

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Tomáš Pazderka

Studium dynamiky proteinů pomocí optické spektroskopie

Fyzikální ústav UK

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

Konzultant: Doc. RNDr. Vladimír Baumruk, DrSc.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

2009

V první řadě bych chtěl poděkovat Dr. Vladimíru Kopeckému Jr. za vedení diplomové práce. Dále bych chtěl poděkovat doc. Vladimíru Baumrukovi za rady ohledně vyhodnocování výsledků měření a pomoc při experimentech, Dr. Kateřině Hofbauerové za pomoc při experimentech, přípravu vzorků a cenné rady z oblasti chemie a biochemie, doc. Jiřímu Bokovi za pomoc při pronikání do teoretických výpočtů studované problematiky a dále Danielu Rozbeskému za přípravu vzorků proteinu NKR-P1.

Také bych chtěl poděkovat kolektivu Oddělení fyziky biomolekul za příjemné pracovní prostředí a všechny poskytnuté rady a pomoc při mém experimentování.

Své rodině a přítelkyni bych chtěl poděkovat za podporu při mém studiu.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a jejím zveřejňováním.

V Praze dne 4.9.2009

Tomáš Pazderka

Obsah

Seznam použitých zkratk	6
1 Úvod	8
1.1 Proteiny	8
1.2 Dvoudimenzionální korelační spektroskopie	9
2 Proteiny a jejich studium pomocí 2DKoS	10
2.1 Zobecněná 2D korelační spektroskopie	10
2.1.1 Numerické výpočty korelačního spektra	13
2.2 Aplikace 2D korelační analýzy na studium dynamiky proteinů	14
2.2.1 Ramanova optická aktivita	17
2.3 Lysozym	19
2.4 Protein NKR-P1	19
3 Materiály a experimentální postupy	20
3.1 Materiál	20
3.2 Faktorová analýza	20
3.3 Ramanova spektroskopie	21
3.3.1 Ramanův spektrometr	21
3.4 Ramanova optická aktivita	22
3.4.1 ROA aparatura	22
3.4.2 Zpracování spekter Ramanovy optické aktivity	23
3.4.3 Zpracování Ramanových spekter	27
3.5 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků	30
3.5.1 Ramanův mikrospektrometr	30
3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	31
3.6.1 Zpracování FTIR spekter	32
3.6.2 FTIR spektrometr	32
4 Výsledky a diskuze	34
4.1 Vytvoření programu na 2DKoS s grafickým uživatelským prostředím	34
4.2 Testování rutin a rozšíření metodiky	35
4.3 Ramanova spektra lysozymu	47
4.4 Spektra Ramanovy optické aktivity lysozymu	52

4.5	FTIR spektra NKR-P1	65
4.6	Ramanova spektra NKR-P1	72
5	Závěr	82
	Literatura	83
	Přílohy	87

Název práce: Studium dynamiky proteinů pomocí optické spektroskopie
Autor: Bc. Tomáš Pazderka
Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK
Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.
e-mail vedoucího: kopecky@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: V rámci diplomové práce byl vytvořen a otestován software pro dvou-dimenzionální korelační spektroskopii (2DKoS). Na modelových případech byly otestovány jednotlivé možné jevy v 2DKoS analýze vibračního cirkulárního dichroismu. Pro účely praktické aplikace 2DKoS byly změřeny teplotní a časové závislosti Ramanových spekter a spekter Ramanovy optické aktivity proteinu lysozymu. Fibrilace a teplotní denaturace lysozymu byla analyzována pomocí 2DKoS a faktorové analýzy (FA). Druhým studovaným systémem byly proteiny NKR-P1A a NKR-P1C, jejich teplotní dynamika byla monitorována pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a Ramanovy spektroskopie. Pomocí 2DKoS se podařilo charakterizovat dynamické chování všech studovaných proteinů.

Klíčová slova: Dvoudimenzionální korelační spektroskopie, Ramanova optická aktivita, Lysozym, Ramanova spektroskopie, Infračervená spektroskopie, protein NKR-P1.

