

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

**Studium interakce membránových proteinů na
molekulární úrovni pomocí silové spektroskopie,
optické spektroskopie a metod výpočetní biochemie**

Martina Matěnová

Vedoucí práce: Mgr. David Kaftan, PhD.

Ústav fyzikální biologie Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Nové Hradky

České Budějovice 2011

Matěnová M., 2011, Studium interakce membránových proteinů na molekulární úrovni pomocí silové spektroskopie, optické spektroskopie a výpočetních metod, [Membrane protein interactions studied on single molecular level by force spectroscopy, optical spectroscopy and methods of computational biochemistry, Mgr. Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

I have set for a challenging study that combined experimental and theoretical approaches in an attempt to resolve a role of small aminoacids in intermolecular interactions. First, I have proposed a hypothesis that described the interaction among individual aminoacids forming D helices of D1 and D2 proteins based on molecular dynamic simulations of a simplified model representing the reaction centre of photosystem II. Stability of the putative interhelical hydrogen bond network connecting D1 and D2 proteins was investigated experimentally with dynamic force spectroscopy using atomic force microscope. The results of both methods are in a full agreement with each other and reveal the key role of D1-Gly208 aminoacid in stability and functionality of photosystem II by providing milieu for weak interactions among three contact points at the cross of D helices: D1-Gly208 (O) and D2-Cys211 ($O\gamma$), D1-Ser209 ($O\gamma$) and D2-Ile204 (O), D1-Ser212 ($O\gamma$) and D2-Gly207 (O). Mutation of the D1-Gly208 led to the increase in probability of the binding among the aforementioned aminoacids, undesirably strengthening the overall interactions among the proteins compromising photosynthetic capacity (D1-Ser208) or disabling of autotrophic growth (D1-Val208).

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou - elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:.....

Podpis:.....

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především Mgr. Davidu Kaftanovi, Ph.D. za vedení této práce, pomoc a rady při jejím vypracování, M.Sc. Alexandru Dulebovi za poskytnuté materiály, software a to, že mě naučil pracovat s AFM a YASARou, RNDr. Milanu Durchanovi, CSc za umožnění měřit cirkulární dichroismus a Ing Heleně Polákové Ph.D. za pomoc s analýzou dat silové spektroskopie a garantovi této práce na PřF JU Doc. RNDr. Františku Váchovi, CSc.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a přátelům za všestrannou podporu během mého studia.

Tento výzkum byl podpořen Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy ČR (MSM6007665808), Grantovou agenturou ČR (IAA608170901) a Jihočeským výzkumným centrem akvakultury a biodiverzity hydrocenóz (CZ.1.05/2.1.00/01.0024).

1. ÚVOD	7
1.1 PROTEINY	7
1.2 FOTOSYSTÉM II	10
1.3 ROLE GLYCINU V MEZI PROTEINOVÝCH INTERAKCÍCH	12
1.4 ÚVOD K POUŽITÝM METODÁM	14
1.4.1 Molekulární dynamika	14
1.4.2 Cirkulární dichroismus	17
1.4.3 AFM a silová spektroskopie	17
2. CÍLE PRÁCE	28
3. METODY	29
3.1 PARAMETRY SIMULACÍ MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKY	29
3.2 REKONSTITUCE PEPTIDŮ	31
3.3 SILOVÁ SPEKTROSKOPIE	31
3.3.1 Protokol na úpravu AFM hrotů a slídy	31
3.3.2 Postup měření silové spektroskopie	32
3.3.3 Analýza dat silové spektroskopie	32
4. VÝSLEDKY	35
4.1 SIMULACE MOLEKULÁRNÍ DYNAMIKY	35
4.2 CD SPEKTROSKOPIE	37
4.3 SILOVÁ SPEKTROSKOPIE	40
5. DISKUZE	44
6. ZÁVĚR	48
7. POUŽITÁ LITERATURA	49

Seznam zkratek

AFM	mikroskopie atomárních sil
CD	cirkulární dichroismus
CM AFM	kontaktní mód AFM
d1S	peptid simulující D helix D1 proteinu s mutací Gly208Ser
d1V	peptid simulující D helix D1 proteinu s mutací Gly208Val
d1WT	peptid simulující D helix D1 proteinu
d2WT	peptid simulující D helix D2 proteinu
DDM	dodecylmaltozid
DMSO	dimethyl sulfoxid
MW	molekulární hmotnost
NC AFM	nekontaktní mód AFM
NMR	nukleární magnetická rezonance
OEC	kyslík vyvíjející komplex
PEG	polyethylenglykol
PG	fosfatidylglycerol
PSII	fotosystém II
Q _A	chinon A
Q _B	chinon B
RC	reakční centrum
RTG	rentgen
SDS	dodecylsulfát sodný
SPM	mikroskopie skenovací sondou
STM	skenovací tunelovací mikroskopie

1. Úvod

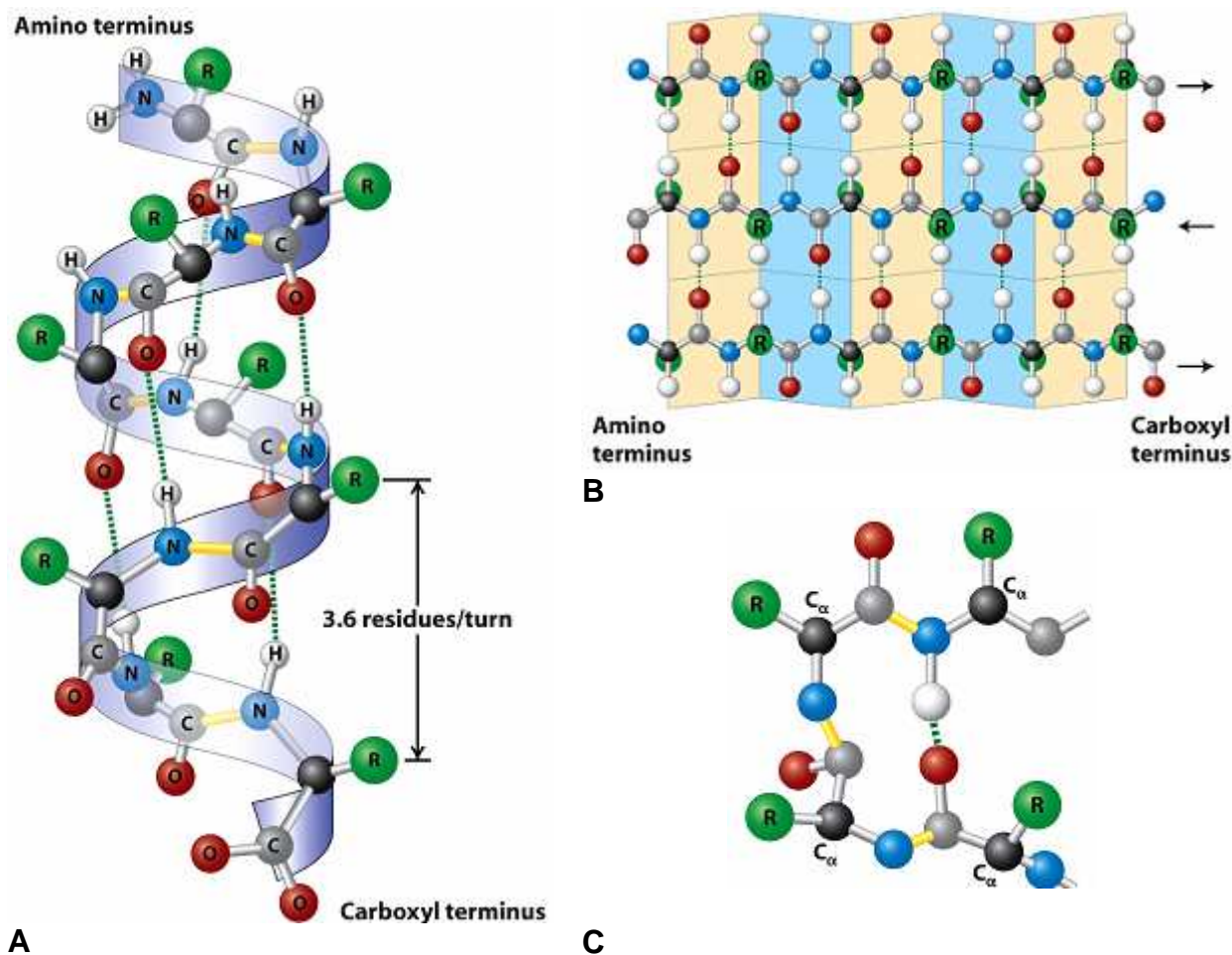
1.1 Proteiny

Proteiny jsou početná a strukturně rozmanitá skupina makromolekul plnící v buňkách množství funkcí – stavební (mikrofilamenta, mikrotubuly, intermediální filamenta), katalytické (enzymy), slouží jako aktivní či pasivní kanály umožňující přenos látek přes membrány (poriny, protonové pumpy, sodíkodraslíkové pumpy), mohou být protilátkami (imunoglobuliny), přenašeči (hormony, cytokiny) a receptory signálů (G-protein, tyrosinové proteinkinázy), nebo molekulárními motory (kinesin, dynein, myozin) ale výjimečně též součástí metabolických rezerv (cyanophycin). Komplexy sestávající se z několika proteinů pak často plní i více funkcí zároveň, například sodíko – draslíková pumpa je přenašečem a zároveň enzymem katalyzujícím syntézu ATP (Alberts 2005).

Funkce proteinů je daná jejich strukturou. Na základní úrovni je struktura určena sekvencí aminokyselin spojených kovalentní peptidickou vazbou. V prostoru zaujímá aminokyselinový řetězec nejčastější sekundární strukturní motivy: α helix, β list (skládáný list) a β turn (obr. č. 1). Struktura α helixu vzniká tak, že se kyslík v karbonylové skupině jedné aminokyseliny váže vodíkovou vazbou na vodík v amidové skupině čtvrté následující aminokyseliny v řetězci. Postranní řetězce aminokyselin jsou na vnější straně šroubovice. Na deset závitů je třeba 36 aminokyselin, délka takovéto šroubovice je 5,4nm (Lodish et al. 2007).

Některé aminokyseliny se nachází v řetězcích tvořících α helix častěji než ostatní, v membránových helixech jsou to leucin, alanin, valin, fenylalanin a izoleucin. Nejmenší zastoupení mají naopak cystein, glutamin, kyselina asparagová a lysin. Zřídka se také v helixech nachází glycin (Eilers et al. 2000).

β skládáný list (β sheet) se skládá z antiparalelních krátkých řetězců (5-8 aminokyselin), které jsou mezi sebou vázány vodíkovými můstky mezi karbonylovými a amidovými skupinami. Tyto krátké úseky mohou být buď částí jednoho peptidu propojené smyčkami na okrajích skládaného listu, nebo mohou být z naprosto rozdílných peptidických řetězců. Poslední strukturní motiv, β turn, se skládá ze čtyř aminokyselin tvořících tvar písmene U, stabilizovaného vodíkovým můstkem mezi krajními aminokyselinami. Často se nacházejí na povrchu proteinů, kde zajišťují prudké ohnutí peptidického řetězce. Různou kombinací a orientací těchto motivů v prostoru je pak dána terciální struktura proteinů. Její součástí jsou i řetězce bez pravidelné struktury (random coil) a kratší lineární části řetězců spojující například helixy membránových proteinů, tzv. smyčky (loops) (Lodish 2007).



Obr. č. 1: A: α helix, B: β skládaný list, C: β turn (převzato z Lodish, Molecular Cell Biology)

Sekundární, terciální a kvartérní strukturu proteinů a jejich reakce s dalšími molekulami určují v některých případech kovalentní disulfidické můstky, převážně však nekovalentní interakce: elektrostatické, hydrofilní/hydrofobní, Van der Waalsovy interakce a vodíkové můstky. Tyto mají v biologii zásadní význam, protože jsou vratné. Díky tomu se nejen mění struktura makromolekul v závislosti na vnějších podmínkách, ale také to umožňuje plnit proteinům jejich biologické funkce (uvolnění signální molekuly od receptoru nebo výsledného produktu katalyzované reakce od enzymu).

Nekovalentní interakce se dají dělit podle několika hledisek. Jedním z nich je závislost síly interakce na vzdálenosti vazebných partnerů. Největší dosah mají interakce elektrostatické. Lze je popsat Coulombovým zákonem pro sílu působící mezi dvěma náboji q_1 a q_2

$$F = \frac{1}{4\pi\epsilon_0\epsilon} \frac{q_1q_2}{r^2} \quad (1)$$

kde ϵ_0 je permitivita vakua a ϵ relativní permitivita prostředí. Specifickým příkladem elektrostatických interakcí jsou vodíkové můstky, často jsou ale považovány za samostatnou skupinu. Právě jim je přisuzována hlavní role ve stabilizaci sekundární struktury biologických polymerů. Musíme ale přihlídnout k tomu, že vodíkové vazby nevznikají jen mezi atomy vlastního proteinu, ale také s okolními molekulami vody. Během tvorby vyšších organizačních struktur proteinu mohou vodíkové můstky působit spíše proti sbalení proteinu, poté jsou významné pro udržení sekundární struktury. Pro stabilitu bílkoviny jsou také klíčové hydrofobní interakce způsobené snahou polárních molekul vody vyloučit ze svého okolí nepolární molekuly. Ve vodě rozpustné proteiny proto mají hydrofilní „obal“, který skrývá postranní řetězce nepolárních aminokyselin. Naopak při sbalování membránových proteinů v hydrofobním prostředí vytváří hydrofilní aminokyseliny v nepřítomnosti vody vodíkové můstky mezi sebou a vytváří tak α helix s hydrofobním povrchem.

Poslední zmiňované ne vazebné interakce - Van der Waalsovy - je obtížné definovat. Obecně se jedná o krátkodosahové interakce mezi dvěma molekulami, které spolu chemicky nereagují. Mají elektrickou podstatu, ale nelze je popsat Coulombovým zákonem a náboje, které tyto reakce vyvolávají, nejsou celistvým násobkem náboje elementárního. Dělí se na čtyři typy:

- 1) Interakce permanentní dipól – permanentní dipól
- 2) Interakce permanentní dipól – indukovaný dipól
- 3) Londonovy disperzní interakce
- 4) Patrové interakce

První dva případy jsou dány nerovnoměrným rozložením náboje v molekulách, případně jeho přerozdělením v blízkosti jiného náboje. Třetí vzniká díky fluktuaci hustoty náboje v molekule. Tak se molekula na krátký čas stává dipólem a interaguje s dalšími takovými molekulami. Jelikož tyto interakce trvají krátce, nemají na stabilitu proteinu vliv. Patrové interakce jsou interakcemi π elektronů, důležitou roli hrají při stabilizaci DNA (Kodíček 2000). Protože jsou protein – proteinové interakce zásadní pro fungování všech proteinů v organizmech, je jim věnována velká pozornost. Studium protein – proteinových interakcí membránových proteinů (které v organizmech převažují) je komplikováno v první řadě nedostupností jejich struktur s vysokým rozlišením a komplikacemi nastávajícími v cizích expresních systémech a během sbalování izolovaných proteinů *in vitro*. Přesto existuje několik modelů, které umožnily studovat roli specifických aminokyselin v interakcích

podjednotek membránových proteinů (Tao 2006, Sowa a Berry 2008, Devenish 2008, Katsuhara 2008, Barber 2009, Hirai et al 2009).

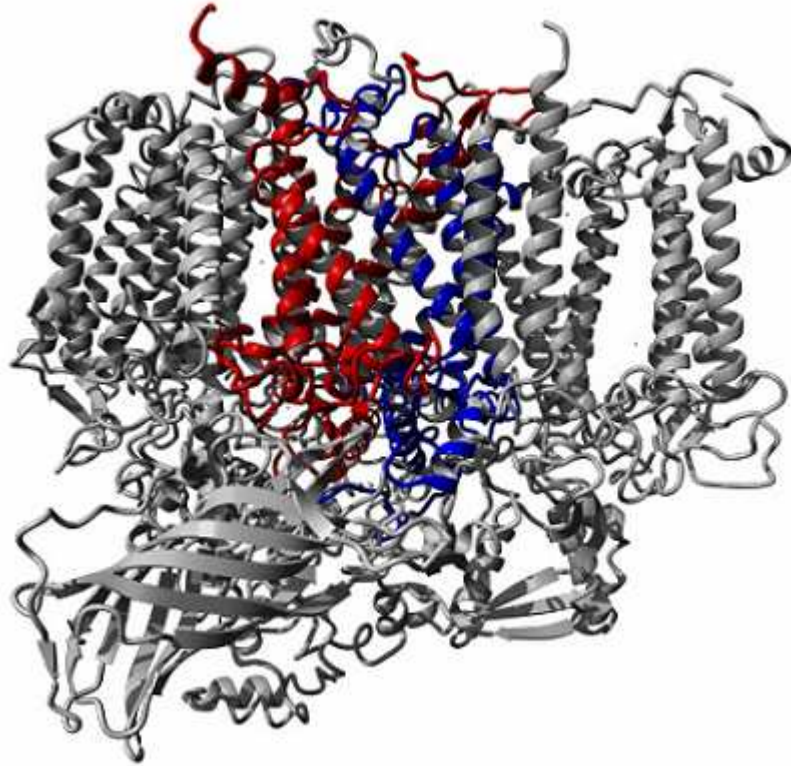
Vhodnými systémy jsou často redox aktivní enzymové komplexy sestávající z množství proteinových podjednotek vázajících kofaktory a umožňující měřit rychlost reakce, kterou katalyzují. Je třeba si však uvědomit, že přítomnost kofaktorů a jiných neproteinových molekul může být zároveň zdrojem komplikací jak při experimentální práci, tak při počítačovém modelování. Jedním takovým enzymem je fotosystém II (PSII) jenž je zodpovědný za klíčové kroky bezesporu nejvýznamnější biochemické reakce na Zemi – fotosyntézy - během které je světelná energie převedena na energii chemických vazeb a využita při vázání vzdušného CO₂ do jednoduchých sacharidů během Calvinově cyklu (Blankenship 2002).

