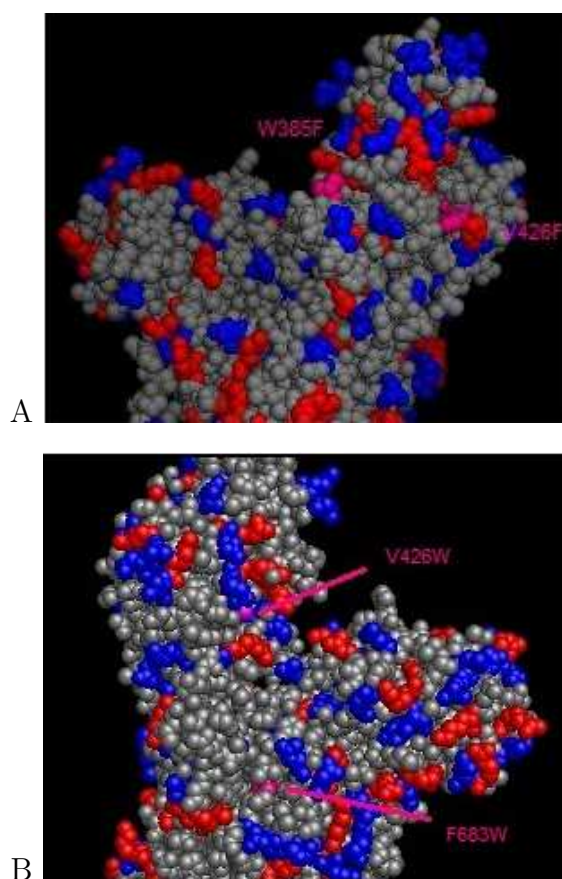
Dynamické zhášení je proces řízený difúzí a na jeho efektivitu může mít tedy vliv viskozita roztoku. Jak uvádí [Kestin, J., Khalifa, E. H. a Correia, R. J., 1981], dynamická viskozita při 25°C roste spolu s koncentrací roztoku. V našem případě je změna dynamické viskozity v řádu jednotek procent (při změně koncentrace soli z nuly na 1 M koncentraci se změní dynamická viskozita o 1,5%). Pokles bimolekulárních zhášecích konstant tedy nemůže být zcela vysvětlen změnou viskozity roztoku, nicméně tato změna k pozorovanému efektu přispívá.

Pokles efektivity zhášení může být také důsledkem změny difúzního koeficientu akrylamidu. Jeho difúzní koeficient může být také změněn interakcí s ionty. Může se být také důsledek hydrofobního efektu, který napomáhá agregaci molekul (vysolování) a tím ke snížení jejich difúzního koeficientu. Dostupná literatura ani naše experimenty však neposkytují dostatečnou oporu pro tyto hypotézy ani pro kvantifikaci tohoto efektu. Poměr bimolekulárních zhášecích konstant pro jodid a akrylamid v případě NATA roste s rostoucí iontovou silou. Protože NATA je také molekula neutrální, nejedná se tedy o vliv iontové síly na elektrostatické interakce, ale spíše se jedná o důsledek snížení difúzního koeficientu pro akrylamid, jak bylo diskutováno v předchozím odstavci.

Vliv iontové síly - proteiny

V případě proteinů nemá smysl uvažovat o významnější změně difúzního koeficientu fluoroforu, ale zvyšování iontové síly může mít jiný efekt, a sice změnu konformace proteinu. Na změnu konformace je velmi citlivá střední doba života excitovaného stavu tryptofanu a naše měření ukázalo, že u HSA a BSA k ovlivnění tohoto parametru rostoucí iontovou silou dochází, narozdíl od mutantů Na^+/K^+ -ATPasy. Toto pozorování naznačuje, že struktura mutantů Na^+/K^+ -ATPasy je poměrně stabilní, zatímco struktura HSA a BSA se s rostoucí iontovou silou mění.

Molekulární model ukazuje rozmístění nabitých aminokyselin v okolí pozic, kde byly umístěny tryptofanové zbytky u mutantů Na^+/K^+ -ATPasy. Situace je zjednodušeně znázorněna na následujících obrázcích.



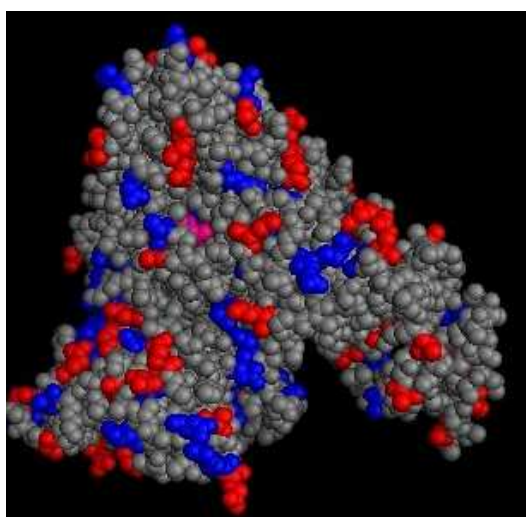
Obrázek 37 - Obrázek znázorňující rozložení náboje v Na^+/K^+ -ATPase. Modře jsou označeny kladně nabitě aminokyseliny arginin a lysin. Červeně jsou označeny záporně nabitě aminokyseliny kyselina asparagová a kyselina glutamová. Růžově jsou označena mutovaná residua Na^+/K^+ -ATPasy. Obrázek A zobrazuje residua na pozicích 385 a 426. Obrázek B zobrazuje residua na pozicích 683 a 426.

Naše experimenty ukázaly, že poměr bimolekulárních zhášecích konstant se signifikantně nemění s rostoucí iontovou silou, což naznačuje, že elektrostatické interakce nemají na účinnost zhášení velký vliv. To potvrzují i obrázky 37 A a B, které ukazují, že v okolí tryptofanu v mutantu V426F se nacházejí jak kladně tak záporně nabitá rezidua a výsledná hodnota elektrostatického potenciálu je zřejmě blízká nule.

Podobně velmi slabá závislost poměru bimolekulárních zhášecích konstant byla pozorována u mutantu F683W. Jak ukazuje obrázek 37 B, tryptofan je na tomto místě obklopen aminokyselinami bez kladného či záporného náboje.

