

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**NMR a jeho využití pro testování
biologické aktivity látek**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Jakub Hodulák
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2017

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jakub Hodulák
Název práce	NMR a jeho využití pro testování biologické aktivity látek
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Nukleární magnetická rezonanční spektroskopie je unikátním nástrojem pro sledování molekulárních interakcí v roztoku a jako taková si získala nezastupitelné místo v oblasti detekce a charakterizace interakcí nízkomolekulárních látek s většími makromolekulami. Experimenty z pohledu ligandu jsou hojně využívány v rámci vývoje léčiv a mohou tak přispět k vyšší efektivitě v této oblasti.</p> <p>Tato práce se zaměřuje na zavedení metody, s využitím nukleární magnetické rezonance, pro rychlé a efektivní testování velkého množství biologicky aktivních látek, které jsou na místním pracovišti <i>de-novo</i> syntetizovány. Jako cílový protein byl vybrán <i>AtCKX2</i>, který je ze všech CKX isoform nejvíce studovaným a také nejvíce zastoupeným proteinem v <i>Arabidopsis thaliana</i>.</p> <p>.</p>
Klíčová slova	Nukleární magnetická rezonance, STD, NOE, CKX2, SAR.
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Jakub Hodulák
Title of thesis	NMR and its application in bioassays
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Tomáš Pospíšil, Ph.D.
The year of presentation	2017
Abstract	<p>Nuclear magnetic resonance is a unique tool to study molecular interactions in solution, which gained an irreplaceable place for detection and characterization of interactions between small organic compounds and larger macromolecules. Ligand-based NMR experiments are used in drug discovery, where they are making the research more effective.</p> <p>This diploma thesis is focused on application of nuclear magnetic resonance spectroscopy for rapid and effective testing of large number of small molecules and their interactions with protein. As a target protein was chosen <i>AtCKX2</i>, which is the most studied and the most abundant CKX's isoforms in <i>Arabidopsis thaliana</i>.</p>
Keywords	Nuclear magnetic resonance, STD, NOE, CKX2, SAR.
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Tomáše Pospíšila, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

Poděkování:

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu diplomové práce Mgr. Tomáši Pospíšilovi, Ph.D. za cenné rady, ochotu a trpělivost nejen při řešení této diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat paní Mgr. Zuzaně Pěkné z oddělení chemické biologie a genetiky – CRH, za pomoc při purifikaci proteinu. Můj dík putuje i k zaměstnancům firmy Jeol, konkrétně Mgr. Michalu Maloňovi, Ph.D., za pomoc při optimalizaci pulzních sekvencí.

A v neposlední řadě patří můj dík mé rodině, za bezmeznou podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1	Úvod a cíle práce.....	8
2	Současný stav řešené problematiky	9
2.1	Nukleární magnetická rezonance	9
2.1.1	Od historie po současnost	9
2.1.2	Princip	10
2.1.2.1	Relaxace	13
2.1.2.1.1	Podélná relaxace	14
2.1.2.1.2	Příčná relaxace.....	14
2.1.3	Jaderný Overhauserův efekt (Nuclear Overhauser Effect – NOE)	15
2.1.4	Biomedicinální výzkum	22
2.2	Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa	28
3	Materiál a metodika	32
3.1	Chemikálie	32
3.2	Pracovní postupy	33
3.2.1	Příprava CKX enzymu	33
3.2.2	Nukleárně magnetická rezonanční spektroskopie	33
3.2.2.1	Příprava vzorků pro STD experimenty	34
3.2.2.1.1	HSA	34
3.2.2.1.2	CKX2	34
3.2.2.2	STD experiment	35
3.2.3	Zpracování výsledků.....	36
4	Výsledky	38
4.1	STD Build-up experiment.....	38
4.2	Určení hodnoty K_D	40
4.3	Aplikace STD experimentu pro testování ligandů u CKX2	42

5	Diskuze.....	47
6	Závěr	55
7	Literatura	56

1 Úvod a cíle práce

S boomem v oblasti sekvenačních metod nové generace přišel do módy termín „personalizovaná medicína“, která otevřela dveře pro nová léčiva. Bohužel v následujících letech tento trend pomalu ustupoval, i přestože počet nově objevovaných potencionálních terapeutických cílů stále narůstal. Jako důvod se jevila přílišná komplexnost a finanční náročnost *de novo* vývoje léčiv (Cuatrecasas P, 2006), což ovšem otevřelo cestu pro vývoj nových, a hlavně efektivnějších metod. Jednou z těchto metod, která se začala na poli vývoje léčiv uplatňovat, je nukleární magnetická rezonanční spektroskopie. Hlavně z důvodu svojí robustnosti si postupně našla cestu do všech vývojových fází (Jahnke W, Widmer H, 2004). Největším přínosem je ovšem na poli detekce interakcí mezi léčivem a biomakromolekulou. Existuje celá řada experimentů, jako jsou STD (Mayer M, Meyer B, 1999), WaterLOGSY (Dalvit C et al., 2000; Dalvit C et al., 2001), či heteronukleární 2D HSQC (Maurer T et al., 2012), které tyto mezi-molekulové interakce charakterizují. Využití těchto metod se postupně rozšířilo i mimo biomedicíální výzkum a dnes se uplatňují ve všech oborech, kde dochází k intermolekulovým vazebným interakcím.

Cílem této diplomové práce s názvem „NMR a jeho využití pro testování biologické aktivity látek“ je zavedení rychlé a účinné metody pro detekci interakcí nízkomolekulárních látek s vybraným rostlinným enzymem cytokinin oxidázou (AtCKX2, CKX2) pomocí nukleární magnetické rezonance na oddělení chemické biologie a genetiky v Centru regionu Haná pro zemědělský a biotechnologický výzkum.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Nukleární magnetická rezonance

2.1.1 Od historie po současnost

S pojmem nukleární magnetické rezonance se poprvé setkáváme v práci Nizozemského fyzika Gortera (1936), ve které popsal fenomén magnetické rezonance, ale nedokázal ji prakticky prokázat. Na jeho poznatky navázal o rok později další fyzik I. I. Rabi (1937), který již zdárně v praxi nukleární magnetickou rezonanci aplikoval a je tedy považován za jejího objevitele.

Opomeneme-li obecné fyzikální poznatky, potom tedy mezi jeden z prvních objevů vedoucích k metodě nukleární magnetické rezonanční spektroskopie můžeme zařadit práci Wolfganga Pauliho (1927), který v ní formuloval rovnici pro částice se spinem $-1/2$, při jejich interakci s externím elektromagnetickým polem.:

$$\left[\frac{1}{2m} (\boldsymbol{\sigma} \times (\mathbf{p} - q\mathbf{A}))^2 + q\phi \right] |\psi\rangle = i\hbar \frac{\partial}{\partial t} |\psi\rangle, \quad (1)$$

Pauliho rovnice (Rovnice (1)) vychází z nerelativistické Schrödingerovy rovnice, je ovšem obohacena o relativistickou část z Diracovy rovnice, která predikuje částicový spin.

V následujících letech, po zveřejnění práce I. I. Rabiho, byl další vývoj poznamenán obdobím světového konfliktu. Ovšem v návaznosti na rychlý vývoj radarových technologií během druhé světové války, se na přelomu let 1945 a 1946, dvěma na sobě nezávislým týmům okolo E. M. Purcella (1946) a F. Blocha (1946) poprvé podařilo úspěšně pozorovat fenomén nukleární magnetické rezonance. Tým vedený F. Blochem využil měření v roztoku, zatímco Purcellův tým měřil pevné skupenství. V následujících letech nabral vývoj NMR velkou rychlost, v roce 1949 byl objeven chemický posun (Proctor WG, Yu FC, 1950), v roce 1958 bylo detekováno spektrum ve vysokém rozlišení měřené v pevné fázi pod magickým úhlem (Andrew ER, et al., 1959) a v roce 1966 byla R. R. Ernstem využita Fourierova transformace, která dala podobu záznamu výsledných spekter tak, jak je známe dnes. Během sedmdesátých a osmdesátých let byly popsány

pulzní sekvence pro 2D experimenty, jež byly ve stejném období i úspěšně demonstrovány.

Milníkem pro využití NMR v lékařství byl rok 1972, kdy byl poprvé proveden MRI (magnetic resonance imaging) experiment. Se zvyšující se silou magnetů a využitím 2D experimentů se poprvé podařilo, v roce 1978 (Wagner G, Wüthrich K), určit strukturu proteinu pomocí NMR.

V dnešní době se fenomén NMR využívá při studiu struktur chemických látek (přírodních i syntetizovaných), mechanismů reakcí a dále také pro studium struktury nových materiálů. V biologických oborech pak pro studium protein-protein interakcí, určování 3D struktur peptidů, enzymové kinetiky, vývoje léčiv či zobrazování.

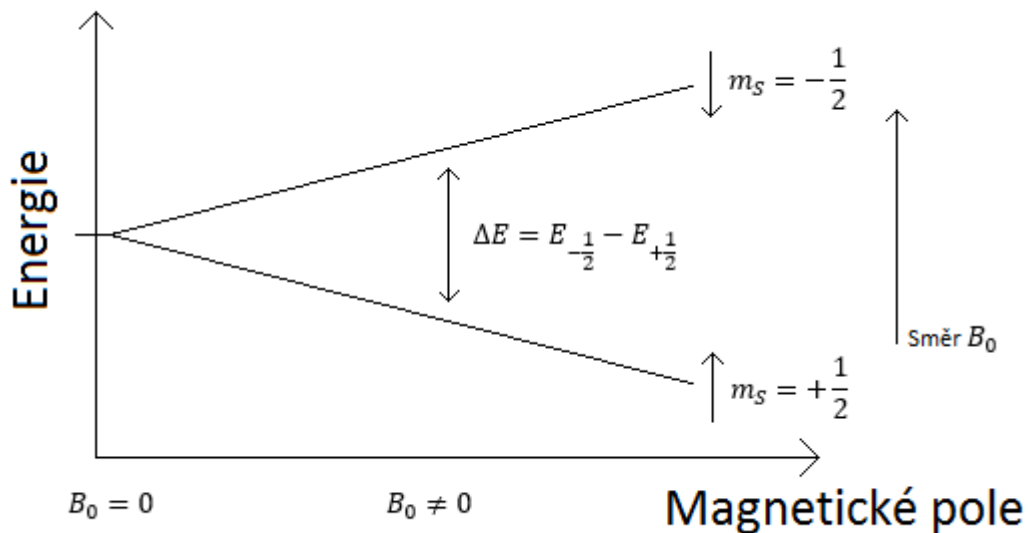
2.1.2 Princip

Co rozhoduje o tom, zda bude atom poskytovat NMR signál? Každý atom je složený ze subatomárních částic, které mají magnetické vlastnosti, a právě ty mohou být využity k pozorování atomu. Podle kvantové mechaniky mají subatomární částice (proton, neutron, elektron) jistou vnitřní formu hybnosti, spin. U některých atomů (^{12}C , ^{16}O , ^{32}S) se sudým počtem protonů i neutronů, se spiny spárují, navenek nevykazují žádný magnetický moment (μ) (Rovnice (2)) a tudíž jsou pro NMR experimenty nepoužitelné. Oproti tomu, pokud je součet protonů i neutronů lichý, atomové jádro vykazuje nenulové spinové kvantové číslo (I), v tomto případě $\frac{1}{2}$ (rotující koule), a je tudíž aktivní v NMR experimentu. Příkladem těchto atomů jsou ^1H , ^{13}C , ^{31}P , ^{15}N , ^{19}F . Poslední možností, která může nastat, je, že protonové i neutronové číslo je liché. V takovém případě je spinové kvantové číslo větší nebo rovno 1 (rotující elipsoid). Ale i tyto jádra atomů vykazují magnetický moment a jsou tedy detekovatelné v NMR experimentu.

$$\mu = \gamma \times \hbar \times I \quad (2)$$

Rovnice (2) Magnetický moment charakterizovaný jako násobek gyromagnetického poměru, redukované Planckovy konstanty a spinového kvantového čísla.

Předtím, než jsou jádra vložena do magnetického pole přístroje (B_0), se vyskytují v takzvaném základním stavu, kdy spiny nejsou uspořádány a není mezi nimi žádný energetický rozdíl. Po vložení do silného magnetického pole, dojde k seřazení magnetických momentů jader rovnoběžně po a proti směru vnějšího magnetického pole (Zeemanův jev) (Obr. 1).



Obr. 1 Energetický rozdíl spinových stavů v závislosti na velikosti vnějšího magnetického pole B_0 .

Pro zjednodušení budou brána v potaz pouze jádra s $l = 1/2$, protože pro tyto jádra existují pouze dvě energetické hladiny, charakterizované kvantovým číslem m . Dle kvantové mechaniky může m nabývat pouze hodnot od $-l$ do l v celočíselných krocích. Takže v tomto případě jsou možné pouze hodnoty $m = -1/2$ a $+1/2$. Na základě Boltzmannova zákona (Rovnice (3)):

$$N_{+1/2} / N_{-1/2} = e^{\Delta E / kT}, \quad (3)$$

kde N je populace spinového stavu, ΔE je energetický rozdíl mezi oběma stavy, T je teplota (K) a k je Boltzmannova konstanta, bude mírně převažovat orientace ve směru magnetického pole ($m = +1/2$). Rozdíl energií (ΔE) je poté dán vztahem (Rovnice (4)):

$$\Delta E = \frac{h\gamma B_0}{2\pi}, \quad (4)$$

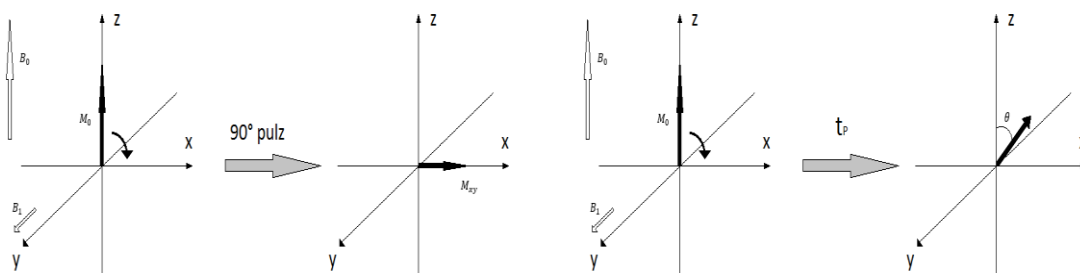
kde h je Planckova konstanta, γ je gyromagnetický poměr (charakteristický pro každé jádro).

Magnetický moment rotujícího jádra není orientován pouze staticky paralelně (antiparalelně), ale koná takzvaný precesní pohyb, který je charakterizován úhlovou (Larmorovou) frekvencí danou vztahem (Rovnice (5)):

$$\omega_0 = \gamma \times B_0. \quad (5)$$

Tímto procesem generuje elektrické pole s frekvencí ω_0 . Pokud v této chvíli aplikujeme elektromagnetické záření (radiové vlnění, MHz) B_1 a jeho frekvence dosáhne stejné hodnoty jako je Larmorova frekvence daného jádra ($\omega_0 = \omega_1$), nastane emise nebo absorpce záření v závislosti na energetickém spinovém stavu. Jak již bylo zmíněno dříve, mírně převažují jádra ve spinovém stavu $+1/2$ s nižší energií, proto bude ve výsledku převažovat absorpce. Jádra budou přecházet z nižší energetické hladiny do vyšší. Tento proces se nazývá rezonance, protože frekvence aplikovaného záření a precesní frekvence se shodují neboli rezonují.

Skupinu stejně orientovaných spinů ve směru osy z můžeme nahradit společným vektorem magnetizace M . Jeho velikost je závislá na vnějším magnetickém poli, kdy při $B_0 = 0 = M$. Interakcí jaderných spinů s externím radiofrekvenčním zářením (B_1 , ve směru osy y) je vyvoláno vychýlení vektoru magnetizace M od osy z (od směru vektoru vnějšího magnetické pole B_0) směrem k ose x . (Obr. 2).



Obr. 2 Schéma sklápění vektoru magnetizace M v závislosti na délce radiofrekvenčního pulzu.

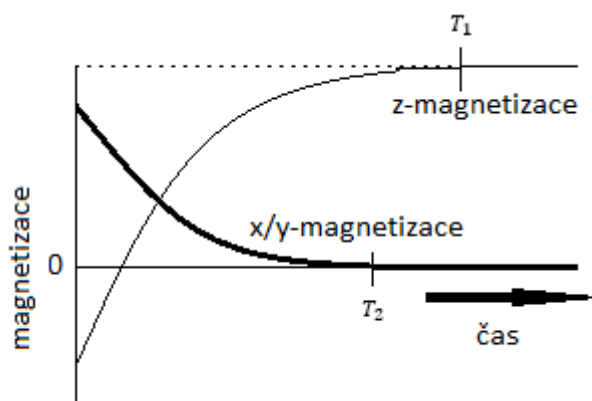
V závislosti na délce působení radiofrekvenčního pulzu (t_p), dochází k růstu velikosti sklápěcího úhlu θ , dle vztahu (Rovnice (6)):

$$\theta = \omega \times t_p = \gamma \times B_1 \times t_p. \quad (6)$$

Po přerušení radiofrekvenčního pulzu začnou vektory magnetizace relaxovat zpět do původní pozice, která je rovnoběžná s osou z . Během relaxace koná vektor magnetizace rotační pohyb okolo osy z a v určitých fázích dosahuje rozdílných hodnot v ose x (pokles magnetizace do nuly, poté dosahuje maximální záporné hodnoty a vrací se zpět přes nulu do maximální kladné hodnoty). Změny jsou periodické, a pokud je zasadíme do časové osy, můžeme pozorovat typickou kosinusoidu se snižující se amplitudou. V přístroji tyto změny magnetizace indukují odpovídající kmitavé napětí v detekční cívce a hovoříme o „free induction decay“ (FID). Pokud aplikujeme na získanou kosinusoidu Fourierovu transformaci bude výsledkem spektrum závislosti intenzity absorbovaného záření na jeho frekvenci.

2.1.2.1 *Relaxace*

Relaxací je myšlen proces, při němž se magnetický moment jádra navrácí do svého rovnovážného stavu, ze kterého byl vychýlen aplikací radiofrekvenčního záření (Marion D, 2013). Rozlišujeme dva druhy relaxace, spin-mřížkovou relaxaci (podélnou) a spin-spinovou relaxaci (příčnou) (Popa I, 2012). Magnetický spin relaxuje oběma druhy současně, rozdílem je, že podélné magnetizace se navrácí do rovnováhy ve směru osy z (rovnováha s nadbytkem spinů $+1/2$), s časovou konstantou T_1 . Na druhou stranu příčná relaxace má svoji rovnováhu v 0 (hodnota nulové magnetizace), které dosáhne za časovou konstantu T_2 (Obr. 3) ve směru os x a y .



Obr. 3 Schéma vývoje relaxací magnetického spinu pro jednotlivé směry v osách z a x - y v čase do jejich dosažení rovnováhy.

Proces relaxace je sám o sobě přirozený, bez nutnosti vnějšího zásahu (Keeler J, 2010).

2.1.2.1.1 Podélná relaxace

Budeme-li hovořit o spin-mřížkové relaxaci, jedním z vlivů na dosažení rovnováhy má mechanismus nazvaný „lokální pole“. Tento jev je způsoben samovolným vznikem oscilačního pole, které vytváří pohybující se částice ve vzorku a které má, stejně jako aplikované radiofrekvenční záření, schopnost interagovat s magnetickými momenty a tím je vychylovat z rovnovážné polohy. Takto vychýlené spiny generují magnetické pole, jež v závislosti na vzdálenosti od sledovaného jaderného spinu, větší či menší měrou ovlivňují jeho velikost a směr. Vzhledem k interakci dvou spinů, se tento mechanismus taktéž nazývá jako dipól-dipólový.