Title: Protein dynamics studied by means of optical spectroscopy
Author: Bc. Tomáš Pazderka
Department: Institute of Physics of Charles University
Supervisor: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.
Supervisor's e-mail address: kopecky@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: In this diploma thesis a software for Two-dimensional correlation spectroscopy (2DCoS) was programmed and tested. Possible spectral phenomena in 2DCoS analysis of vibrational circular dichroism were tested on model cases. Thermal and time dependent series of Raman and Raman optical activity spectra of lysozyme protein were measured for practical applications of 2DCoS. Fibrillation and denaturation process of lysozyme was analyzed by means of 2DCoS and Factor analysis (FA). Proteins NKR-P1A and NKR-P1C were also studied and their thermal dynamics was monitored by means of Fourier transformed infrared spectroscopy and Raman spectroscopy. Dynamical behaviour of all studied proteins was characterized using 2DCoS.

Keywords: Two-dimensional correlation spectroscopy, Raman optical activity, Lysozyme, Raman spectroscopy, Infrared spectroscopy, NKR-P1 protein.

Seznam použitých zkratek

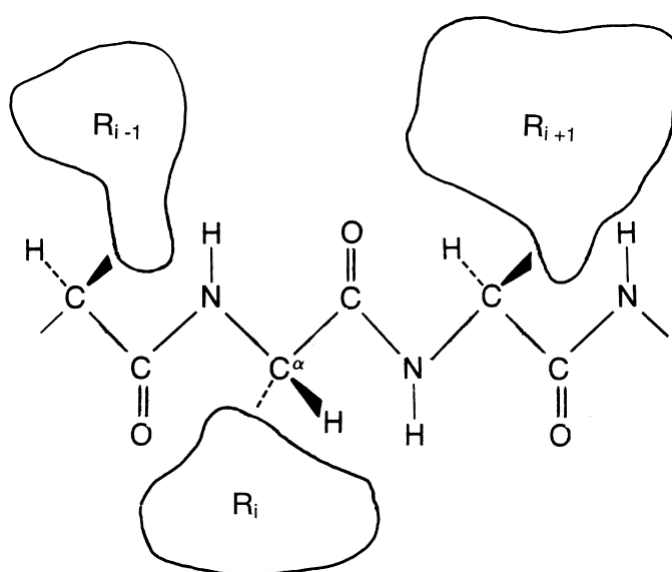
2D	Dvoudimenzionální
2DKoS	Dvoudimenzionální korelační spektroskopie
3D	Trojdimenzionální
a.u.	Arbitrární jednotky (arbitrary units)
ATR	Zeslabená totální reflexe
CCD	Charge-coupled device
CD	Církulární dichroismus
DCDR	Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků (drop coating deposition Raman spectroscopy)
DIRLD	Dynamický infračervený lineární dichroismus (Dynamic IR Linear Dichroism)
DTGS	Deuterated Triglycine Sulfate
FA	Faktorová analýza
FT	Fourierova transformace
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GUI	Grafické uživatelské prostředí
ICP	Incident circular polarization
IR	Infračervená spektroskopie
LIRS	Laser injection rejection system
MCT	Mercury-Cadmium Telluride
NK	Přirozeně zabíječské buňky (natural killer cells)
NKR-P	Receptorový protein přirozeně zabíječských buňek
NMR	Nukleární magnetická resonance

ROA	Ramanova optická aktivita
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan $((\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2)$
UV–VIS	Ultrafialová až viditelná oblast
VOA	Vibrační optická aktivita

1 Úvod

1.1 Proteiny

Proteiny jsou základními prvky všech živých organismů. Plní v nich různé funkce, od stavby vlastní buňky, přes transportní funkce, regulace buněčných mechanismů až po obranné a ochranné funkce (Alberts et al., 1998). Jsou to velké biologické makromolekuly složené z menších stavebních jednotek zvaných aminokyseliny. Jednotlivé aminokyseliny jsou mezi sebou spojeny amidovou vazbou (obr. 1.1) a tvoří tak řetězce.



Obrázek 1.1: Amidová vazba v proteinu (přepřacováno z Barron et al., 2000).

U struktury proteinů rozlišujeme čtyři druhy. První je primární struktura, která je dána sekvencí aminokyselin v řetězci. Ta přímo určuje chemické vlastnosti proteinu a také se od ní přímo odvíjí vyšší struktury. Další je sekundární struktura, která popisuje uspořádání řetězce na krátké vzdálenosti. Týká se tedy jen několika po sobě jdoucích aminokyselin (až desítky). Mezi její zástupce patří např. α -helix, β -skládaný list a různé otkčky. Uspořádání těchto prvků sekundární struktury v prostoru se nazývá terciární struktura. U některých proteinů lze nalézt i kvartérní struktura, která udává vzájemnou pozici jednotlivých podjednotek (samostatných řetězců) proteinu.