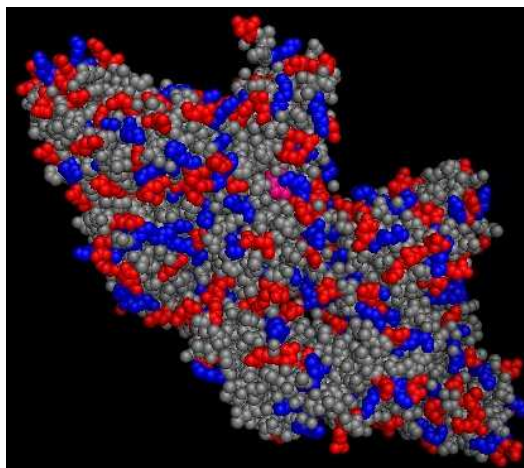
V případě tryptofanu W385 jsme s rostoucí iontovou silou pozorovali, že dochází k nárůstu poměru bimolekulárních zhášecích konstant pro jodid a akrylamid, což značí, že v případě jodidu dochází k oslabování elektrostatické repulze. Protože je jodid záporně nabitý, znamená to, že W385 se nachází v oblasti se záporným nábojem. Pohled na obrázek 37A ukazuje, že skutečně v bezprostřední blízkosti W385 se nachází aminokyselina se záporným nábojem.

V případě HSA není tryptofanové residuum na povrchu proteinu, ale je umístěno v kavitě, k níž je přístup tunelem, v jehož blízkosti se nacházejí jak kladně tak záporně nabitě aminokyseliny. Poměr bimolekulárních zhášecích konstant pro jodid a akrylamid klesal s rostoucí iontovou silou, což ukazuje na to, že dochází k oslabování elektrostatického přitahování a tedy, že větší význam mají kladně nabitě aminokyseliny.



Obrázek 38 - Obrázek znázorňující rozložení náboje v HSA. Označení kladně nabitých aminokyselin arginin a lysin je modré. Červeně jsou označeny záporně nabitě aminokyseliny kyselina asparagová a kyselina glutamová. Růžově je označeno tryptofanové residuum.

Tryptofanové residuum v HSA není obklopeno nabitými aminokyselinami. Zhášení fluorescence není tedy přímo ovlivněno náboji v okolí fluoroforu. Proces zhášení by tedy měl být podobný procesu v případě fluoroforu NATA. Je zřejmé, že proces zhášení v proteinu je komplikovanější a je ovlivněn více parametry.



Obrázek 39 - Obrázek znázorňující rozložení náboje v BSA. Označení kladně nabitých aminokyselin arginin a lysin je modré. Červeně jsou označeny záporně nabitě aminokyseliny kyselina asparagová a kyselina glutamová. Růžově jsou označena dvě nativní tryptofanová residua.

V případě BSA je situace zřejmě ještě komplikovanější, neboť závislost poměru bimolekulárních zhášecích konstant na iontové síle nemá monotónní trend. Je to pravděpodobně tím, že BSA obsahuje 2 tryptofany, přičemž jeden z tryptofanů je na povrchu a druhý tryptofan je zanořený do proteinu (na obr. 39 není vidět). BSA tedy není vhodný modelový protein.

Kapitola 13

Závěr

Hlavním předmětem zkoumání této diplomové práce bylo dynamické zhášení fluorescence aplikované na sadu jedno-tryptofanových mutantů velkého cytoplazmatického segmentu C45 Na^+/K^+ -ATPasy, albuminy z lidského a hovězího séra a N-acetyl-L-tryptofanamid. Předpokládali jsme, že rostoucí iontová síla eliminuje vliv elektrostatických interakcí na efektivitu zhášení fluorescence. Další parametry ovlivňující efektivitu zhášení, jako je například přístupnost fluoroforu a difúzní koeficienty pro zhášedlo a fluorofor, lze určit pomocí neutrálního zhášedla. Naše výsledky potvrdily, že efektivita zhášení skutečně závisí na iontové síle. Pro každý ze studovaných proteinů je ovlivněn jiným způsobem, což v principu umožňuje určit elektrostatický potenciál na povrchu studovaného proteinu v okolí tryptofanového residua. Interpretaci výsledků ale komplikuje fakt, že iontová síla ovlivňuje i zhášení pomocí neutrálního zhášedla.

Parametry, pro které literatura uvádí konkrétní hodnoty, popřípadě jsme je schopni dostatečně přesně změřit (změna dob života excitovaných stavů, změna viskozity), vysvětlují pozorované změny jen částečně. Významnou roli zde mají zřejmě i další efekty, jako je například hydrofóbní interakce, pro tuto hypotézu však nemáme žádnou oporu v experimentálních datech nebo literatuře.

Reálné zkoumání elektrostatických interakcí na povrchu biomolekul tedy zatím komplikuje absence ucelené teorie a velké množství proměnných.

Literatura

- [1] ALBERS, R. W. (1967): *Biochemical Aspects of Active Transport*. Annual Review of Biochemistry **36**, 727-756.
- [2] ALBERTS B. a kolektiv (2008): *Molecular Biology of the Cell*. Fifth edition. Garland Science, New York, USA. ISBN 978-0-8153-4106-2.
- [3] ANDO, T., ASAI, H. (1980): *Charge effects on the dynamic Quenching of fluorescence of 1, N-ethenoadenosine oligophosphates by iodide, thalium and acrylamide*. Journal of Biochemistry (Tokyo) **88**, 265-276.
- [4] ATKINS, P. W. (1998): *Fyzikálna chémia - Časť 1*. Šestá vydání. Oxford University Press. ISBN 80-227-1238-8.
- [5] COHN, E. J. (1925): *The Physical Chemistry of the Proteins*. Physiological Review. **5**, 349-437.
- [6] DAY, J. F., THORPE S. R. a BAYNES, J. W. (1979): *Nonezymatically glucosylated albumin. In vitro preparation and isolation from normal human serum*. Journal of Biological Chemistry **254**(3), 593-597.
- [7] DEBYE, P. , HÜCKEL, E. (1923): *The theory of electrolytes I. Lowering of freezing point and related phenomena*. Physicalische Zeitschrift **24**, 185-206.
- [8] DEMPSKI, R. E., FRIEDRICH, T. a BAMBERG E. (2009): *Voltage clamp fluorometry: Combining fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure-function of Na⁺/K⁺-ATPase*. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics **1787**, 714-720.
- [9] EDELHOCH, H. (1967): *Spectroscopic Determination of Tryptophan and Tyrosine in Proteins*. Biochemistry **7**, (6), 1948-1954.
- [10] EFTINK, M. R., GHIRON, C. A. (1976): *Fluorescence quenching of indole and model micelle systems*. Journal of Physical Chemistry **80**, 486-493.