Nejenom jaderné spiny mohou generovat magnetické pole, ale jsou to i nepárové elektrony, které vytváří lokální magnetická pole. Magnetický moment elektronu je o poznání vyšší než magnetický moment protonu. Z tohoto důvodu je i generované magnetické pole silnější a v procesu relaxace zaujímá nezanedbatelné místo i přes nízké koncentrace nepárových elektronů.

Jak je z názvu relaxace patrné, nedílnou součástí je interakce spinu s jeho okolím (mřížkou), jež probíhá pomocí molekulárního pohybu. Při této interakci ztrácí spin energii, získanou absorpcí, ve formě tepla.

2.1.2.1.2 Příčná relaxace

Spin-spinová relaxace je stejně jako spin-mřížková relaxace ovlivněna mechanismem „lokálních polí“. Jejich vliv je jak tzv. sekulární tak i nesekulární (Keeler J, 2010). Sekulárním vlivem se nazývá ovlivnění pocházející z vnějšího pole B_0 obohaceného o z -složku z „lokálních polí“. Za nesekulární pak příspěvek zmenšování průmětu magnetizace do roviny x,y při sklápění magnetizace do osy z . V důsledku nehomogenity pole dochází k rozdílům v precesních frekvencích jednotlivých spinů, a z toho důvodu se jejich fáze stávají nahodilými (Popa I, 2012). Tento jev má vliv na chemickou výměnu a způsobí rozšíření signálu ve spektru.

2.1.3 Jaderný Overhauserův efekt (Nuclear Overhauser Effect – NOE)

V roce 1953 byla poprvé popsána nová metoda polarizace jader Albertem W. Overhauserem (1953), při jeho studiu polarizace jader kovů. Overhauser se ve své práci zabýval změnami intenzit rezonančních signálů jednotlivých jader, při ozáření jiného jádra radiofrekvenčním zářením. Nejedná se tedy o změny v chemických posunech, které vznikají na základě spin-spinových interakcí skrze elektrochemické vazby, ale o změny způsobené přenosem magnetizace z jednoho jádra na druhé skrze prostor. Využívá se dipól-dipólové relaxace a vícenásobné rezonance, kdy je jedno ze dvou prostorově blízkých jader (<5 Å) saturováno zářením, způsobující rozdílnou distribuci magnetických momentů (Boltzmannovy populace) druhého jádra (Popa I, 2012). Projevem této redistribuce je změna v rezonanční intenzitě. Dokladem budiž diferenciální Solomonova rovnice míry změny v \underline{z} -magnetizaci (Rovnice (7)):

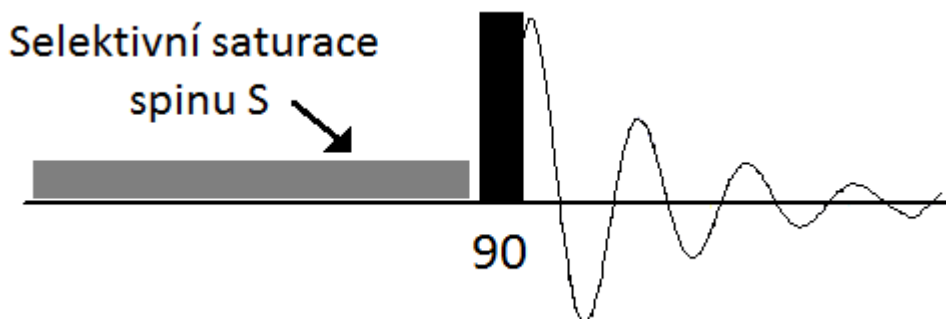
$$\frac{dI_{1z}}{dt} = -R_z^{(1)}(I_{1z} - I_{1z}^0) - \sigma_{12}(I_{2z} - I_{2z}^0), \quad (7)$$

kteřá říká, že pokud spin dva není v rovnováze ($I_{2z} - I_{2z}^0 \neq 0$), míra změny v \underline{z} -magnetizaci u spinu jedna bude mít hodnotu podílu $\frac{dI_{1z}}{dt}$, jež je úměrný křížové relaxaci σ_{12} (změna stavu jednoho spinu ovlivňuje stav spinu druhého a naopak) a rozsahu odchylky druhého spinu od rovnováhy v ose \underline{z} .

Pokud budeme uvažovat dvouspinový systém, ve kterém tyto dva spiny sdílejí dipolární vazbu, ale ne vazbu chemickou (J-coupling), pak v případě stejných jader jde o homonukleární NOE (H_s, H_l) a v druhém případě rozdílných jader heteronukleární NOE (např. H_x, N_y), Bude-li populace spinů jednoho jádra (S) vychýlena z rovnováhy, budeme stejný efekt pozorovat na intenzitě signálu spinu druhého jádra I. NOE bude definováno jako změna intenzity $\eta\{S\}$, dle vztahu (Rovnice (8)):

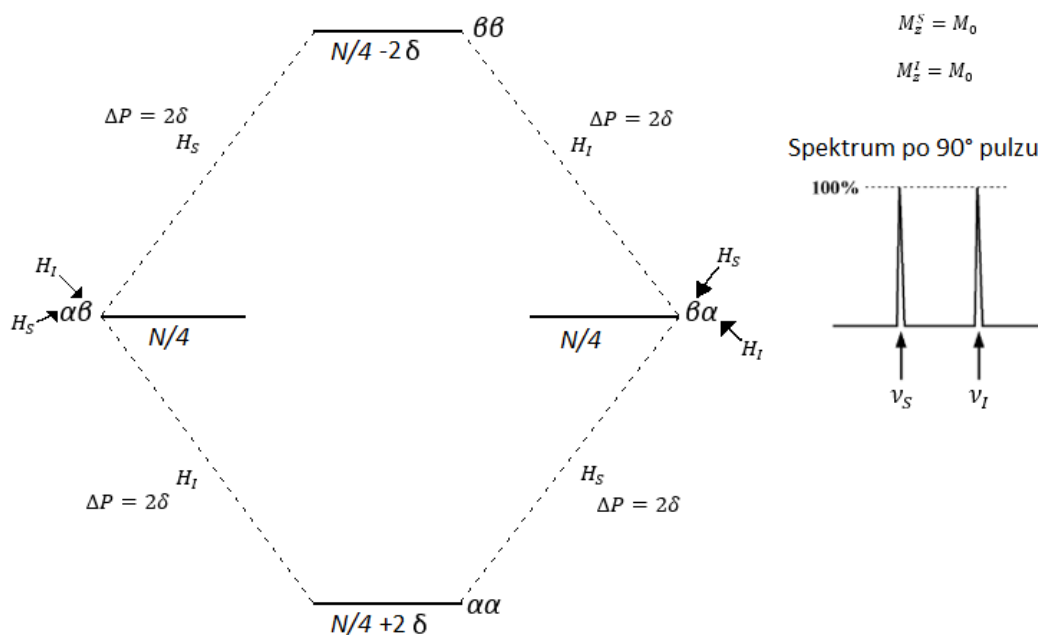
$$\eta\{S\} = \frac{I - I_0}{I_0} \times 100\%. \quad (8)$$

Podrobněji se dá NOE popsat na nejjednodušším NOE experimentu, kterým je „steady state“. Selektivně se zde saturuje spin S, a následně je aplikován 90° pulz, díky kterému pozorujeme změnu u populace spinů I (Obr. 4).



Obr. 4 Diagram pulzní sekvence NOE steady state experimentu.

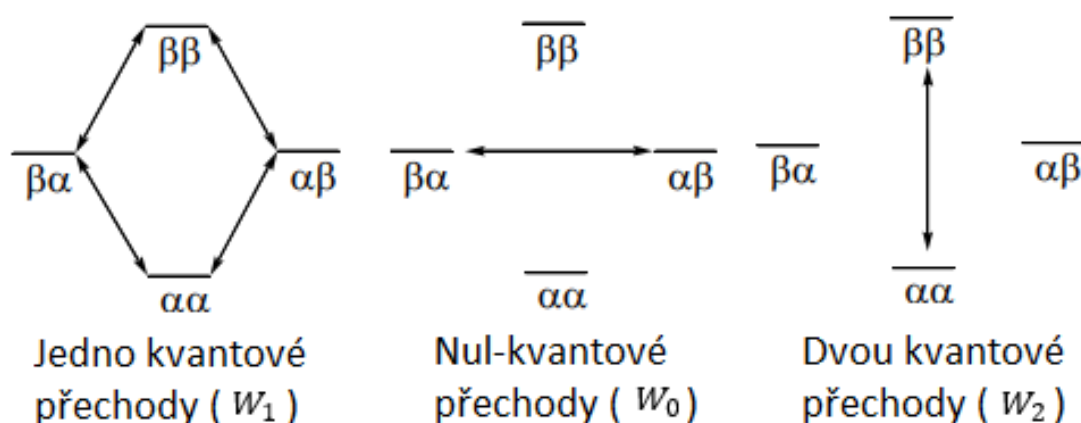
Dokud je systém v rovnováze, rozdíly mezi energetickými stavy jsou určeny na základě Boltzmanovy distribuce (Obr. 5) a dovolené přechody mezi nimi jsou pouze jedno kvantové (Obr. 6).



Obr. 5 Energetický diagram normálního dvou spinového systému. H_S a H_I označují protonová jádra s frekvencemi ν_S a ν_I ; α reprezentuje spinové populace na nižší energetické hladině, β značí populace na vyšší energetické hladině; ΔP je symbolem pro rozdíl v počtu spinů mezi energetickými hladinami; δ charakterizuje určitý počet spinů; $N/4$ značí rovnoměrné rozdělení spinů do všech energetických stavů; M_0 udává hodnotu magnetizace ve stavu rovnováhy, M_z^S a M_z^I jsou specifické hodnoty magnetizace pro jednotlivá jádra H_S a H_I .

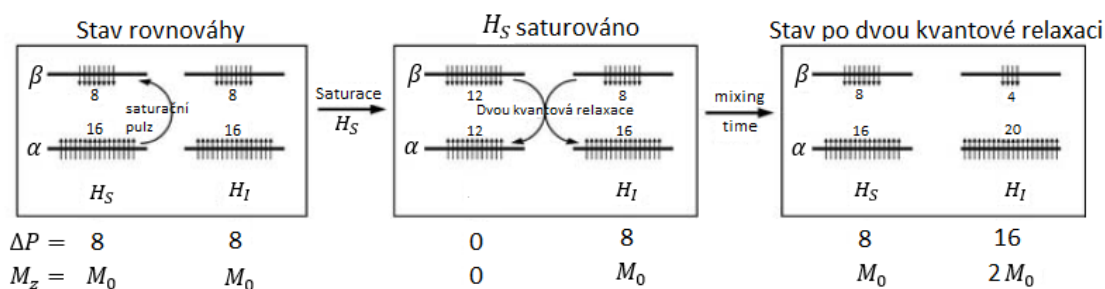
Ozáříme-li jedno z jader (H_S) selektivním nízko energetickým pulzem, bude toto jádro vyvedeno z rovnováhy, protože populace spinů α (nižší energie) a β (vyšší

energie) budou shodné (Jacobsen NE, 2007). Z pohledu H_s , bude H_I kolem H_s vykonávat rotační pohyb a oscilovat pro molekulu charakteristickou frekvencí, která je blízká Larmorově frekvenci. Z důvodu oscilačního pohybu H_I bude na H_s působit vznikající magnetické pole, jež zapříčiní pokles spinové populace energetického stavu β ve prospěch spinové populace na nižší energetické hladině α . Toto je hlavní mechanismus pro T_1 relaxaci. Jsou pozorovány jedno kvantové přechody mezi energetickými hladinami spinových populací, ovšem bez tvoření NOE efektu.



Obr. 6 Kvantové přechody mezi jednotlivými energetickými spinovými stavy.

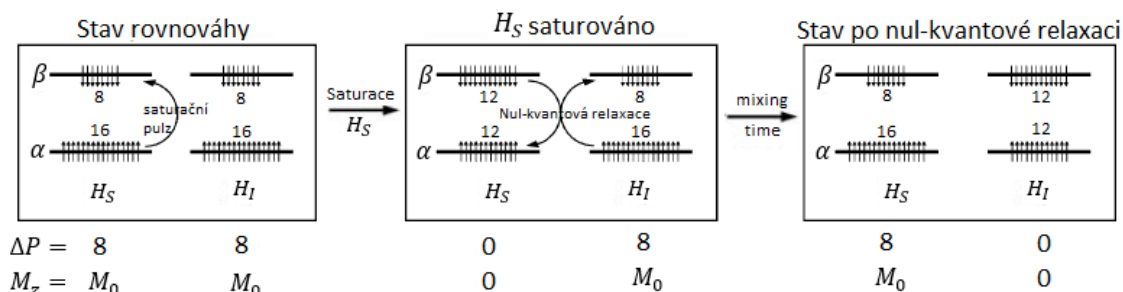
Další způsob relaxace zahrnuje přechod spinových populací u obou jader současně. Převažují-li tedy u obou jader β populace ($\beta\beta$ stav), může dojít ke společnému přechodu do $\alpha\alpha$ stavu (převaha α spinových populací). Tento přechod se nazývá jako dvou kvantový a jeho projevem je pozitivní NOE efekt. Představíme-li si extrémní situaci, kdy budeme saturovat jádro H_s , ale jako jediný z relaxačních procesů by se uplatňoval dvou kvantový přechod a. Pokaždé když bude jeden ze spinů přecházet z energeticky vyššího stavu β do stavu α , bude s sebou strhávat i spin z jádra H_I . Pro spiny z jádra H_s se bude jednat o znovuoobnovení Boltzmanovy distribuce (mírně vyšší počet spinů v energetické hladině α), ovšem pro nesaturované spiny jádra H_I , bude tato situace znamenat výrazné navýšení v téže energetické hladině α , a tudíž výsledný rozdíl mezi oběma energetickými hladinami (spinovými populacemi), a zároveň magnetizace (M_z), bude dvojnásobný (Obr. 7).



Obr. 7 Schéma změn v rozložení spinových populací na energetických hladinách α a β v důsledku saturace jednoho jádra a následné dvou kvantové relaxaci.

Když za takového stavu aplikujeme 90° pulz s následnou detekcí, budeme pozorovat, že nesaturované jádro (pík ve spektru), bude mít dvojnásobnou intenzitu píku oproti situaci bez saturace.

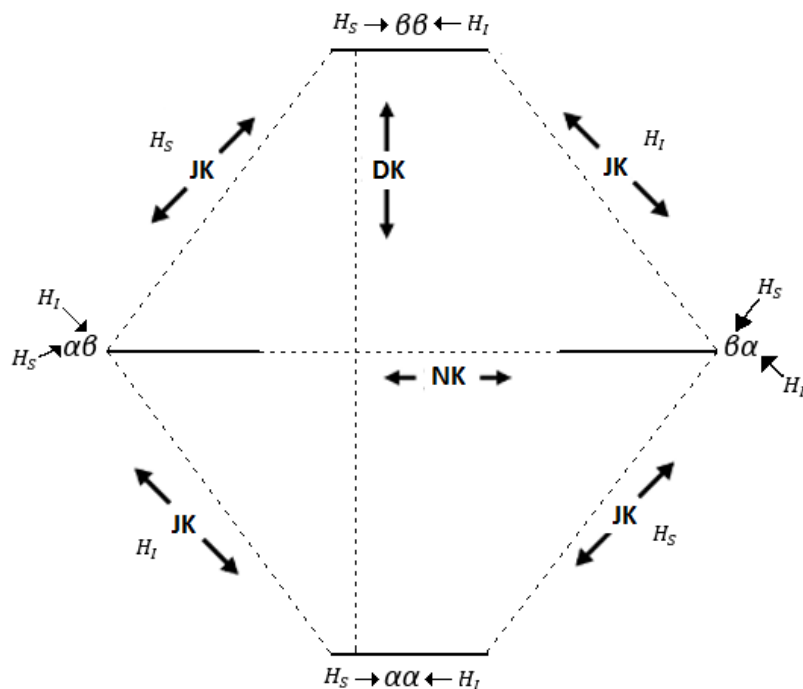
Poslední možností přechodu mezi spinovými stavy je takzvaný přechod nul-quantový. Z důvodu dipolárních interakcí je možný přechod z α do β , z β do α nebo z $\alpha\beta_S$ do $\beta\alpha_S$ (Carbajo RJ, Neira JL, 2013). Těmito přechody se snaží o zpětné dosažení rovnováhy mezi $\alpha\beta_S$ a $\beta\alpha_S$, ale ponechává populace $\alpha\alpha_S$ a $\beta\beta_S$ nezměněné. I tento kvantový přechod vytváří NOE efekt, ale negativní. Představme si opět extrémní situaci, kdy je jako jediný relaxační proces umožněn pouze jediný, v tomto případě nul-quantový spinový přechod. Po saturaci jádra H_S , začne docházet k relaxaci pomocí nul-quantového spinového přechodu, jež způsobí návrat excitovaných spinů z energetického stavu β , do stavu α . Tímto ustalováním do před saturační Boltzmanovy distribuce, způsobené molekulovými pohyby s nul-quantovou frekvencí (charakterizovanou rozdílem frekvencí dvou spinů: $\nu_0(H_S) - \nu_0(H_I)$) jsou ovlivňovány spiny jádra H_I . A to tak, že přestupují z nižší energetické hladiny α do stavu β . Výsledný rozdíl spinových populací pro jádro H_I bude nulový (Obr. 8).



Obr. 8 Schéma změn v rozložení spinových populací na energetických hladinách α a β v důsledku saturace jednoho jádra a následné nul-quantové relaxaci.

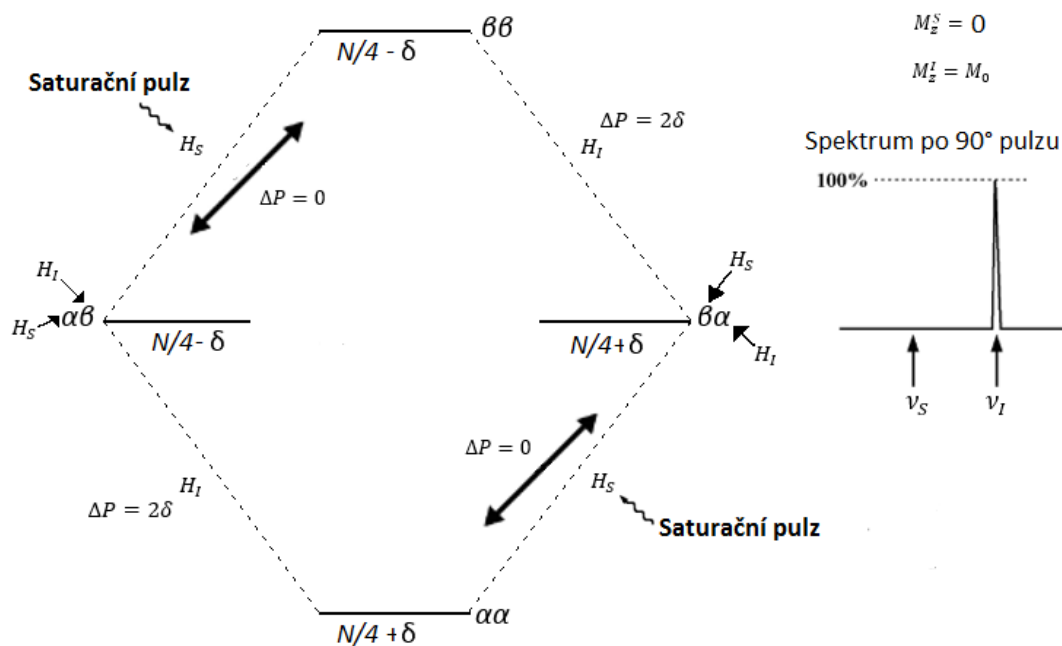
Projevem na naměřeném spektru po aplikování 90° pulzu bude snížení intenzity nesaturovaného píku H_I .