1.2 Fotosystém II

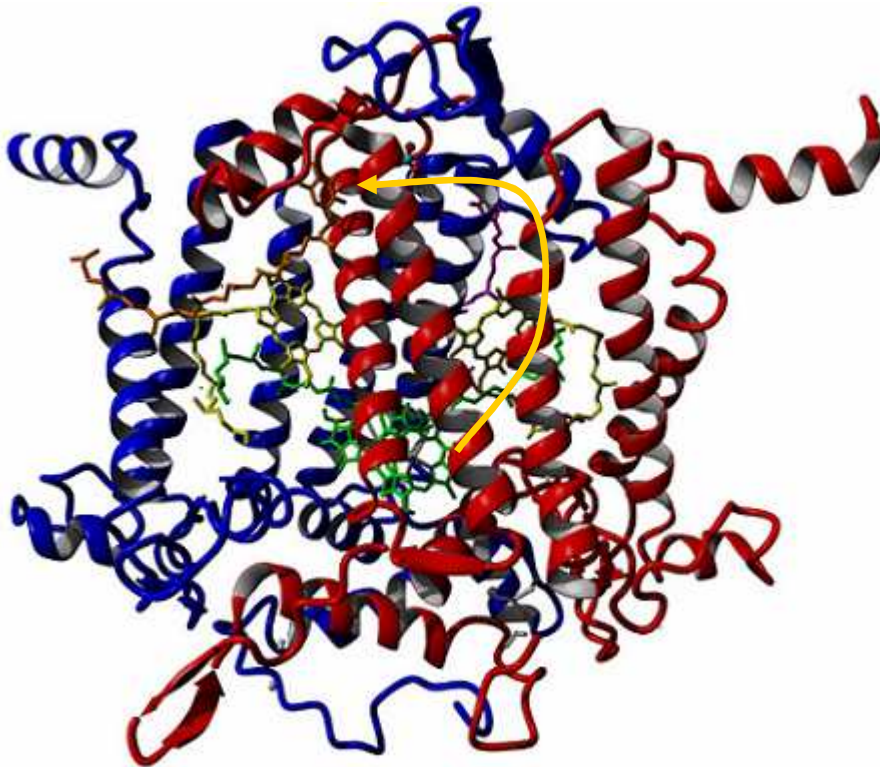
PSII (obr. č. 3) funguje jako světlem poháněná oxidoreduktáza v tylakoidních membránách chloroplastů vyšších rostlin a řas a v bakteriích schopných oxygenní fotosyntézy. Studium PSII je v dnešní době umožněno znalostí modelu struktury PSII termofilní sinice *Thermosynechococcus elongatus* s rozlišením 2,9 Å, který zahrnuje 17 integrálních membránových proteinů, 25 lipidů a tři ve vodě rozpustné proteiny, ze kterých se skládá kyslík vyvíjející komplex (OEC, oxygen evolving komplex), 35 molekul chlorofylu a (ChlA), 12 karotenoidů, molekuly chinonu A, B a C a anorganické ionty (Ca²⁺, Cl⁻, Mg²⁺, Fe²⁺, HCO³⁻), všechny uspořádané k plnění specifických funkcí – absorpci světla, přeměně jeho energie na energii chemickou, rozštěpení vody a přenosu elektronu na plastochinon (Guskov et al. 2009). Tyto klíčové reakce vyjma štěpení vody jsou zajištěny reakčním centrem (RC) tvořeným proteiny D1, D2 a cytochromem b₅₅₉.

Přenos elektronu v RC (obr.č. 4) začíná excitací primárního donoru P680, dvojici chlorofylů a, umístěných na lumenální straně reakčního centra PSII. Následující rozdělení a stabilizace náboje vede k přenosu excitovaného elektronu z P680* přes podpůrné molekuly chlorofylů a molekulu feofytinu na primární chinonový akceptor Q_A trvale vázaný na stromální straně D2 proteinu. Následně je redukována molekula chinonu Q_B přechodně zachycená ve vazebném místě D1 proteinu reakčního centra. Na úplnou redukci Q_B jsou třeba dva takové cykly vedoucí k dvojí redukci Q_B následované dvojí protonací na Q_BH₂ a jeho uvolnění do tylakoidní membrány, do takzvaného plastochinonového poolu. V RC je ihned nahrazena jinou molekulou Q_B. Na rozštěpení dvou molekul vody a uvolnění jedné molekuly kyslíku

jsou třeba čtyři pozitivní náboje, které se s každým fotocyklem hromadí na OEC (Blankenship 2002).



Obr. č. 3: Fotosystém dva, modře protein D1, červeně D2



Obr. č. 4: Reakční centrum PSII s vyznačeným řetězcem přenosu elektronu, zeleně speciální chlorofylový pár P680, oranžově chinon Q_B, růžově chinon Q_A, žlutě feofytiny, šipkou je znázorněn přenos elektronu

Dvě podjednotky, D1 a D2, se každá skládají z pěti transmembránových helixů vytvářejících jádro RC (obr.č.4). Čtvrté a páté (D a E) helixy výše zmíněných proteinů společně koordinují na lumenální straně atom železa Fe^{2+} a vytváří vazebné místo pro chinony Q_A a Q_B , na stromální straně pak spolu interagují skrze speciální pár chlorofylů. Střední D helixů se kříží ve uprostřed membrány. Interhelixové interakce mezi D1 a D2 jsou zde zprostředkovány aminokyselinami D1-209 a 212, které tvoří sekvenční motiv G208xxxG212 (Shlyk-Kerner *et al.* 2006). Sekvenční motiv GXXXG (kde G zastupuje malé aminokyseliny jako alanin, serin, cystein a threonin) často způsobuje dimerizaci helixů v membránových proteinech skrze síť vodíkových vazeb. Zároveň ale zajišťuje flexibilitu helixů v tomto místě. Změny aminokyselin v této sekvenci v D1 proteinu v PSII sinice *Synechocystis* sp. PCC6803 vedly ke změně flexibility (a stability) a ovlivnily tak termodynamiku elektronového transportu (Shlyk-Kerner *et al.* 2006).

1.3 Role glycinu v mezi proteinových interakcích

Aminokyseliny, které však leží v těsném kontaktu D1 a D2 jsou D1-Gly208 a D2-Gly207, druhý pár je tvořen D1-Ala209 a D2-Ala208 na okraji výše zmíněného sekvenčního motivu GXXXG. O tom, jakou zde zastávají funkci, zda také zprostředkovávají interakci mezi helixy nebo zvyšují flexibilitu α helixů, není doposud známo.

Stručně se dá říci, že glycin stabilizuje helikální membránové proteiny a zároveň díky své velikosti umožňuje struktuře být flexibilní. Na druhou stranu je řetězec v okolí glycinu pružnější, protože tato aminokyselina nemá postranní řetězec. Proto se glycin obvykle nevyskytuje v transmembránových částech proteinů, majících pouze jednu podjednotku prostupující membránou. Záměna glycinu za aminokyseliny, jejichž přítomnost může vést ke zvýšení dimerizace může ale také zvýšit pevnost struktury a tím se protein může stát nefunkčním. Jak a do jaké míry se vzájemně ovlivňují flexibilita a stabilita zaručující enzymatickou aktivitu a do jaké míry můžeme zvyšovat stabilitu proteinu aniž bychom ohrozili jeho funkci zůstávají dosud nezodpovězenými otázkami .

Flexibilita v daném místě proteinu je vyšší, pokud je zde přítomen glycin. Tato aminokyselina nemá postranní řetězec a proto se může hlavní řetězec proteinu ohýbat pod různými úhly. Pokud se vyskytuje v α helixech, může zde fungovat jako kloub, který pomáhá orientovat helixy. Také je součástí GXXXG sekvenčních motivů, které velkou měrou zvyšují kondenzaci helixů a také podporují jejich dimerizaci. Glycin se proto často vyskytuje na styku helixů a v místě jejich křížení. Experimenty zabývající se vlivem glycinu na flexibilitu a funkčnost proteinu byly provedeny například s laktózovou permeázou, kde nahrazení cysteinu (Cys154

v helixu V) glycinem vedlo k těsnějšímu sbalení a snížení transportu (Ermolova *et al* 2005). Naproti tomu nahrazení Gly121 v bakteriorhodopsinu vede k tomu, že je pigment méně stabilní (Han *et al.* 1996). Stejně tak náhrada glycinů v napěťovém Ca²⁺ kanálu způsobuje nefunkčnost těchto kanálů (Raybaud *et al.* 2006).

Role konzervovaného glycinu D1-G208 v proteinové flexibilitě a regulaci rychlosti elektronového přenosu v PSII byla v současné době poprvé studována pomocí mutace v pozici D1-208 v buňkách *Synechocystis* sp. PCC 6803. Růstu byly schopné jen ty buňky, u kterých proběhla záměna za jednu ze tří aminokyselin (Ala, Thr a Ser) z celkem 19 použitých. U životaschopných mutantů byla naměřena fotosyntetická aktivita, termoluminiscence a rychlost přenosu elektronu (Shlyk-Kerner 2006). Tyto experimenty ukázaly, že glycin je skutečně klíčovou aminokyselinou pro fungování PSII, jeho konkrétní role ale odhalena nebyla.

Další cestou k vyřešení tohoto problému je simulace molekulární dynamiky příslušných α helixů a přímé měření síly jejich interakcí pomocí silové spektroskopie na AFM.

1.4 Úvod k použitým metodám

1.4.1 Molekulární dynamika

Počítačové simulace propojují svět molekul se světem laboratorních pokusů, teorii s experimenty. Simulace molekulární dynamiky je metodou dávající do souvislosti strukturu a vlastnosti molekul na atomové úrovni v nanosekundovém časovém rozmezí, pomáhá nahlédnout na strukturu a konformace studovaných objektů, na interakce mezi nimi a navíc poskytuje informace o termodynamice a kinetice „reakcí“. To, a k tomu ještě fakt, že modelovaný systém může mít několik tisíc atomů, umožňuje tuto metodu aplikovat nejen v biochemii, ale také například ve fyzice pevných látek a materiálových vědách. Ovšem tato metoda má i své nevýhody: s rostoucím počtem simulovaných atomů rychle narůstá čas výpočtů, molekulární dynamika nepopisuje chemické reakce a nepočítá s excitovanými stavy atomů. Při simulaci molekulární dynamiky opakovaně probíhá výpočet pohybu atomů nebo molekul v silovém poli. V silovém poli jsou vazby popisovány jako pružiny a atomy jako hmotné body nesoucí náboj. Energie silového pole $U(r^N)$ je vyjádřena:

$$U(r^N) = \sum k_l (l - l_0)^2 + \sum k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum A_n [1 + \cos(n\phi - \phi_0)] + \sum_{ij} \epsilon_{ij} \left[\left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum_{ij} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_r \epsilon_0 r_{ij}} \quad (2)$$

kde první čtyři členy popisují energii vazebných interakcí, která má čtyři příspěvky: energie vlastní vazby, vazebných, dihedralních a torzních úhlů. Poslední dva členy vyjadřují energii výše popsanych ne vazebných interakcí. Počet parametrů popisujících silové pole prudce narůstá s přibývajícím druhem atomů, které se v modelovaném systému vyskytují. Do dnes jich bylo vyvinuto několik, každé je vhodné pro modelování různých systémů. Pro simulaci molekulární dynamiky proteinů je určen například AMBER, GROMACS, CHARMM, OPLS (Ponder a Case 2003). Simulace molekulární dynamiky se skládá z mnoha jednotlivých řešení rovnice vyjadřující druhý Newtonův pohybový zákon:

$$F = \frac{d^2 r}{dt^2} \quad (3)$$

Sílu F jsme schopni určit z potenciální energie $U(r^N)$ podle vztahu:

$$F_i = \frac{\partial U(r^N)}{\partial r_i} \quad (4)$$

Pokud známe sílu působící na atom, snadno si dopočítáme jeho hybnost p_i , zrychlení a_i , rychlost v_i a polohu r_i :

$$F_i = m_i a_i \quad \frac{dp_i}{dt} = F_i \quad v_i = \frac{dr_i}{dt} = \frac{p_i}{m_i} \quad (5,6,7)$$

Výpočet následujících rychlostí a poloh probíhá podle Verletova algoritmu, případně podle jeho modifikace zvané „leap frog“. Pro časový interval Δt se dopočítá rychlost a poloha:

$$v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) = v_i\left(t - \frac{\Delta t}{2}\right) + a_i(t)\Delta t \quad (7)$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i(t) + v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right)\Delta t \quad (8)$$

$$v_i(t + \Delta t) = v_i\left(t + \frac{\Delta t}{2}\right) + a_i(t + \Delta t)\frac{\Delta t}{2} \quad (9)$$

Zjednodušeně se dá celý proces popsat v osmi krocích:

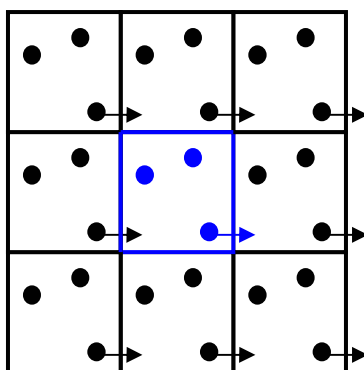
- 1) přiřadit atomu počáteční rychlost
- 2) určit síly působící na atom
- 3) spočítat zrychlení
- 4) zadat časový interval Δt
- 5) spočítat změnu rychlosti za tento časový interval
- 6) určit rychlost v čase Δt
- 7) určit novou polohu atomu
- 8) vrátit se do bodu 2)

Jeden časový úsek Δt (integrační krok) musí být dostatečně malý na to, aby se dala simulace považovat za kontinuální. Typicky se pohybuje ve femtosekundách. Celková doba simulací musí řádově odpovídat době trvání simulovaného procesu, běžně se pohybuje od nanosekund po mikrosekundy.

Pro spuštění simulace potřebujeme zadat počáteční souřadnice atomu a počáteční rychlost (viz bod 1). Souřadnice se určují z experimentálně zjištěné struktury molekul, nejčastěji získané metodami rentgenové krystalografie a NMR. Takto získané struktury molekul musí být před simulací molekulární dynamiky ještě upraveny. Například RTG krystalografie není schopná detekovat atomy vodíku, které ale ovlivňují celkovou energii a tím pádem i dynamiku

molekuly. Tyto atomy musí být ke struktuře „přidány“ a k tomu existuje několik algoritmů. Po přidání vodíků musí být celá struktura energeticky minimalizována. Během tohoto procesu se hledá rovnovážný stav molekuly, tzn. globální minimum potenciálu, který zahrnuje energii vazeb. Rovněž na tento proces existuje celá řada algoritmů založených na třech různých přístupech. Příkladem nederivujících metod (non-derivative method) je simplex method, mezi minimalizační metody prvního řádu se řadí steepest descent method (metoda nejvyššího spádu) a příkladem metody užívající druhé derivace je Newton-Raphson method a její obměny. Počáteční rychlosti jsou odvozeny z teploty systému T . Pokud nemáme bližší informace, platí pro rychlosti Maxwellovské rozdělení rychlostí.

Vzhledem k časové (výpočetní) náročnosti této metody můžeme pracovat pouze s omezeným množstvím částic. Když je umístíme do simulačního prostoru, nejčastěji tvaru krychle nebo kvádrů (simulační box, simulation cell, simulation box) o objemu V , budou některé částice reagovat s jeho stěnami. Pokud nastavíme box dostatečně velký, bude se stěnami interagovat jen malá část molekul, na druhou stranu počet částic systému bude velmi vysoký. Proto zavádíme periodické okrajové podmínky. Simulační box je obklopen kopiemi sebe samého (obr. č. 5), takže pokud ho některá částice na jedné straně opustí, na opačné straně boxu se zase objeví. Částice se tak mohou volně pohybovat, ale jejich počet zůstává stejný. Pro velikost boxu z toho vyplývá další podmínka – musí být dostatečně velký na to, aby molekula neinteragovala se svým obrazem ve vedlejší buňce.



Obr.č. 5: Symbolické znázornění simulačního boxu s periodickými okrajovými podmínkami

Pro usnadnění výpočtů se také zavádí omezení potenciálů (cut off). V určité vzdálenosti od částice je už síla, kterou působí na ostatní částice v systému zanedbatelná, proto není nutné s ní počítat a určíme proto podmínku že pokud $r > r_c$, tak $u_i = 0$. Nastavuje se také tak, aby žádný z atomů nereagoval se svým obrazem.

Příkladem softwaru pro výpočty molekulární dynamiky je například Gromacs, Gromos, Amber a Yasara. Jména softwarů se shodují s typy silových polí, protože většinou byly vyvíjeny společně (Nezbeda et al. 2003, Nezbeda 2006, Allen 2004, Schlick 2002).

1.4.2 Cirkulární dichroismus

Cirkulární dichroismus (CD) je jev, který je pozorován při interakci opticky aktivní látky s kruhově polarizovaným světlem. Opticky aktivní jsou látky, jejichž molekuly nemají rovinu ani osu symetrie a takové, které nemají symetrické uspořádání v prostoru. Tyto látky absorbují rozdílně pravo- a levotočivě kruhově polarizované světlo. Na tomto jevu je založená CD spektroskopie. Tato metoda je s výhodou využívána ke studiu proteinů, protože s jedinou výjimkou (glycin) jsou všechny aminokyseliny opticky aktivní a zároveň uspořádání molekul proteinů v prostoru je nesymetrické. Proto se využívá k odhadu konformace proteinů, zjišťování změn jejich konformace během vzájemných interakcí, studiu termodynamiky a kinetiky jejich sbalování a další.

Chromoforem, který v případě proteinů interaguje s kruhově polarizovaným světlem, je amidová vazba. V peptidech mívají tyto vazby za sebou přesné uspořádání. Pokud jsou elektrony podílející se na jedné vazbě excitovány, ovlivní to i vazby okolní. Díky tomu má každý strukturní motiv typickou křivku cirkulárního dichroismu. Ta je rozdílem absorpce pro pravo- a levotočivě polarizované světlo.