- [11] EFTINK, M. R.(1991): *Fluorescence quenching: theory and applications*, in LAKOWICZ, J. R.(Ed.) *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Volume 2: Principles*. Plenum, New York. ISBN 0-306-43875-5.
- [12] GE, S. a kolektiv (1998): *Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns*. Journal Biomaterials Science, Polymer Edition **9** (2), 131-150.
- [13] GEERING, K. (2008): *Functional roles of Na, K-ATPase subunits*. Current Opinion in Nephrology and Hypertension **17**, 526-532.
- [14] GELETIČOVÁ, J. (2011): *Studium molekulárních parametrů ovlivňujících dynamické zhášení fluorescence*. UPOL, bakalářská práce.
- [15] GOODSELL, D. (online): *Www.pdb.org: Molecule of the Month*. RCSB PROTEIN DATA BANK. Wwww.pdb.org [online]. [cit. 2013-03-12]. Dostupné z: <http://www.pdb.org/pdb/101/motm.do?momID=118>
- [16] GRYCOVA, L. a kolektiv (2009): *ATP and magnesium drive conformational changes of the Na⁺/K⁺-ATPase cytoplasmic headpiece*. Biochimica et Biophysica Acta **1788**, 1081-1091.
- [17] HUANG, B. X., KIM, H. Y. a DASS C. (2004): *Probing Three-Dimensional Structure of Bovine Serum Albumin by Chemical Cross-Linking and Mass Spectroscopy*. Journal of American Society for Mass Spectrometry **15**, 1237-1247.
- [18] IBERG, N. a FLÜCKINGER R. (1986): *Nonenzymatic glycosilation of albumin in vivo. Identification of multiple glycosylated sites*. Journal of Biological Chemistry **261**(29), 13542-13545.
- [19] KESTIN, J., KHALIFA, E. H. a CORREIA, R. J. (1981): *Tables of the Dynamic and Kinematic Viscosity of Aqueous KCl Solutions in the Temperature Range 25 - 150°C and the Pressure Range 0,1-35 MPa*. Journal of Physical Chemistry Referenced Data **10**, 57-70.
- [20] KUBALA, M. a kolektiv (2009): *Changes in Electrostatic Potential of Na⁺/K⁺-ATPase Cytoplasmic headpiece Induced by Cytoplasmic Ligand(s) Binding*. Biophysical Journal **17**, 1756-1764

- [21] LAKOWICZ, J. R. (1999): *Principles of fluorescence spectroscopy*. Second edition. Plenum, New York. ISBN 0-306-46093-9.
- [22] MACH, H. a MIDDAGH, C. R. (1994): *Simultaneous Monitoring of the Environment of Tryptophan, Tyrosine and Phenylalanine Residues in Proteins by Near-Ultraviolet Second-Derivative Spectroscopy*. *Analytical Biochemistry* **222**, 323-331.
- [23] MILLIS, R. (1957): *The self diffusion of chloride ion in aqueous alkali chloride solutions at 25° C*. *Journal of Physical Chemistry* **61**, 1631-1634.
- [24] MISHRA, B. a kolektiv (2005): *Fluorescence spectroscopic studies on binding of a flavonoid antioxidant quercetin to serum albumins*. *Journal of Chemical Sciences - Indian Academy of Science* **6**, Volume 117, 641-647.
- [25] POST, R. L., HEGYVARY, C. a KUME, S. (1972): *Activation by adenosin triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase*. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 6530-6540.
- [26] RATHEAL, I. M. a kolektiv (2010): *Selectivity of externally facing ion-binding sites in the Na/K pump to alkali metals and organic cations*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 18718-18723.
- [27] RESHETNYAK, Y. (online) *PFAST: Protein Fluorescence and Structure Toolkit*. UNIVERSITY OF RHODE ISLAND. [Www.pfast.phys.uri.edu](http://www.pfast.phys.uri.edu) [online]. [cit. 2013-03-17]. Dostupné z: <http://www.pfast.phys.uri.edu/background/background.php>
- [28] STOKES, R. H. (1957): *Tracer diffusion of iodide ion in aqueous alkali chloride solutions at 25° C*. *Journal of Physical Chemistry* **61**, 1634-1636.
- [29] SZABO, A. G. a RAYNER, D. M. (1980): *Fluorescence Decay of Tryptophan Confromers in Aqueous Solutions*. *Journal of the American Chemical Society* **102:2**, 554-563.
- [30] TAYEH, N., RUNGASSAMY, T. a ALBANI, J. R. (2009): *Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins*. *Journal of Pharmaceutical and Biochemical Analysis* **50**, 107-116.

- [31] TINOCO, I., SAUER, K. a WANG, J. C. (1985): *Physical Chemistry: Principles and Applications in Biological Sciences*. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs. ISBN 0-12-666280-3.
- [32] TOYOSHIMA, C., KANAI, R. a CORNELIUS F. (2011): *First Crystal Structures of Na⁺, K⁺ -ATPase: New Light on the Oldest Ion Pump*. Structure **19** - Elsevier, 1732-1738.
- [33] VALEUR, B. (2006): *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-vch, Weinheim. ISBN 3-527-29919-X.
- [34] VIVIAN, J. T. a CALLIS, P. R. (2001): *Mechanisms of Tryptophan Fluorescence Shifts in Proteins*. Biophysical Journal **80**, 2093-2109.
- [35] WRIGHT, M. R. (2007): *An Introduction to Aqueous Solutions*. Wiley, Weinheim. ISBN 978-0-470-84293-5.
- [36] ZELENT, B. a kolektiv (1998): *Time-resolved and steady-state fluorescence quenching of N-acetyl-L-tryptophanamide by acrylamide and iodide*. Biophysical Chemistry **73**, 53-75.