Nebudeme-li uvažovat extrémní případy, dochází u reálných vzorků ke všem typům kvantových přechodů současně. V diagramu energetických hladin u dvouspinového systému (jádra H_I a H_S) se čtyřmi spinovými stavy (Obr. 9) můžeme pozorovat jeden spin od obou jader ve stavu α ($\alpha\alpha$), to stejné u stavu β ($\beta\beta$). Další spiny z jádra H_I v α stavu a z H_S v β stavu ($\alpha\beta$) a obráceně v $\beta\alpha$. Hladina energie vzrůstá od stavu $\alpha\alpha$ a postupuje k nejvyšší hladině u stavu $\beta\beta$. V diagramu jsou zachyceny i kvantové přechody (JK – jedno kvantový; NK – nul-kvantový; DK – dvou kvantový).



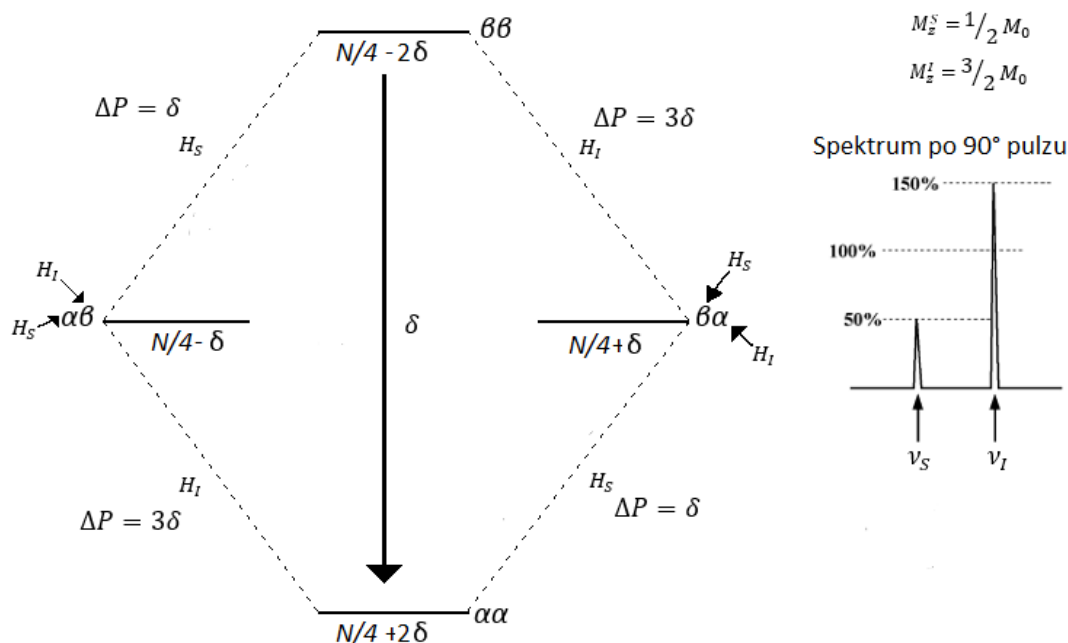
Obr. 9 Energetický diagram spinových populací dvou spinového systému se zobrazením možných kvantových přechodů.

Jak bude vypadat energetický diagram, pokud budeme kontinuálně, po určitý čas, ozařovat jedno z jader (H_S) pomocí nízko energetického záření o frekvenci ν_S ? Spiny z jaderných populací jádra H_S , ve stavu α , budou excitovány a přejdou do vyšších energetických stavů β (Obr. 10).



Obr. 10 Energetický diagram spinových populací po saturaci jádra H_s . H_s a H_I označují protonová jádra s frekvencemi ν_s a ν_I ; α reprezentuje spinové populace na nižší energetické hladině, β značí populace na vyšší energetické hladině; ΔP je symbolem pro rozdíl v počtu spinů mezi energetickými hladinami; δ charakterizuje určitý počet spinů; $N/4$ značí rovnoměrné rozdělení spinů do všech energetických stavů; M_0 udává hodnotu magnetizace ve stavu rovnováhy, M_z^S a M_z^I jsou specifické hodnoty magnetizace pro jednotlivá jádra H_s a H_I .

Tyto přechody způsobí snížení populace u $\alpha\alpha$ stavu a u $\alpha\beta$ stavu. Oproti tomu bude docházet k nárůstu populací u stavů $\beta\beta$ a $\beta\alpha$ ($\alpha\alpha \rightarrow \beta\alpha$; $\alpha\beta \rightarrow \beta\beta$). V tomto momentě je rozdíl mezi populačními stavy jádra H_I shodný s rovnovážným stavem ($\Delta P = 2\delta$). U populačních stavů jádra H_s však došlo ke změně, kde je rozdíl roven nule. To se projeví ve spektru jako vymizení píku reprezentujícího jádro H_s (s frekvencí ν_s). Nastane-li v této chvíli dvou kvantová relaxace, která se snaží o znovu nastolení rovnováhy v podobě Boltzmannovy distribuce, dojde k dalším změnám v rozdílech mezi jednotlivými populačními stavy (Obr. 11).

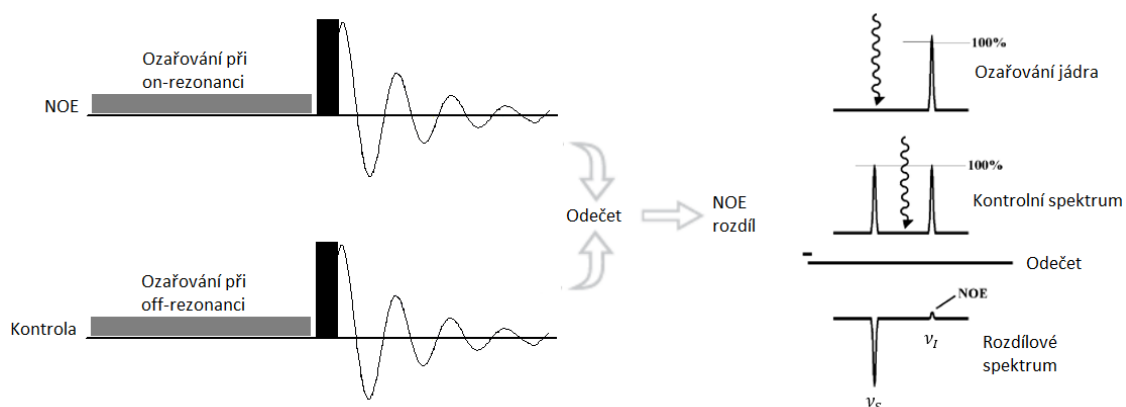


Obr. 11 Energetický diagram spinových populací při dvou kvantové relaxaci. H_s a H_l označují protonová jádra s frekvencemi ν_s a ν_l ; α reprezentuje spinové populace na nižší energetické hladině, β značí populace na vyšší energetické hladině; ΔP je symbolem pro rozdíl v počtu spinů mezi energetickými hladinami; δ charakterizuje určitý počet spinů; $N/4$ značí rovnoměrné rozdělení spinů do všech energetických stavů; M_0 udává hodnotu magnetizace ve stavu rovnováhy, M_z^S a M_z^I jsou specifické hodnoty magnetizace pro jednotlivá jádra H_s a H_l .

U jádra H_s ještě rozdíl ve spinových populacích nedosahuje hodnoty jako při rovnováze (ΔP při rovnováze pro H_s je 2δ) a naopak rozdíl v populacích u jádra H_l již převyšuje hodnotu rovnováhy (ΔP při rovnováze pro H_l je 2δ). Tento stav vyvolává změny v intenzitách jednotlivých píků ve spektru. Kdy pro jádro ν_s je z důvodu poklesu magnetizace M_z^S o polovinu, oproti stavu v rovnováze, snížena intenzita o 50 %. V opačném případě platí pro jádro ν_l nárůst magnetizace M_z^I o polovinu. Pokud tedy po saturaci jednoho jádra, které je vzdáleno od druhého sledovaného jádra méně než 5\AA , pozorujeme snížení intenzity ozařovaného jádra o 50 % a naopak neozařované jádro vykazuje nárůst intenzity o stejný procentuální podíl, můžeme, zjednodušeně, označit NOE efekt za přenos z magnetizace mezi sledovanými jádry.

Jak již bylo zmíněno, nejjednodušším NOE experimentem, je steady state experiment. Mezi historicky první se řadí NOE difference. Princip tohoto experimentu spočívá v tom, že jedno jádro je saturováno nízkou energetickou kontinuální vlnou o stejné frekvenci, jako je jeho vlastní, po dobu několika sekund. Během této doby, dochází ke zvyšování NOE efektu na prostorově blízkém jádru,

až do dosažení ustáleného stavu, v němž se již magnetizace dále nezvyšuje. Po uplynutí periody ozařování je aplikován 90° tvrdý pulz, který vychýlí všechny jádra ve vzorku a díky následné precesi je generován signál FIDu. Ozářené jádro neposkytuje téměř žádný signál, protože v době aplikace tvrdého pulzu byla jeho magnetizace v ose z téměř nulová. Nárůst intenzity blízkého jádra není v reálných měřeních nikterak výrazná, ovšem pokud bude změřeno i referenční spektrum (Off-resonance) lišící se ve frekvenci pulzu s nízkou energií (ideálně někde na okraji spektra) a poté bude matematicky odečteno od NOE spektra, dostaneme spektrum rozdílové (Obr. 12).



Obr. 12 Princip vzniku rozdílového NOE spektra.

V průběhu času byly vyvinuty další a daleko robustnější pulzní sekvence, jež zkrátily čas experimentu a poskytují daleko uhlazenější spektra. Ovšem původní smysl využití NOE efektu zůstává i nadále stejný, a to je snaha zachytit interakce přes prostor, čehož se využívá v konformační analýze biomolekul, stereochemii, určování mezijaderných vzdáleností a v neposlední řadě můžeme díky tomuto efektu detekovat a následně charakterizovat vazebné interakce mezi jednotlivými biomolekulami.

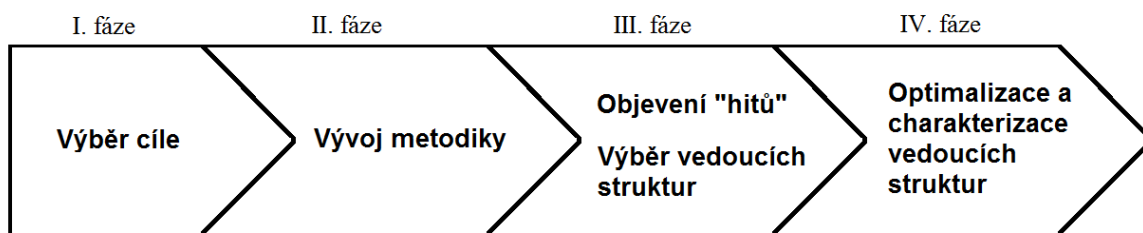
2.1.4 Biomedicinální výzkum

Krátce po úspěšném osekvcování lidského genomu, se ve světě medicíny dostal na výsluní termín „personalizovaná medicína“, což mělo za následek nebývalý nárůst nových farmaceutických léčiv cílících na celou řadu chorob (Stark J L, Powers R, 2011). Ovšem po necelých deseti letech začal tento trend pomalu ustupovat. Nehledě na stále nové terapeutické cíle, se množství nově schválených

farmaceutických léčiv snížilo o bezmála polovinu. Vysvětlení se nabízí hned několik, ale jedno z nich je nejvíce nasnadě. Vývoj *de novo* léčiva je velmi komplexní, stojí mnoho úsilí a v neposlední řadě je extrémně drahý. Vždyť 80-90 % léčiv skončí ve fázi klinického testování a na trh se vůbec nedostane (Cuatrecasas P, 2006). Tyto a další problémy vedou nutně k přehodnocení a k následným změnám vývojové fáze tak, aby se vývoj léčiv stal co nejvíce efektivní.

Prvotním krokem při vývoji léčiva je výběr proteinového cíle. Samotné informace z bioinformatické analýzy, v podobě znalosti sekvence genů, nestačí jako odůvodnění výběru právě tohoto cíle (White R H, 2006). Bezesporu je potřebná i znalost kvartérní struktury, jež může poskytnout vhled do molekulárních procesů a prozradit biologickou funkci, či způsob zapojení proteinu do dějů způsobujících dané onemocnění. Informace o struktuře mohou též v dalších fázích napomoci k lepšímu porozumění a popisu ligand-vazebných interakcí (metoda SAR – Structure Activity Relationship), což povede k usnadnění výběru vedoucí molekuly léčiva a její další optimalizaci pro vyšší specifitu a efektivitu. V dnešní době je primární metodou vedoucí k identifikování vedoucí molekuly takzvaný *high-throughput screening* (HTS), kdy je proskenováno obrovské množství látek, v co možno nejkratším čase a co nejlevněji. Tyto metody ovšem poskytují velké procento falešně pozitivních výsledků (Rishton G M, 1997), proto je cílem vyvíjet alternativní metody, které povedou k usnadnění této fáze ve vývoji léčiv (Macarron R, 2006).

Jeden z přístupů založený na vztahu struktura-aktivita, který zefektivňuje proces vývoje léčiv, se nazývá SAR pomocí nukleární magnetická rezonanční spektroskopie (Powers R, 2009; Shuker S B, 1996). NMR přímo detekuje interakce mezi ligandem a proteinem (či jinou biomakromolekulou). Analýza vzorku probíhá v nativních podmínkách, přičemž je možné otestovat až stovky vzorků během jednoho dne. Taktéž informace o vazebném místě spolu s vazebnou afinitou jsou snadno zjistitelné. Pro svoji robustnost se dnes NMR analýza využívá ve všech fázích vývoje léčiva (Jahnke W, Widmer H, 2004) (Obr. 13).



Obr. 13 Čtyři fáze ve vývoji léčiva.

První fáze vývoje léčiva již byla zmíněna dříve, je to výběr proteinového cíle, určení jeho 3D struktury a zhodnocení možnosti jeho využití pro charakterizaci vazebných míst. V druhé vývojové fázi, kde dochází k výběru ideální metodiky pro testování vazebných interakcí mezi ligandem a proteinem, je NMR univerzální metodou. Hlavním výhodou NMR je, že není potřeba specificky upravovat a „šít na míru“ rozdílné podmínky pro každý jednotlivý protein nebo vyvíjet nové fluorescenčně značené ligandy.

Během třetí vývojové fáze, která je časově nejnáročnější, jsou pomocí některé z metod HTS objeveny hity, které se posléze mohou stát vedoucí strukturou. Jsou zde zcharakterizovány jak vazebná místa proteinu, tak vazebný epitop ligandu. NMR v tomto kroku může doplnit jinou HTS metodu nebo ji dokonce úplně nahradit.

Jaké změny v NMR spektrech tedy můžeme v praxi snadno a s vysokou citlivostí detekovat při studování vazebných interakcí ligandů s biomakromolekulou? Příkladem mohou být změny v chemických posunech, změny v relaxačních časech, změny difúzních konstant, změny v NOE signálech nebo může být využito změn v saturaci jako úměru pro sílu vazby mezi ligandem a biomakromolekulou (Meyer B, 2003). V praxi jsou aplikovány dva experimentální přístupy. Jeden je z pohledu proteinu, druhý z pohledu ligandu. Oba však mají společný základ a to ten, že se vždy porovnávají naměřená spektra s a bez přítomnosti druhého člena vazebné dvojice.

Pro experimentální přístup z pohledu proteinu je nejvíce typickým parametrem chemický posun (Cala O et al., 2013). Závisí totiž na chemickém okolí příslušných residuí. Pokud je k proteinu přidán ligand, změny v chemických posunech určí, které z residuí se přímo účastní protein-ligandové interakce nebo

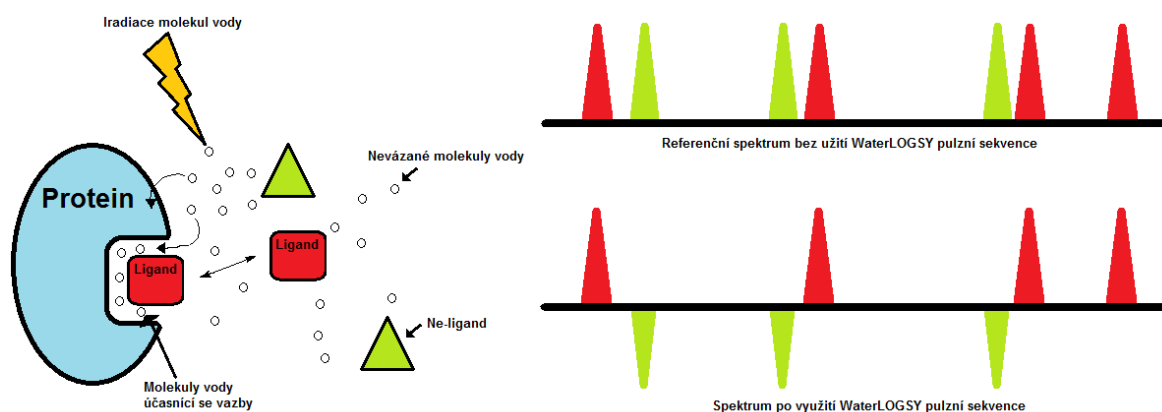
keré z residuí reprezentují sekundární efekty, jako jsou konformační změny, z důsledku ligandové vazby (Jahnke E, 2004). 1D experimenty zachycující proteinové spektrum se jeví jako příliš složité z důvodu velkého množství překrývaných píků, proto se dává přednost 2D experimentům. Typickými jsou dvou-dimenzionální heteronukleární NMR experimenty (Maurer T et al., 2012), ^1H - ^{15}N HSQC nebo ^1H - ^{13}C HSQC.

Nevýhodou u těchto experimentů je nutnost značení proteinu těžkými izotopy (^{13}C , ^{15}N), znalost 3D struktury (přiřazení residuí) a také velikost proteinu (>25 kDa). Avšak díky tomu získáme přesnou informaci o vazebném místě, s použitím titrace ligandem i hodnotu K_D a vyloučíme falešně pozitivní či falešně negativní případy (Harner M J, 2017).

U druhého z přístupů, z pohledu ligandu, vznikla během dvou desetiletí řada metod, které můžeme rozdělit do tří kategorií: testování strukturních fragmentů, ligand vazebné studie a kvalitativní strukturální prověřování (Harner M J, 2017). Oproti předchozímu přístupu není potřeba biomakromolekulu (protein) ani ligand izotopicky značit, odpadá limitace v jejich velikostech a koncentrace proteinu je řádově několikanásobně nižší. V naprosté většině případů jsou použity 1D experimenty, ve kterých (z důvodu nízkých koncentrací biomakromolekul) jsou píky ligandu snadno detekovatelné. Mezi nevýhody této metody se řadí nutnost rozpustnosti ligandů ve vodě, detekce i nescifických interakcí a pokud jsou vazebná interakce až příliš silné, nemusí být vůbec detekovány.