Při vyhodnocování dat můžeme buď použít čistě teoretický postup, kdy je nutné spočítat elektronovou strukturu dané molekuly, určit možné konformace a pro ty nejpravděpodobnější spočítat rotační síly přechodů a ty následně porovnat s naměřenými daty. Druhou možností je porovnat naměřené CD spektrum se spektry modelových látek. Tyto dvě metody je možné kombinovat a dosáhnout tak kompromisu mezi náročným teoretickým a ne zcela přesným empirickým postupem. Pro interpretaci CD spekter existuje několik algoritmů, z nichž každý je vhodný pro jiný druh molekul (SELCON –self consistent method, VARSLC – variable selection, K2D, CDNN – neural networks) (Prosser, 1989; Johnson 1990, Greenfield, 2004)

1.4.3 AFM a silová spektroskopie

V roce 1981 Gerd Binnig a Heinrich Rohrer vyvinuli ve švýcarském výzkumném pracovišti IBM první skenovací tunelovací mikroskop (STM). Tato metoda je založena na tunelování elektronů mezi dvěma vodivými tělesy (sondou a vzorkem). Tunelový jev je schopnost elektronů překonat energetickou bariéru. Protože však elektrony nemají na překonání takovéto bariéry

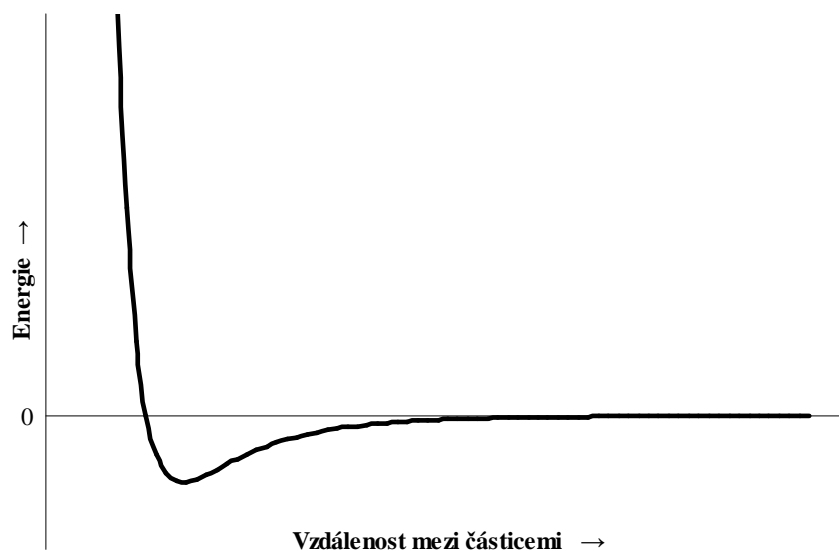
dostatek energie, je pravděpodobnost „protunelování se“ velmi malá. Kromě toho je pravděpodobnost tunelování v obou směrech stejná, takže výsledný tunelovací proud je nulový. Pokud mezi sondu a vzorek vložíme elektrické napětí, budou elektrony tunelovat jen jedním směrem a tak můžeme měřit tunelovací proud. Protože velikost tunelovacího proudu klesá exponenciálně s rostoucí vzdáleností, můžeme pomocí tunelovacího proudu měřit tuto vzdálenost. Pomocí STM byla poprvé zobrazena atomová struktura krystalu křemíku (Binnig 1983) a dokonce dokázáno, že je možné manipulovat jednotlivými atomy (Binnig 1982).

Od té doby vzniklo několik dalších metod založených na STM, nazývaných společně mikroskopie skenování sondou (SPM, scanning probe microscopy). Dnes se používá celá řada variant založených na různých fyzikálních principech, kterým se pak přizpůsobuje sonda. Obecně pro tyto metody platí, že rozlišení je závislé pouze na parametrech sondy, přístroj je možné využívat v různých prostředích (vzduch, kapalina,...) a vzorky většinou není třeba zdlouhavě upravovat.

Mikroskopie atomárních sil (AFM, atomic force microscopy) byla poprvé provedena v roce 1986 (Binnig,1986). Pro zkoumání povrchu využívá sil, které působí u všech vzorků, vodivých i nevodivých. Tyto síly mají různou fyzikální podstatu, největší roli hraje Van der Waalsova přitažlivá síla při větších vzdálenostech a odpuzivá síla působící, pokud se sonda přiblíží ke vzorku na atomovou vzdálenost. Celková síla je popsána Lennard-Jonesovým potenciálem:

$$U(r) = \epsilon \left[\left(\frac{r_0}{r} \right)^{12} - \left(\frac{r_0}{r} \right)^6 \right] \quad (10)$$

Lennard Jonesův potenciál je graficky znázorněný na obrázku č. 6.



Obr. č. 6: Lennard Jonesův potenciál, vzdálenost mezi částicemi je řádově v Å

Dále musíme vzít v úvahu kapilární síly působící na hrot v místě dotyku, třecí síly vznikající během skenování atd.

Konstrukce AFM

Skener

Jádrem celého systému je skener, na kterém je vlastní AFM senzor s ohebným raménkem nesoucím ostrý hrot. Skener zajišťuje velmi přesnou polohu hrotu nad vzorkem a také jeho pohyb po povrchu vzorku. Z tohoto důvodu se používaly nejčastěji piezoelektrické válcové skenery schopné realizovat pohyb hrotu s přesností na desetiny nanometru a nenáročné na konstrukci. Válcový skener je z jednoho kusu piezoelektrického materiálu a je na něm přiloženo pět elektrod, čtyři z nich tvoří vnější část válce, pátá je uvnitř. Připojení napětí na některou ze čtyř vnějších elektrod způsobí expanze nebo kontrakce piezoelektrického materiálu ve směru XY, při připojení napětí na vnitřní elektrodu se piezoelektrický krystal zkracuje nebo prodlužuje, tak je zajištěn pohyb v ose Z. Od těchto skenerů se v dnešní době ustupuje kvůli jejich nelineární odpovědi a hysterezi a začínají se využívat mechanické tzv. flexure scannery. Existují i systémy skenující vzorkem (sample scanning), ve kterých je skener součástí podkladu nesoucího vzorek.

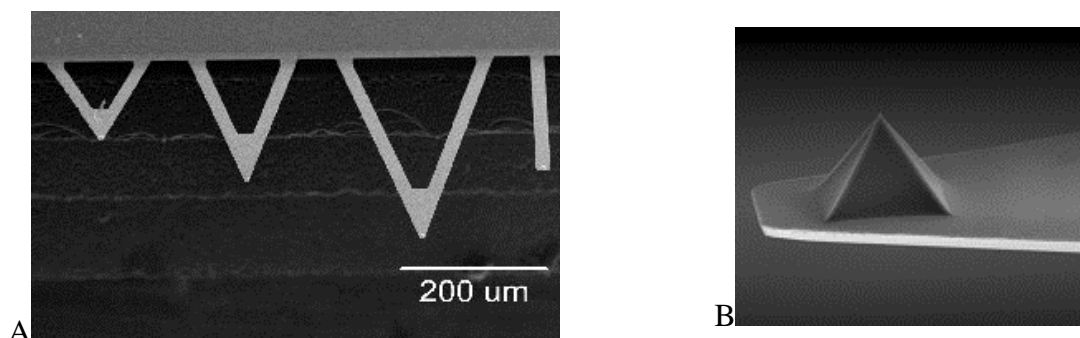
Raménko s hrotem

Čip, který je přichycen na skeneru nese jedno nebo více pružných ramének s hrotem (obr. č. 6). Při kontaktu se vzorkem působí na hrot síla, přenášejí se na raménko z jehož ohybu, měřeného nejčastěji pomocí odrazu laserového paprsku, jsme podle Hookova zákona (1) schopni tuto sílu určit.

$$F = k \cdot \Delta x \quad (11)$$

kde k je tuhost raménka a Δx je ohnutí raménka. Hrot, raménko i celý čip jsou nejčastěji vyrobeny z křemíku nebo nitridu křemíku mikrolitografickými technikami. Raménko by mělo mít vysokou rezonanční frekvenci (na které závisí kvalita odezvy, především v nekontaktním módu) a co nejmenší setrvačnost. Tyto parametry lze ovlivnit snížením hmotnosti raménka. Aby byly malé síly snímány s dostatečnou citlivostí, musí mít však raménko malou tuhost. Ta se pohybuje řádově $0,001 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$ do $10 \text{ N}\cdot\text{m}^{-1}$. Kratší raménka mají větší tuhost a tím pádem i větší rezonanční frekvenci, která se mění v řádech kHz až stovky kHz. Obecně platí, že pro dotykový režim se používají delší raménka než pro bezdotykový. Dále musí raménka odolávat zkroucení, proto je nejčastější tvar ramének V nebo X. Vlastní limit rozlišení AFM závisí na

ostrosti hrotu. Hrotů se používá několik typů, které se liší tvarem a ostrostití. Ostřejší hroty mají poloměr křivosti 1nm a dosahují angströmového rozlišení.



Obr.č. 7: A: Raménka nesoucí hroty, převzato z www.mobot.org, B: AFM hrot, převzato z www.nanotech-now.com

Dioda detekující laser

Nejčastějším způsobem měření ohybu raménka je tzv. optické vahadlo. Na raménko dopadá laserový paprsek, který se odráží a dopadá na diodu skládající se ze čtyř částí. V závislosti na ohnutí raménka dopadá paprsek pod různým úhlem a podle různého osvětlení v každé ze čtyř částí diody je určena poloha hrotu.

K regulaci síly, kterou hrot působí na vzorek se používá operátorem definovaná zpětnovazebná smyčka. Vstupním signálem smyčky je informace o síle působící mezi vzorkem a hrotem získaná z fotodiody. Zpětná vazba ve výsledku reguluje vertikální pozici hrotu. Takto se udržuje konstantní ohnutí nosníku přizpůsobováním napětí vloženým na skener. Čím rychleji může zpětnovazebná smyčka upravovat ohnutí nosníku, tím rychleji může AFM získat obraz, proto jsou dobře sestavená smyčka a ostrost hrotu klíčové pro výkon mikroskopu.

AFM pracuje ve dvou standardních módech – kontaktním a nekontaktním. Kontaktní mód (CM AFM, contact mode) je jednodušší a také původní. Hrot je přímo v mechanickém kontaktu se vzorkem. Protože na hrot působí odpuzivé síly, je do vzorku v podstatě vtačován. V případě tvrdých vzorků je možné tímto režimem dosáhnout atomárního rozlišení. Kontaktní mód má dvě modifikace, s konstantní výškou raménka nad povrchem, kdy se měří ohnutí raménka, a s konstantní silou, kdy je ohnutí raménka udržováno stejné a mění se vzdálenost vzorku od povrchu. Při zobrazování měkkých (biologických) vzorků ale dochází k jejich deformaci vlivem třecích sil. Deformace může být sice vratná, ale přesto dochází ke zkreslení výsledku.

Minimalizace těchto sil je umožněna semikontaktními a bezkontaktními měřícími přístupy. Tak, jako kontaktní mód využívá odpudivé síly, bezkontaktní mód (NC AFM, noncontact mode) využívá síly přitažlivé. Hrot se nachází v určité vzdálenosti od vzorku (v řádu nanometrů) a je ohýbán k jeho povrchu. Raménko se rozkmitá (magneticky nebo akusticky) s frekvencí, která je o něco nižší než rezonační frekvence raménka a měříme velikost amplitudy a fázový posun kmitání. Jeho nevýhodou je menší rozlišení (za určitých podmínek ale může dosáhnout stejného rozlišení jako CM AFM) a citlivost na interakce mezi hrotem a vzorkem. Semikontaktní mód tento problém částečně obchází tím, že se při průchodu dolní amplitudou dotkne vzorku.

Nejčastěji používaným podpůrným povrchem je v AFM mikroskopii, tak i silové spektroskopii slída (muskovit). Její výhodou je snadné odštěpování podle krystalické mřížky. Pokud ze slídy sloupneme jednu vrstvu, dostaneme povrch, jehož nerovnosti odpovídají velikosti jednoho atomu.

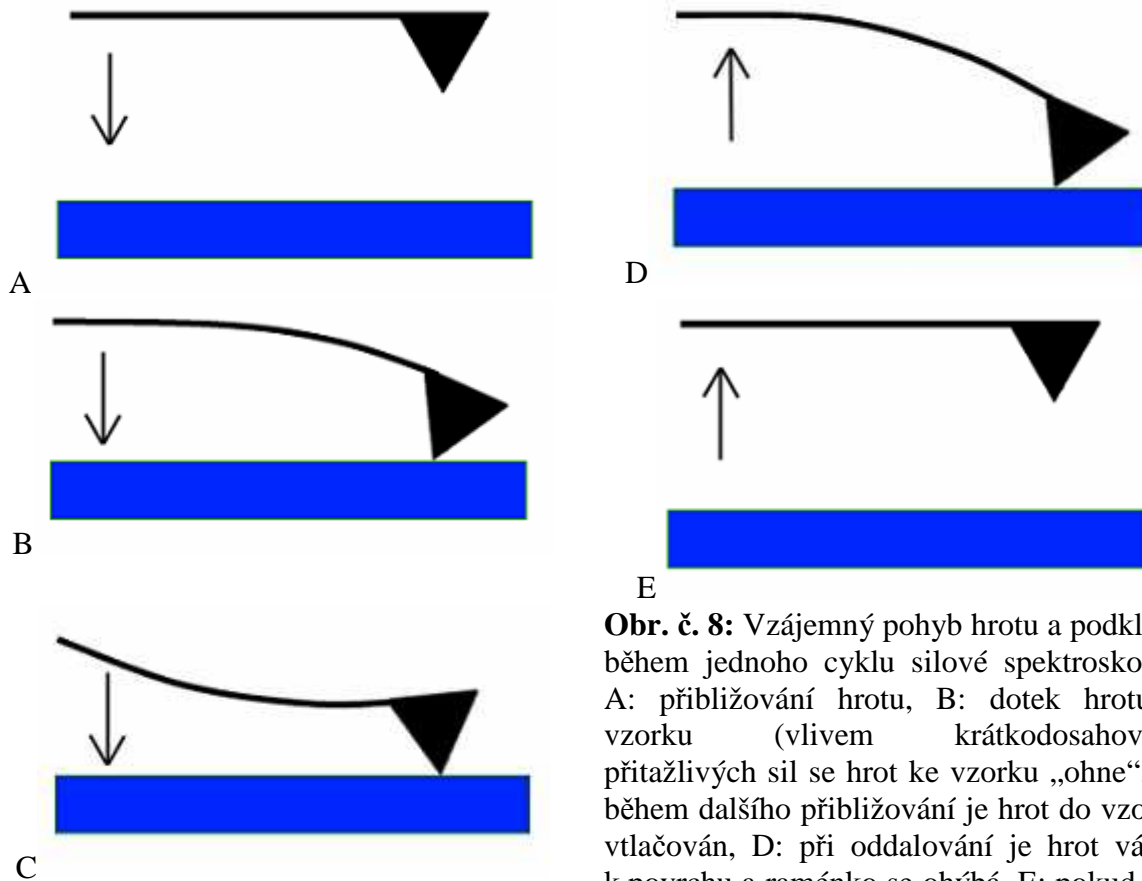
AFM umožňuje mimo zobrazování vzorků také měření jejich elastických vlastností a interakcí mezi hrotem a vzorkem, čehož se využívá v silové spektroskopii (force spectroscopy) (Möller *et al* 1999, Reich *et al* 2001, Jena P.B., 2002, Kubínek R., 2003; Allen *et al* 2003,).

Úvod do silové spektroskopie AFM

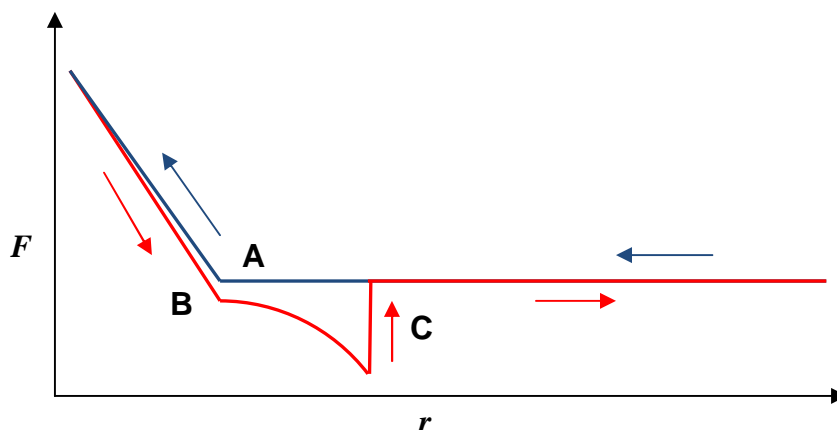
AFM spektroskopie poskytuje informace o síle působící mezi interagujícím párem molekul, z nichž jedna je navázána na povrch a druhá na AFM hrot. Měření sil mezi jednotlivými molekulami probíhá v časovém rozmezí odpovídajícím vzniku a zániku interakce mezi těmito molekulami s přesností řádově v pikonewtonech (Hinterdorfer 2002). První takový pokus provedl Merkel (Merkel *et al.* 1999), zároveň popsal způsob analýzy a zpracování dat (viz níže).

Při spektroskopii AFM se měří závislost působící vertikální síly na vzdálenosti hrotu od vzorku. Hrot s navázanou molekulou a vzorek se opakovaně přibližují a oddalují. Jeden cyklus (obr.č. 8) se dá popsat takto: na začátku je raménko s hrotem asi 50-500 nm nad vzorkem, začne se přibližovat k povrchu a vlivem odpudivých sil (viz. Lennard Jonesův potenciál, obr.č. 7) se začne rovnoměrně ohýbat směrem nahoru. Síla ohýbající raménko by ale neměla být příliš vysoká, hranice je 1 nN, z důvodu nevratného poškození hrotu nebo vzorku. Poté se začne hrot od vzorku oddalovat, ohnutí se zmenšuje až je raménko opět rovné. Pokud došlo k interakci, specifické i nespecifické, začne se při dalším oddalování raménko nerovnoměrně ohýbat směrem dolů. Toto ohnutí je způsobené silou, kterou na raménko působí navázané molekuly. Když je táhnoucí síla vyšší, než síla vazebné interakce pojící dvě

molekuly, dojde k odtržení molekul a raménko se prudce vrátí do normální polohy (Jena P.B., 2002, Kubínek R., 2003.). Závislost síly působící na raménko na vzdálenosti, ve které se raménko nalézá, je na obr. č. 9.