Apendix

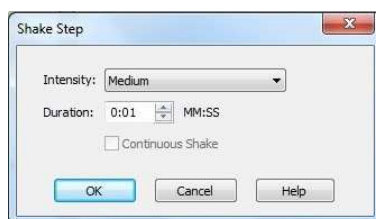
Měření na mikrotitračních destičkách

Měření na mikrotitračních destičkách přináší několik výhod, jako je například malé množství vzorku, současné měření při různých koncentracích vzorků a umožňuje realizovat velké množství opakování s malým časovým nákladem. Pro tento druh měření byl použit přístroj Synergy MX od firmy BioTek Instruments, Inc. (USA), který je dodáván spolu se softwarem Gen5TM.

Kalibrační měření bylo provedeno s využitím zásobního roztoku fluoresceinu v etanolu (Sigma) o koncentraci 1 mM a NATA (Sigma) o koncentraci zásobního roztoku 750 μ .

Obecné informace

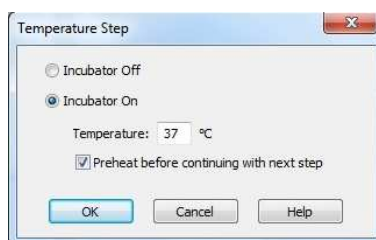
Přístroj umožňuje provést třepání destičky (ve třech různých rychlostech), jež může pomoci smísení jednotlivých komponent studovaného vzorku.



Obrázek A1 - Obrázek dialogového okna, kde je možné definovat třepání destičky. Přístroj umožňuje nastavení doby, po kterou třepání bude probíhat a rychlost třepání (výběr ze tří možností).

Je možné nastavit teplotu a měřit při konstantní teplotě. V přístroji jsou umístěny vyhřívací destičky, jež prohřívají vzduch a ten následně zahřívá destičku se vzorkem.

Výrobce udává rozsah teplot od pokojové teploty do cca 65 °C. Bohužel jak jsme experimentálně prokázali je čas nutný pro vyhřívání destičky poměrně dlouhý (zahřívání z 37°C na 60°C trvá 26 minut a 10 vteřin, ale pro pokles teploty z 60°C na 37°C je nutný čas okolo 66 minut). Dále bylo prokázáno, že během samotného zahřívání, popřípadě chlazení, není možné pracovat se softwarem a není možné tento čas využít pro jiná měření. Dokonce byl pozorován nárůst teploty během samotného měření, při kterém nebyla udržována její konstantní hodnota, což může být problematické pro dlouhá měření, kde je vyžadována striktně konstantní teplota.

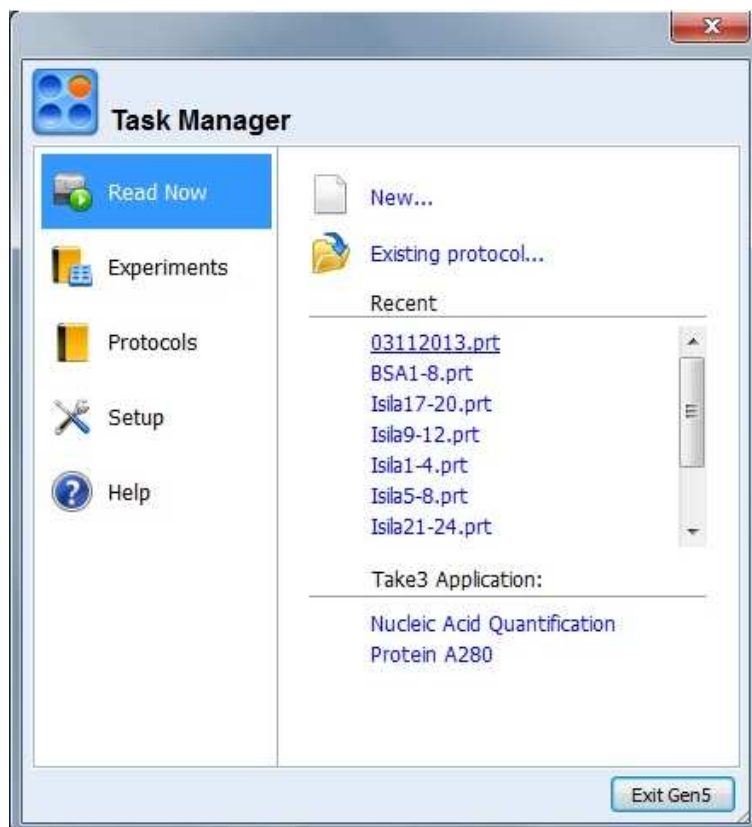


Obrázek A2 - Obrázek okna, které slouží pro nastavení konstantní teploty. Do okna se přímo zadá hodnota, jež má být po dobu trvání experimentu konstantní.

Existuje velké množství mikrotitračních destiček - použitý typ destičky je podřízen aplikaci. Samotný software umožňuje nastavení typu destičky (počet jamek, tvar jamek, atd.).

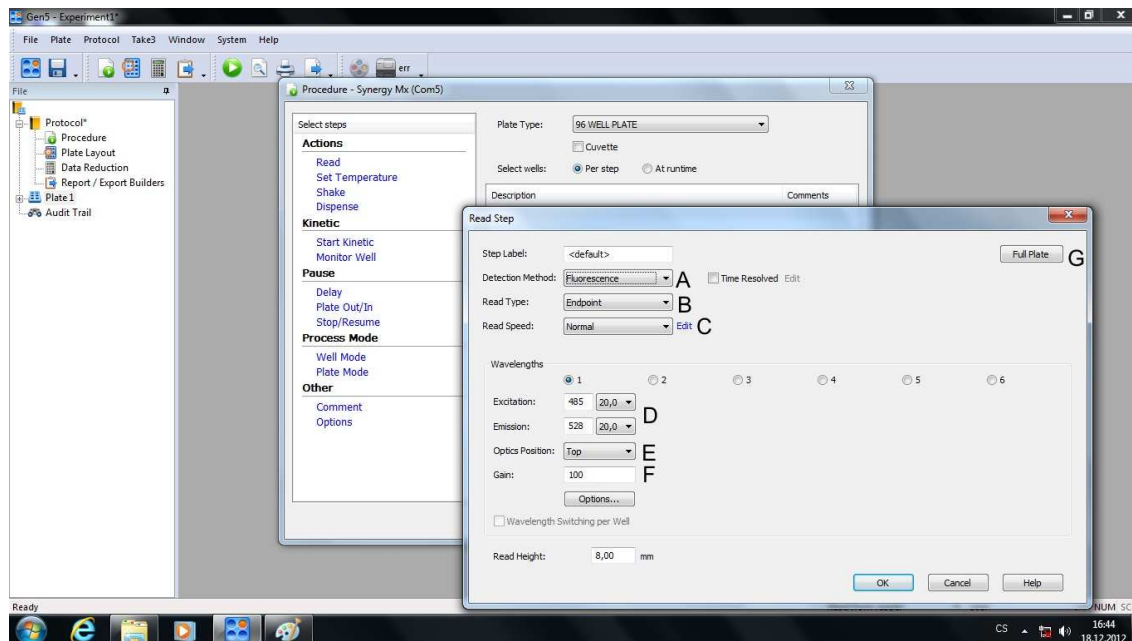
Nastavení přístroje a měření fluorescence