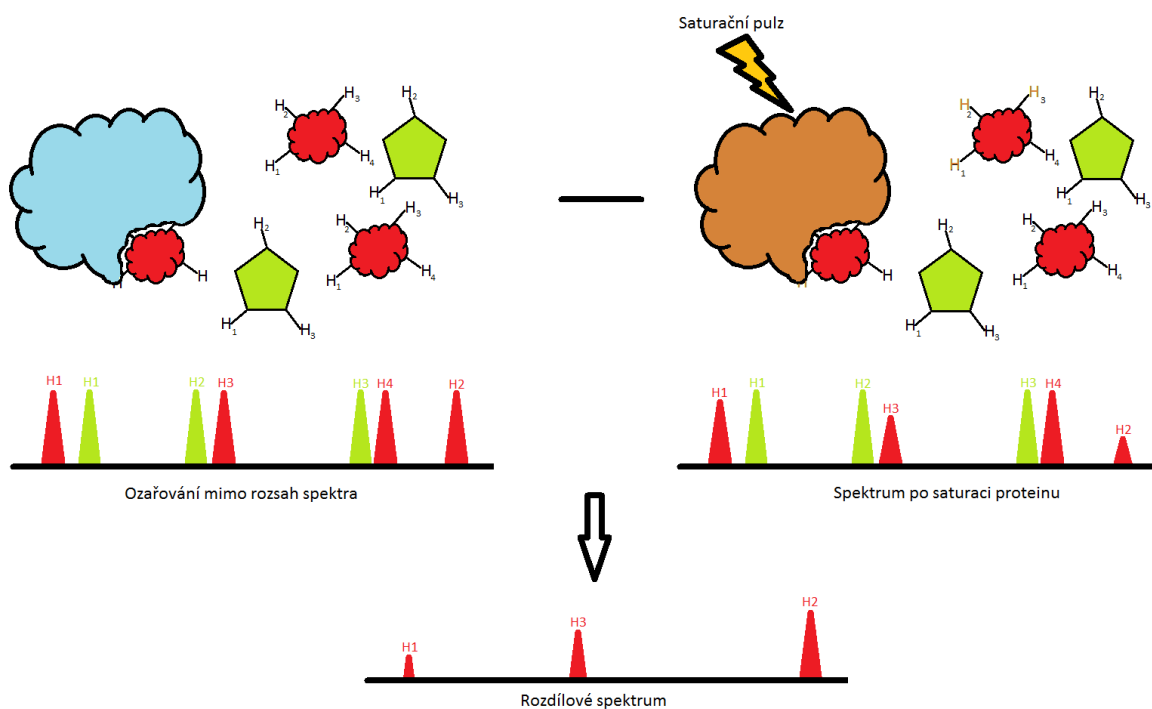
Kterých efektů se využívá pro rozlišení vázaného ligandu a jeho volné formy? Ve fázi, kdy je vytvořen komplex protein-ligand, přebírá dočasně nízkomolekulární látka vlastnosti proteinu. Vykazuje tak rychlejší relaxaci, pomalejší difúzi a větší NOE (Jahnke W, 2004). Na základě těchto poznatků byly vyvinuty metody pro jejich detekci. T_2R je název metody detekující rapidní nárůst příční relaxace, s časem T_2 , která má za následek rozšíření protonových píků ve spektru pro vzorek ligandu s proteinem (Hajduk P J et al., 1997). Při porovnání s referenčním spektrem (bez přítomnosti proteinu) budou píky ligandu ve vazbě tlumené. Hojně využívané jsou dvě metody pracující na bázi NOE efektu, Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy (WaterLOGSY) a Saturation Transfer

Difference (STD). Principem u první ze zmiňovaných metod, WaterLOGSY, je přenos magnetizace z protonů molekul vody na protony molekul ligandu (Dalvit C et al., 2000; Dalvit C et al., 2001). Když je předpokládán ligand ve volném stavu, tak z důvodu rychlého Brownova pohybu molekul ligandu a vody dochází k tvorbě slabého pozitivního NOE efektu. Naopak pokud je ligand ve vazbě, vykazuje znaky proteinu, a přenesená magnetizace způsobí negativní NOE efekt. Díky obráceným efektům tak můžeme rozlišit vázané ligandy od nevázaných. Ve výsledném spektru se projeví jako negativní, respektive pozitivní píky (Obr. 14).



Obr. 14 Schématické zobrazení principu WaterLOGSY experimentu (Unione L et al., 2014; upraveno).

Principem druhé zmiňované metody, STD, je saturace proteinu zapříčiněná jeho selektivním ozařováním pomocí nízko-energetického radiofrekvenčního záření s určitou frekvencí. Saturace se rozšíří po celém proteinu vlivem NOE a spinové difúze a dále bude přenesena na navázaný ligand skrze mezimolekulární NOE. Vlivem rychlé chemické výměny ligandu mezi vázaným a volným stavem, můžeme detekovat excitované protony ligandu ve volném stavu (Wang Y et al., 2004). Tento přenos magnetizace produkuje negativní NOE efekt, který způsobí snížení intenzity píků účastnících se protein-ligandové vazby. Odečtem referenčního spektra (vzniklé ozařováním mimo pozice proteinových píků) od získaného spektra se specifickým ozařováním proteinové frekvence získáme spektrum diferenční, jež reprezentuje NOE efekt u jednotlivých protonů, vlivem protein-ligandové vazby (Obr. 15).



Obr. 15 Schématické znázornění principu STD experimentu.

Metoda byla publikována jako rychlá a vhodná pro testování knihoven potenciálních proteinových ligandů s hodnotou K_D v rozmezí mM- μ M (Mayer M, Meyer B, 1999). V praxi jsou vzorky připravovány tak, že se v roztoku nachází velký přebytek ligandu oproti proteinu (1:100 až 1:1000) (Cala O, 2013). Koncentrace proteinu se odvíjí od jeho velikosti, kdy platí pravidlo, že čím větší protein, tím menší koncentrace, ovšem běžné hodnoty jsou v řádech od stovek μ M po 10^{-1} nM. Hodna saturačního času je v rozmezí od 1-2 s. Bezesporu mezi nejdůležitější parametry patří saturační frekvence, která se nastavuje na pozici proteinového signálu (nejčastěji methylových skupin). Pro spektrum bez saturace proteinu se volí frekvence mimo všechny možné signály. Nejmodernější pulzní sekvence pro STD dokáží vyvinout dostatečně silný radiofrekvenční pulz, který zvýší citlivost i pro proteiny s velikostí menší než 70 kDa. Dalším vylepšením je možnost po sobě jdoucího střídavého měření dvou spekter (jedno s on-rezonancí a druhé s off-rezonancí) Tato funkce potlačuje vznik excitační artefaktů u ligandu (Xia Y. et al., 2010). Výrazným posunem kupředu byla kombinace STD experimentu a pulzních sekvencí pro potlačení signálu vody (Furihata K, 2009, 2010).

Čtvrtou a zároveň poslední fází ve vývoji léčiv je optimalizace nalezených vedoucích struktur (Jahnke W, 2003), ve smyslu zvýšení vazebné afinity, zvýšení selektivity a dodání farmakologického a farmakokinetického profilu. NMR může poskytnout informace i v této fázi například v podobě dynamických informací o protein-ligandovém komplexu či detekci vazby léčiva na proteiny krevní plazmy.

2.2 Cytokinin oxidasa/dehydrogenasa

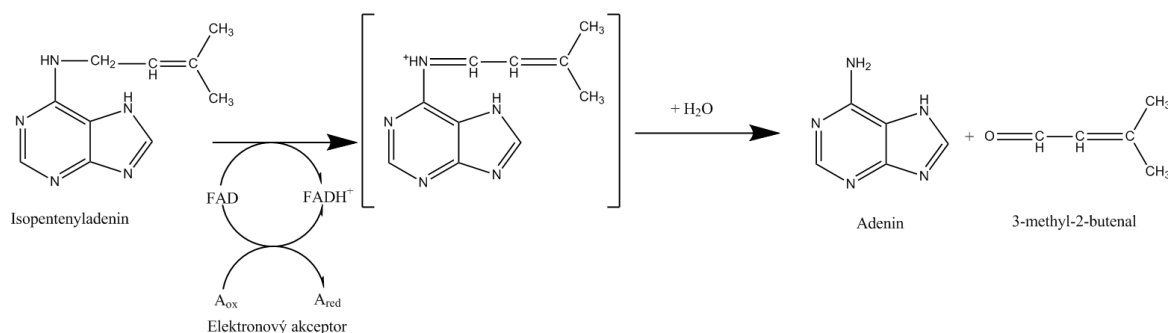
Z mnoha látek působících v rostlinách můžeme vyzdvihnout deriváty adeninu nesoucí N⁶-isoprenoidní nebo N⁶-aromatický postranní řetězec. Tyto rostlinné hormony, cytokininy, se účastní řady klíčových procesů v růstu a vývoji rostliny, jako jsou buněčné dělení, vývoj prýtu a kořene, apikální dominance a klíčení semen (Mok DWS, Mok MC, 2001). Z těchto důvodů je pro rostlinu esenciální, aby udržovala určitou hladinu cytokininů. To se může dít více způsoby, jako je regulace v jejich syntéze, buněčná kompartmentace, či jejich inaktivace a degradace (Hare PD, van Staden J, 1994).

Enzym zodpovědný za katabolismus a inaktivaci cytokininů je cytokinin oxidasa/dehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12). V roce 1971 její aktivitu jako první objevil V. Pačes, který při studiu tabákových buněčných extraktů pozoroval přeměnu N⁶-(2-isopentenyl) adeninu na adenin (Pačes V et al., 1971). V následujících letech byla aktivita CKX detekována v rozličných rostlinných druzích, například v kukuřici (Whitty CD, Hall RH, 1974), pšenici, fazolích, rýži a sóji. Dále se díky celo-genomovým analýzám podařilo zjistit, že jsou enzymy CKX kódovány genovými rodinami s rozdílným počtem členů. U rostlinného druhu *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno 7 CKX genů (*AtCKX1-AtCKX7*) (Schmülling T et al., 2003), u rýže to bylo 11 genů (Werner T et al., 2006), u kukuřice 13 genů (Vyroubalová et al., 2009) a u ječmene byl zjištěn stejný počet jako u *Arabidopsis*, tedy 7 CKX genů (Galuszka P et al., 2004).

Od roku 1974, kdy publikovali svoji práci Whity a Hall, se předpokládalo, že CKX pro svoji aktivitu, inaktivaci cytokininů reakcí přes iminový meziproduct (Laloue M, Fox JE, 1985), potřebují v aktivním místě vázaný kationt mědi

a molekulární kyslík jako elektronový akceptor (Whitty CD, Hall RH, 1974). Z toho důvodu byl enzym klasifikován jako aminoxidasa obsahující měď (EC 1.4.3.6). Ovšem v návaznosti na pozorování Chatfielda a Armstronga (1987), při kterém byla zjištěna substituce molekulárního kyslíku za měďno-imidazolový komplex, a skutečnosti, že aminoxidasa nedokáže odštěpit sekundární aminoskupiny z cytokininů, které jsou inhibitory enzymu (Galuszka P et al., 1998), se stala tato klasifikace poněkud zavádějící. Rozhodující milník nastal při úspěšném naklonování CKX genu z kukuřice. Zjistilo se, že ZmCKX1 obsahuje flavin-vázající doménu (Morris RO et al., 1999) a taktéž byl nalezen GHS motiv naznačující možnost kovalentní vazby enzymu na FAD skrze histidinový zbytek (Houba-Hérin N et al., 1999). Tyto poznatky jsou podpořeny značnou inhibicí CKX enzymů pomocí inhibitorů flavoproteinových oxidoreduktas (Houba-Hérin N et al., 1999; Galuszka P et al., 2001). Ve své práci se Galuszka na základě testování dalších možných elektronových akceptorů přiklání k možnosti, že pokud je CKX aktivita zvýšena díky jednomu z analogů ubiquinonu, můžeme předpokládat elektronový přenos pomocí flavinového kofaktoru do druhého redoxního centra enzymu, který jej dále předává právě ubiquinonu. Obdobný elektronový přenos pozorujeme u membránového proteinu, sukcinát dehydrogenasy. Vlivem těchto okolností je záhodno klasifikovat CKX jako cytokinin dehydrogenasu a nikoli jako oxidasu (Galuszka P et al, 2001).

Principem inaktivace cytokininů pomocí CKX je jednokrokové odštěpení postranního řetězce na N⁶ substituovaném místě. Reakce probíhá dehydrogenací cytokininu přes iminový meziproduct, na adenin a příslušný aldehyd (Obr. 16). Reakce se účastní kovalentně vázaný kofaktor FAD, který se během reakce redukuje na FADH. Při reoxidaci kofaktoru (FADH -> FAD) dochází k předání dvou elektronů na elektronový akceptor (Werner T et al., 2006).

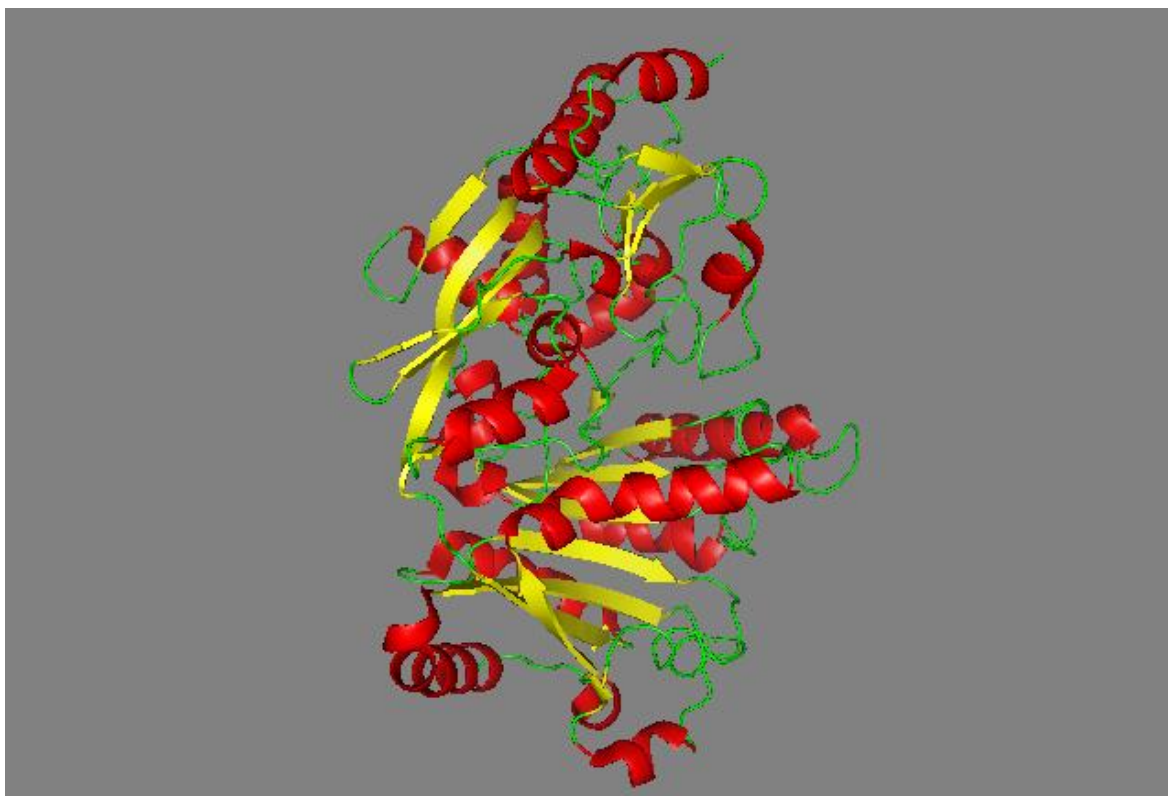


Obr. 16 Degradace substrátu iP enzymem cytokinindehydrogenasou (CKX) s kovalentně vázaným FAD (upraveno podle Werner T et al., 2006).

Jednotlivé *AtCKX* enzymy se odlišují svými biochemickými vlastnostmi, regulací exprese a subcelulární lokalizací (Schmülling T et al., 2003). Studium exprimovaných isoform bylo objeven N-terminální hydrofobní peptid, díky kterému dochází k funkční diverzifikaci. Čtyři proteiny (*AtCKX2*, *AtCKX4*, *AtCKX5*, *AtCKX6*) jsou zaměřeny na rostlinné sekreční dráhy a lokalizovány v apoplastu. Další dva proteiny (*AtCKX1*, *AtCKX3*) byly lokalizovány pomocí GFP ve vakuolách, konkrétně *AtCKX3* v centrální vakuole a *AtCKX1* pouze v malých vakuolách (Werner T et al., 2003). U jako jediné isoformy, *AtCKX7*, nebyl objeven žádný signální peptid, jeho lokalizace se tedy na základě intracelulární exprese rekombinantního proteinu v *E. coli* a *Pichia pastoris* předpokládá v cytosolu (Kowalska M et al., 2010).

Jak již bylo zmíněno, sekvenováním genomu *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 7 homologních genů kódujících CKX proteiny. Na chromozomu 1 byl objeven gen pro *AtCKX5*, na druhém chromozomu jsou umístěny dva geny pro *AtCKX1* a *AtCKX2*, třetí chromozom obsahuje gen pro *AtCKX6*, gen pro *AtCKX4* je umístěn na chromozomu 4 a poslední dva geny (*AtCKX3* a *AtCKX7*) jsou shodně na chromozomu 5 (Bilyeu KD et al., 2001). Predikované velikosti proteinů jsou řádově 60 kDa, ovšem proteiny podléhají post-translačním úpravám, zejména četným glykosylacím, jež finální velikost ovlivňují (Gu R et al., 2010). Ke glykosylaci může docházet na několika shodných N-glykosylačních místech. Tato post-translační modifikace má vliv na enzymovou aktivitu (například udává pH optimum), dále na translokaci enzymu a na proteinovou stabilitu (Schmülling T et al., 2003).

V této diplomové práci byl použit enzym *AtCKX2* získaný z geneticky modifikované *P. pastoris* (pGAPZα:*AtCKX2*). Velikost proteinu byla pomocí SDS-PAGE elektroforézy stanovena na 61 kDa (Frébortová J et al., 2007). Ovšem nutno podotknout, že enzym byl exprimován v *Saccharomyces cerevisiae*. Krystalová struktura proteinu z *Arabidopsis thaliana* nebyla doposud získána, zatím je k dispozici pouze enzym z kukuřice seté *ZmCKO2* (Obr. 17; 4ML8), exprimován v *E. coli* (Morera S et al., 2016).



Obr. 17 3D struktura CKX enzymu z kukuřice seté, *ZmCKO2*; 4ML8.

AtCKX2 je nejvíce studovaným a také nejvíce zastoupeným proteinem v *Arabidopsis*, zejména v její vrcholové části (Werner T et al., 2003), ze všech 7 CKX isoformů. Nové poznatky ohledně aktivity a funkce CKX proteinů vedou též k lepšímu pochopení jejich role v rostlinné fyziologii a ve vývoji rostlin (Schmülling T et al., 2003). Existuje spousta postupů, jak docílit vyřazení CKX z její přirozené aktivity. Jedním z nich je použití specifického inhibitoru, a to nám právě otevírá dveře pro využití robustní techniky NMR k otestování velkého množství látek jako prekurzorů pro budoucí potenciální inhibitory.

3 Materiál a metodika

3.1 Chemikálie

D₂O – deuterovaná voda (100 atom % D), Aldrich

DMSO-*d*₆ – dimethyl sulfoxid-*d* (99,9 atom % D), Aldrich

NaCl – chlorid sodný, Sigma-Aldrich

NaH₂PO₄ – dihydrogenfosforečnan sodný, Merck

NaOH – 1M hydroxid sodný, Penta

HSA – lidský sérový albumin, Sigma-Aldrich

6-CH₃-D,L-tryptofan – 6-methyl-D,L-tryptofan, Sigma-Aldrich

N,N-dimethylanilin – 99 %, Merck-Schachardt

6-chloropurin – 99 %, Sigma-Aldrich

Ac. Acetylsalicylicum – 98 %, Tamba a.s.