Obr. č. 8: Vzájemný pohyb hrotu a podkladu během jednoho cyklu silové spektroskopie, A: přibližování hrotu, B: dotek hrotu a vzorku (vlivem krátkodosahových přitažlivých sil se hrot ke vzorku „ohne“, C: během dalšího přibližování je hrot do vzorku vtlačován, D: při oddalování je hrot vázán k povrchu a raménko se ohýbá, E: pokud síla posunující raménko překročí sílu vazby, dojde k odtržení hrotu od povrchu



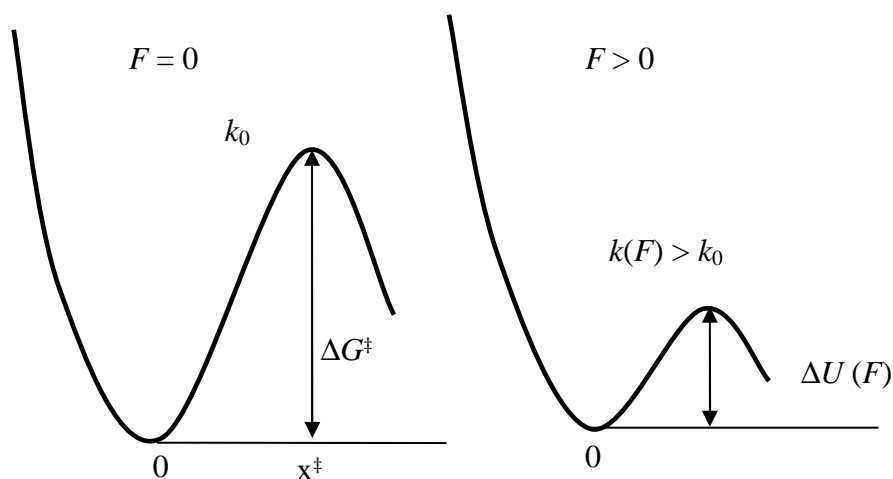
Obr. č. 9: Závislost síly působící na AFM hrot během jednoho cyklu, modrá – přibližování hrotu, červená – oddalování hrotu. V bodě A dojde ke kontaktu mezi hrotem a povrchem, v bodě B se hrot od povrchu odtrhne, v bodě C dojde k přerušení vzniklé vazebné interakce

Síly působící na raménko nejsou měřeny přímo. Pomocí odrazu laserového paprsku měříme ohnutí raménka. To souvisí se silou podle Hookova zákona (rovnice (1)). Měkčí raménka jsou proto při měření sil citlivější a umožňují měřit síly odpovídající přetržení jediné vodíkové vazby. Takto naměřená data ovšem charakterizují systém daleko od rovnováhy.

Teoretické předpoklady pro rekonstrukci rychlostní konstanty a aktivačních parametrů probíhající reakce v rovnováze (bez působící síly) položil Bell v roce 1978. Bellův vzorec popisuje závislost rychlostní konstanty disociace molekul na vnější působící síle:

$$k(F) = k_0 \exp Fx^\ddagger \quad (12)$$

kde k_0 je rychlostní konstanty disociace v rovnováze (za nepřítomnosti vnější působící síly), F působící síla a x^\ddagger vzdálenost mezi základním a přechodovým stavem systému podél reakční koordináty (obr. č. 10). (Bell 1978, Merkel *et al.*, 1999, Dudko *et al* 2006). Pro pochopení, proč síla závisí na rychlosti růstu síly (loading rate), je důležité vědět že při působení vnější síly se doba života nekovalentní vazby rychle zmenšuje. Vnější síla snižuje výšku energetické bariéry a tím i pravděpodobnost vazby a zvyšuje rychlost disociace. Závislost naměřené síly na logaritmičtě rostoucí rychlosti růstu síly je lineární a odpovídá energetické bariéře, která se vlivem působící síly zmenšuje. Pokud během měření působí konstantní vnější síla, je přímo zkoumána doba života systému, který je závislý na této síle; $\tau(F)$. Naproti tomu, pokud měření probíhá při stálé rychlosti odtahování (pulling speed), musí být rozdělení naměřených sil dále zpracováno, abychom získali informaci o době života. Teoretické základy pro tuto analýzu jsou odvozeny níže.



Obr. č. 10: Schématické znázornění energetického povrchu, vlevo vlastní potenciálový povrch, vpravo potenciálový povrch se sníženou energetickou bariérou vlivem působící vnější síly

Při experimentu s konstantní rychlostí oddalování molekul platí pro působící sílu:

$$F(t) = KVt \quad (13)$$

kde K je tuhost raménka, V rychlost pohybu raménka nad povrchem a součin KV dává rychlost růstu působící síly (loading rate). Pro pravděpodobnost $S(t)$, že je systém v čase t stále intaktní platí rovnice:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{S(t)}{\tau(F(t))} \quad (14) \quad \dot{S}(t) = -\frac{p(F)dF}{dt} \quad (15)$$

$$\text{kde } \dot{S}(t) = \frac{dS}{dt}$$

Pro odvození popisu distribuce sil (rupture forces) vyjdeme ze vztahů (14) a (15). Z rovnice (15) vyplývá:

$$p(F) = -\frac{1}{dF} \cdot \dot{S}(t)dt \quad (16)$$

Za $\dot{S}(t)$ dosadíme z rovnice (14) a dostáváme:

$$p(F) = \frac{dt}{dF} \cdot \frac{S(t)}{\tau(F(t))}$$

$$p(F) = \frac{1}{\dot{F}\tau(F(t))} \cdot S(t)$$

což je obměna rovnice (16). $S(t)$ vypočítáme z rovnice (14).

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{S(t)}{\tau(F(t))}$$

$$\frac{dS}{dt} + \frac{S(t)}{\tau(F(t))} = 0$$

$$\frac{dS}{S} = -\frac{1}{\tau(F(t))}dt$$

Ze složené funkce $F(t)$ vyjádříme vztah mezi df a dt a dosadíme do předchozího výrazu:

$$\frac{dS}{S} = -\frac{1}{\tau(f)\dot{F}}df$$

$$\int \frac{dS}{S} = -\int \frac{1}{\tau(f)\dot{F}}df$$

$$\ln(kS) = -\int \frac{1}{\tau(f)\dot{F}}df$$

Okrajové podmínky jsou:

$$t_0 = 0 \text{ s}, F_0 = 0 \text{ pN}, S_0 = S(0) = 1, \ln S_0 = 0$$

takže:

$$\ln S = -\int_0^F \frac{1}{\tau(f)\dot{F}} df$$

$$S = \exp\left[-\int_0^F \frac{1}{\tau(f)\dot{F}} df\right]$$

Tento integrál dosadíme do rovnice (16) a dostaneme matematický popis rozložení naměřených interakčních sil:

$$p(F) = \frac{1}{\dot{F}\tau(F)} \exp\left[-\int_0^F \frac{1}{\tau(f)\dot{F}} df\right] \quad (17)$$

Pro popis vlastní reakce však potřebujeme znát parametry charakterizující reakci na mikroskopické úrovni. Pro rozdělení dob života v závislosti na síle opět vyjdeme ze vztahů:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{S(t)}{\tau(F(t))} \quad (14) \quad \text{a} \quad \dot{S}(t) = -\frac{p(F)dF}{dt} \quad (15)$$

Dosazením rovnice (15) do rovnice (14) dostaneme:

$$-\frac{p(F)dF}{dt} = -\frac{S(t)}{\tau(F(t))}$$

$$\tau(F) = \frac{dt}{p(F)dF} \cdot S(t)$$

$$\tau(F) = \frac{1}{p(F)\frac{dF}{dt}} \cdot S(t)$$

$$\tau(F) = \frac{1}{p(F)\dot{F}} \cdot S(t) \quad (18)$$

$S(t)$ vypočítáme z rovnice (15):

$$\dot{S}(t) = -\frac{p(F)dF}{dt}$$

$$\frac{dS}{dt}(t) = -\frac{p(F)dF}{dt}$$

$$dS = -p(F)dF$$

$$S = -\int p(F)dF$$

Okrajové podmínky jsou stejné jako v předchozím případě:

$$\int_0^{\infty} p(F)dF = 1$$

$$t_0 = 0 \text{ s}, F_0 = 0 \text{ pN}, S_0 = S(0) = 1$$

$$S = 1 - \int_0^F p(f) df$$

$$S = \int_F^\infty p(f) df$$

Dosažením tohoto integrálu do rovnice (16) dostaneme:

$$\tau(F) = \frac{1}{p(F)\dot{F}} \cdot \int_F^\infty p(f) df \quad (19)$$

Matematické vyjádření závislosti doby života komplexu na působící síle (viz rovnice č. 19) z histogramů sil, při kterých komplex disociuje, získaných při různých rychlostech, nám dává možnost pomocí Kramerovy teorie (Dudko *et al.* 2008) interpretovat tuto závislost z mikroskopického hlediska (rovnice č. 20)

$$\tau(F) = \tau_0 \left(1 - \frac{vFx^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1-1/v} \exp \left[-\beta \Delta G^\ddagger \left[1 - \left(1 - \frac{vFx^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1/v} \right] \right] \quad (20)$$

Předpokládejme, že disociace komplexu může být popsána jako únik z jednorozměrné potenciálové jámy. Faktor v určuje její tvar. Pro $v = 1$ se vztah zjednodušuje na již známý Bellův vzorec (viz rovnice č. 12).

Úprava AFM hrotů pro silovou spektroskopii

Molekuly jsou na hrot a povrch navázány přes linker, který nejen umožňuje volný pohyb molekuly a její natáčení k vazebnému místu jejího protějšku a tím zvyšuje pravděpodobnost vzniku interakce. Dále díky svým elastickým vlastnostem umožňuje rozlišit specifické a nespecifické interakce. Na konci hrotu by měla být navázána pouze jedna molekula, druhým požadavkem je, že hrot ani povrch by neměly po chemické úpravě nespecificky reagovat. Tyto dva požadavky jsou splněny, pokud se použije některý z již zavedených protokolů.

Prvním krokem funkcionalizace hrotů a slídivých povrchů je navázání aminů ethanolaminhydrochloridu na atom křemíku. Druhým krokem reakce katalyzovaná triethylaminem, vedoucí ke vzniku kovalentní vazby mezi PEG (polyethylenglykol) linkerem funkcionalizovaným esterem N-hydroxisukcinimidu a aminoskupinou navázanou na křemík. Na molekulu linkeru je kladeno několik požadavků, které PEG splňuje. Je rozpustný ve vodě a chloroformu, netoxický, chemicky stabilní, můžeme snadno získat požadovanou délku řetězce a je pružný. Na každém konci řetězce linkeru je funkční skupina umožňující specifickou vazbu buď na aminy nebo na ligand k zabránění vzájemné reakce obou konců

linkeru. V nejjednodušším případě je molekula, jejíž interakce chceme měřit, navázána přímo na linker, ale samozřejmě může následovat ještě několik dalších kroků podle vlastností použitého ligandu. Ten je ve všech případech opět vázán kovalentně.

K navázání proteinů na povrch slídy (případně jiné používané povrchy) se používají stejné metody, v některých případech se využívají elektrostatické interakce mezi povrchem a zkoumanými molekulami. Pro většinu proteinů ale není možné výše zmíněné elektrostatické interakce využít, proto se vážou opět kovalentně a to většinou přes lysiny navázané přes jejich amidovou skupinu (Ebner 2007).

2. Cíle práce

Cílem práce bylo studium role malých aminokyselin zprostředkujících kontakt mezi α helixy proteinů D1 a D2 ve fotosystému II. Úkolem bylo připravit struktury pro simulaci jejich molekulární dynamiky v programu YASARA, analyzovat průběh simulace, vazebných energií, délky vazeb a interakčního povrchu a formulovat hypotézu o interakcích modelovaných α helixů a předpovědění interakcí celých D1 D2 proteinů. Tato hypotéza byla následně testována pomocí měření interakčních sil působících mezi páry α helixů dynamickou silovou spektroskopií AFM. Specifická role studovaných aminokyselin byla teoreticky i experimentálně ověřena na mutantních strukturách α helixů.

3. Metody

3.1 Parametry simulací molekulární dynamiky

Pro simulaci molekulární dynamiky byl použit software YASARA (Yet Another Scientific Artificial Reality Application) (www.yasara.org) a silové pole YAMBER3. To je odvozené od AMBERu a podle je to jedno z nejpřesnějších silových polí pro simulaci molekulární dynamiky proteinů ve vodném prostředí v programu YASARA (Krieger *et al.* 2004). Kvůli snížení výpočetní náročnosti byla modelována pouze část interagujícího systému D1 a D2 proteinu. Minimalizovaný interakční model sestával z dvojice α helixů, jejichž sekvence odpovídá nativním D helixům D1 a D2 proteinu a analogy D helixu D1 proteinu s mutacemi D1-Gly208Val a D1-Gly208Ser. Mutované sekvence byly vybrány z následujících důvodů: buňky s mutací D1-Gly208Ser jsou ještě životaschopné, ale neprospívají. Serin se ale v této poloze vyskytuje i přirozeně, a to u termotolerantní fazole *Vigna unguiculata* L. Naopak buňky s mutací D1-Gly208Val nejsou již životaschopné, ačkoli se dá valin považovat za malou kyselinu a dalo by se proto předpokládat, že proteiny s touto mutací budou stále funkční.

Základní struktura modelovaných peptidů byla získána z pdb souboru 3BZ1, popisujícího strukturu PSII s rozlišením 2,9 Å získanou pomocí rentgenové krystalografie (Guskov 2009). Z tohoto modelu byly vybrány molekuly D1 a D2 (označeny A a D) a z nich interagující helixy ohraničené aminokyselinami č. 196 - 221 pro D1 a 195 - 219 pro D2. Sekvence aminokyselin je následující:

D1: PFHQLGVAGVFGGALFCAMHGSLVTS

D2: PFHMMGVAGVLGGALLCAIHGATVE

Jejich sekvence byla nejdříve *in silico* pozměněna tak, aby odpovídala sekvenci peptidů o délce 30 aminokyselin napodobujících D helixy PSII *Synechocystis* sp. PCC6803. Následně byly přidány dva terminální lysiny, které byly u peptidů používaných pro silovou spektroskopii na oba konce dosyntetizovány kvůli přečištění peptidů na HPLC a jejich navázání na AFM hroty. Sekvence, které byly nakonec pro simulace molekulární dynamiky použity, jsou tyto:

d1WT - KKPFHMLGVAGVFGGSLFSAMHGSLVTSKK

a sekvence s mutací na místě Gly208:

d1S - KKPFHMLGVAGVFGSSLFSAMHGSLVTSKK

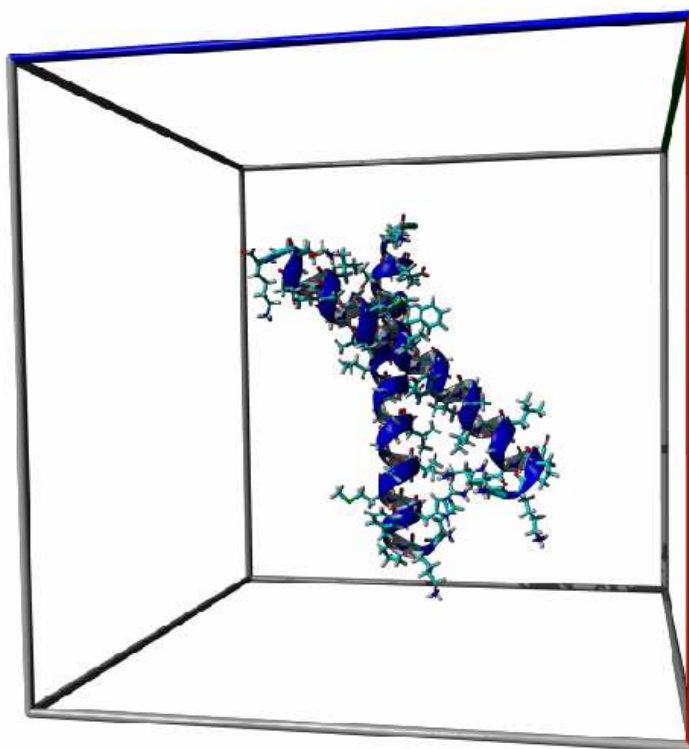
d1V - KKPFHMLGVAGVFGVSLFSAMHGSLVTSKK

a jejich vazebný protějšek:

d2WT - KKPFHMMGVAGILGGALLCAIHGATVENKK

K takto upraveným peptidům byly přidány vodíky. Simulační cela o rozměrech 66 Å (obr. č. 11) byla naplněna molekulami vody TIP3P, koncentrace NaCl v modelovaném systému byla 0,9% (což odpovídá fyziologickému roztoku). Simulace byla provedena při teplotě 298 K, pH 8 a při konstantním tlaku. Dalekodosahové coulombické interakce byly počítány algoritmem Particle Mesh Ewald. Omezení potenciálů (cut off) bylo 10 Å a byly použity periodické okrajové podmínky. Celková doba simulace byla 20 ns s časovým krokem 2 fs. Minimalizace energie molekul byla provedena metodou „steepest descent“, čili metodou největšího spádu potenciálu.

Data byla analyzována pomocí makra vytvořeného Alexandrem Dulebem v jazyce Python. Takto získaná data byla dále zpracována pomocí funkce v MATLABu.