Studium struktury proteinů a dynamického chování jejich struktury je důležité pro pochopení fungování jednotlivých proteinů, pro pochopení vzniku řady chorob spojených se špatným sbalením proteinové struktury a následně pro vývoj léků cílených na konkrétní proteiny. V současné době se pro studium těchto struktur využívají hlavně techniky rentgenostrukturní analýzy a

NMR spektroskopie, které dokáží vyřešit jejich 3D strukturu. Přesto však existují problémy, které se s jejich pomocí řešit nedají (např. agregace a fibrilace proteinů). Pak na jejich místo nastupují techniky optické spektroskopie, např. UV–VIS, CD, FTIR a Ramanova spektroskopie, které sice nejsou schopny poskytnout kompletní 3D strukturu, ale při využití moderních matematických metod (např. FA a 2DKoS) dodají velké množství informací o struktuře a dynamice proteinu.

1.2 Dvoudimenzionální korelační spektroskopie

Metoda 2DKoS původně vznikla v oblasti NMR spektroskopie. Již od jejího počátku byly snahy přenést ji i do oblasti optické spektroskopie, protože dokáže určit pořadí změn jednotlivých pásů ve spektru a má také mnohem lepší dekonvoluční schopnosti. Tato snaha však narazila na problémy s časovou škálou, protože bylo třeba excitovat systém velmi krátkými pulsy. To však nebylo až do sestrojení femtosekundových laserů možné, a proto byla snaha o vytvoření nějaké zobecněné formy 2DKoS. K praktickému využití tzv. obecné 2DKoS mohlo dojít teprve v roce 1986, kdy Isao Noda rozpracoval její základní teorii (Noda, 1986). V ní je místo krátkých excitačních pulsů využito poruch ve vnějších podmínkách systému – tzv. perturbací (např. změny pH, teploty, koncentrace aj.) a takto „porušený“ systém je pak analyzován jednou či více spektroskopickými technikami. Získaná spektra jsou následně zpracována pomocí jisté korelační funkce do podoby dvoudimenzionálního spektra. Tato metoda nám tedy umožňuje studovat odezvy systému na různé fyzikálně-chemické podněty s využitím konvenčních spektrometrů, bez nutnosti použití femtosekundových laserů. Navíc nám poskytuje i informaci o sledu a vzájemné souvislosti jednotlivých změn spektrálních pásů v závislosti na vnějším podnětu (Noda, 1990).

2 Proteiny a jejich studium pomocí 2DKoS

2.1 Zobecněná 2D korelační spektroskopie

Pro použití 2D korelační spektroskopie nejprve potřebujeme získat sadu spekter změřených na systému, který byl přinucen nějakým vnějším podnětem ke změně. Spektrální intenzity této sady můžeme vyjádřit jako $I(\nu, t)$, kde ν je spektrální charakteristika (vlnočet, vlnová délka nebo Ramanův posun) a t je parametr vnějšího podnětu. Tím může být vývoj systému v čase, teplota, pH, koncentrace a podobně. Spektrální závislost jsme schopni změřit pouze pro určitý rozsah parametru t , a proto zavádíme tzv. dynamické spektrum definované dle vztahu (Noda, 1993a):

$$\tilde{y}(\nu, t) = \begin{cases} y(\nu, t) - \tilde{y}(\nu) & \text{pro } T_{min} \leq t \leq T_{max}, \\ 0 & \text{jinak} \end{cases} \quad (2.1)$$

kde $\tilde{y}(\nu)$ je referenční spektrum systému. Za referenční spektrum se obvykle volí průměrné spektrum, ale lze zvolit i spektrum pozorované při referenční hodnotě parametru t nebo spektrum plně relaxovaného systému.

Korelační spektrum může být vyjádřeno pomocí předpisu:

$$\chi(\nu_1, \nu_2) = \langle \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) \rangle, \quad (2.2)$$

kde symbol $\langle \rangle$ značí tzv. kros-korelační funkci definovanou předpisem:

$$C(t, \tau) = \langle \Phi(\tau) | \Psi(t) \rangle, \quad (2.3)$$

Toto spektrum vyjadřuje míru funkční závislosti spektrální intenzity mezi dvěma body ν_1 a ν_2 během pevného intervalu vnější proměnné t . Pro další zjednodušení můžeme s touto funkcí zacházet jako s komplexním výrazem a rozdělit ji na synchronní a asynchronní část (Noda, 1993b):

$$\chi(\nu_1, \nu_2) = \Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2). \quad (2.4)$$