Benzylamin – 99 %, Aldrich

Anilin – 98 %, Fluka

N,N-dimethyltoluen – 97 %, Fluka

6-chloropurin ribosid 97 %, Olchemim

m-anisidin – 97 %, Aldrich

deuterovaný fosfátový pufr – 75 mM, pH = 7,5, NaCl = 150 mM v D₂O

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava CKX enzymu

Prvním krokem byla příprava prekultury, která probíhala ve sterilním prostředí flowboxu. Byla provedena inokulace 1,8 mL YPD média s 0,2 mL 20% vodným roztokem glukosy a 8 μ L zeocinu (koncentrace 25 mg/mL) pomocí zamražené kultury (-80 °C) *P. pastoris* pGAPZ α :AtCKX2. Antibiotikum zeocin bylo před použitím zvortexováno a stočeno na stolní centrifuze. Takto připravená prekultura byla za tmy kultivována 48 h při 30 °C a 130 rpm na třepačce.

Druhým krokem bylo přepipetování 2 mL prekultury do 250 mL Erlenmayerovy baňky k 43 mL YPD média s 5 mL 20 % vodného roztoku glukosy. Erlenmayerova baňka s roztokem byla kultivována 24 h při 30 °C a 130 rpm na třepačce.

Posledními kroky přípravy enzymu byly: V předem vychlazené centrifuze na 4 °C centrifugovat mléčně bílou kulturu po dobu 10 minut při 10000 rpm, výsledný supernatant byl slit a bylo upraveno pH na hodnotu 8 pomocí 1 M Tris/HCl (pH 8; 12,8 mL). Přítomnost CKX enzymu byla ověřena testem na CKX aktivitu, která dosahovala hodnot 323,6 pKat/mL.

Finální krokem byla sterilizace média s enzymem přes 0,2 μ M filtr. Zásobní roztok byl poté skladován v lednici.

Původních 50 mL zásobního roztoku s enzymem bylo zkoncentrováno pomocí Amicon Ultra-15 (NMWL 15) na 500 μ L. Koncentrace 201 mM byla stanovena metodou Bradfordové (Bradford M M, 1976).

3.2.2 Nukleárně magnetická rezonanční spektroskopie

Spektra nukleární magnetické rezonance byla získána na přístroji Jeol 500 ECA při frekvenci 500 MHz pro jádra ^1H . Použitá rozpouštědla byla vždy deuterovaná (D_2O ; $\text{DMSO-}d_6$).

3.2.2.1 Příprava vzorků pro STD experimenty

3.2.2.1.1 HSA

Pro vzorky s lidským sérovým albuminem byl připraven zásobní roztok, o koncentraci 50 μM , rozpuštěním 10 mg HSA ve 3 mL deuterovaného fosfátového pufru, který byl následně skladován ve 4°C. Dalším zásobním roztokem byl 5mM roztok ligandu. Ten vznikl rozpuštěním 5 mg 6-CH₃-D,L-tryptofanu v 5 mL DMSO-*d*₆.

Vzorek pro STD build-up experiment byl připraven z 200 μL zásobního roztoku ligandu, 200 μL zásobního roztoku HSA a 100 μL deuterovaného fosfátového pufru.

Vzorky pro determinaci K_D a α_{STD} byly připraveny dle následující tabulky 1.

Tabulka 1. Objemy jednotlivých roztoků pro tvorbu vzorků k určení K_D a α_{STD} .

Vzorek	Zásobní roztok		Deuterovaný fosfátový pufr [μL]	Poměr Ligand/Protein
	6-CH ₃ -D,L-tryptofan [μL]	Zásobní roztok HSA [μL]		
D1	10	200	290	5
D2	20	200	280	10
D3	40	200	260	20
D4	80	200	220	40
D5	100	200	200	50
D6	140	200	160	70
D7	200	200	100	100

3.2.2.1.2 CKX2

Pro přípravu vzorků k testování interakcí mezi proteinem CKX2 a vybranými ligandy byly použity aliquoty ze zásobního roztoku CKX2 (201 mM) a to 0,638 mM, 100 μM a 83 μM . Z důvodu odlišných vlastností rozpustnosti jednotlivých ligandů, byly užity odlišné koncentrace prakticky pro každý jednotlivý vzorek (Tabulka 2.), ovšem stále byl zachován poměr Ligand/Protein minimálně 100:1.

Tabulka 2. Tabulka pipetovaných roztoků pro přípravu vzorků k testování detekce interakcí ligandů s proteinem CKX2.

Ligand	Zásobní roztok ligandu v D ₂ O [mM]	Aliquot CKX2 v d-fosfátovém pufru [mM]	Ligand [μL]	Aliquot CKX2 [μL]	Poměr Ligand/Protein
m-anisidin	91	0,638	250	250	143
N,N-dimethylalanin	81	0,638	250	250	127
Anilin	324	0,638	125	250	254
1,3-dimethylurea	324	0,638	125	250	254
6-chlorpurin ribosid	20	0,1	125	250	100
Benzylamin	20	0,1	125	250	100
Acetyl salicylová kyselina	16,6	0,083	125	250	200
6-chlorpurin	16,6	0,083	125	250	200

Ligandy Anilin a 1,3-dimethylurea byly testovány společně v jedné kyvetě, stejně tak jako dvojice 6-chlorpurin ribosid – Benzylamin a Acetyl salicylová kyselina – 6-chlorpurin.

K ověření chemických posunů jednotlivých ligandů (1D ¹H experimenty) byly připraveny vzorky o objemu 500 μL obsahujících zásobní roztoky ligandů v deuterované vodě. Jejich koncentrace zásobních roztoků jsou zaznamenány v tabulce 2.

3.2.2.2 *STD experiment*

Před samotným STD experimentem bylo provedeno několik dalších úkonů. Poté co byl vzorek umístěn do stroje, teplota byla nastavena na stabilní hodnotu 30°C, proběhlo automatické ladění sondy (tune and match), vzorek byl „zalokován a zashimmován“. Pomocí standartního experimentu byla stanovena hodnota 90° pulzu. V dalším kroku byla určena frekvence pro ozařování proteinového píku

s užitím experimentu wgh.jxp, který potlačuje signál vody a proteinové píky jsou poté intenzivnější.

Byla vybrána pulzní sekvence `sat_transfer_difference_wgh_2d_b` s parametrem `outer_scans`. Jedná se o optimalizovanou pseudo 2D pulzní sekvenci klasického STD experimentu, obohacenou o pulzy potlačující signál vody (wgh) a parametr `outer_scans`, který způsobuje střídavé měření dvou spekter (jedno s on-rezonancí a druhé s off-rezonancí). Díky těmto dvěma, po sobě jdoucím měřením se zabraňuje vzniku excitačních artefaktů u píků ligandu.

Samotné nastavení `sat_transfer_difference_wgh_2d_b` experimentu zahrnuje:

- Spuštění automatického určení receiver gain.
- Vypnutí spinování, ponechání vyhřívání sondy.
- Nastavení `x_offset` na pozici signálu vody.
- Nastavení počtu scanů na hodnotu „1“ a upravení počtu `outer_scans` (dle koncentrace vzorku v rozmezí 128-1024).
- Pro nastavení pulzu, `x_pulse` použít zjištěnou hodnotu 90° pulzu.
- `Std_sel_onreso` nastavit na pozici píku proteinu (ideálně methylových skupiny které se vyskytují v rozsahu od 1 do -1 ppm).
- `Std_sel_offreso` nastavit mimo všechny signály (např. -10 ppm).
- `Wgh_pulse` použít opět hodnotu 90° pulzu.
- `Wgh_grad_amp` bylo optimalizováno na 60 [mT/m] v separátním experimentu.
- `Std_loop` (ovlivňuje relaxační čas) nastavit u experimentů pro určení K_D na 125 (relax. čas bude 2,5s), pro Build-up experiment hodnoty 20; 38; 50; 65; 75; 100; 125; 150; 200.
- `Relaxation_delay` ustanoveno na 5 s.

3.2.3 Zpracování výsledků

Analýza NMR spekter probíhala pomocí programu Delta NMR Processing and Control Software v5.0.2 ve verzi pro Windows. Výsledné 1D spektrum bylo

sfázováno a uloženo. Následně byl otevřen "Data slide" obsahující dvě spektra. První bylo změřeno při ozařování na pozici proteinového signálu a druhé na pozici -10 ppm. Tyto dvě spektra byla od sebe, pomocí funkce Operate on files, odečtena a výsledné spektrum reprezentovalo STD efekt.

Určení hodnoty K_D a α_{STD} spolu s tvorbou grafů a curve fitting bylo provedeno pomocí programu Prism 5, verze 5.00 pro Windows.

4 Výsledky

4.1 STD Build-up experiment

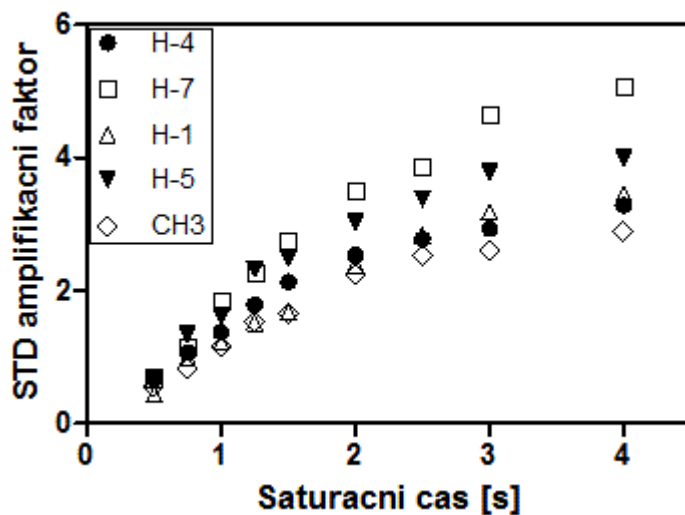
Pro analýzu STD efektu byl využit amplifikační faktor (A_{STD}), který byl vypočítán pro každý protonový signál v určitém saturačním čase, dle Rovnice (9).

$$A_{STD} = \frac{I_0 - I_{SAT}}{I_0} \times \frac{[L]_T}{[P]} = \frac{I_{STD}}{I_0} \times \frac{[L]_T}{[P]}, \quad (9)$$

kde I_0 reprezentuje referenční intenzitu signálu, I_{SAT} je hodnota intenzity po saturačním pulzu a $[L]_T/[P]$ zastupuje molární poměr relativního přístupu ligandu k proteinu. Při vytvoření grafu závislosti STD amplifikačního faktoru na saturačním čase (Graf 1) dostáváme z hodnot (Tabulka 3), jasný vzrůstající trend (Build-up) STD efektu v závislosti na zvyšujícím se saturačním čase.

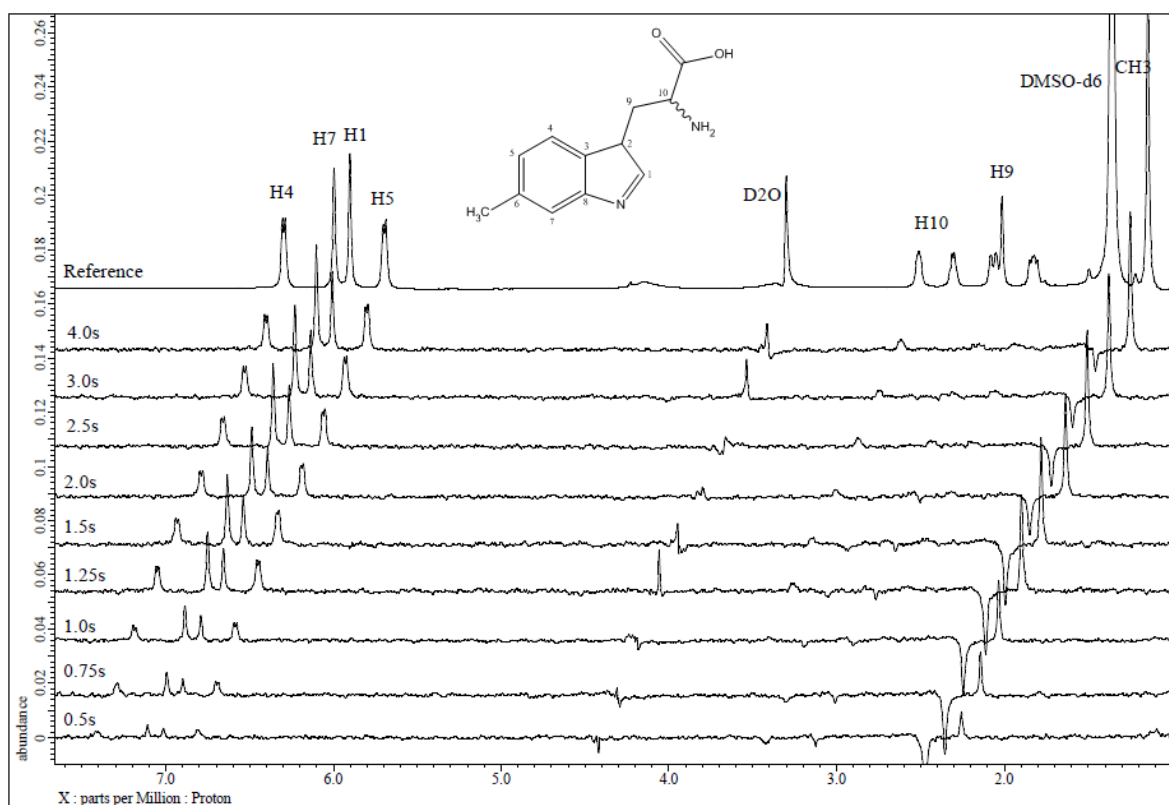
Tabulka 3. Data rozdílných hodnot amplifikačního faktoru v závislosti na saturačním čase pro jednotlivé protony ligandu.

Saturační čas [s]	Amplifikační faktor kalkulovaný pro jednotlivé protony				
	H-4	H-7	H-1	H-5	CH3
0,50	0,67	0,67	0,44	0,68	0,55
0,75	1,07	1,15	1,00	1,34	0,82
1,00	1,37	1,85	1,22	1,61	1,17
1,25	1,79	2,27	1,52	2,33	1,54
1,50	2,13	2,74	1,68	2,49	1,65
2,00	2,54	3,51	2,39	3,03	2,25
2,50	2,78	3,87	2,83	3,38	2,53
3,00	2,93	4,66	3,19	3,79	2,62
4,00	3,29	5,08	3,44	3,99	2,89



Graf 1. STD amplifikační faktor jako funkce saturačního času.

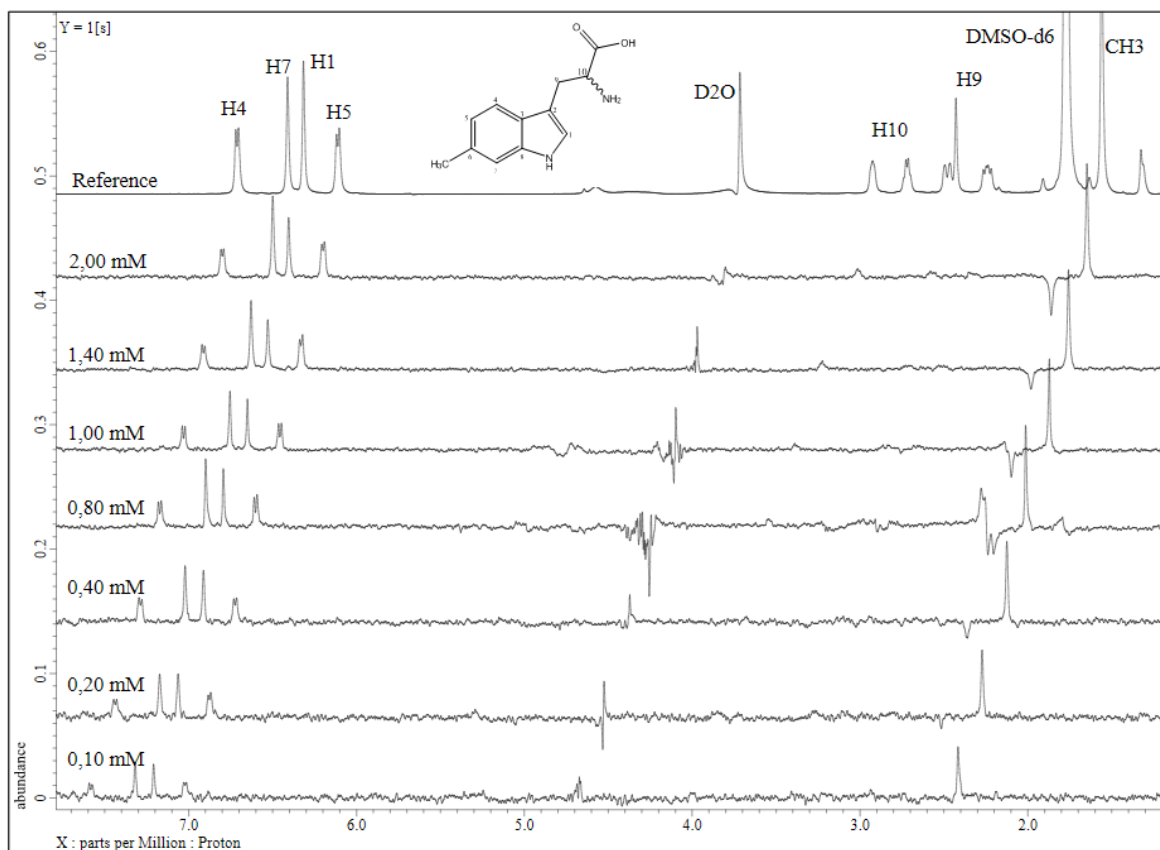
Nárůst STD efektu je pozorovatelný i u STD-NMR spekter (Obr. 18).



Obr. 18 STD-NMR spektra zobrazující nárůst STD efektu z důvodu prodloužení saturačního času od 0,5 s po 4,0 s.

4.2 Určení hodnoty K_D

Jednoduchou titrací ligandu bylo změřeno 7 spekter. Při jejich porovnání můžeme pozorovat nárůst STD efektu v závislosti se zvyšující se koncentrací ligandu (Obr. 19).



Obr. 19 STD-NMR spektra zobrazující nárůst STD efektu v závislosti na zvyšující se koncentraci ligandu, 6-CH₃-D,L-tryptofanu, v přítomnosti stejné koncentrace HSA.

Aplikujeme-li stejnou rovnici (9), jako v případě STD Build-up experimentu, získáme opět charakteristiku STD efektu v podobě amplifikačního faktoru A_{STD} . Hodnoty amplifikačního faktoru z tabulky číslo 4, můžeme poté analyzovat pomocí curve fitting programu (Prism 5) jako funkci podobnou hyperbolické Michaelis-Mentenové, a tím získat K_D hodnotu ligandu, danou průměrem K_D hodnot pro jednotlivé protony.

Tabulka 4. Data rozdílných hodnot amplifikačního faktoru v závislosti na koncentraci 6-CH₃-D,L-tryptofanu pro jednotlivé protony.