Obr. č. 11: Simulační box s peptidy d1 (modře) a d2-WT (červeně)

3.2 Rekonstituce peptidů

Sekundární struktura syntetizovaných peptidů v roztoku byla určena pomocí CD spektroskopie. Modelovým peptidem pro určení struktury byl d1WT, ostatní nebyly analyzovány z důvodu jejich vysoké homologie s d1WT. Spektra byla měřena na přístroji Jasco J-715 Spektropolarimeter při pokojové teplotě, v kyvetě o šířce 0,1 cm v rozmezí vlnových délek 180 – 320 nm s krokem 1 nm a rychlostí přeběhu 50 nm za minutu. Výsledná spektra byla výsledkem průměrování pěti jednotlivých měření.

Zastoupení sekundárních strukturních motivů v peptidu bylo získáno analýzou v softwaru CDNN (Böhm 1992), s použitím následujících parametrů: peptid se skládá z 30 aminokyselin, jeho molekulární hmotnost určena pomocí Protein Calculator v3.3: <http://www.scripps.edu/~cdputnam/protcalc.html> a programem YASARA je MW=3120 Da a koncentrace peptidu v roztoku byla 1,756 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.3 Silová spektroskopie

3.3.1 Protokol na úpravu AFM hrotů a slídy

AFM hroty byly upraveny podle protokolu podle Ebnera (2007). Do malé kádinky s víčkem byly nasypány molekulární síta (Fluka, typ 4Å) tak, aby pokryly dno, 2,2 g ethanolaminhydrochloridu (SIGMA-ALDRICH) bylo rozpuštěno ve 4 ml DMSO (SIGMA-ALDRICH). Čipy omyté ve chloroformu byly přes noc (zhruba na 15 hodin) ponořeny do nasyceného roztoku ethanolaminhydrochloridu. Poté byly omyty v DMSO a ethanolu. Suché čipy byly přeneseny do čisté Petriho misky s roztokem 1mg NHS-PEG-acetalu (vyroben na zakázku na Keplerově univerzitě v Linci ve skupině Prof. Hermanna Grubera) v 0,5 ml chloroformu (SIGMA-ALDRICH). Do roztoku bylo přidáno 30 μl triethylaminu (SIGMA-ALDRICH) a reakce probíhala dvě hodiny při pokojové teplotě. Poté byly čipy omyty chloroformem a přeneseny na deset minut do 1 % roztoku kyseliny citrónové. Následně byly omyty vodou a suché uloženy v Petriho misce tak, aby ležely hroty k sobě.

Na hroty bylo nakápnuto 100 μl roztoku proteinu o koncentraci přibližně 0,2 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a 2 μl 1M NaCNBH₃ (SIGMA-ALDRICH). V tomto roztoku byly hroty inkubovány nejméně hodinu, deset minut před koncem bylo do roztoku ještě přidáno 5 μl 1 M ethanolaminu rozpuštěného ve vodě. Takto upravené špičky byly omyty puřem používaným během vlastního měření. Dlouhodobé skladování funkcionalizovaných hrotů není vhodné, ale možné při teplotě 4 °C po dobu maximálně několika dní.

Jako povrch pro navázání peptidů byla použita slída. Při funkcionalizaci slídy je třeba dvojnásobné množství PEG acetalu ve chloroformu a zrovna tak dvojnásobné množství triethylaminu, který reakci katalyzuje, a pětinasobné množství používaného roztoku peptidu a 1M roztoku ethanolaminu. Z tohoto důvodu byl v počátcích měření peptid d2WT vázán na slídu a jeho protějšky d1WT a d1V na hroty, takže slída mohla být použita na obě měření. Později během pokusu byl peptid d2WT vázán na hroty a jeho protějšky d1WT, d1V a d1S na slídu.

3.3.2 Postup měření silové spektroskopie

Měření silové spektroskopie probíhalo na přístroji Pico SPM firmy Agilent Technologies s funkcionalizovanými hroty z nitridu křemíku s pozlaceným odrazivým povrchem (MSCT, Bruker). Jejich kalibrace byla provedena podle Sadera (Sader et al. 1999) a tuhost raménka C, které bylo na měření používáno, byla stanovena na 40 pN.nm^{-1} .

Pro každou sérii měření byly funkcionalizovány tři čipy a s každým naměřeno 2000 cyklů, vždy po 100 v jedné poloze na slídě. To se opakovalo pro šest různých rychlostí. Hrot se přibližoval ke slídě po vertikální trajektorii 100 nm s frekvencí 0,3 Hz, 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz, 4,5 Hz a 10 Hz. Během měření však byly některé špičky zničeny a také některé křivky byly pro další zpracování nepoužitelné. Proto nebylo pro každou sadu měření zpracovááno stejné množství dat. To ovšem výsledky experimentu nijak neovlivňuje, jen snižuje počet interakcí, které jsme takto schopni identifikovat.

Pro každou špičku byla měřena kontrola, do roztoku SDS ve kterém probíhalo měření bylo přidáno 5 μl jednoho ze dvou právě zkoušených peptidů. Přidání blokujícího peptidu vedlo sice k významnému snížení zaznamenaných specifických interakcí mezi funkcionalizovaným hrotem AFM a slídou, ale také ke vzniku silné adheze mezi povrchem a hrotem. Proto bylo provedeno ještě další měření, kdy byl na slídu i čip navázán tentýž peptid a měřily se tedy interakce mezi páry d2WT - d2WT, d1WT - d1WT, d1V - d1V, d1S - d1S.

3.3.3 Analýza dat silové spektroskopie

Naměřená data byla zanalyzována v softwarovém prostředí MATLAB s použitím funkcí vytvořených Dr. Christianem Ranklem z Ústavu biofyziky Univerzity Johanna Keplera v Linci (Rankl 2008). Tento program načítá naměřené křivky, detekuje vazebné události, počítá sílu těchto interakcí a uspořádává je do tříd podle úrovně šumu. Kinetické a termodynamické parametry měřené interakce (rychlost disociace komplexu k_{off} , doba života komplexu τ_0 , vzdálenost mezi základním stavem a aktivovaným komplexem podél reakční

koordináty x_β a změna Gibbsovy volné energie reakce ΔG) byly odvozovány pomocí formalismu Bella (1978) a Dudko (2006,2008) (viz kapitola č.1.3.3) ze závislosti síly interakcí na síle působící na komplex, která se mění podle rychlosti pohybu hrotu. Distribuce naměřených sil

$$p(F) = \frac{1}{\dot{F} \tau(F)} \exp - \int_0^F \frac{1}{\tau(f) \dot{F}} df \dots\dots\dots (17)$$

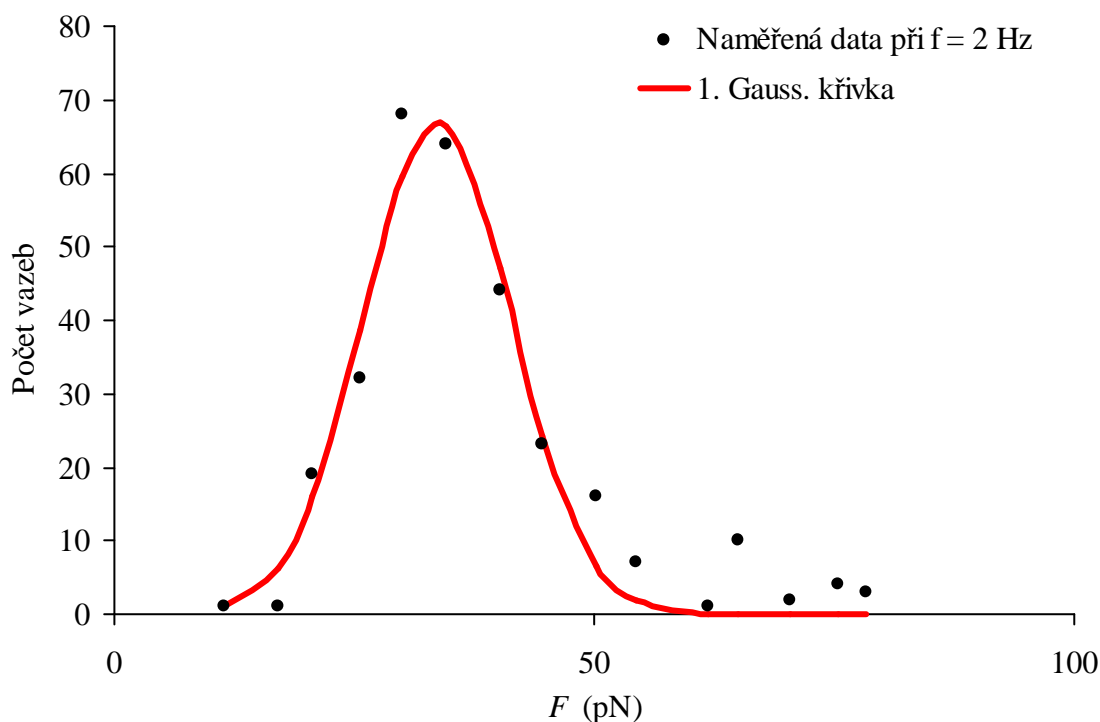
byla numericky fitována na jednu (obr. č. 12:), nebo součet dvou Gaussových křivek (obr. č. 13) a histogramy renormalizované podle rovnice:

$$\tau(F) = \frac{1}{p(F) \dot{F}} \cdot \int_F^\infty p(f) df \dots\dots\dots (19)$$

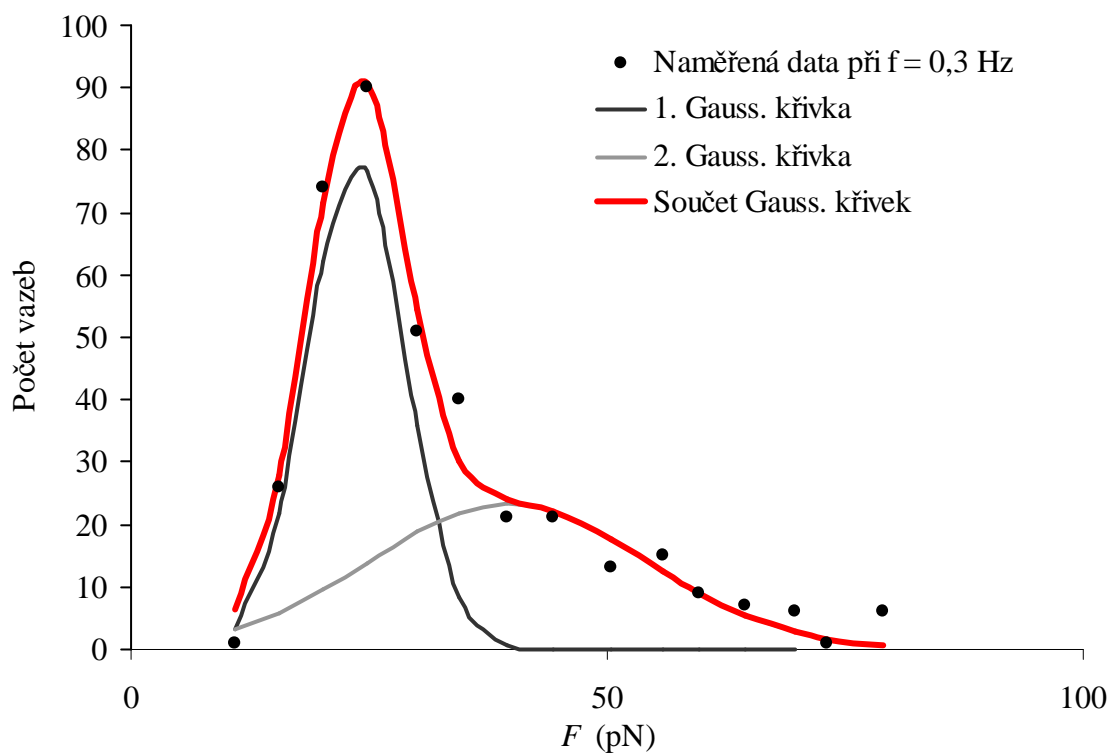
byly numericky fitovány na rovnici

$$\tau(F) = \tau_0 \left(1 - \frac{\nu F x^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1-1/\nu} \exp \left(-\beta \Delta G^\ddagger \left[1 - \left(1 - \frac{\nu F x^\ddagger}{\Delta G^\ddagger} \right)^{1/\nu} \right] \right) \quad (20)$$

metodou minimalizace součtu čtverců.



Obr. č. 12: Fitování distribuce naměřených sil mezi peptidy D1-Val208 a D2 jednou Gaussovou křivkou



Obr. č. 13: Fitování distribuce naměřených sil mezi peptidy D1 - Val208 a D2 součtem dvou Gaussových křivek

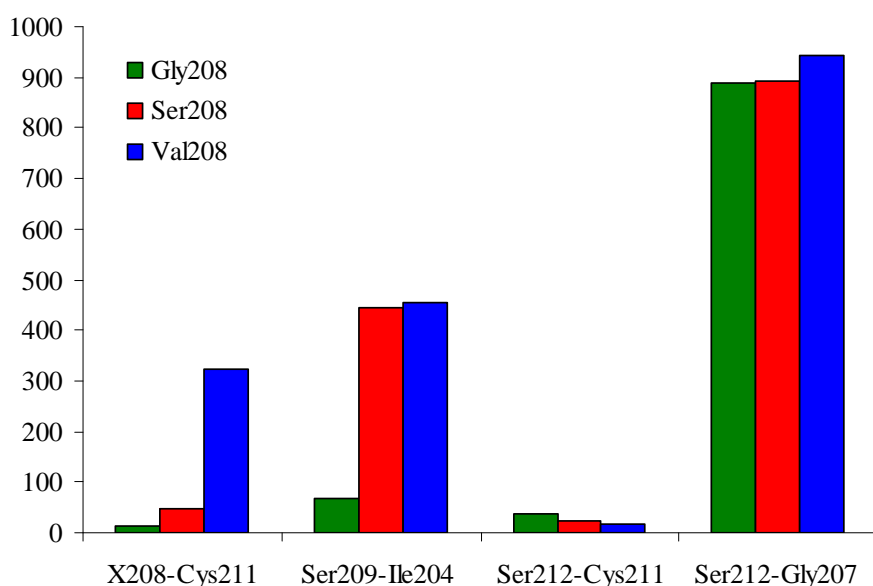
4. Výsledky

4.1 Simulace molekulární dynamiky

Simulace molekulární dynamiky D helixu D1 a D2 proteinu poskytla informace o vývoji struktury helixů po dobu 20 ns. V průběhu simulace byly analyzovány interakce mezi peptidy d1 (WT, S a V) a d2WT. Četnost vzniku interhelikálních vodíkových vazeb byla sledována mezi středy helixů, mezi nejfrekventovanější vazbou D1-Ser212 a D2-Gly207 (> 89 % simulačních kroků), D1-Ser209 a D2-Ile204, D1-Ser212 a D2-Cys211 a mezi D1-208 a D2-Cys211. Četnost vazeb, jejich energie a délka mezi interagujícími helixy jsou uvedeny v tabulce č.1.

Změna aminokyseliny D1-Gly208 neměla prokazatelný vliv na žádný z parametrů charakterizující dominantní interhelikální vazbu D1-Ser212 (O γ) a D2-Gly207 (O) (až na mírný nárůst četnosti této vazby po mutaci D1 Gly208Val). Zcela překvapivě však mutace tohoto glycinu na serin ovlivnila četnost vazeb mezi D1-Ser209 (O γ) a D2-Ile204 (O) téměř sedminásobně, výměna glycinu za valin vedla k témuž zvýšení počtu této vazby a dále k prudkému nárůstu vazeb mezi D1-208 (O) a D2-Cys211 (O γ). Počet vazeb mezi Ser212-Cys211 zůstal po všech mutacích nízký (obr. č. 14). Z toho můžeme předvídat o něco vyšší stabilitu systému po mutaci D1 Gly208Ser a výrazněji vyšší po mutaci D1 Gly208Val. Vznikající vodíkové vazby mezi jednotlivými peptidy jsou na obrázku č. 15

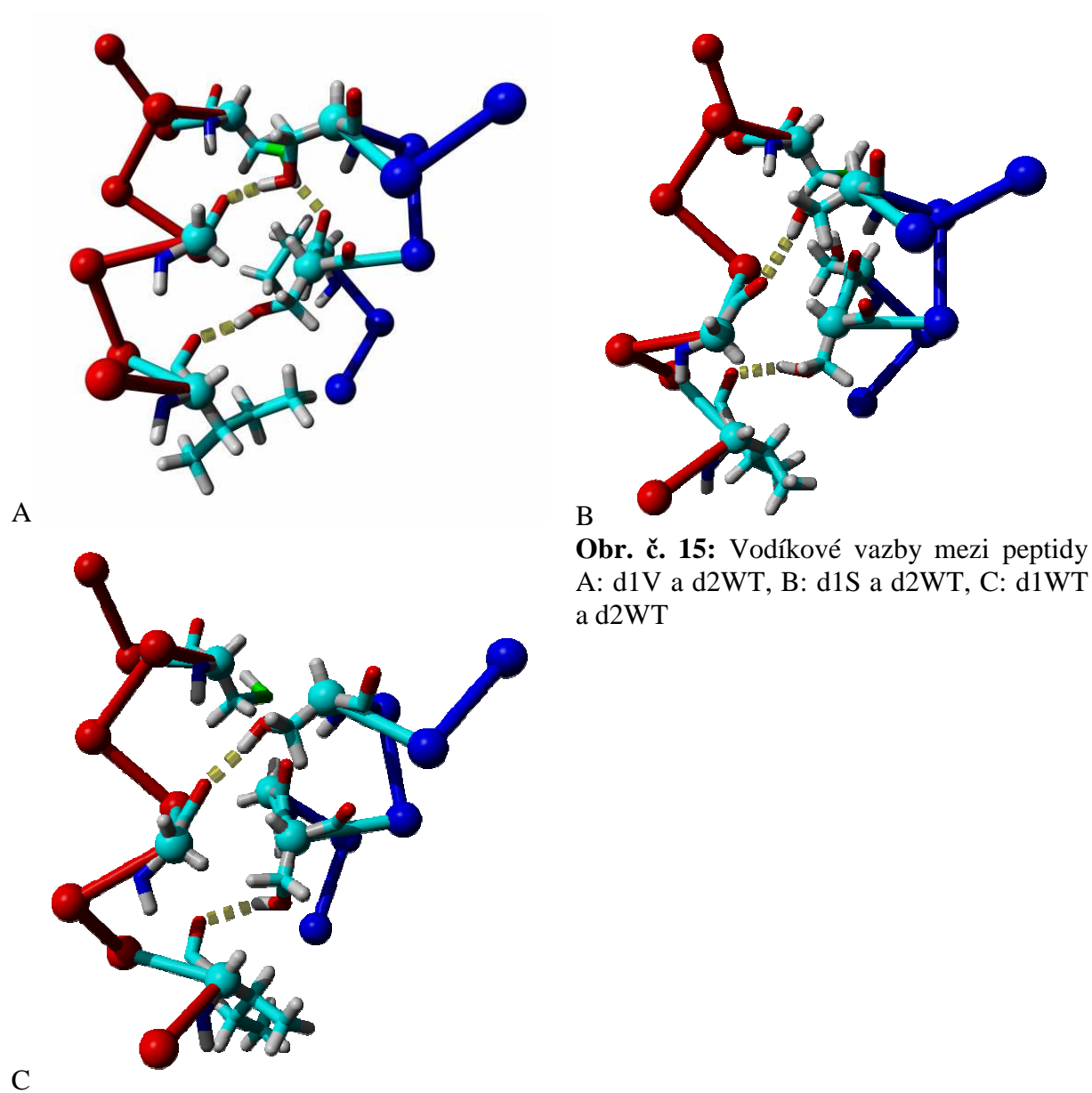
Důležitým zjištěním bylo, že energie a délka sledovaných vazeb se vlivem mutací výrazně nezměnila (viz tab. č. 1).