Formální definice 2D korelačního spektra je dána jako:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{\pi(T_{max} - T_{min})} \times \int_0^\infty \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2(\omega) d\omega, \quad (2.5)$$

kde výraz $\tilde{Y}_1(\omega)$ je dopředná FT variace spektrální intenzity $\tilde{y}_1(\nu_1, t)$ měřené v určité spektrální proměnné ν_1 v průběhu vnějšího podnětu t . Můžeme si ji tedy přepsat jako:

$$\tilde{Y}_1(\omega) = \int_{-\infty}^\infty \tilde{y}(\nu_1, t) e^{-i\omega t} dt. \quad (2.6)$$

Jak je patrné z rovnice (2.1), tato FT dynamického spektra je svázána s pevným intervalem vnějšího podnětu mezi T_{min} a T_{max} . Fourierova frekvence ω reprezentuje individuální frekvenční komponentu variací spektra $\tilde{y}_1(\nu_1, t)$ sledované podél vnějšího podnětu t . Obdobným způsobem je definována i veličina $\tilde{Y}_2(\omega)$, která je však zpětnou Fourierovou transformací $\tilde{y}_2(\nu_1, t)$.

Reálná část (nazývaná *synchronní*) nám poskytuje informaci o podobnosti nebo o náhodných trendech mezi dvěma spektrálními intenzitami měřenými za různých vnějších podmínek. Pásky na diagonále odpovídají autokorelační funkci a jejich intenzita proto odpovídá velikosti změny během měřené série spekter. Imaginární část (nazývaná *asynchronní*) nám poskytuje informaci o změnách ve spektru, které se dějí mimo fázi.

Klasická kroskorelační funkce plynoucí z klasické časové analýzy je dána předpisem:

$$C(\tau) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t + \tau) dt. \quad (2.7)$$

Díky jistému překryvu mezi zobecněnou teorií 2D korelační analýzy a statistickou kroskorelační analýzou lze s využitím Wiener-Khintchinského teorému (Noda, 2000) na rovnici (2.5) dojít ke vztahu mezi Fourierovou transformací kroskorelační funkce a časovou Fourierovou transformací dynamických spektrálních variací jako:

$$C(\tau) = \frac{1}{2\pi(T_{max} - T_{min})} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1^*(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) e^{i\omega\tau} d\omega. \quad (2.8)$$

Pokud nastavíme korelační čas $\tau = 0$, tak se rovnice (2.8) zredukuje na:

$$C(0) = \frac{1}{2\pi(T_{max} - T_{min})} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1^*(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega. \quad (2.9)$$

Vzhledem ke skutečnosti, že imaginární část musí obsahovat pouze liché funkce, dojde díky integraci $d\omega$ přes symetrický obor k jejímu vymizení. Z celého integrálu zbyde pouze reálná část:

$$\begin{aligned} C(0) &= \frac{1}{\pi(T_{max} - T_{min})} \Re \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1^*(\omega) \cdot \tilde{Y}_2(\omega) d\omega \right\} \\ &= \frac{1}{\pi(T_{max} - T_{min})} \Re \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega \right\}. \end{aligned} \quad (2.10)$$

Podle rovnice (2.4) se tedy jedná přímo o synchronní spektrum, které tak může být velmi snadno spočteno podle:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) dt. \quad (2.11)$$

Pro výpočet asynchronního spektra je nutné použít Hilbertovu transformaci (Noda, 2000). Pro danou analytickou funkci $g(t)$ je Hilbertova transformace $h(t)$ této funkce dána předpisem:

$$h(t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{g(t')}{t' - t} dt', \quad (2.12)$$

kde integrál je Cauchyovský integrál ve smyslu hlavní hodnoty, takže je z integrace vyloučena singulární hodnota výrazu v bodě $t = t'$. Rovnici (2.12) si je možné také představit jako konvoluční integrál funkcí $g(t)$ a $\frac{1}{t}$. S využitím konvolučního teorému tedy můžeme napsat Fourierovu transformaci Hilbertovy transformace jako Fourierovu transformaci funkcí $g(t)$ a $\frac{1}{t}$:

$$H(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} h(t)e^{-i\omega t} dt = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{1}{t} e^{-i\omega t} dt \cdot \int_{-\infty}^{\infty} g(t)e^{-i\omega t} dt. \quad (2.13)$$