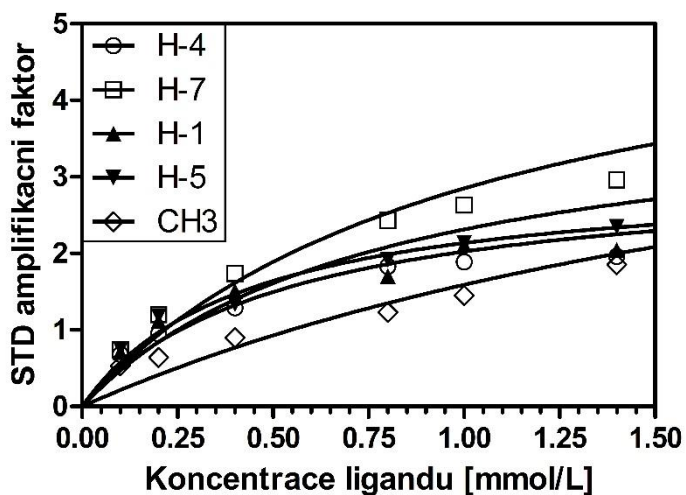
Koncentrace ligandu [mM]	Amplifikační faktor kalkulovaný pro jednotlivé protony				
	H-4	H-7	H-1	H-5	CH ₃
0,1	0,68	0,74	0,71	0,75	0,53
0,2	0,95	1,20	1,12	1,18	0,64
0,4	1,29	1,74	1,51	1,34	0,90
0,8	1,83	2,43	1,70	1,92	1,23
1	1,89	2,63	2,11	2,14	1,45
1,4	1,96	2,96	2,05	2,35	1,85
2	2,80	4,23	2,92	3,36	2,64

Analogem rovnice Michaelis-Mentenové je rovnice (10):

$$A_{STD} = \frac{\alpha_{STD}[L]}{K_D + [L]}, \quad (10)$$

kde α_{STD} odpovídá maximálnímu amplifikačnímu faktoru, $[L]$ koncentraci ligandu.

Když promítneme hodnoty amplifikačního faktoru oproti koncentraci ligandu v jednotlivých měřeních a využijeme curve fitting s rovnicí 10, získáme graf číslo 2.

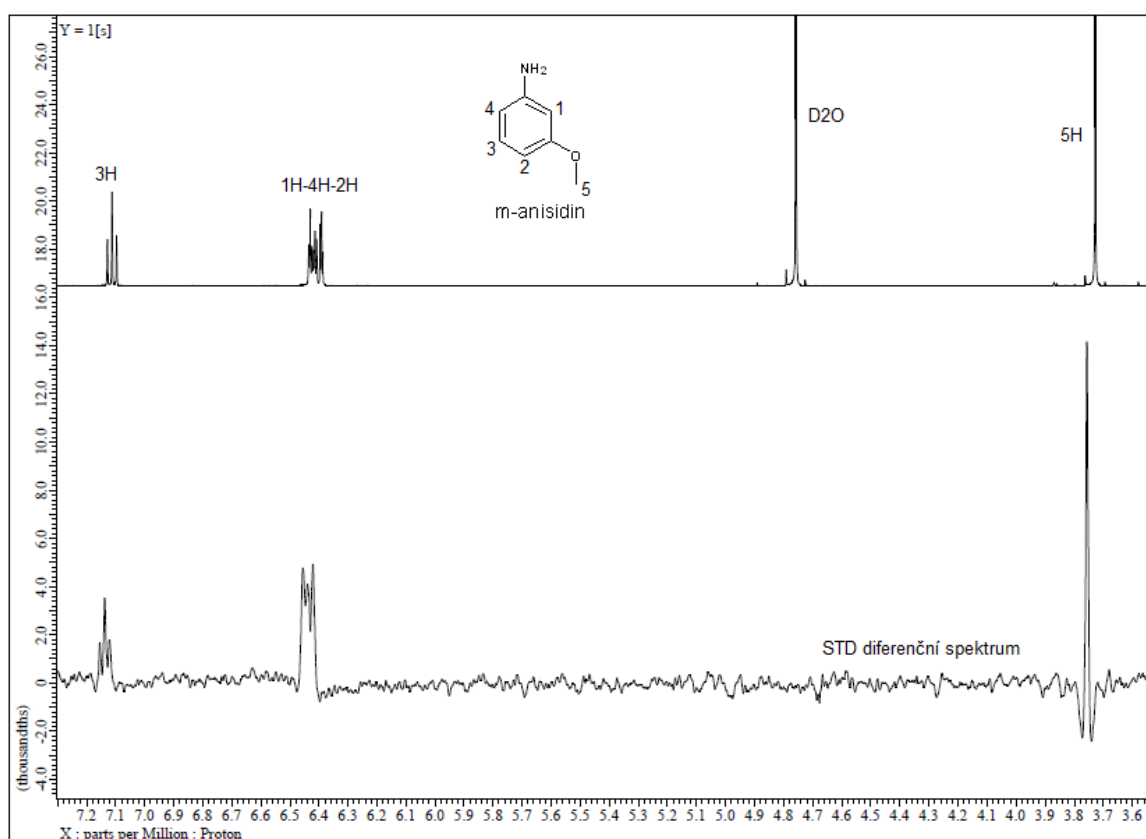


Graf 2. STD amplifikační faktor jako funkce koncentrace ligandu. Křivky reprezentují fit na základě rovnice č. 10.

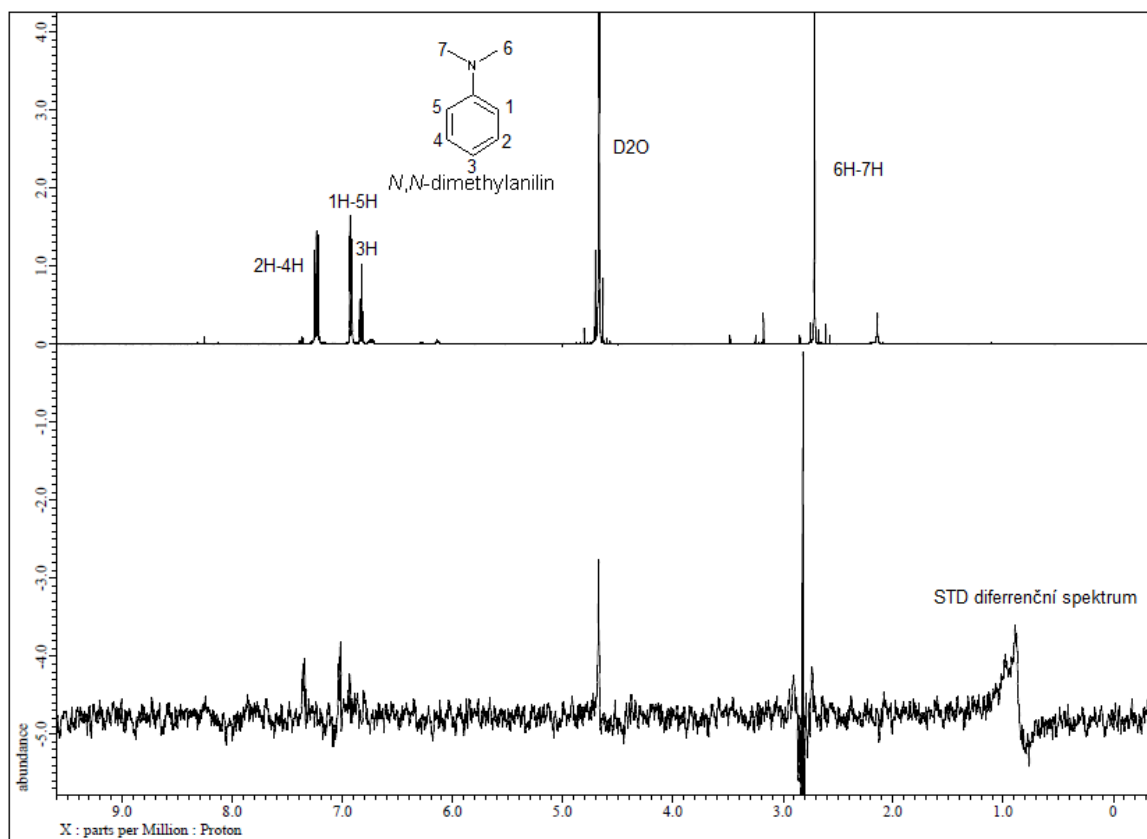
Výsledná hodnota K_D byla určena jako průměr hodnot K_D pro jednotlivé protony a dle výpočtu dosahuje hodnoty $393 \pm 25 \mu\text{M}$.

4.3 Aplikace STD experimentu pro testování ligandů u CKX2

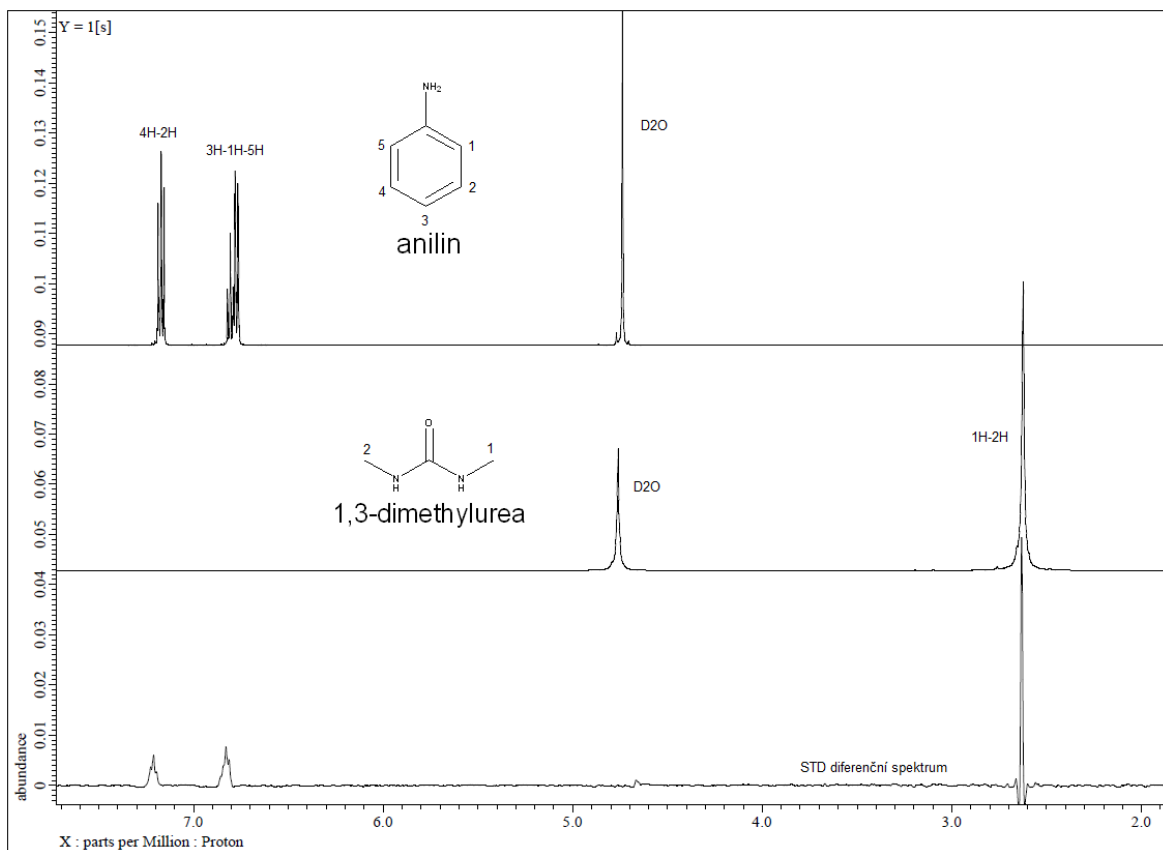
S použitím optimalizované pulzní sekvence (sat_transfer_difference_wgh_2d_b s parametrem outer_scans) byla naměřena STD spektra ligandů s proteinem CKX2.



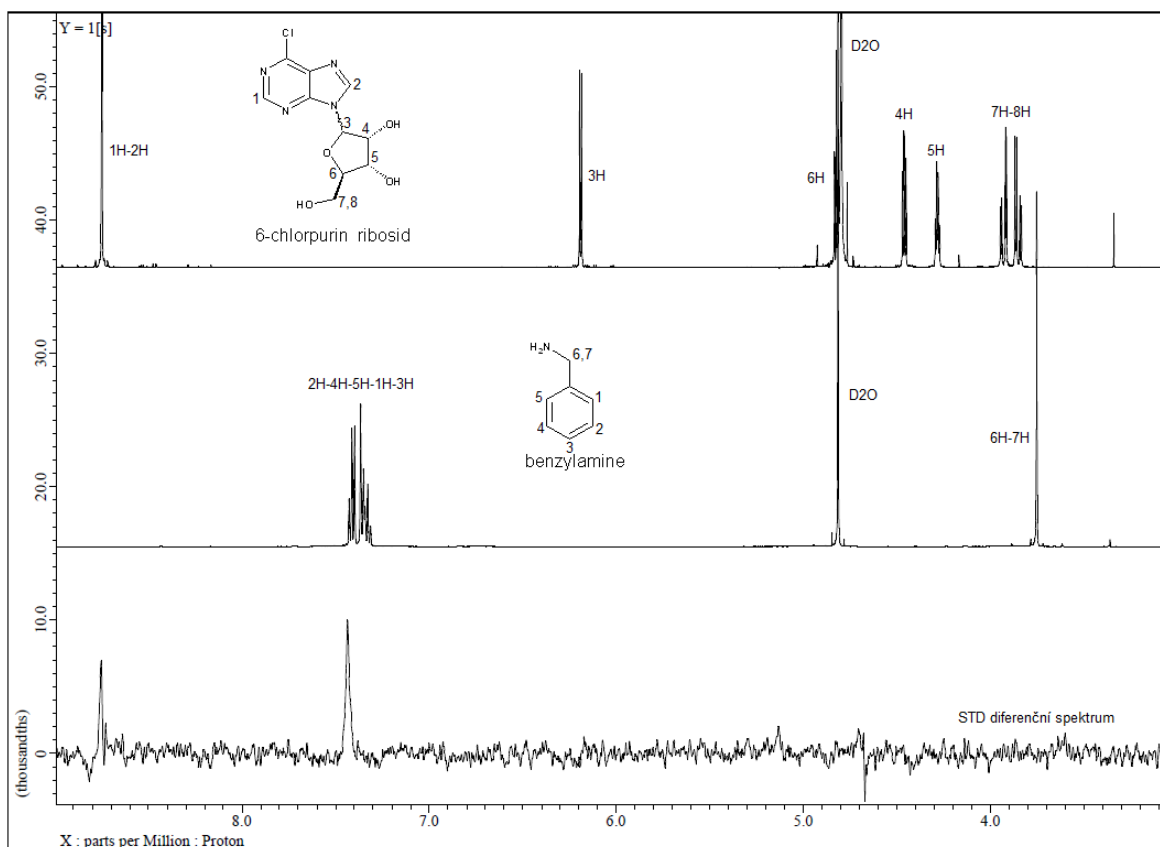
Obr. 20 V horní části ¹H spektrum látky *m*-anisidinu v deuterované vodě. V dolní části STD diferenční spektrum zobrazující píky *m*-anisidinu interagující s CKX2 s použitím 128 outer scanů.



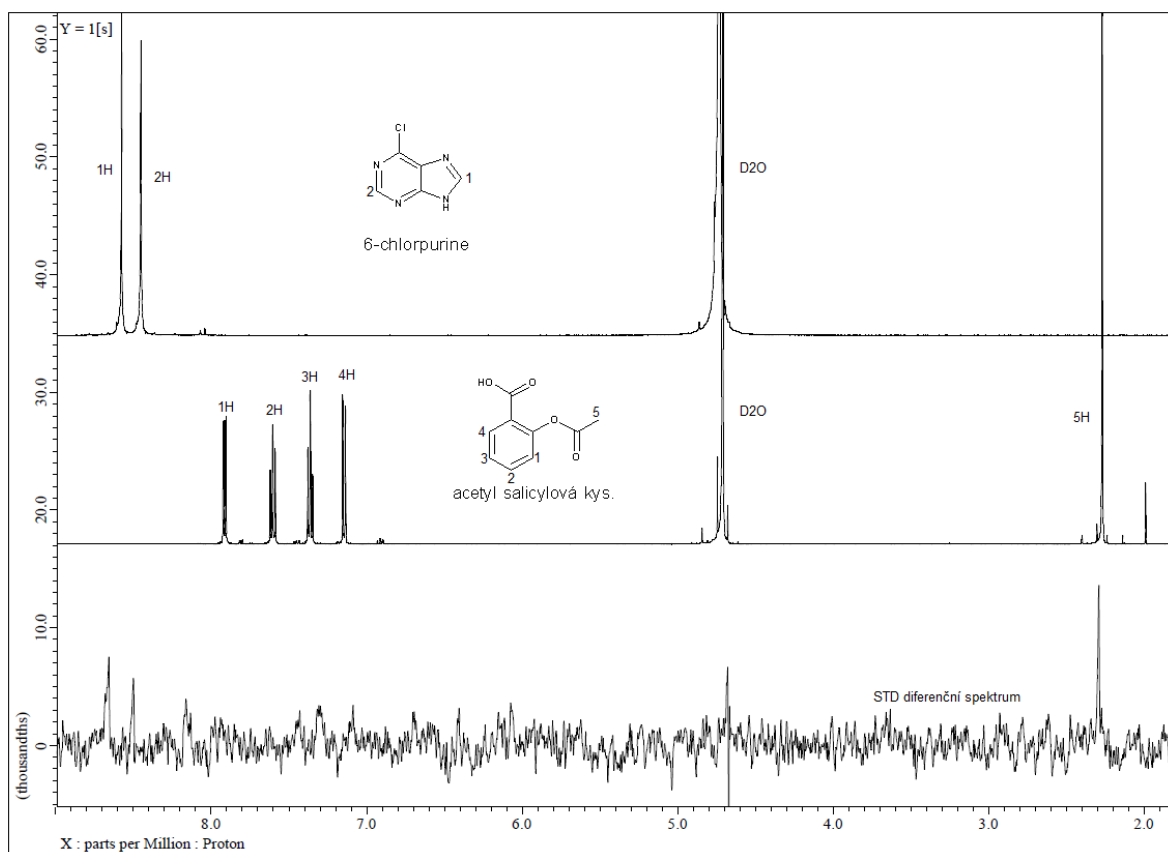
Obr. 21 V horní části ^1H spektrum látky *N,N*-dimethylanilinu v deuterované vodě. V dolní části STD diferenční spektrum zobrazující píky *N,N*-dimethylanilinu interagující s CKX2 s použitím 512 outer scanů.



Obr. 22 V horní části ^1H spektra látek anilinu a 1,3-dimethylurey v deuterované vodě. V dolní části STD diferenční spektrum zobrazující píky anilinu a 1,3-dimethylurey interagující s CKX2 s použitím 512 outer scanů.



Obr. 23 V horní části ^1H spektra látek 6-chlorpurin ribosidu a benzylaminu v deuterované vodě. V dolní části STD diferenční spektrum zobrazující píky 6-chlorpurin ribosidu a benzylaminu interagující s CKX2 s použitím 1024 outer scanů.