Software Gen5TM pracuje s pojmy "Protokol" a "Experiment", které je možné uložit pro další využití. Pojem protokol můžeme vnímat jako jakýsi šablónu pro celé měření. Pomocí intuitivního klikacího prostředí je možné navolit jednotlivé kroky v pevně daném pořadí pro celou měřicí proceduru. Pokud je protokol uložen, tak je možné provést shodné měření pro více vzorků, což může zefektivnit a zkrátit práci. Druhý pojem, experiment, je samotný záznam měření včetně naměřených hodnot.



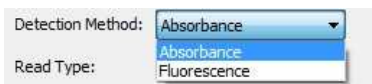
Obrázek A3 - Obrázek dialogového okna ihned po spuštění programu. V nabídce lze naléznout již uložené protokoly, popřípadě je možné vytvořit si nový protokol.

Samotný přístroj Synergy MX umožňuje měření absorbance, luminiscence, fluorescence a sledování kinetik chemických reakcí s parametry obdobnými jako u jiných komerčních přístrojů. V této práci využíváme primárně měření fluorescenčních emisních spekter, a proto se budeme blíže zabývat nastavením parametrů fluorescenčních měření.

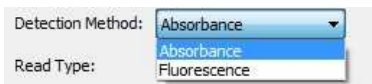


Obrázek A4 - Okno programu Gen5TM.

A - rolovací okno pro výběr spektrálního měření.



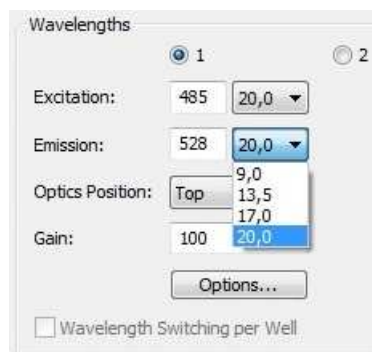
B - nastavení snímání spektra (závislost intenzity fluorescenčního signálu na vlnové délce) nebo měření fluorescence v pevných bodech. Pro měření v pevných bodech je možné nastavit až 6 různých vlnových délek.



C - rychlost měření. Nastavení *sweep* odpovídá rychlosti snímání 1 záblesku na jednu jamku. Druhou možností nastavení je *normal*, kde pomocí položky edit je možné nastavit počet záblesků na jednu jamku.



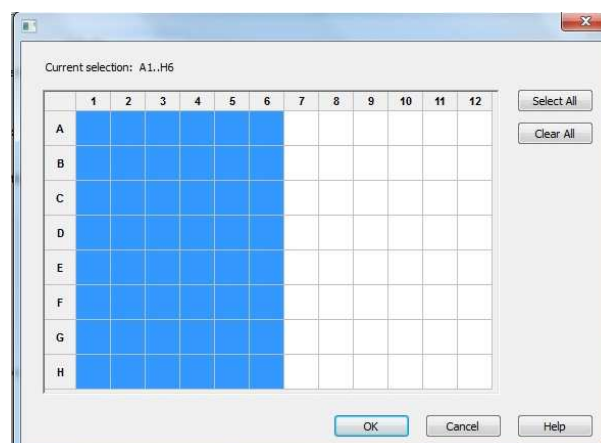
D - nastavení vlnové délky excitace a emise včetně šířky spektrálního pásu uvedené v nanometrech. Šířka spektrálního pásu je omezena jen na hodnoty v nabídce, která je uvedena na následujícím obrázku.



E - pozice optiky během měření (nahore nebo dole).

F - nastavení elektronické odezvy přístroje neboli gainu (hodnoty jsou v rozmezí 0 - 25 - 255). Jedná se o parametr fotodiody.

G - nastavení snímané oblasti (celá destička nebo vybraná oblast).

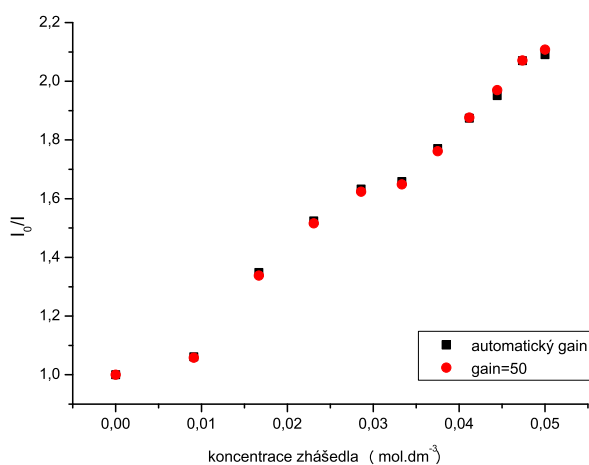


Vliv nastavení parametru "gain" na měření

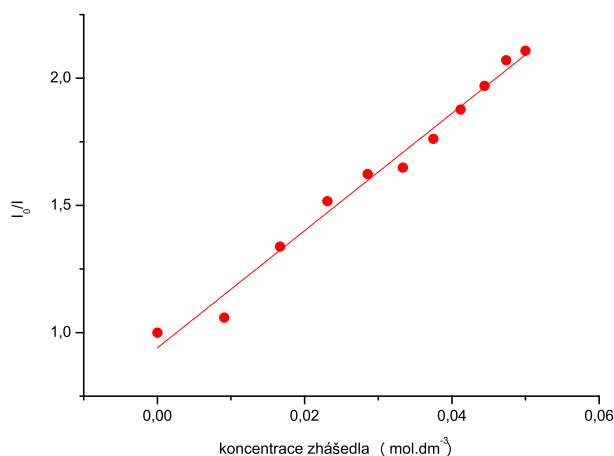
Přístroj samotný umožňuje nastavit parametr "gain" automaticky (*scale to high wells* - podle maximální hodnoty intenzity ze snímané oblasti, *scale to low wells* - nastavení parametru "gain" podle nejnižší hodnoty intenzity z jamek) a nebo, jako pevnou hodnotu v uvedeném rozmezí.