Fourierovy transformace funkcí $g(t)$ a $h(t)$ jsou spolu svázány jako:

$$H(\omega) = i \operatorname{sgn}(\omega) \cdot G(\omega) = \begin{cases} G^{\Im}(\omega) - iG^{\Re}(\omega) & \text{pro } \omega < 0 \\ 0 & \text{pro } \omega = 0 \\ -G^{\Im}(\omega) + iG^{\Re}(\omega) & \text{pro } \omega > 0. \end{cases} \quad (2.14)$$

Zjednodušeně si lze Hilbertovu transformaci představit jako funkci, která posouvá fázi každé Fourierovy komponenty transformované funkce dopředu o $\frac{\pi}{2}$ pokud je $\omega > 0$ a o $\frac{\pi}{2}$ dozadu, pokud je $\omega < 0$. Z toho tedy vyplývá, že jsou funkce $g(t)$ a $h(t)$ ortogonální.

Můžeme si tedy zavést ortogonální spektrum $\tilde{z}(\nu_2, t)$ jako časovou Hilbertovu transformaci dynamického spektra $\tilde{y}(\nu_2, t)$:

$$\tilde{z}(\nu_2, t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\tilde{y}(\nu_2, t')}{t' - t} dt', \quad (2.15)$$

kde integrál je opět ve smyslu hlavní hodnoty. Toto spektrum je tedy funkcí, kde je fáze každé Fourierovské komponenty variací dynamického spektra posunuta o $\frac{\pi}{2}$.

Dvoudimenzionální ortogonální korelační funkce mezi variacemi spektrálních intenzit pozorovaných na vlnočtech ν_1 a ν_2 je tedy dána:

$$D(\tau) = \frac{1}{2\pi(T_{max} - T_{min})} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{z}(\nu_2, t + \tau) dt, \quad (2.16)$$

kde τ je korelační čas. Tato ortogonální korelační funkce je z hlediska svých vlastností shodná s korelační funkcí (2.7). Lze tedy analogicky odvodit s využitím Wiener-Khintchinského teorému vztah pro ortogonální korelační funkci vyjádřenou s pomocí Fourierových transformací dynamického spektra a ortogonálního spektra:

$$D(\tau) = \frac{1}{2\pi(T_{max} - T_{min})} \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1^*(\omega) \cdot \tilde{Z}(\omega) e^{i\omega\tau} d\omega. \quad (2.17)$$

Při využití vztahu (2.14) a při korelačním čase $\tau = 0$ se rovnice (2.17) zredukuje na:

$$D(0) = \frac{i}{2\pi(T_{max} - T_{min})} \int_{-\infty}^{\infty} \operatorname{sgn}(\omega) \tilde{Y}_1^*(\omega) \cdot \tilde{Y}_2(\omega) d\omega. \quad (2.18)$$

Při využití vztahu (2.14) lze rovnici dále upravit do podoby:

$$D(0) = \frac{1}{\pi(T_{max} - T_{min})} \Im \left\{ \int_{-\infty}^{\infty} \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2^*(\omega) d\omega \right\}. \quad (2.19)$$

Protože je funkce signum lichá, zůstane po integraci přes symetrický rozsah pouze imaginární složka kroskorelačního spektra. Podle rovnice (2.4) se tedy $D(0)$ rovná přímo asynchronnímu spektru:

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{z}(\nu_2, t) dt. \quad (2.20)$$

2.1.1 Numerické výpočty korelačního spektra

Matematický aparát zavedený v kapitole (2.1) je pro praktický výpočet těžko použitelný. Při použití algoritmu rychlé Fourierovy transformace je sice výpočet diskretního spektra jednoduchý, ale tento výpočet je potřeba provést pro každý bod 2D spektra zvlášť, což je výpočetně velice náročné.

Pro numericky snadný výpočet synchronního spektra lze využít rovnici (2.11) z předchozí kapitoly:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) dt. \quad (2.21)$$

Tento předpis lze využít pro libovolnou sadu měřených dat. V případě, že jsou data ekvidistantní, lze přejít od integrálu k diskretní sumaci (Noda, 2002):

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}(\nu_1) \cdot \tilde{y}(\nu_2), \quad (2.22)$$

kde m je počet spekter změřených ekvidistantně mezi T_{min} a T_{max} s přírůstkem daným podle:

$$\Delta t = \frac{T_{max} - T_{min}}{m-1}. \quad (2.23)$$

Pokud nejsou data rozdělena tímto způsobem, je nutno použít buď (2.21), nebo vhodnou transformací přejít k ekvidistantnímu rozdělení (Noda, 2002).