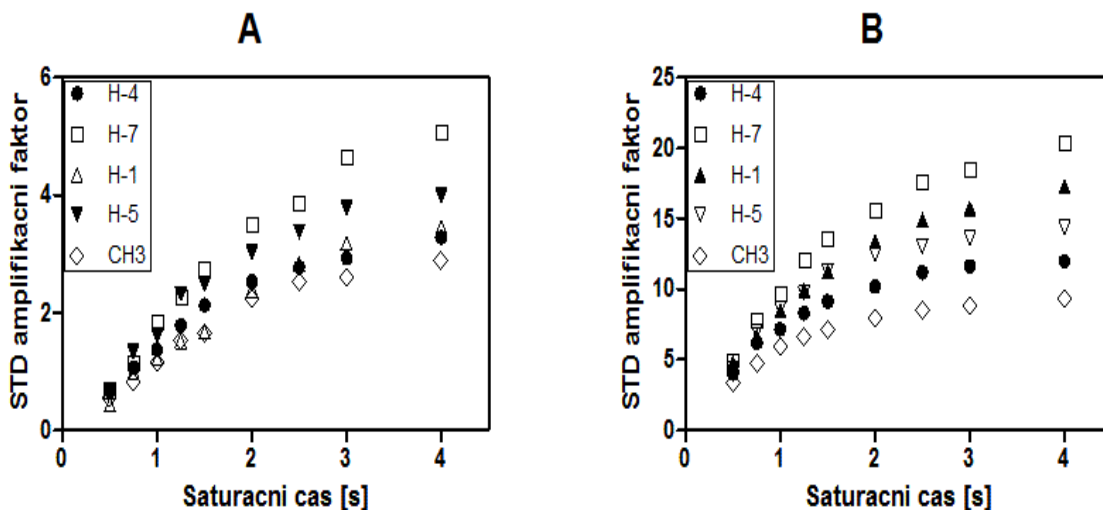


Obr. 24 V horní části ^1H spektra látek kyseliny acetyl salicylové a 6-chlorpurinu v deuterované vodě. V dolní části STD diferenční spektrum zobrazující píky kyseliny acetyl salicylové a 6-chlorpurinu interagující s CKX2 s použitím 128 outer scanů.

5 Diskuze

Od první publikace STD-NMR metody, popsané jako rychlá a vhodná pro testování knihoven potencionálních ligandů s hodnotou K_D v rozmezí od mM po μM , uběhla již řada let (Mayer M, Meyer B, 1999). V návaznosti na tuto metodu publikoval Meyer B. a Petersem T. (2003) článek, ve kterém využil amplifikačního faktoru jako charakteristiku STD efektu. Při zavádění metody STD pro studium ligand-proteinových interakcí použil ve své práci Wang Y. S. et al. (2004) lidský sérový albumin (HSA) spolu s nízkomolekulárním ligandem 6-methyl-D,L,-tryptofanem. Stejně látky použil během svého výzkumu i Viegas A. et al (2011), když vytvořil návod pro své studenty, kteří docházeli do jeho kurzu.

Před samotným studiem interakcí CKX2 s ligandem bylo nutno ověřit spolehlivost STD experimentu v podmínkách přítomných na pracovišti. Jako reference posloužil postup Viegase pro interakci HSA s 6-methyl-D,L,-tryptofanem. Jelikož Viegas pracoval se stroji firmy Bruker a na pracovišti oddělení chemické biologie a genetiky je spektrometr firmy JEOL bylo nutné ověřit pulsní sekvenci. Standartní pulsní sekvence pro STD experiment poskytovala pouze vyhotovené STD spektrum, ovšem pro potřeby výpočtu amplifikačního faktoru je potřeba znát i hodnoty intenzit z nesaturovaného spektra. Po konzultaci s výrobcem spektrometru, firma JEOL poskytla sérii nových pulzních sekvencí, které jsme otestovali. Nejvhodnější pulsní sekvence (sat_transfer_difference_wgh_2d_b s parametrem outer_scans) umožňuje získat všechny potřebné informace, a navíc limituje vznik excitačních artefaktů. Pomocí této pulzní sekvence byly naměřeny spektra vzorků obsahujících HSA a 6- CH_3 -D,L-tryptofan v poměru 1:100. Prvotním cílem byl takzvaný Build-up experiment, kdy byl zachováván molární poměr protein-ligand, ale měnil se saturační čas v sekundách (0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00). To mělo za následek nárůst amplifikačního faktoru, respektive STD efektu (Obr. 25A). Nárůst STD efektu měl obdobný průběh, jaký byl ukázán Viegasem pro pulsní sekvenci na spektrometru Bruker (Obr. 25B)



Obr. 25 Grafy závislosti amplifikačního faktoru na saturačním čase. Graf A reprezentuje námi zjištěné hodnoty amplifikačního faktoru při rozdílných saturačních časech [s] (0,50; 0,75; 1,00; 1,25; 1,50; 2,00; 2,50; 3,00; 4,00). Graf B zobrazuje závislost amplifikačního faktoru na saturačním čase, převzato a upraveno Figure 3. z Viegas A. et al. (2011).

Druhým cílem k ověření spolehlivosti pulsní sekvence bylo určení disociační konstanty K_D . Byla vytvořena série vzorků, obdobná titračním experimentům, s lišícími se koncentracemi ligandu v mM (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1; 1,4; 2). Saturační čas byl zachován pro všechny vzorky a to 2,5 s. Dle vztahu 9, byly vypočítány amplifikační faktory, jež byly aplikovány do grafu jako závislost A_{STD} na koncentraci ligandu. Vzniklými body byly následně proloženy predikované křivky na bázi analogie s rovnicí dle Michaelis-Mentenové (Rovnice 10). Pomocí tohoto vztahu byla poté určena i průměrná hodnota K_D (ze všech K_D hodnot protonů ligandu) pro 6-methyl-D,L-tryptofan, $393 \pm 25 \mu\text{mol L}^{-1}$. K_D zjištěné Viegasem bylo $400 \pm 73 \mu\text{mol L}^{-1}$. Oproti tomu hodnoty K_D pro tento systém v jiné literatuře uvádějí $37 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Dalvit C et al., 2002). Tento desetinásobný rozdíl ilustruje jednu z limitací přímého výpočtu disociační konstanty z STD experimentu, a to ten, že pomocí STD-NMR experimentu nejsme schopni určit specifické a nespecifické vazebné interakce (Ji Z et al., 2009). Výše zmíněnými výsledky bylo ověřeno, že pulsní sekvence produkuje velmi podobná data jako sekvence od firmy Bruker a byla použita pro prvotní studii ligand-proteinových interakcí s enzymem AtCKX2.

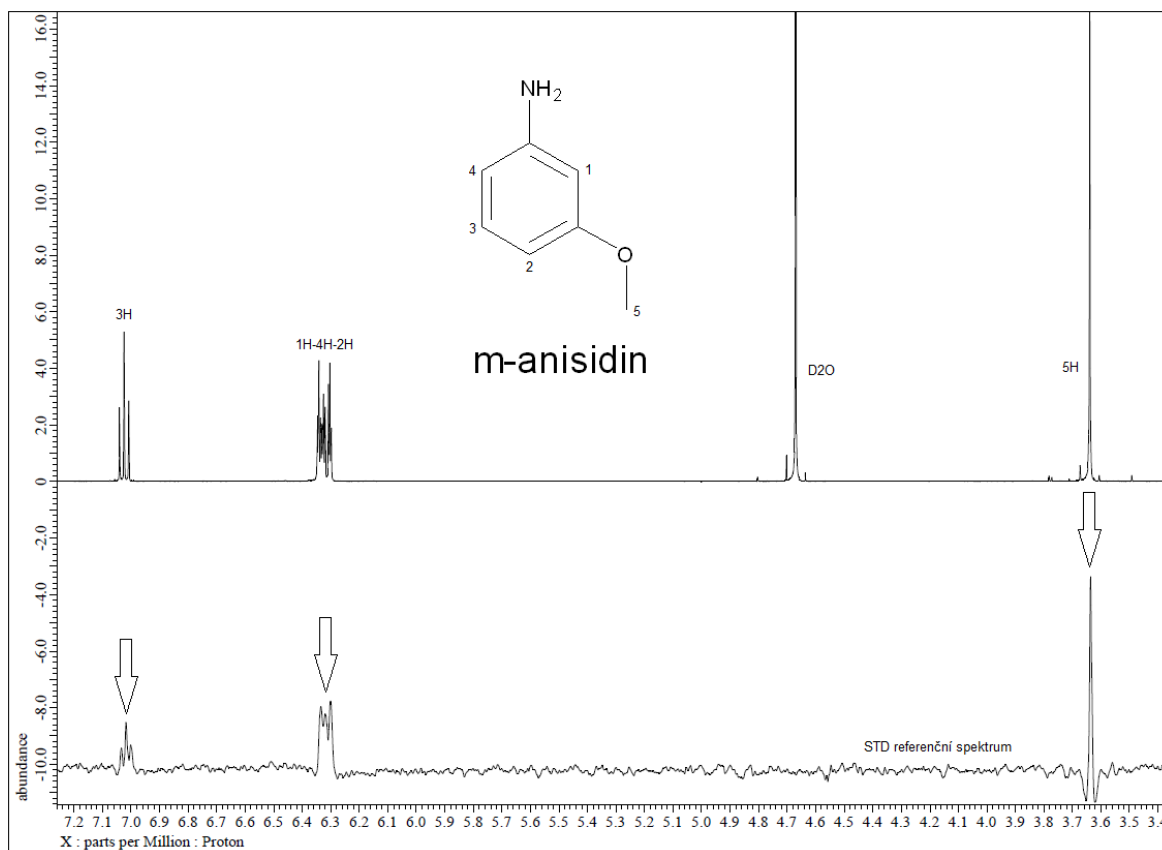
Jak již bylo zmíněno, enzym *AtCKX2* je jedním z nejvíce studovaných a nejvíce zastoupených proteinů v *Arabidopsis thaliana* (Werner T et al., 2003). Z důvodu dosud nekompletně prostudovaných vlivů cytokininů na růst a vývoj

rostlin, se jeví možnost inhibovat jeden z enzymů podílející se právě na regulaci cytokininů v rostlině jako slibný krok v jejich dalším studiu. V dnešní době již existuje řada inhibitorů cytokinin oxidasy/dehydrogenasy (Zatloukal M et al., 2008; Aremu A O et al., 2014).

Exprese, izolace a purifikace proteinu *AtCKX2* z *P. pastoris* byla provedena úspěšně, když se podařilo izolovat vzorek o koncentraci 201 mM a objemu 500 uL. Jeho aktivita byla stanovena na 323,6 pKat / mL. Oproti velikosti proteinu exprimovaného v *Saccharomyces cerevisiae* (61 kDa), zmiňované v práci J. Frébortové et al. (2007) bude velikost *AtCKX2* z *P. pastoris* v rozmezí od 15 do 30 kDa a to na základě toho, že při zakoncentrovávání vzorku pomocí systému Amicon Ultra-15, nebyl protein zachycen na síti s velikostí do 30 kDa, ale byl zachycen až na síti s velikostí do 15 kDa. Pravděpodobně bude protein postrádat některé posttranslační modifikace, jako je například glykosylace (Amstrong D J, 1994 in Mok D W S, Mok M C, 2001).

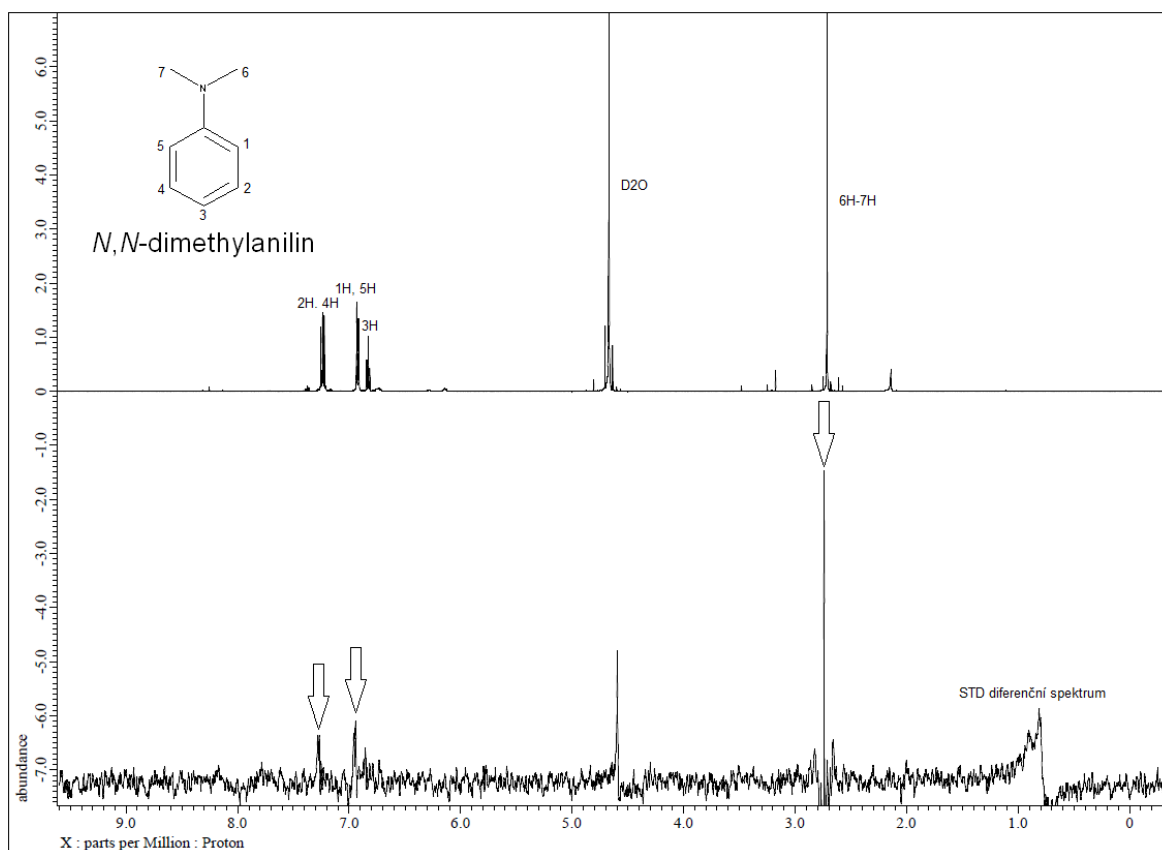
Pro prvotní experimenty byly za ligandy interagující s CKX2 enzymem vybrány známé cytokininy jako jsou kinetin, 6-benzylaminopurin a INCYDE. STD spektra těchto látek se však nepodařilo změřit, z důvodu malé rozpustnosti těchto látek ve vodných roztocích. Abychom zabránili precipitování látek ve vodném pufru, kde se nacházel protein, a zachovali přitom jejich koncentraci alespoň v řádu jednotek mM, museli bychom mít v roztoku přebytek DMSO oproti vodě. To ale není možné, protože jsme zjistili, že i při 5 % koncentraci DMSO ve vodě dochází k denaturaci proteinu. Proto byly na základě strukturální analogie s již prokázanými inhibitory CKX enzymu (Aremu A O et al., 2014; Zatloukal M et al., 2008) zvoleny ligandy s dostatečnou rozpustností ve vodě. Jednalo se převážně o různé fragmenty inhibitorů odvozených od 6-anilinopurinu. Zvolenými fragmenty byly *m*-anisidin, *N,N*-dimethylanilin, 6-chloropurin, benzylamin, anilin, *N,N*-dimethylurea, 6-chloropurin ribosid.

V STD diferenčním spektru s látkou *m*-anisidinem (Obr. 26) pozorujeme STD efekt u všech protonů.



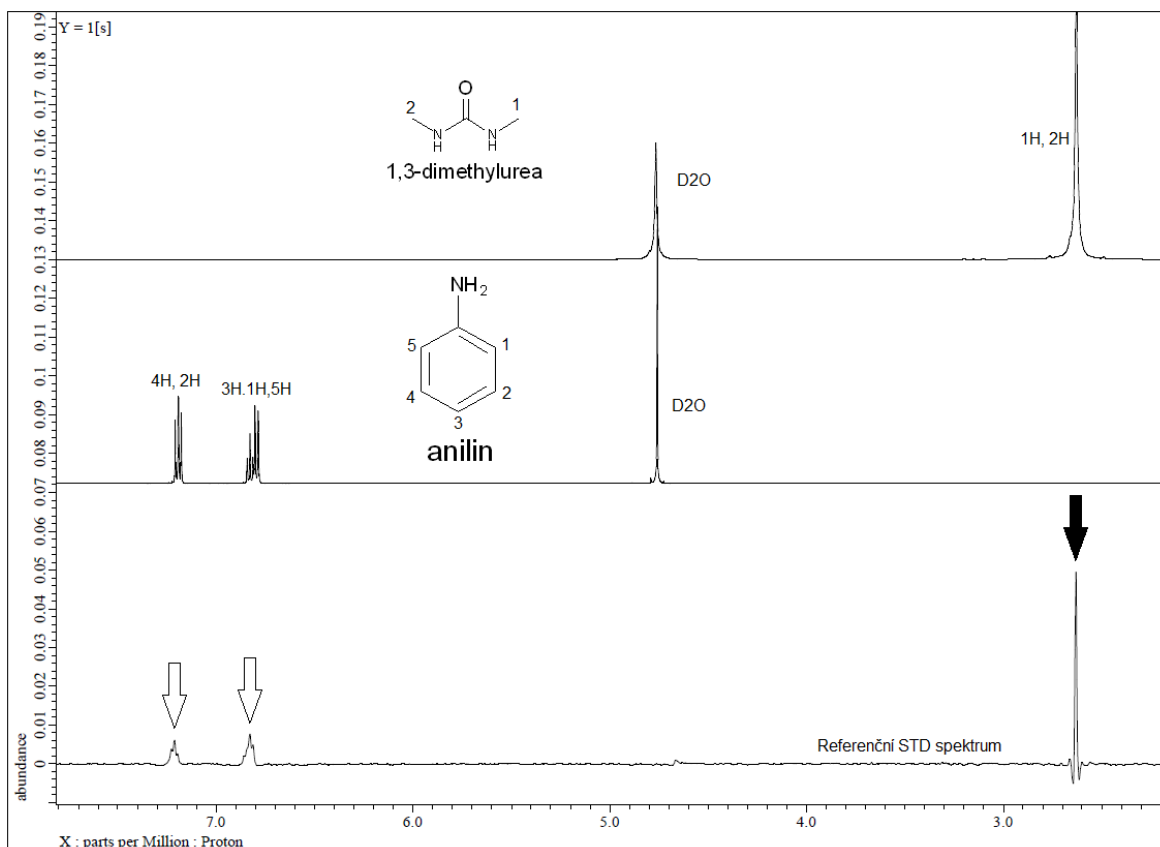
Obr. 26 Protomy *m*-anisidinu interagující s CKX2 enzymem znázorněné v STD diferenčním spektru prázdňou šipkou.

Látka pravděpodobně zapadá celá do jedné z proteinových kavit, ve které interaguje s proteinem vodíkovými vazbami. U látky *N,N*-dimethylanilinu (Obr. 27) nastává stejná situace jako u *m*-anisidinu. Veškeré protony interagují s CKX2, díky čemuž detekujeme signály všech jejích protonů v STD diferenčním spektru.



Obr. 27 Protony *N,N*-dimethylalaninu interagující s proteinem CKX2 (prázdná šipka).