Obr. č. 14: Počet jednotlivých vodíkových vazeb mezi peptidy D1-(WT, S, V) a D2- WT

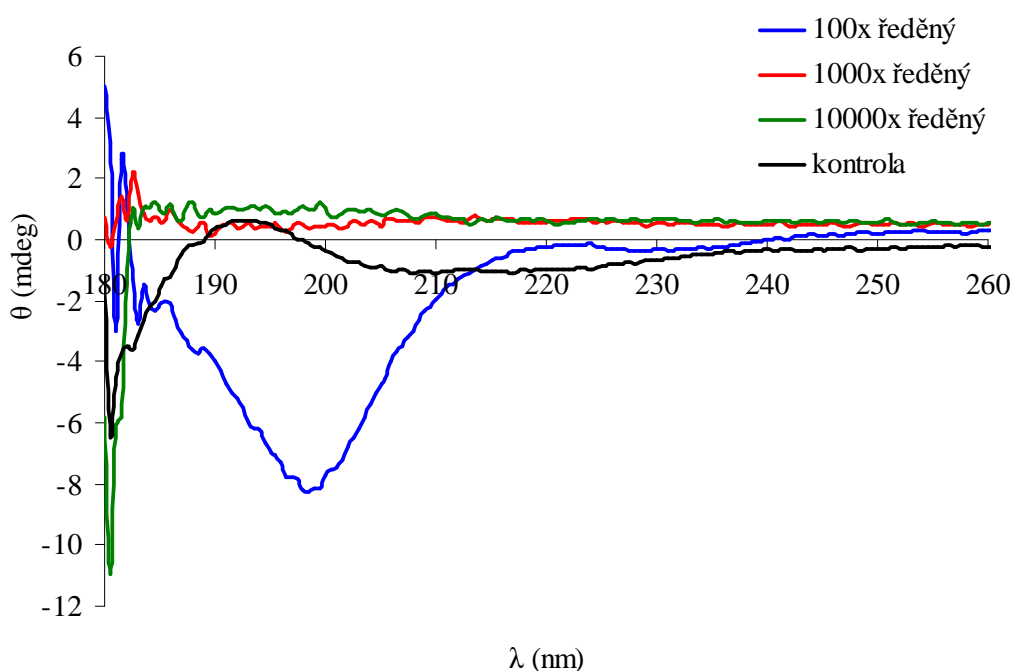
Vazba	X208-Cys211			Ser209-Ile204			Ser212-Cys211			Ser212-Gly207		
	p	E (kJ/mol)	d (Å)	p	E (kJ/mol)	d (Å)	p	E (kJ/mol)	d (Å)	p	E (kJ/mol)	d (Å)
Gly	14	16.5±5.4	2.1±0.2	67	17.8±5.7	2.0±0.2	37	13.8±5.4	2.1±0.2	890	22.5±0.9	1.9±0.2
Ser	47	15.1±5.7	2.1±0.2	443	20.7±4.4	1.9±0.2	25	11.5±3.9	2.2±0.1	892	23.2±2.7	1.8±0.1
Val	322	17.8±5.6	2.1±0.2	456	16.5±5.0	2.0±0.1	17	14.0±5.1	2.2±0.2	944	23.7±2.1	1.8±0.2

Tab. č. 1: Četnost, energie a délka jednotlivých vodíkových vazeb vznikajících mezi helixy během 20 ns simulace molekulární dynamiky



4.2 CD spektroskopie

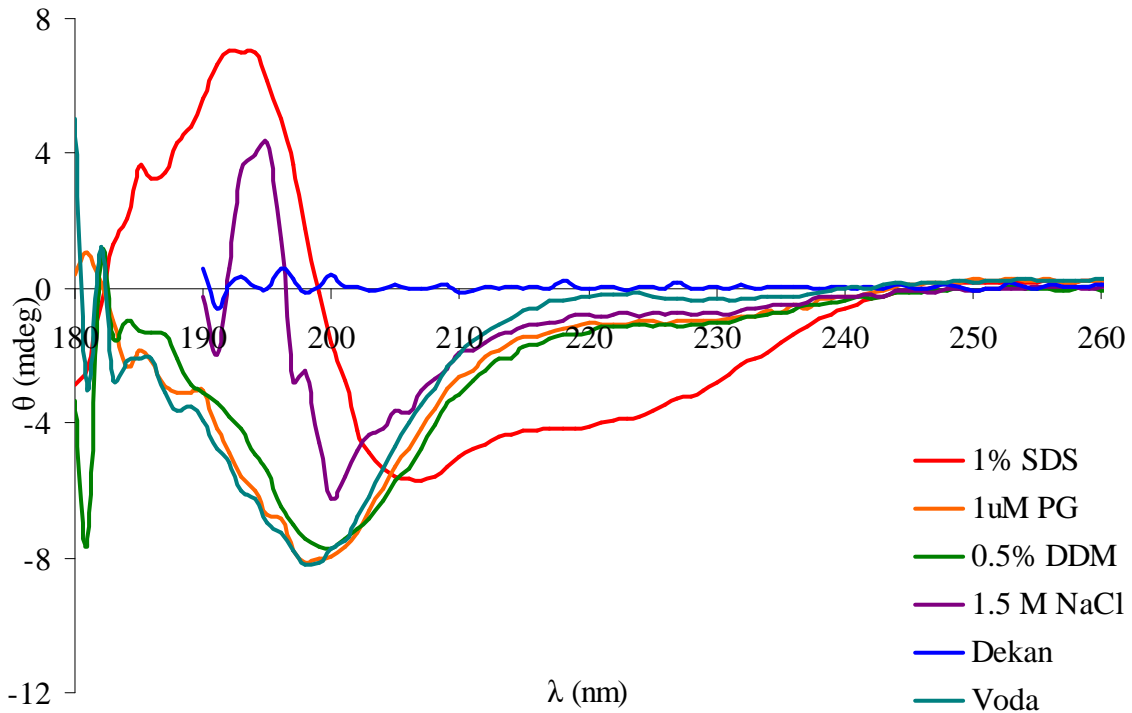
CD spektroskopii jsem použila k identifikaci podmínek pro sbalení peptidu do α helikální struktury, která reprezentuje nativní konformaci této části D1 a D2 proteinů. V první řadě jsem zjišťovala optimální koncentraci peptidu představující D helix D1 proteinu pro měření CD spekter (obr. č. 16). Peptid, rozpuštěný v deionizované vodě, o koncentraci $1,756 \mu\text{g ml}^{-1}$ jsem dále ředila 100x, 1000x a 10 000x. Nejlepší poměr signálu k šumu poskytoval peptid ředěný 100x, což odpovídá konečné koncentraci $17,56 \text{ nm.ml}^{-1}$.



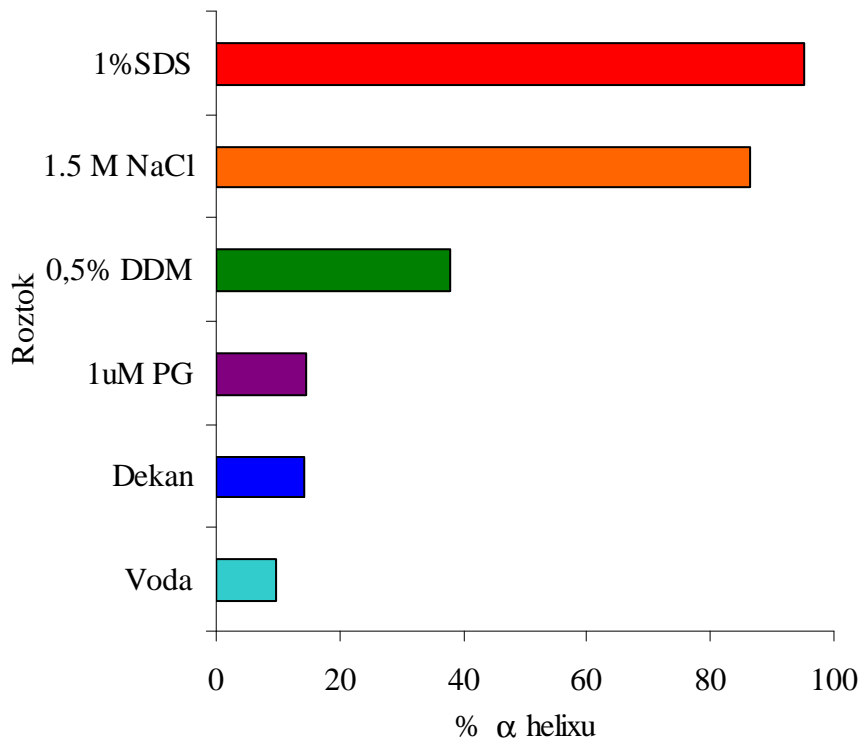
Obr. č. 16: CD spektra peptidu v ředěném zásobním vodném roztoku

Dekonvoluce tohoto spektra ukázala, že peptid rozpuštěný ve vodě má nízké (9,6%) zastoupení α helikální struktury. K nalezení podmínek pro sbalení peptidu do α helikální struktury bylo navrženo několik vodných roztoků (SDS (sodium dodecylsulphate), dodecylmaltozid (DDM), fosfatidyl glycerol (PG) a NaCl) o různých koncentracích. Nevodné prostředí bylo simulováno rozpuštěním peptidu v dekanu (obr. č. 17). Některé ze vzorků byly také sonikovány a ohřívány na $80 \text{ }^\circ\text{C}$, to však nemělo na sbalování peptidu žádný vliv.

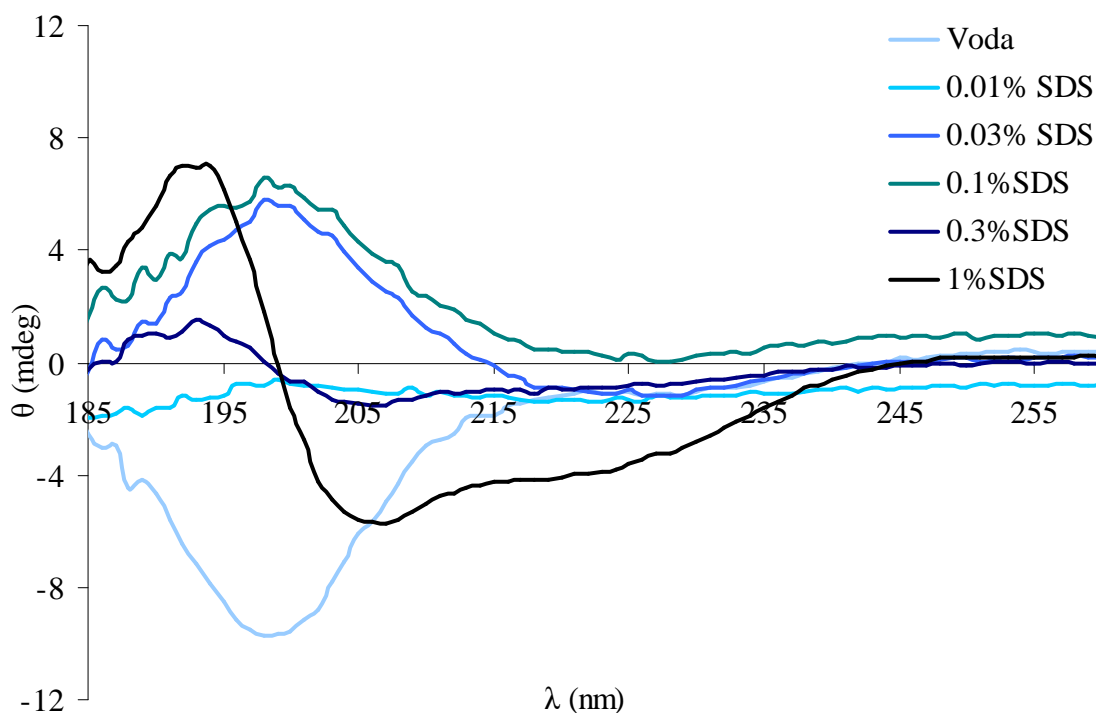
Sloupcový graf na obrázku č. 18 znázorňuje zastoupení α helixu po rozpuštění peptidu v jedlitolivých roztocích. Je patrné, že nejvíce α helixu je v 1,5 M NaCl a 1 % SDS. Protože však kvůli rozptylu světla o vlnových délkách délkách 180 – 200 nm není už spektrum měřitelné a tato část spektra je důležitá pro analýzu dat, nelze tato data považovat za zcela důvěryhodná. Proto byly pro další měření použity roztoky o různé koncentraci SDS (obr. č. 19 a 20).



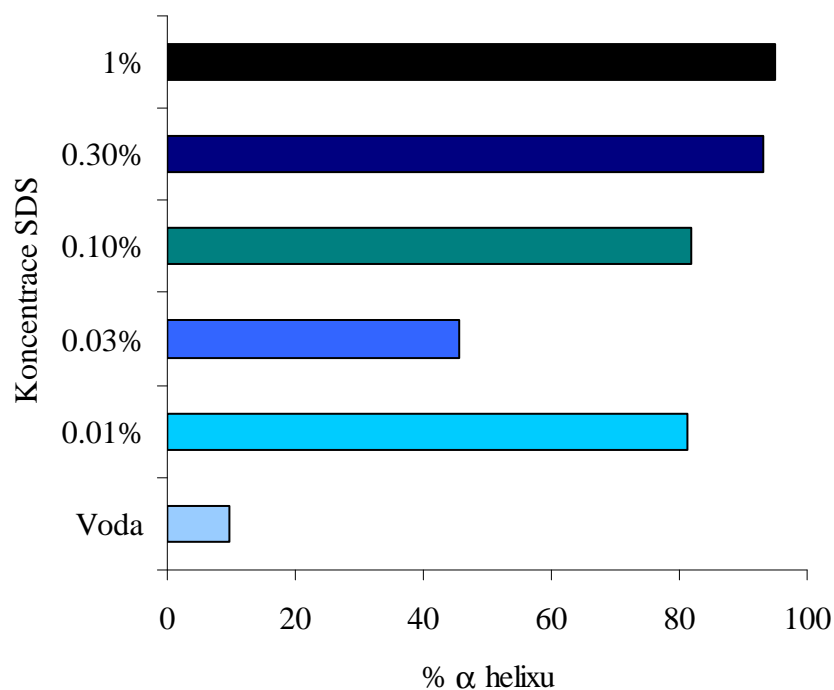
Obr. č. 17: CD spektra peptidu rozpuštěného v roztocích SDS, PG, DDM, NaCl, dekanu a vodě



Obr. č. 18: Zastoupení peptidu v α helikální struktuře v roztocích SDS, PG, DDM, NaCl, dekanu a vodě

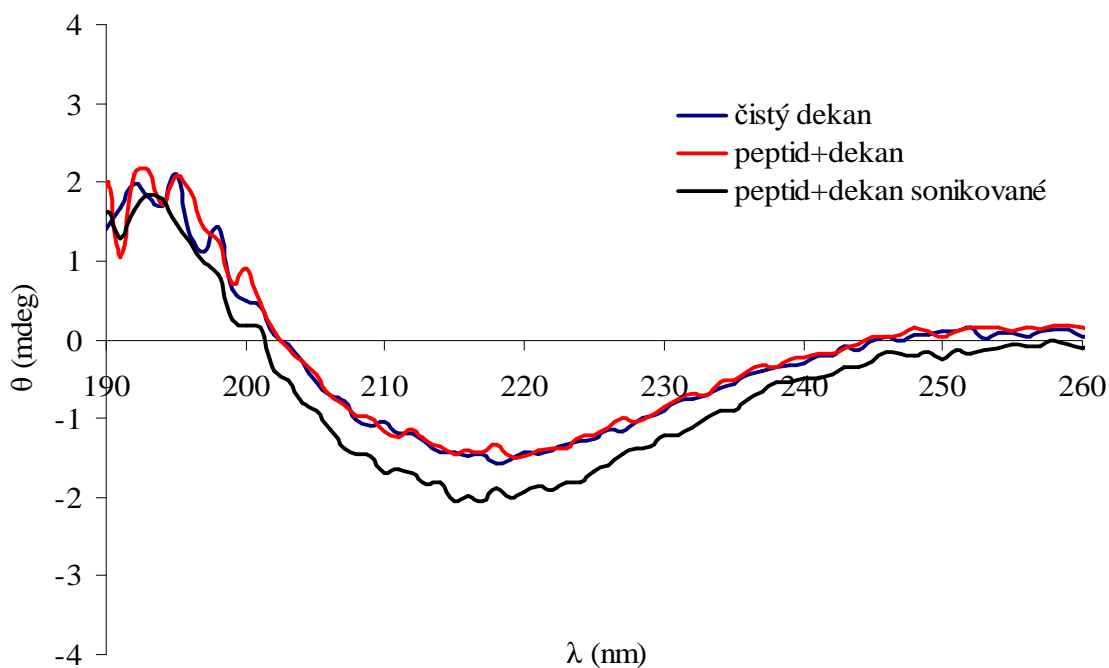


Obr. č. 19: CD spektra peptidu v roztocích o různé koncentraci SDS



Obr. č. 20: Zastoupení peptidu v α helikální struktuře v roztocích SDS o různé koncentraci

Nejvíce peptidu v α helikální struktuře je v 1 % SDS. V dekanu se peptid vůbec nepodařilo rozpustit. Z obrázku č. 21 je patrné, že spektra čistého dekanu a dekanu ve kterém by měl být rozpuštěný peptid jsou stejná a to i po sonikaci.