Pomocí jednoduchého zhášecího experimentu jsme prostudovali vliv tohoto parametru na měření. Jako fluorofor byl použit N-acetyltryptofanamid (750 μM zásobní roztok v TRIS pufru o koncentraci 20 mM a pH 7,4) a zhášedlem byl 100 mM akrylamid rozpuštěný ve vodě. Vlnová délka excitace byla 298 nm a emise bylo snímána na vlnové délce

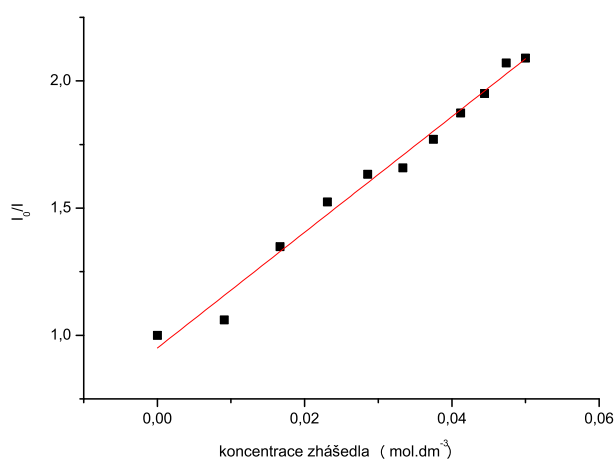
350 nm. Nastavení excitačních i emisních štěrbin bylo shodné, a to 9,0 nm a data byla snímána rychlostí 30 záblesků na jamku. Výsledky tohoto experimentu prezentujeme na obrázku.



Obrázek A5 - Graf zhášení fluoresceinu akrylamidem. Černou barvou je zde zobrazen výsledek naměřený pro automatické nastavení parametru "gain" (včetně automatického škálování - autoscale). Červeně je zobrazen výsledek pro nastavení pevné hodnoty gainu. Tato pevně nastavená hodnota byla 50. Jako fluorofor byl použitý roztok NATA (10 μl , koncentrace 750 μM zásobní roztok), pufr Tris (200 μl , pH 7,4 a koncentrace byla 20 mM). Bylo 10x přidáno po 5 μl akrylamidu (100 mM zásobní roztok). Získané hodnoty byly opraveny vzhledem k ředění roztoku. Proces určení korekce a zohlednění ředění roztoku fluoroforu je uvedeno dále.



Obrázek A6 - Stern-Volmerův graf zhášení NATA akrylamidem pro automatické nastavení gainu. Regresní rovnice má tvar $y=23,05x+0,94$ a parametr stability $R^2 = 0,98$.



Obrázek A7 - Stern-Volmerův graf zhášení fluoresceinu akrylamidem pro gain=50. Regresní rovnice má tvar $y=22,73x-0,95$ a parametr stability $R^2 = 0,98$.

Jak je v obou případech jasné, trendy si vzájemně odpovídají. Parametr stability pro oba fity je shodný. I když automatické nastavení gainu umožňuje zaznamenat vždy optimální úroveň signálu, je pro naše aplikace nevhodné, protože není přesně určená hodnota parametru "gain". Pro další experimenty budeme udržovat nastavení gainu na pevnou hodnotu, abychom zajistili opakovatelnost měření.

Poznámka A1: Během seznamování s přístrojem bylo zjištěno, že není snadné porovnávat data, která byla obdržena pro různá nastavení parametru "gain". Hodnoty výsledné intenzity jsou obecně exponenciálně závislé na nastavení parametru "gain", což jsme prokázali i experimentálně. Exaktní vyjádření závislosti intenzity a nastavení parametru "gain" není výrobcem ani dodavatelem v manuálu uvedeno. Vzhledem k problematickému porovnávání hodnot získaných při různých nastaveních parametru "gain" byl kontaktován dodavatel přístroje, od něhož toho jsme získali vzorec, s jehož pomocí jsme schopni hodnoty intenzit a parametru "gain" přepočítat. Vzorce pro přepočet těchto hodnot jsou:

$$D = B \left(\frac{C}{A} \right)^{7,2}, \quad (13.1)$$

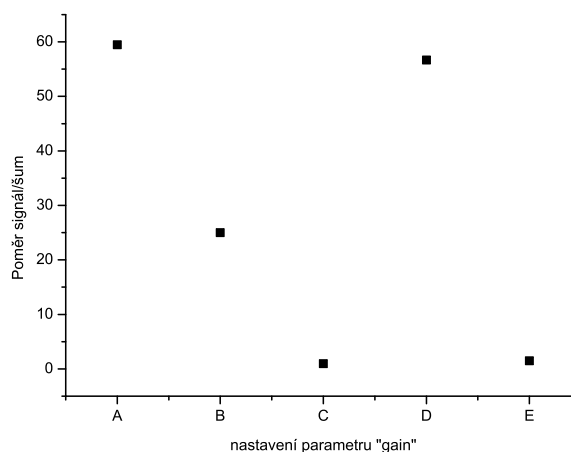
kde D je naměřená hodnota při druhém nastavení parametru "gain", C je druhá nastavená hodnota parametru "gain" a A je původní hodnota parametru "gain".

Pro případ, kdy chceme znát hodnotu parametru "gain", která je neznámá, ale máme k dispozici naměřená data, slouží následující vztah:

$$C = A \exp \left\{ \frac{\ln \left(\frac{D}{B} \right)}{7,2} \right\}, \quad (13.2)$$

kde C je druhá nastavená hodnota parametru "gain", D je naměřená hodnota při druhém nastavení parametru "gain", A je původní hodnota parametru "gain" a B jsou původní naměřená data.