Pro další zjednodušení výpočtu lze použít zápis sady naměřených dat pomocí maticové notace, kde dynamické spektrum je reprezentováno jako sloupcový vektor složený podle:

$$\tilde{y}(\nu) = \begin{bmatrix} \tilde{y}(\nu, t_1) \\ \tilde{y}(\nu, t_2) \\ \vdots \\ \tilde{y}(\nu, t_m) \end{bmatrix} \quad (2.24)$$

Pak lze synchronní spektrum jednoduše spočítat podle (Noda, 2000):

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \tilde{y}(\nu_1)^T \tilde{y}(\nu_2). \quad (2.25)$$

Pro výpočet asynchronního spektra lze opět využít rovnici (2.20) uvedenou v předchozí kapitole (2.1):

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{z}(\nu_2, t) dt. \quad (2.26)$$

Analogicky pro ekvidistantně naměřenou sadu dat lze přejít od integrace k sumaci:

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}(\nu_1) \cdot \tilde{z}(\nu_2). \quad (2.27)$$

Diskrétní ortogonální spektrum získáme snadno pomocí lineární transformace:

$$\tilde{z}_j(\nu_2) = \sum_{k=1}^m N_{jk} \cdot \tilde{y}_k(\nu_2), \quad (2.28)$$

kde

$$N_{jk} = \begin{cases} 0 & \text{pro } j = k \\ \frac{1}{\pi(k-j)} & \text{jinak.} \end{cases} \quad (2.29)$$

Při opětovném využití maticového zápisu (2.24) lze asynchronní spektrum přepsat jednoduše jako:

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \tilde{y}(\nu_1)^T N \tilde{y}(\nu_2), \quad (2.30)$$

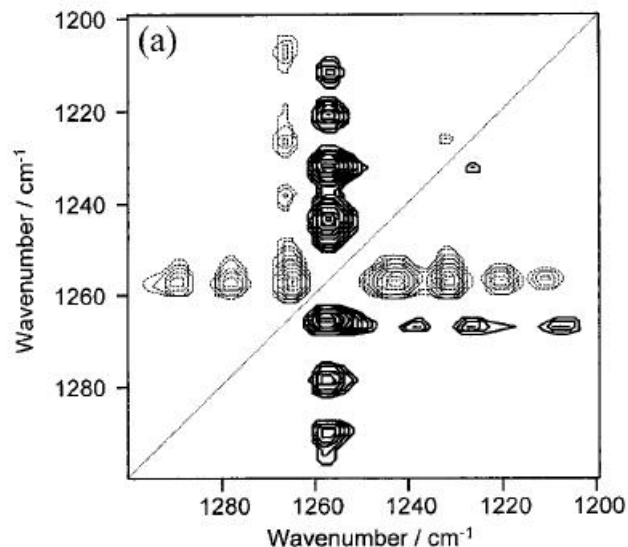
kde matice N je tzv. Hilbert-Nodova transformační matice (Noda, 2000) daná předpisem:

$$N = \frac{1}{\pi} \begin{bmatrix} 0 & 1 & \frac{1}{2} & \frac{1}{3} & \dots \\ -1 & 0 & 1 & \frac{1}{2} & \dots \\ -\frac{1}{2} & -1 & 0 & 1 & \dots \\ -\frac{1}{3} & -\frac{1}{2} & -1 & 0 & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \ddots \end{bmatrix}. \quad (2.31)$$

2.2 Aplikace 2D korelační analýzy na studium dynamiky proteinů

2D korelační analýza je v současné době používána v široké škále spektroskopických metod pro studium dynamiky proteinů (Ozaki, 2002). Její největší využití je pro studium denaturačních procesů proteinů. Díky ní je možné sledovat následnost jednotlivých kroků.