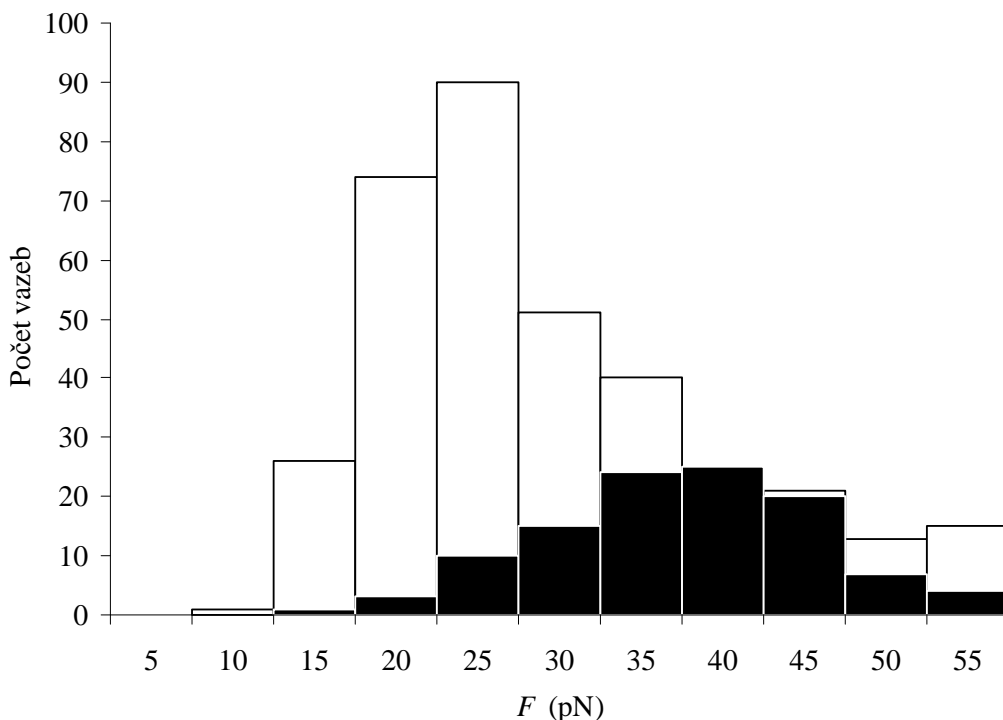
Obr. č. 21: CD spektra peptidu rozpuštěného v dekanu

4.3 Silová spektroskopie

Bylo naměřeno nejméně 6000 (s výjimkou měření d1V – d2WT při frekvencích 0,3 Hz a 10 Hz) cyklů silové spektroskopie mezi funkcionalizovanými špičkami a povrchem. Pro statisticky průkaznou analýzu dat bylo třeba shromáždit minimálně 150 specifických interakcí. Pravděpodobnost vzniku interakce byla poměrně malá (viz tab. č. 2), v rozmezí 0,7 % do 13,2%, nejmenší počet naměřených interakcí byl pro kombinaci peptidů d1S – d2WT při frekvenci 3 Hz (55 interakcí) a nejvyšší pro d1WT – d2WT při frekvenci 2 Hz (789 interakcí). Protože i přes velký počet měření nebyl pro peptid s mutací d1S získán dostatečný počet interakcí, nebylo možné toto měření dále zpracovat pomocí Bellovy teorie.

	0.3 Hz	1 Hz	2 Hz	3 Hz	4.5 Hz	10 Hz
d1WT - d2WT	5.8	3.3	13.2	6.9	2.7	1.8
d1V - d2WT	11.0	2.8	5.2	5.4	2.4	7.3
d1S - d2WT	1.4	1.2	1.2	0.7	0.9	0.8

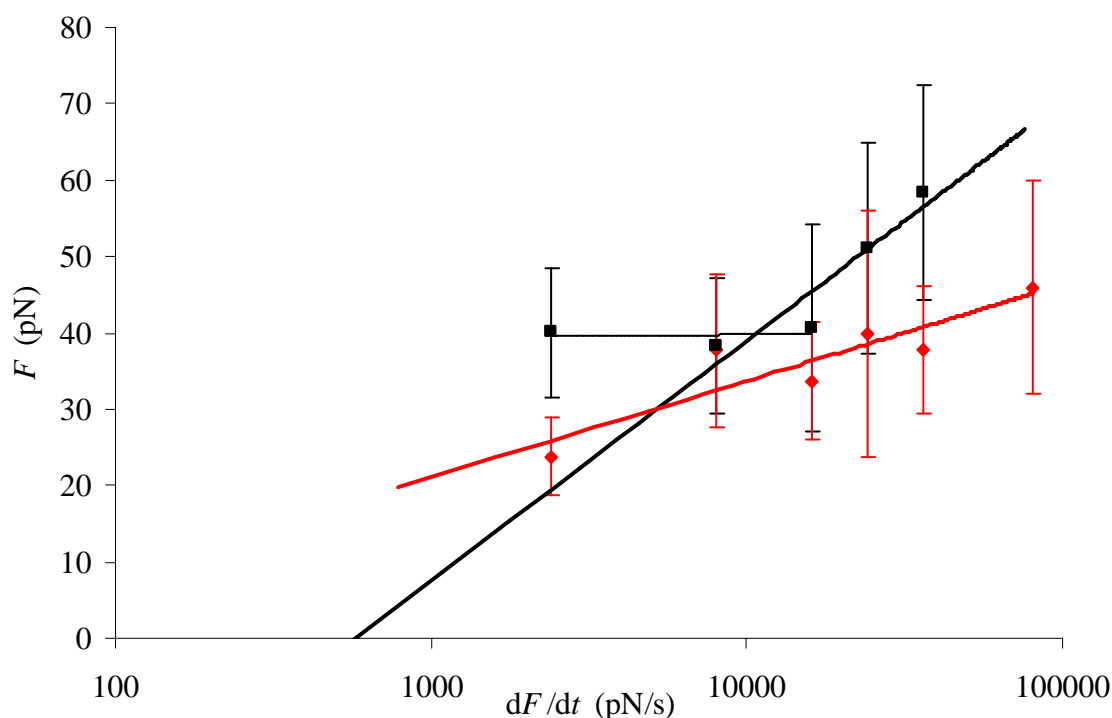
Tab. č. 2: Pravděpodobnost vzniku interakce mezi peptidy při daných frekvencích



Obr. č. 22: Histogram rozdělení sil vazeb mezi peptidy d1V a d2WT, třídy histogramu jsou 5 pN, bílé sloupce: síly naměřené při frekvenci 0,3 Hz, černé při frekvenci 4,5 Hz

Naměřené síly z jednotlivých měření byly soustředěny do histogramů do tříd po 5 pN. Posun maxim histogramů pro d1V – d2WT při frekvenci 0,3Hz (bílá) a 4,5Hz (černá) na obr. č. 22 je zcela v souladu s Bellovou teorií, která zároveň předpokládá i pokles pravděpodobnosti vzniku interakce při vyšší frekvenci měření.

Fitování Gaussovými křivkami poskytlo pro každou frekvenci měření průměrnou sílu a standardní odchylku. Na obrázku č. 23 je graf závislosti velikosti těchto průměrných sil na rychlosti změny vnější působící síly dF/dt , loading rate. Síla potřebná k disociaci komplexu klesá strměji pro d1WT a d2WT a při rychlostech pod $200 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ (velikost působící síly se blíží nule) jsou naměřené síly nižší než pro komplex d1V a d2WT. Z logaritmické extrapolace této závislosti vyplývá podle Bella, že rychlost disociace komplexu při působení nulové síly je vyšší u d1WT – d2WT než u d1V – d2WT. Z této analýzy také vyplývá přibližně dvojnásobně kratší doba života a nižší stabilita komplexu d1WT – d2WT.

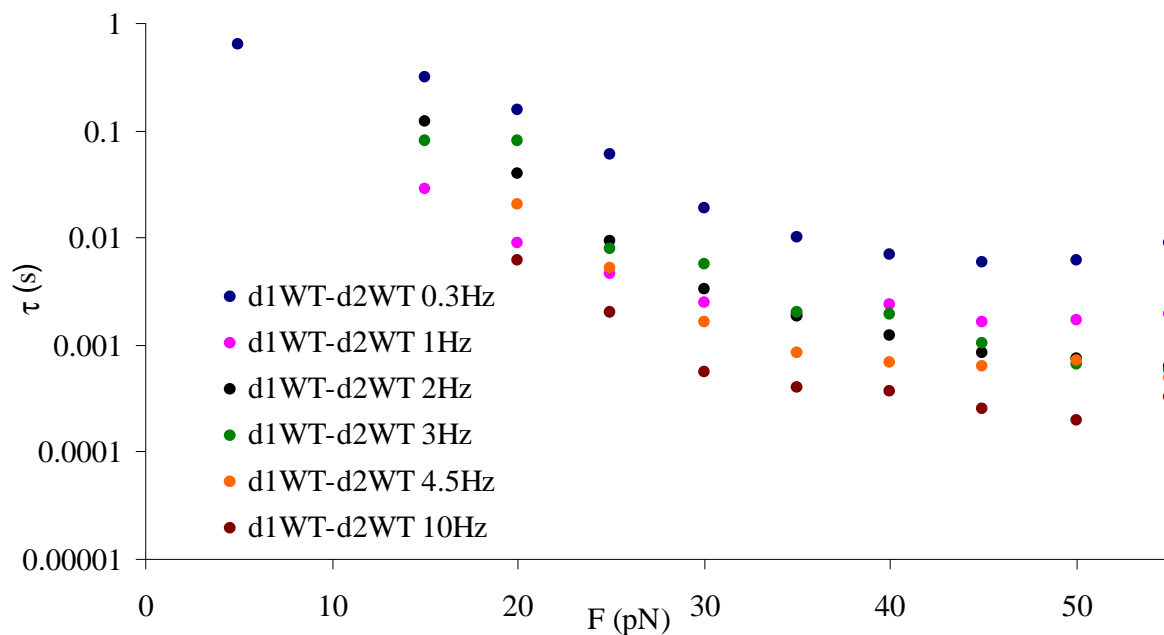


Obr. č. 23: Graf závislosti síly vazeb mezi peptidy na rychlosti její změny, červená d1V – d2WT, černá d1WT – d2WT

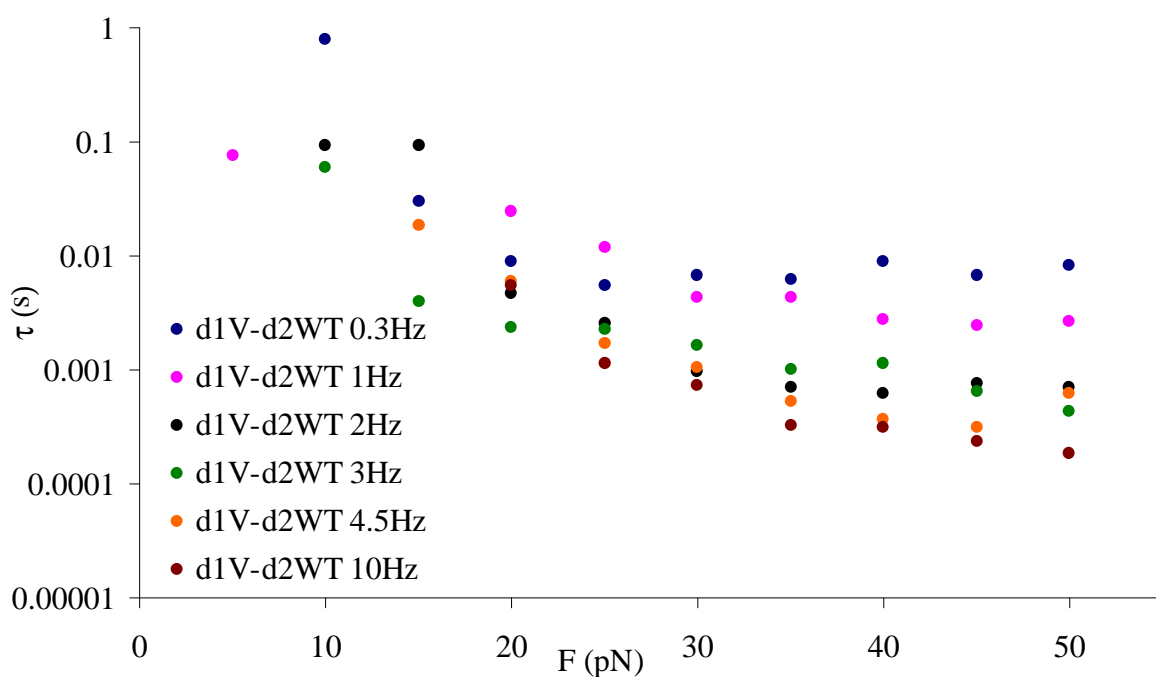
Narozdíl od Bellovy fenomenologické teorie, poskytuje Dudko a Szabo podrobnější informace o termodynamice disociace a mikroskopických vlastnostech disociujících komplexů. Obrázky č. 24 a 25 ukazují data z původních histogramů transformovaná podle rovnice č. 19 na závislost doby života komplexu na působící síle. Předpokládáme, že disociace probíhá jako únik z harmonické jednorozměrné potenciálové jámy a parametr ν v rovnici č. X je $\nu = 1/2$. Protože množství naměřených dat nebylo dostatečné a šum byl příliš vysoký, dávalo fitování nerealistické výsledky (ΔG^\ddagger větší než $100k_B T$, x_B větší než 1,5 nm). Proto byly histogramy naměřených sil renormalizovány podle rovnice

$$\tau(\langle F \rangle) \approx \left[\frac{\pi}{2} (\langle F^2 \rangle - \langle F \rangle^2) \right]^{1/2} / \dot{F}(\langle F \rangle) \quad (21)$$

která se používá pro analýzu problematických dat. Potom podle rovnice č. 20 dává fitování dat τ_0 pro d1WT – d2WT 9 ms, pro d1S – d2WT 23 ms a pro d1V – d2WT 52 ms. Tyto hodnoty jsou v souladu se závěry vyčtenými na základě analýzy podle Bellovy teorie. Zde jsem předpovídala nižší stabilitu komplexu d1WT – d2WT na základě strmého poklesu závislosti maximální síly potřebné k disociaci komplexu na rychlosti změny síly.



Obr. č. 24: Závislost doby života interakce mezi peptidy d1WT a d2WT na interakční síle měřené při rozdílných rychlostech oddalování složek komplexu. Data byla získána renormalizací histogramů naměřených sil podle rovnice č. 19



Obr. č. 25: Závislost doby života interakce mezi peptidy d1V a d2WT na interakční síle měřené při rozdílných rychlostech oddalování složek komplexu. Data byla získána renormalizací histogramů naměřených sil podle rovnice č. 19.

5. Diskuze

Propojení experimentálních a teoretických přístupů je nesnadno realizovatelný úkol, protože teoretické přístupy převážně umožňují studovat objekty v jiném časovém rozmezí a rozměrech než přístupy experimentální. Měření silové spektroskopie je unikátní tím, že umožňuje detekci událostí, při kterých došlo k disociaci (přetržení) jednotlivé vazebné interakce. Současné přístroje jsou schopny zaznamenat i sílu potřebnou k přetržení jedné vodíkové vazby s vysokým časovým rozlišením. To nám dává možnost vzhledu do procesů, jejichž studium bylo donedávna nedostupné. Mezi tyto procesy patří především interakce mezi proteiny, které jsou klíčové pro veškeré reakce v buňce.

Těžko by se hledala reakce, která je pro život na Zemi důležitější, než štěpení vody na kyslík realizované fotosystémem II. Studium tohoto procesu má zásadní význam nejen pro pochopení molekulární podstaty této reakce, ale také pro využití v různých biotechnologických procesech, počínaje kontrolovanou výrobou biomasy až po kýžené využití makety fotosyntetického procesu pro výrobu (bio)elektřiny. Funkčnost fotosystému II závisí na mnoha na interakcích mezi všemi podjednotkami komplexu. Není překvapením, že jakákoliv malá změna jakékoli z těchto interakcí povede ke zhoršení funkce. Zkoumání takovýchto interakcí ztěžuje fakt, že se všechny procesy odehrávají hydrofobním prostředím lipidické membrány. Takové proteiny je obtížné krystalizovat a proto nemáme příliš informací o jejich struktuře. Také modelování takovýchto systémů je obtížné, protože nejsou ještě vyvinuta taková silová pole, která by umožnila modelovat proteiny v heterogenním lipidickém prostředí.

Cílem této práce bylo studium interakce mezi D1 a D2 proteinem, která je zprostředkovaná sítí vodíkových vazeb. Dosud nezkoumaná vazba, kterou vytváří D1-Gly208 nacházející se na okraji GXXXG motivu, u jiných membránových proteinů obvykle podporuje dimerizaci. Střed tohoto motivu a okolní aminokyseliny byly již v D1 proteinu mutovány a vliv těchto mutací na elektronový transport a stabilitu PSII byl studován (Shlyk-Kerner *et al* 2006). Narozdíl od mutací v místech D1-212 a D1-209, kde bylo možné původní aminokyselinu v *Synechocystis* sp. PCC6803 nahradit množstvím jiných aminokyselin (s výjimkou nabitých a velkých aminokyselin) (Shlyk-Kerner *et al* 2006), je glycin v poloze D1-208 možné zaměnit pouze za tři malé kyseliny: alanin, threonin a serin. Z toho lze usoudit, že glycin má v této poloze vysoce specifickou, ale neznámou, funkci.