Další zajímavou závislostí je chování poměru signál/šum v závislosti na nastavení parametru "gain". Pro odhalení tohoto vztahu jsme využili Ramanova rozptylu vody. Měřili jsme emisní spektra v rozmezí 300 - 600 nm, přičemž vlnová délka excitace byla 350 nm. Ramanův rozptylový pík by měl být pozorován okolo 397 nm. Ve spektru jsme vymezili oblast šumu 590-600 nm a oblast signálu 390-400 nm. Naměřené hodnoty byly v těchto intervalech zprůměrovány.

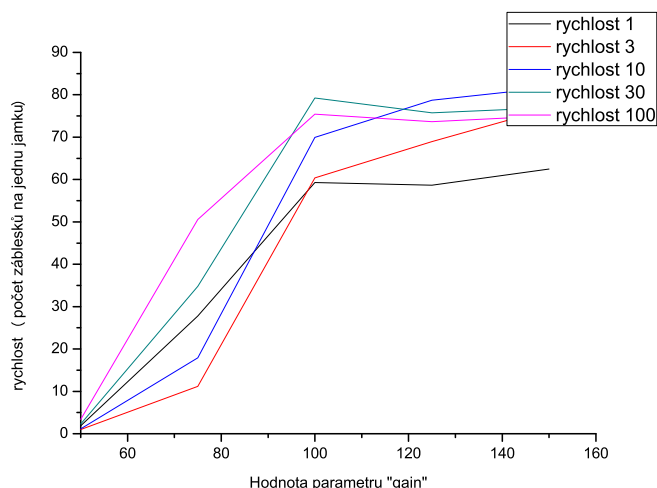


Obrázek A8 - Graf závislosti poměru signál/šum na nastavení parametru "gain". Body označující nastavení parametru "gain": A-fixní gain=150, B-fixní gain=75, C-fixní gain=50, D-automatický gain pro maximální hodnotu a vlnovou délku 397 nm, E-automatický gain pro maximální hodnotu a vlnovou délku 350 nm. Rychlost měření byla jeden záblesk na jednu jamku.

Jak je zřejmé z grafu A8, tak poměr signál/šum roste spolu s rostoucí hodnotou parametru "gain". Automatické nastavení pro vlnovou délku 350 nm (Rayleigho rozptyl) umožňuje dosáhnout optimálního nastavení poměru signál/šum, ale jak jsme uvedli dříve, tak toto nastavení není vhodné pro zkoumání zhášení fluorescence.

Vliv rychlosti měření na poměr signál/šum

Poslední významnou oblastí, které jsme se blíže věnovali, bylo sledování poměru signál/šum vzhledem k počtu záblesků na jednotlivé sledované jamky. Zdrojem světla je v tomto případě xenonová výbojka s opakovací frekvencí 50 Hz a šířkou pulzu 20 μ s. V případě snímání spektra je maximální rychlost načítání spektra 2300 nm/min. Využijeme experimentu z předchozí části (Ramanův rozptyl). Oblast signálu uvažujeme jako 390-400 nm a oblast šumu náleží konci sledovaného spektra, a to 590-600 nm.

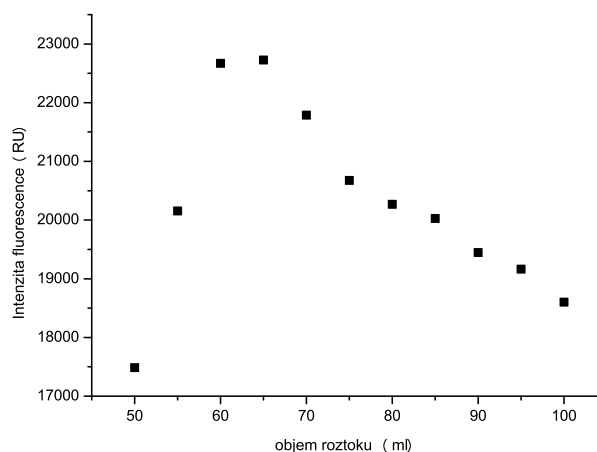


Obrázek A9 - Graf závislosti poměru signál/šum na parametru "gainu" pro různé nastavení rychlosti snímání. Označení rychlost 10 znamená, že signál z jedné jamky je určen pomocí 10 záblesků. Analogicky jsou označeny i další rychlosti.

Jako optimální nastavení se zdá být co nejnižší možné nastavení parametru "gain" (vzhledem k intenzitě fluoroforu), stejně jako co nejvyšší nastavení rychlosti. Vzhledem k tomu, že měření při rychlosti snímání 100 záblesků na jamku je zdlouhavé, bereme jako optimální rychlost 30 záblesků na jamku.

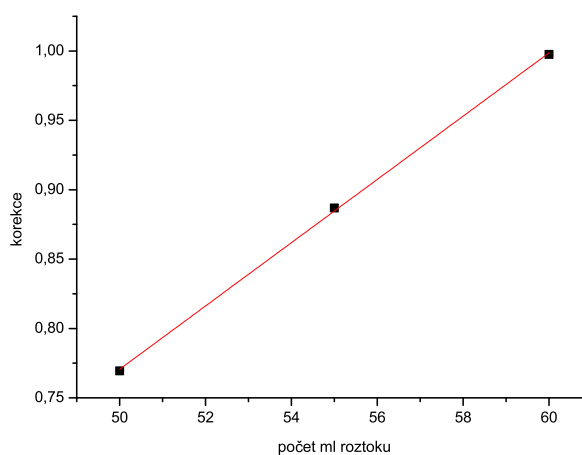
Určení korekčních koeficientů při ředění roztoku

Během experimentální části jsme zjistili, že opomíjíme další parametr - změnu objemu při titraci. Později se ukázalo, že tento parametr budeme muset zohlednit pomocí empirických koeficientů korekce. K zjištění těchto korekčních koeficientů jsme využili následujícího experimentu. V šestnácti jamkách byl roztok $1 \mu\text{l}$ fluoroforu NATA ($750 \mu\text{M}$ roztok) a $49 \mu\text{l}$ pufru Tris (20 mM , $\text{pH } 7,4$). K tomuto roztoku jsme celkem 10-krát přidali $5 \mu\text{l}$ uvedeného pufru. Na konci měření byl tedy původní roztok ($50 \mu\text{l}$) dvakrát zředěný ($100 \mu\text{l}$). Vlnová délka excitace byla 298 nm , vlnová délka emise byla 350 nm , štěrby byly $9,0$ a $9,0$. Parametr "gain" byl nastaven na fixní hodnotu 100. Pozice optiky byla nastavená na snímání zdola a rychlost byla 30 záblesků na jamku.