Pokud se jako zdrojová data pro 2DKoS použije pouze jedna metodika, lze studovat pořadí jednotlivých změn ve spektru, jak to na příkladu β -laktoglobulinu ukázali Jung et al., 2000. Těm se podařilo odhalit, že pás na 1258 cm^{-1} , který přísluší neuspořádané struktuře, sdílí kroskorelační pásy s mnoha pásy příslušejícím k β -otočkám (1290 cm^{-1}), α -helixům (1278 cm^{-1}) a β -skládaným listům (1243 a 1233 cm^{-1}) (viz obr: 2.1). Dalším zajímavým pásem je tyrosinový pás na 1265 cm^{-1} , který koreluje s pásy na 1238 , 1227 a 1208 cm^{-1} . Z pořadí těchto jednotlivých změn potom vyplývá, jakým způsobem dochází k vlastní denaturaci laktoglobulinu. Nejprve jsou vodě vystaveny náhodné struktury, následují je β -skládané listy a β otočky, později jsou vodě vystaveny další β -skládané listy, které jsou umístěny hlouběji v proteinu. Jako poslední



Obrázek 2.1: Asynchronní 2D IR spektrum β -laktoglobulinu. Převzato z Jung et al., 2000.

Přiřazení pásu	IR		Raman	
	Synchronní	Asynchronní	Synchronní	Asynchronní
α -helix	1311, 1304	1314, 1305	1318	1311
β -otočka, 3_{10} helix	1291, 1282 1277	1290, 1278 1265	1294, 1282 1276, 1265	1298, 1283 1268
Náhodné klubko	1257	1258	1248, 1243	1255, 1245
β skládaný list	1239, 1227, 1219	1243, 1232, 1221	1228	1235
Tyrosin	1207	1211	1212	1214

Tabulka 2.1: Přiřazení pásů v oblasti Amid III pomocí 2D spekter. Přepřacováno z Ozaki, 2000.

jsou vodě vystaveny tyrosiny. Tyto informace byly dále potvrzeny pomocí Ramanovy spektroskopie a také rentgenovou strukturální analýzou. Podrobnější přiřazení jednotlivých pásů je zobrazeno v tabulce 2.1.

Pomocí spojení FTIR a 2DKoS byl zkoumán také postup denaturace cytochromů *c* (Filosa et al., 2001). Jako vstupní spektra pro 2D korelační analýzu využívají samo-dekonvolovaná FTIR spektra. Z těchto výsledků se jim podařilo sestavit tabulku (viz tab. 2.2), ve které jsou shrnuty jednotlivé procesy. Sloupce a řádky zde znázorňují jednotlivé frekvence pásů, šipky (\uparrow , \downarrow) reprezentují nárůst nebo pokles intenzity pásů s teplotou, znaménka + a - reprezentují znaménko kroskorelačního pásu nad diagonálou (vlevo pro synchronní a vpravo pro asynchronní spektrum) a vodorovná šipka označuje pořadí změn ($X \Leftarrow Y$ znamená, že se změna *X* děje při nižších teplotách než *Y* a naopak).

cm^{-1}	1684 \uparrow	1652 \downarrow	1637 \downarrow
1630 \downarrow	$-+ \Rightarrow$	$++ \Leftarrow$	$++ \Leftarrow$
1637 \downarrow	$-+ \Rightarrow$	$+- \Rightarrow$	
1652 \downarrow	$-+ \Rightarrow$		

Tabulka 2.2: Korelační tabulka pro dekonvolovaná FTIR spektra hovězího cytochromu c v rozsahu teplot od 25 do 81 °C. Přepřacováno z Filosa et al., 2001.

Celkový postup denaturace hovězího cytochromu c je tedy následující. Jako první se rozbálí otočky a řetězce (1637 cm^{-1}) \downarrow , následují je α -helixy (1652 cm^{-1}) \downarrow , dále zbytek prodloužených řetězců (1630 cm^{-1}) \downarrow a jako poslední vnitromolekulární antiparalelní β skládané listy (1684 cm^{-1}) \uparrow .