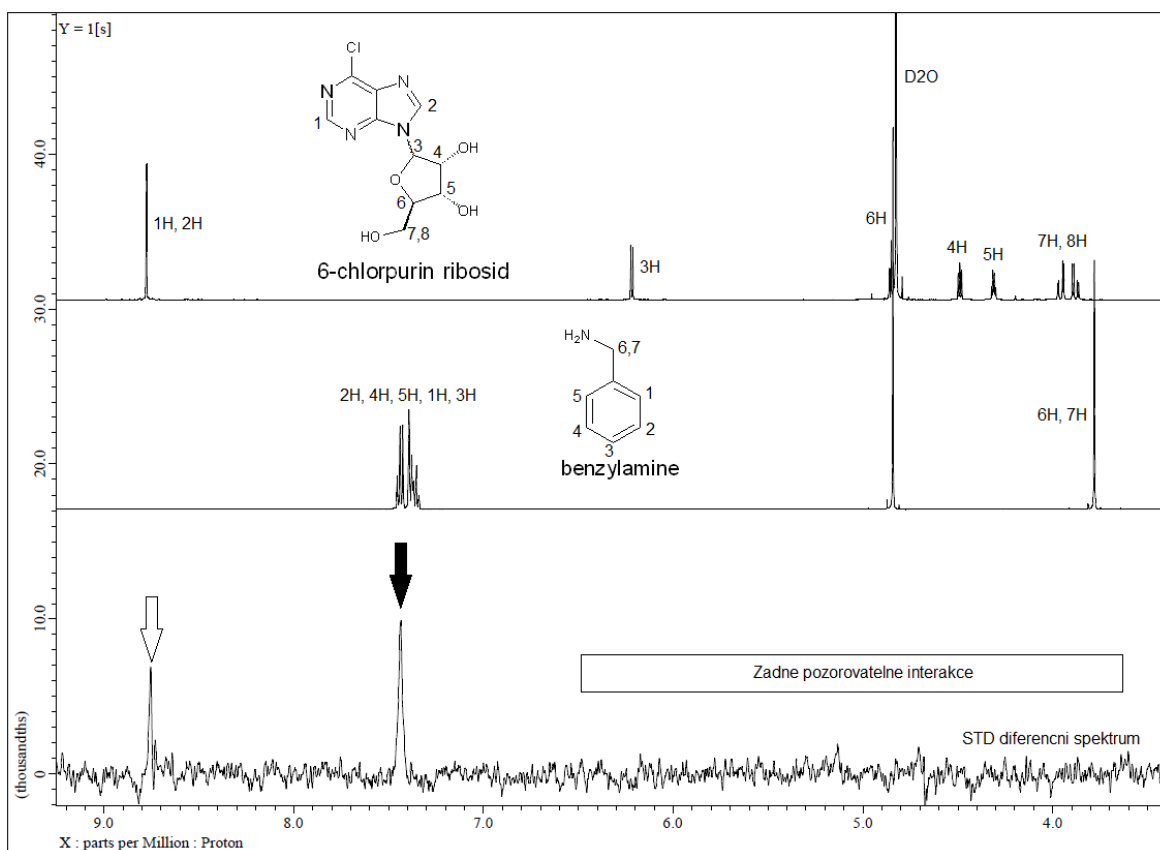
Jednou z výhod STD metody je i možnost testovat v jednom experimentu najednou více látek (běžně 5–10 látek v jednom vzorku (Krishna N R, Berliner L J 2003). Proto jsme pokusně otestovali alespoň dvě látky současně, a to anilin a 1,3-dimethylureu (Obr. 28).



Obr. 28 Protony anilinu interagující s proteinem CKX2 (prázdná šipka), plná šipka reprezentuje protony 1,3-dimethylurey interagující s proteinem CKX2.

V STD diferenčním spektru detekujeme všechny aromatické protony anilinu, který opět pravděpodobně zapadá do některé z kavit proteinu. Ve spektru je viditelný i signál odpovídající methylovým skupinám 1,3-dimethylurey.

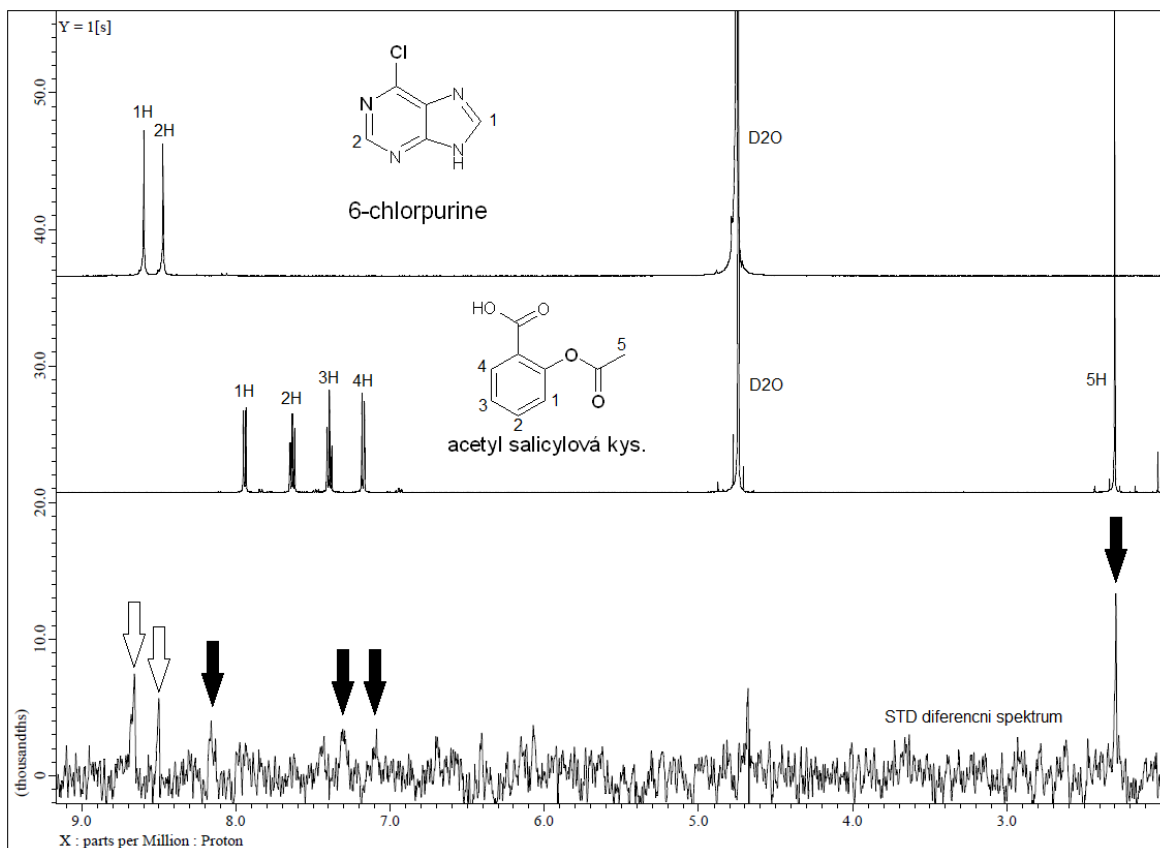
Při dalším multikomponentním experimentu byly testovány společně látky 6-chlorpurin ribosid a benzylamin (Obr. 29).



Obr. 29 Protony 6-chlorpurin ribosidu interagující s CKX2 (prázdná šipka), interagující protony benzylaminu (plná šipka).

Je velice dobře patrné, že jedinými protony, které interagují s CKX2 enzymem v případě 6-chlorpurin ribosidu jsou aromatické protony purinového heterocyklu a nikoliv protony ribózy. Takovýto výsledek nám jednoznačně ukazuje na specifickou orientaci ligandu při vazbě na protein. Můžeme tedy usuzovat, že purinová jednotka 6-chlorpurin ribosidu je v kavitě enzymu, kdežto ribóza vně respektive nevytváří žádnou přímo interakci s enzymem. V případě benzylaminu je patrné, že vazebnou interakci vykazují aromatické protony, kdežto protony methylenového můstku ne. Podle STD diferenčního spektra (pík s posunem 7,5 ppm) ovšem nelze přesněji určit, který či které aromatické protony vazbu vykazují. Látka tudíž interaguje s enzymem jen svoji aromatickou částí, „alifatická“ část je orientována mimo enzym.

V posledním experimentu byly změřeny látky 6-chlorpurin a acetyl salicylová kyselina (Obr. 30).



Obr. 30 Protony 6-chlorpurinu interagující s CKX2 reprezentují prázdné šipky, plné šipky zobrazují protony acetyl salicylové kyseliny interagující s enzymem CKX2.

Zde STD diferenční spektrum vykazuje interakci enzymu s 6-chlorpurinem. Takovýto výsledek naznačuje skutečnost, že 6-chlorpurin zapadá celý do proteinové kavity, což odpovídá interakci enzymu s 6-chlorpurin ribosidem. U kyseliny acetylsalicylové byl zaznamenán STD efekt pro protony acetylové skupiny (5H), kdežto u aromatických protonů (2-4H) je tento efekt velmi slabý. To může naznačovat nesespecifické interakce.

Jak již bylo zmíněno dříve, jako hlavní nevýhoda STD experimentu je, že nedokážeme jednoduše rozlišit specifické a nesespecifické vazebné interakce. Pro rozlišení těchto interakcí musí následovat další ověřovací experimenty, a to buď kvantitativním STD experimentem (Cala O, Krimm I, 2015) nebo titrací se silnějším (či lépe rozpustným) kompetitivním ligandem (pokud je k dispozici), či jinou biofyzikální metodou (Silvestre L H et al., 2013).

6 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zavedení nové metody studia ligand-proteinových interakcí pomocí nukleární magnetické rezonanční spektroskopie na pracovišti oddělení chemické biologie a genetiky Centra regionu Haná pro zemědělský a biotechnologický výzkum.

Pro tento účel byla s pomocí firmy JEOL optimalizována pulzní sekvence pro STD experiment, aby co nejlépe vyhovovala našim potřebám. Tato sekvence byla otestována na známém komplexu HSA - 6-methyl-D,L-tryptofan, kdy byla snaha replikovat známé hodnoty charakterizující vazebnou interakci, jako je křivka amplifikačního faktoru či K_D .

Po úspěšném zopakování STD experimentu a tudíž ověření, že i v našich podmínkách tato metoda funguje, byla otestována řada pravděpodobných ligandů na purifikovaném proteinu CKX2. I zde se podařilo prokázat interakce mezi jednotlivými ligandy a proteinem. Na základě postupu uvedeném v této práci je tak možné využívat danou metodu jako rutinní metodu zejména při vývoji nových biologicky aktivních látek pomocí takzvaného fragmentového přístupu.

7 Literatura

Andrew E. R., Bradbury A., Eades R. G. (1959) Removal of dipolar broadening of nuclear magnetic resonance spectra of solids by specimen rotation. *Nature*. **183**: 1802-1803.

Aremu A. O., Masondo N. A., Sunmonu T. O., Kulkarni M. G., Zatoukal M., Spichal L., Doležal K., van Staden J. (2014) A novel inhibitor of cytokinin degradation (INCYDE) influences the biochemical parameters and photosynthetic apparatus in NaCl-stressed tomato plants. *Planta*. **240**(4): 877-889.

Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O. (2001) Molecular and biochemical characterization of a cytokinin oxidase from maize. *Plant Physiology*. **125**: 378–386.

Bloch F., Hansen W., Packard M. (1946) Nuclear induction. *Physical review*. **69**: 127.

Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. **72**: 248-254.

Cala O., Guillière F., Krimm I. (2013) NMR-based analysis of protein-ligand interactions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **406**(4): 943-956.

Cala O., Krimm I. (2015) Ligand-Orientation Based Fragment Selection in STD NMR Screening, *Journal of Medicinal Chemistry*. **58**: 8739–8742.

Carbajo R. J., Neira J. L. (2013) NMR for chemists and biologists, str. 46-49, Springer Dordrecht Heidelberg, NY, UK.

Cuatrecasas P. (2006) Drug discovery in jeopardy. *Journal of Clinical Investigation*. **116**(11): 2837–2842.

Dalvit C., Fasolini M., Flocco M., Knapp S., Pevarello P., Veronesi M. (2002) NMR-Based Screening with Competition Water-Ligand Observed via Gradient Spectroscopy Experiments: Detection of High-Affinity Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. **45**(12): 2610–2614.

Dalvit C., Fogliatto G., Stewart A., Veronesi M., Stockman B. (2001) WaterLOGSY as a method for primary NMR screening: practical aspects and range of applicability. *Journal of Biomolecular NMR*. **21**: 349–359.

Dalvit C., Pevarello P., Tato M., Veronesi M., Vulpetti A., Sundstrom M. (2000) Identification of compounds with binding affinity to proteins via magnetization transfer from bulk water. *Journal of Biomolecular NMR*. **18**: 65–68.

Ernst R. R., Anderson W. A. (1966) Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Review of Scientific Instruments*. **37**: 93-102.

- Frébortová J., Galuszka P., Werner T., Schmölling T., Frébort I. (2007) Functional expression and purification of cytokinin dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana* (AtCKX2) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia Planarum*. **51**: 673-682.
- Furihata K., Shimotakahara S., Shibusawa Y., Tashiro M. (2009) Application of WET sequence for the detection of the ligand signals resonating close to water. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **47**: 971–976.
- Furihata K., Shimotakahara S., Shibusawa Y., Tashiro M. (2010) An effective pulse sequence for detecting a ligand binding with a protein receptor using a WET sequence and the repeated Zfilters. *Analytical Sciences*. **26**: 1107–1110.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P. (2001) Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry*. **268**: 450–461.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I. (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*. **271**: 3990-4002.
- Galuszka P., Šebela M., Luhová L., Zajoncová L., Frébort I., Strnad M., Peč P. (1998) Cytokinins as inhibitors of plant amine oxidase. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. **13**: 457–463.
- Gorter C. J. (1936) Negative result of an attempt to detect nuclear magnetic spins. *Physica*. **3**(9): 995-998.
- Gu R., Fu J., Guo S., Duan F., Wang Z., Mi G., Yuan L. (2010) Comparative expression and phylogenetic analysis of maize cytokinin dehydrogenase/oxidase (CKX) gene family. *Journal of Plant Growth Regulation*. **29**: 428–440.
- Hajduk P. J., Olejniczak E. T., Fesik S. W. (1997) One-dimensional relaxation – and diffusion-edited NMR methods for screening compounds that bind to macromolecules. *Journal of the American Chemical Society*. **119**: 12257-12261.
- Hare P. D., van Staden J. (1994) Cytokinin oxidase: Biochemical features and physiological significance. *Physiologia Plantarum*. **91**: 128-136.
- Harner M. J., Mueller L., Robbins K. J., Reily M. D. (2017) NMR in drug design. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **628**: 132-147.
- Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M. (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *The Plant Journal*. **17**: 615–626.
- Chatfield J. M., Armstrong D. J. (1987) Cytokinin oxidase from *Phaseolus vulgaris* callus tissues. *Plant Physiology*. **84**: 726–731.
- Jacobsen N. E. (2007) NMR spectroscopy explained, str. 187-198, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

- Jahnke W., Widmer H. (2004) Protein NMR in biomedical research. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **61**: 580-599.
- Ji Z., Yao Z., Liu M. (2009) Saturation Transfer Difference Nuclear Magnetic Resonance Study on the Specific Binding of Ligand to Protein. *Analytical Biochemistry*. **385**(2): 380–382.
- Keller J. (2010) Understanding NMR spectroscopy – Second edition, str. 241-317, John Wiley & Sons, Chichester, WS, UK.
- Kowalska M., Galuszka P., Frébortová J., Šebela M., Béres T., Hluska T., Šmehilová M., Bilyeu K. D., Frébort I. (2010) Vacuolar and cytosolic cytokinin dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*: heterologous expression, purification and properties. *Phytochemistry*. **71**: 1970–1978.
- Krishna N. R., Berliner L. J. (2003) Protein NMR for the Millennium, str. 287-337, Springer, New York, USA.
- Laloue M., Fox J. E.: Characterisation of an imine intermediate in the degradation of isopentenylated cytokinins by a cytokinin oxidase from wheat. *12th International Conference on Plant Growth Substances*, International Plant Growth Association, Heidelberg, Germany 1985, page 23.
- Macarron R. (2006) Critical review of the role of HTS in drug discovery. *Drug Discovery Today*. **11**(7–8): 277–279.
- Marion D. (2013) An introduction to biological NMR. *Molecular & Cellular Proteomics*. **12**(11): 3006-3023.
- Maurer T., Garrenton L. S., Oh A., Pitts K., Anderson D. J., Skelton N. J., Fauber B. P., Pan B., Malek S., Stokoe D., Ludlam M. J. C., Bowman K. K., Wu J., Giannetti A. M., Starovasnik M. A., Mellman I., Jackson P. K., Rudolph J., Wang W., Fang G. (2012) Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **109**(14): 5299-5304.
- Mayer M., Meyer B. (1999) Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*. **38**: 1784-1788.
- Meyer B., Peters T. (2003) NMR Spectroscopy Techniques for Screening and Identifying Ligand Binding to Protein Receptors. *Angewandte Chemie International Edition*. **42**(8): 864-890.
- Mok D. W. S., Mok M. C. (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*. **52**: 89–118.
- Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N. (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. **255**: 328–333.
- Overhauser A. W. (1953) Polarization of nuclei in metals. *Physical review*. **92**: 411-415.

- Pačes V., Werstiuk E., Hall R. H. (1971) Conversion of N⁶-(D2-isopentenyl)adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*. **48**: 775–778.
- Pauli W. (1927) Zur Quantenmechanik des magnetischen Elektrons Zeitschrift für. *Physik*. **43**: 601-623.
- Popa I., Novotná R. (2012) Základy NMR spektroskopie, str. 13-51, Univerzita Palackého v Olomouci, CZ.
- Powers R. (2009) Advances in nuclear magnetic resonance for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*. **4**(10): 1077–1098.
- Proctor W. G., Yu F. C. (1950) The dependence of a nuclear magnetic resonance frequency upon chemical compound. *Physical review*. **77**: 717.
- Purcell E. M., Torrey H. C., Pound R. V. (1946) Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Physical review*. **69**: 37.
- Rabi I. I. (1937) Space quantization in a rotating magnetic field. *Physical review*. **51**: 652-654.
- Rishton G. M. (1997) Reactive compounds and in vitro false positives in HTS. *Drug Discovery Today*. **2**(9): 382–384.
- Shuker S. B., Hajduk P. J., Meadows R. P., Fesik S. W. (1996) Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science*. **274**: 1531-1534.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., y Manns I. B. (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of plant research*. **116**: 241-252.
- Silvestrea H. L., Blundell T. L., Abell C., Ciulli A. (2013) Integrated biophysical approach to fragment screening and validation for fragment-based lead discovery. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **110**: 12984-12989.
- Stark J. L., Powers R. (2011) Application of NMR and Molecular Docking in Structure-Based Drug Discovery. In: Zhu G. (eds) *NMR of Proteins and Small Biomolecules*. Topics in Current Chemistry, vol 326. Springer, Berlin, Heidelberg
- Unione L., Galante S., Díaz D., Canada F. J., Jiménez-Barbero J. (2014) NMR and molecular recognition. The application of ligand-based NMR methods to monitor molecular interactions. *Medicinal Chemical Communications*. **5**: 1280-1289.
- Viegas A., Manso J., Nobrega F. L., Cabrita E. J. (2011) Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *Journal of Chemical Education*. **88**: 990-994.
- Vyroubalová S., Václavíková K., Turečková V., Novák O., Šmehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P. (2009) Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant Physiology*. **151**: 433-447.

- Wagner G., Wüthrich K. (1978) Dynamic model of globular protein conformation based on NMR studies in solution. *Nature*. **275**(5677): 247-248.
- Wang Y., Liu D., Wyss D. F. (2004) Competition STD NMR for the detection of high-affinity ligands and NMR-based screening. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **42**: 485-489.
- Werner T., Köllmer I., y Manns I. B., Holst K., Schmölling T. (2006) New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*. **8**: 371-381.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., van Onckelen H. (2003) Cytokinin-deficient transgenic Arabidopsis plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*. **15**: 1–20.
- White R. H. (2006) The difficult road from sequence to function. *Journal of Bacteriology*. **188**(10): 3431–3432.
- Whitty C. D., Hall R. H. (1974) A cytokinin oxidase in Zea mays. *Canadian journal of biochemistry*. **52**: 787–799.
- Xia Y., Zhu Q., Jun K-Y., Wang J., Gao X. (2010) Clean STD-NMR spectrum for improved detection of ligand-protein interactions at low concentration of protein. *Magnetic Resonance in Chemistry*. **48**: 918–924.
- Zatloukal M., Gemrotova M., Dolezal K., Havlicek L., Spichal L., Strnad M. (2008) Novel potent inhibitors of A. thaliana cytokinin oxidase/ dehydrogenase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **16**: 9268-9275.