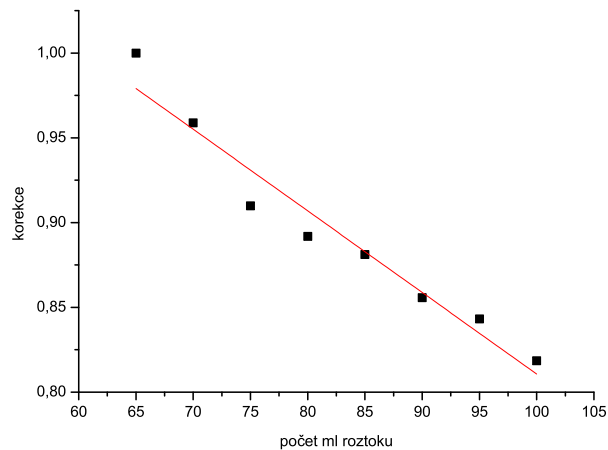


Obrázek A10 - Závislost intenzity fluorescence na objemu roztoku. Fluoroforem byl roztok NATA (750 μM roztok) a 49 μl pufru Tris (20 mM, pH 7,4).

Ideálně by závislost intenzity na objemu měla být konstantní. Jak je zřejmé, tak námi určená závislost konstantní není, dokonce není ani lineární. Data jsme fitovali polynomiálním trendem. Výsledná regresní rovnice byla komplikovaná, proto jsme naměřená data rozdělili do dvou skupin a na každou skupinu aplikujeme lineární regresi. Obdržená data prezentujeme níže.

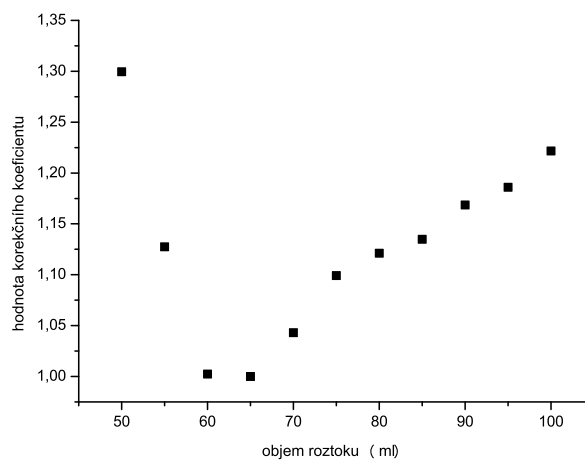


Obrázek A11 - Graf lineární regrese pro první skupinu dat. Objem roztoku v jamkách byl v rozmezí 50-60 μl . Regresní rovnice má tvar $y = -0,369x + 0,022$ a koeficient stability byl $R^2 = 0,999$.

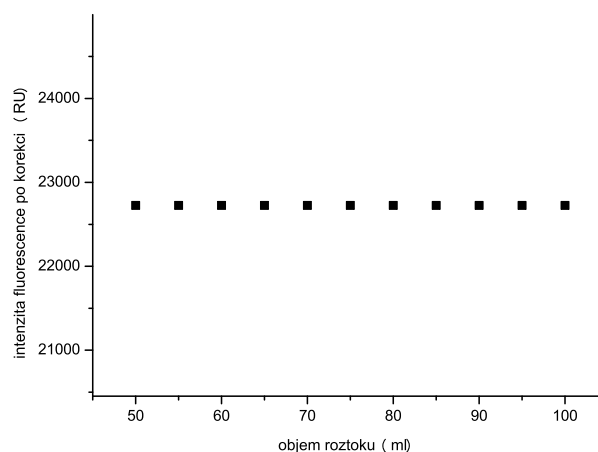


Obrázek A12 - Graf lineární regrese pro druhou skupinu dat. Objem roztoku v jamkách byl v rozmezí 65-100 μl . Regresní rovnice má tvar $y=1,292x+0,005$ a koeficient stability byl $R^2 = 0,942$.

Je zřejmé, že dané trendy jsou lineární. I když jsme provedli regresi, není snadné určit, jaké děje během toho měření probíhají.



Obrázek A13 - Graf závislosti korekčních koeficientů na objemu roztoku.



Obrázek A14 - Graf závislosti intenzity fluorescence na objemu roztoku po korekci na ředění pomocí empirických koeficientů.

Výsledkem korekce je konstantní závislost intenzity fluorescence na objemu roztoku. V tomto konkrétním případě korekce přináší hned několik pozitiv. Jedná se ale o idealizaci reálného problému. Jiné případy mohou vyžadovat specifické korekce, které je potřeba určit. Dále jsme zjistili, že nastavení parametru "gain" také ovlivňuje koeficienty korekce. Provedli jsem určení koeficientů pro dvě nastavení parametru "gain". Tyto koeficienty včetně odchylek a relativních chyb měření jsou uvedené v následující tabulce.

objem roztoku	průměrná intenzita fluorescence	směrodatná odchylka	relativní chyba (%)	koeficient korekce gain=50	průměrná intenzita fluorescence	směrodatná odchylka	relativní chyba (%)	koeficient korekce gain=100
50	82	11	13	1,33	17487	1503	9	1,30
55	93	12	13	1,18	20155	1781	9	1,13
60	104	10	9	1,04	22669	1400	6	1,00
65	110	9	8	1	22726	1021	4	1,00
70	103	10	10	1,06	21789	1368	6	1,04
75	92	7	7	1,19	20677	964	5	1,10
80	97	9	10	1,13	20268	847	4	1,12
85	92	8	9	1,20	20026	1034	5	1,13
90	89	9	11	1,23	19447	1064	5	1,17
95	87	7	8	1,26	19163	1066	6	1,19
100	86	13	16	1,28	18601	960	5	1,22

Tabulka A1: Tabulka korekčních koeficientů pro dvě různá nastavení parametru "gain". Tabulka obsahuje také průměrné hodnoty intenzity fluorescence včetně směrodatných odchylek a relativních chyb měření.