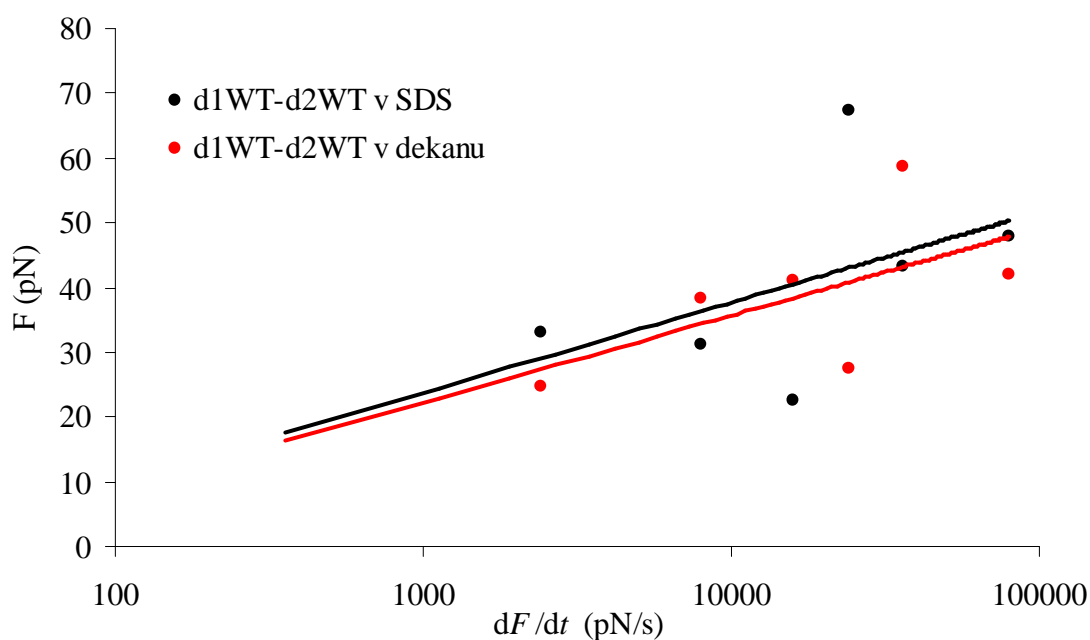
Pro modelování i experimentální měření byl vytvořen zjednodušený model vycházející z omezení použitých metod a zároveň respektující nativní strukturu peptidů reprezentující jádro

reakčního centra. Modelové peptidy byly odvozeny z modelu PSII *Thermosynechococcus elongatus* tak, že některé aminokyseliny byly vyměněny, aby sekvence aminokyselin odpovídala sekvenci D helixů v D1 a D2 proteinech *Synechocystis* sp. PCC6803. I přesto, že byla nová struktura peptidů energeticky minimalizována, mohl tento krok ovlivnit přesnost výpočtů. Další okolností, kterou je třeba vzít v úvahu, je fakt, že simulace molekulární dynamiky probíhala ve vodném prostředí, které je pro membránový protein nepřírodní. Vodíkové vazby, které by v hydrofobním prostředí vznikaly jen mezi α -helixy, teď vznikají i mezi aminokyselinami a molekulami vody a je proto možné, že voda zabraňuje vzniku dalších vodíkových vazeb mezi studovanými peptidy. Za předpokladu, že středy α -helixů jsou k sobě dostatečně blízko a že vodíkové vazby mezi nimi vzniknou rychleji, než se peptid začne přizpůsobovat hydrofobnímu prostředí, můžeme říci, že nejpočetnější vazby (D1 X208 – D2 Cys211, D1 Ser209 - D2 Ile204, D1 Ser212 – D2 Gly207, D1 Ser212 – D2 Cys211) vznikají mezi helixy i v prostředí přirozeném.

Právě hydrofilnímu prostředí a vlivu vzájemných interakcí přidaných okrajových lyzinů bych přisuzovala fakt, že na konci simulace molekulární dynamiky trvající 20 ns mají modelové peptidy pozměněnou strukturu (ohyby, změna vzájemné orientace). Nicméně vodíkové vazby mezi aminokyselinami přetrvávají na kontaktu helixů, odkud je voda vytěsněna.

I když se může zdát modelování ve vodném prostředí a s okrajovými lyziny jen málo vypovídající o vlastnostech a chování skutečného systému, pomůže nám předpovědět chování peptidů během experimentálního měření silové spektroskopie, které probíhalo v 0,1 % vodném roztoku SDS. Tyto podmínky byly zvoleny na základě dekonvolucí CD spekter syntetizovaného peptidu v širokém spektru roztoků. Syntetizovaný peptid neměl ve vodném roztoku α -helikální strukturu, která je podmínkou pro správné provedení experimentu a z toho vyplývající interpretaci dat naměřených silovou spektroskopií. Nejvyšší procento α -helixu měl peptid v 1% roztoku SDS. Tato koncentrace je ovšem nezvykle vysoká a proto byl pro vlastní měření silové spektroskopie použit roztok o koncentraci 0,1%. Použití nižší koncentrace by nemělo další průběh experimentu ovlivnit, protože α helikální strukturu si peptid udrží i po naředění 1 % SDS roztoku na 0,1 % SDS. (V 1 % SDS má α helikální strukturu 95.04 % peptidu, v 0,1 % SDS 81.72 %. I toto číslo je poměrně vysoké. Pokud ovšem roztok 1 % roztok SDS naředíme na 0,1 % SDS až dodatečně, α helixu je v roztoku 95,96 %.) Pokud během vlastního měření silové spektroskopie docházelo k problémům (adhezi), byly hroty omyty roztokem SDS o koncentraci 2 % a teprve potom bylo prováděno vlastní měření v 0,1 % roztoku SDS.

Abychom se alespoň přiblížili prostředí, které je pro peptid přirozené, zkusili jsme změřit jeho CD spektrum v dekanu s úmyslem použít nepolární dekan pro vlastní měření silové spektroskopie spíše než roztok SDS. I přesto, že se v dekanu nepodařilo syntetizovaný peptid rozpustit, byla některá měření silové spektroskopie v dekanu provedena. Předpokládala jsem, že při styku suchého aktivovaného povrchu slídy a AFM hrotu s dekanem bude problém s rozpuštěním peptidů vyřešen. Podařilo se detekovat specifické vazebné události, nicméně menší hustota a viskozita dekanu s sebou přinesla problémy s průběhem měření a proto nebyl těchto interakcí nalezen dostatečný počet. Přesto se nám podařilo naměřená data analyzovat. Analýza měření v dekanu poskytla téměř identické parametry k_{off} pro d1WT-d2WT v porovnání s měřením v SDS (obr. č. 26). Toto měření nám dává jistotu, že měření v SDS nám může poskytnout věrohodné informace o interakcích peptidu v modelovém prostředí, které napodobují interakce D helixů v přirozeném prostředí tylakoidní membrány.



Obr. č. 26: Graf závislosti síly vazeb mezi peptidy na rychlosti její změny, černá d1WT – d2WT v SDS, červená v dekanu

Pomocí jednoduché a následně i rozšířené teorie (Dudko 2008) aplikované na výsledky měření silové spektroskopie jsme byli schopni potvrdit, že komplexy interagujících peptidů vykazují rozdílnou stabilitu. Tímto jsme byli schopni rozlišit vliv záměny glycinu za jinou malou aminokyselinu uprostřed α helixu na interakce studovaného komplexu. Citlivost použité metody tak dosáhla maxima rozlišení mezi silnou a slabou vodíkovou vazbou. Komplex d1S-d2WT vykazoval o něco vyšší stabilitu než komplex d1WT-d2WT a tyto dva

komplexy mají výrazně menší stabilitu než d1V-d2WT. Za předpokladu, že k podobné interakci dochází i mezi odpovídajícími D helixy v PSII, můžeme usoudit, že mírné zvýšení stability vede u sinice *Synechocystis* sp. PCC 6803 pouze ke zhoršení funkce PSII jak tomu bylo pozorováno u mutantů D1-Gly208Ser. Předpokládané zpevnění vazby mezi D1 a D2 proteinem díky mutaci D1-Gly208Ser, která je přítomná u termotolerantní fazole *Vigna unguiculata* L. naopak poskytuje rostlině výhodu za stresových podmínek zvýšené teploty, kdy je zvýšená stabilizace PSII nezbytná pro přežití. Zvýšení stability silnější vazbou mezi helixy však vede k letálnímu projevu, protože mutace D1-Gly208Val nepodporuje v *Synechocystis* sp. PCC6803 fotoautotrofní růst.

6. Závěr

Podářilo se mi úspěšně propojit experimentální a teoretický přístup při řešení obtížné otázky vztahující se k obecnému problému mezimolekulárních interakcí. Na základě simulace molekulární dynamiky zjednodušeného modelu proteinů reakčního centra fotosystému II jsem formulovala hypotézu o interakci jednotlivých aminokyselin D helixů proteinů D1 a D2. Vazebná síla a stabilita předpovězené sítě interhelikálních vodíkových vazeb spojující D1 a D2 proteiny byla zkoumána experimentálně pomocí silové spektroskopie na mikroskopu atomárních sil. Výsledky obou metod zcela shodně potvrzují klíčovou roli aminokyseliny D1-Gly208 pro stabilitu a funkci fotosystému II. Ze zvýšení celkového počtu vznikajících vodíkových vazeb mezi peptidy d1V – d2WT (především vazeb D1-Val208 (O) a D2-Cys211 (O γ), D1-Ser209 (O γ) a D2-Ile204 (O), D1-Ser212 (O γ) a D2-Gly207 (O)) lze usoudit, že komplex sestávající z těchto peptidů bude stabilnější než komplex d1WT –d2WT, což se také potvrdilo měřením silové spektroskopie AFM. Analýza naměřených dat ukázala, že doba života komplexu d1V – d2WT je téměř 6 x větší než doba života komplexu d1WT – d2WT.

7. Použitá literatura

- Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. (2005) *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing
- Allen S., Rigby-Singleton S.M., Harris H., Davies M.C., O'Shea P. (2003) Measuring and visualizing single molecular interactions in biology, *Biochem Soc Trans.* 31, 1052-7
- Barber J. (2009) Photosynthetic energy conversion: natural and artificial, *Chem. Soc. Rev.* 38, 185-196
- Bell G.I. (1978) Models for the specific adhesion of cells to cells, *Science* 200, 618-627
- Binnig G., Quate C.F., Gerber C. (1986) Atomic Force Microscope, *Phys. Rev. Lett.* 56, 930–933
- Binnig G., Rohrer H. (1982) Scanning tunneling microscopy. *Surface Science* 126, 236-244
- Blankenship R.E. (2002) *Molecular Mechanism of Photosynthesis*, Blackwell Science
- Böhm G., Muhr R., Jaenicke R. (1992) Quantitative analysis of protein far UV circular dichroism spectra by neural networks, *Protein Eng.* 5(3), 191-5
- Devenish R. J., Prescott M., Rodgers A.J. (2008) The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases, *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol 267
- Dudko O.K., Hummer G., Szabo A. (2006) Intrinsic rates and activation free energies from single-molecule pulling experiments, *Phys Rev Lett.* 96(10), 108101-1-108101- 4
- Dudko O.K., Hummer G., Szabo A. (2008) Theory, analysis, and interpretation of single-molecule force spectroscopy experiments, *PNAS* 105(41), 15755-60
- Ebner A. (2007) A New, Simple Method for Linking of Antibodies to Atomic Force microscopy Tips, *Bioconjugate Chem.* 18, 1176-1184
- Eilers M., Shekar S.C., Shieh T., Smith S.O., Fleming P.J. (2000) Internal packing of helical membrane proteins, *PNAS* 97 (11), 5796-5801
- Ermolova N. V., Smirnova I.N., Kaho V.N., Kaback H.N. (2005) Interhelical packing modulates conformational flexibility in the lactose permease of *Escherichia coli*, *Biochemistry* 44(21), 7669-7677
- Greenfield N.J. (2004) CD basis handout, dostupné z <http://www.niu.edu/analyticallab/cd/handout.pdf>
- Guskov A., Kern J., Gabdulkhakov A., Broser M., Zouni A., Saenger W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat Struct Mol Biol.* 16(3), 334-42
- Han M., Lin S.W., Minkova M., Smith S.O., Sakmar T.P. (1996) Functional interaction of transmembrane helices 3 and 6 in rhodopsin. Replacement of phenylalanine 261 by alanine

causes reversion of phenotype of a glycine 121 replacement mutant, *Journal of Biological Chemistry*, 271(50), 32337-42

Hinterdorfer P. (2002) *Molecular Recognition Studies Using the Atomic Force Microscope*. In Jena B. P. et Hörber J. K. H. (Eds.) *Methods in Cell Biology*, VOLUME 68: *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*, Elsevier Science, USA

Hirai, T., S. Subramaniam, Lanyi J.K. (2009) Structural snapshots of conformational changes in a seven-helix membrane protein: lessons from bacteriorhodopsin, *Current Opinion in Structural Biology* 19(4): 433-439

Jena B. P. et Hörber J. K. H. (Eds.) (2002) *Methods in Cell Biology*, VOLUME 68: *Atomic Force Microscopy in Cell Biology*, Elsevier Science, USA

Johnson, W. C. (1990) *Protein Secondary Structure and Circular-Dichroism - a Practical Guide*, *Proteins-Structure Function and Genetics* 7, 205-214

Katsuhara, M., Hanba Y.T., Shiratake K., Maeshima M. (2008) Review: Expanding roles of plant aquaporins in plasma membranes and cell organelles, *Functional Plant Biology* 35(1), 1-14

Kodíček M., Karpenko V. (2000) *Biofyzikální chemie*, Academia

Krieger E, Darden T, Nabuurs S, Finkelstein A, Vriend G (2004) *Proteins* 57, 678-683

Kubínek R., Vůjtek M., Mašláň M. (2003) *Mikroskopie skenující sondou*, Vydavatelství Univerzity Palackého v Olomouci

Landolt-Marticorena C., Williams K. A., Deber Ch. M., Reithmeier R. A. F. (1993) Non-random distribution of amino acids in the transmembrane segments of human type I single span membrane proteins, *Journal of Molecular Biology*, 229, 602-608

Lemmon M. A., Engelman D. M. (1994) Specificity and promiscuity in membrane helix interactions. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 27, 157-218

Lodish, Berk, Kaiser, Krieger, Scott, Bretscher, Ploegh, Matsudaira, *Molecular Cell Biology*, Sixth Edition, W.H. Freeman and Company, New York, USA

Merkel R., Nassoy P., Leung A., Ritchie K., Evans E. (1999) Energy landscapes of receptor-ligand bonds explored with dynamic force spectroscopy, *NATURE* 397 (6714), 50-53

Möller C., Allen M., Elings V., Engel A., Müller D.J. (1999) Tapping-Mode Atomic Force Microscopy Produces Faithful High-resolution Images of Protein Surfaces, *Biophysical Journal* 77, 1150-1158

Nezbeda I., (2007), *The Art of Molecular Simulations From principles to applications*, Přírodovědecká fakulta Univerzity J. E. Purkyně v Ústí nad Labem

Nezbeda I., Kolafa J., Kotrla M. (2003) *Úvod do počítačových simulací (Metody Monte Carlo a molekulární dynamiky)*, Karolinum, Praha

Ponder J.W., Case D.A. (2003) *Force Fields for Protein Simulations*, Elsevier

- Prosser V. a kol (1989) Experimentální metody biofyziky, Academia, Praha
- Rankl C. (2008) Doctoral Thesis, Institute of biophysics, JK Univerzity, Linz, Attachment of Rhinoviruses to cell receptors investigated by Single Molecule Force Spectroscopy
- Raybaud A., Dodier Y., Bissonnette P., Simoes M., Bichet D.G., Sauvé R., Parent L. (2006) The role of the GX9GX3G motif in the gating of high voltage-activated Ca²⁺ channels, *The Journal of Biological Chemistry* 281(51), 39424-36]
- Reich Z., Kapon R., Nevo R., Pilpel Y., Zmora S., Scolnik Y. (2001) Scanning force microscopy in the applied biological sciences, *Biotechnology Advances*, Volume 19, 451-485
- Russ W.P., Engelman D.M. (2000) The GxxxG motif: A framework for transmembrane helix-helix association, *Journal of Molecular Biology*, 296 (3), 911-919
- Sader J. E., Chon J. W. M., Mulvaney P. (1999) Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers, *Rev. Sci. Instrum.* 70, 3967
- Senes A., Gerstein M., Engelman D.M. (2000) Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: The GxxxG motif occurs frequently and association with β -branched residues at neighboring positions, *Journal of Molecular Biology*, 296 (3), 921-936
- Shlyk-Kerner O. (2006) Ph.D. Thesis, The Weizmann Institute of Science, The Contribution of Small Amino Acids at the D1/D2 Interface to the Functional Flexibility and Temperature Adaptation of Photosystem II Reaction Center.
- Shlyk-Kerner O., Samish I., Kaftan D., Holland N., Sai P.S., Kless H., Scherz A. (2006) Protein flexibility acclimatizes photosynthetic energy conversion to the ambient temperature, *Nature* 442, 827-30
- Schlick T. (2002) *Molecular Modeling and Simulation, An Interdisciplinary Guide*, Interdisciplinary Applied Mathematics vol. 21, Springer
- Sowa Y., Berry R. M.(2008) Bacterial flagellar motor, *Quarterly Reviews of Biophysics* 41(2): 103-132
- Tao Y. X. (2006) Inactivating mutations of G protein-coupled receptors and diseases: Structure-function insights and therapeutic implications, *Pharmacology & Therapeutics* 111, 949-973