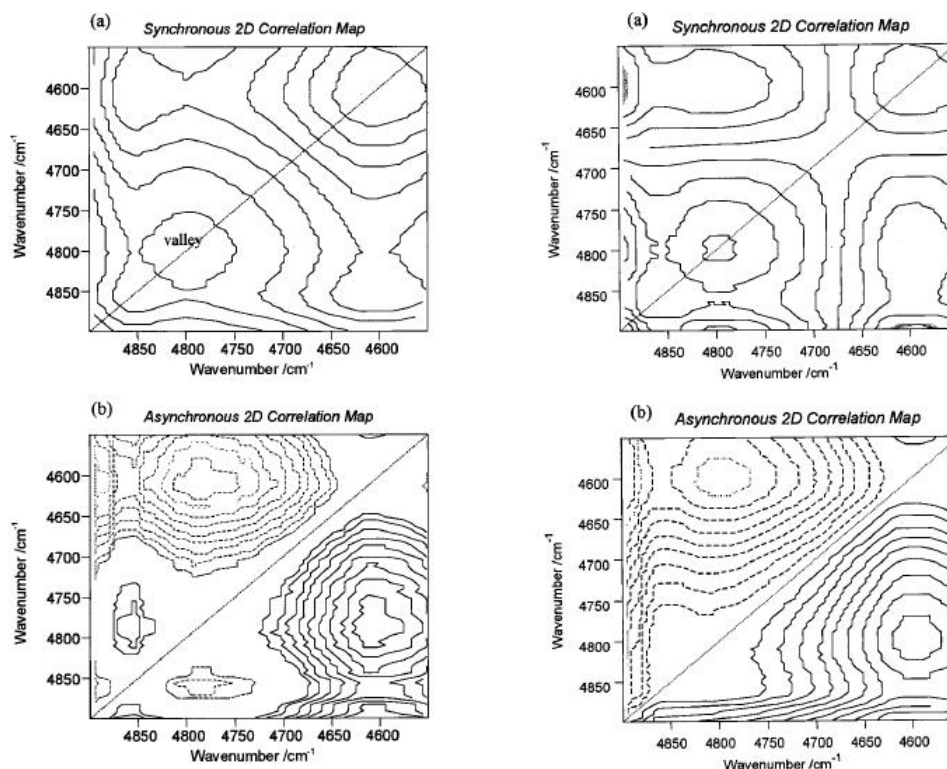
Cytochromu pomocí FTIR spektroskopie se také věnovali Lecomte et al., 2001. Ti si zvolili cytochrom c_{552} z termofilní eubakterie *Thermus thermophilus*. Pomocí časové 2DKoS zkoumali strukturální změny cytochromu během procesů rozpouštění v pufru a adsorpce na jílu. Jednotlivá měření, která byla dále podrobena zkoumání pomocí 2DKoS, pokrývala rozsah časů od 10 minut do 5 hodin od počátku rozpouštění (adsorpce). Výsledky 2D korelační analýzy spekter při rozpouštění jsou shrnuty v tabulce 2.3.

ν_1 (cm^{-1})	ν_2 (cm^{-1})	Synch.	Asynch.
1625 (β -vlákna)	1605 (Tyr)	+	+
1625 (β -vlákna)	1595 (Trp, His)	+	+
1625 (β -vlákna)	1575 (Asp, Glu)	+	+
1605 (Tyr)	1595 (Trp, His)	+	+
1605 (Tyr)	1575 (Asp, Glu)	+	+
1605 (Tyr)	1565 (Asp)	+	+
1575 (Asp, Glu)	1565 (Asp)	+	-

Tabulka 2.3: Znaménka a přiřazení jednotlivých kroskorelačních pásů ve spektru cytochromu c_{552} při rozpouštění s malou iontovou silou. Přepřacováno z Lecomte et al., 2001.

S pomocí 2DKoS lze ale také kombinovat několik různých přístupů ke studované problematice. Toho využili např. Wang et al., 1998, kteří se věnují ovalbuminu a jeho denaturaci. Pro studii využili jak koncentrační, tak teplotní indukci jednotlivých změn. Jako vstupní spektrum si vzali koncentrační série při jednotlivých teplotách a porovnávali 2D spektra. Ta se nejvíce změnila v rozmezí 67–69 °C a po teplotě 71 °C se již neměnila (viz obr. 2.2). Z toho lze vidět, že ovalbumin si zachovává nativní stav až do 65 °C a přechod do denaturovaného stavu je velmi rychlý a děje se v oblasti mezi 67–69 °C. Rozbalování sekundárních struktur pak začíná při 71 °C a pokračuje až do teploty 80 °C.

Odnoží infračervené spektroskopie, na kterou lze 2DKoS aplikovat se zajímavými výsledky, je DIRLD. Při tomto měření se využívá dvou polarizovaných infračervených paprsků k vytváření dichroitického spektra. Velmi podrobný popis teoretického pozadí a uspořádání experimentu lze nalézt v Noda 1990.



Obrázek 2.2: Synchronní (a) a asynchronní (b) 2D NIR spektrum ovalbuminu při teplotě 76 °C (vlevo) a teplotě 67 °C (vpravo). Převzato z Wang et al., 1998.

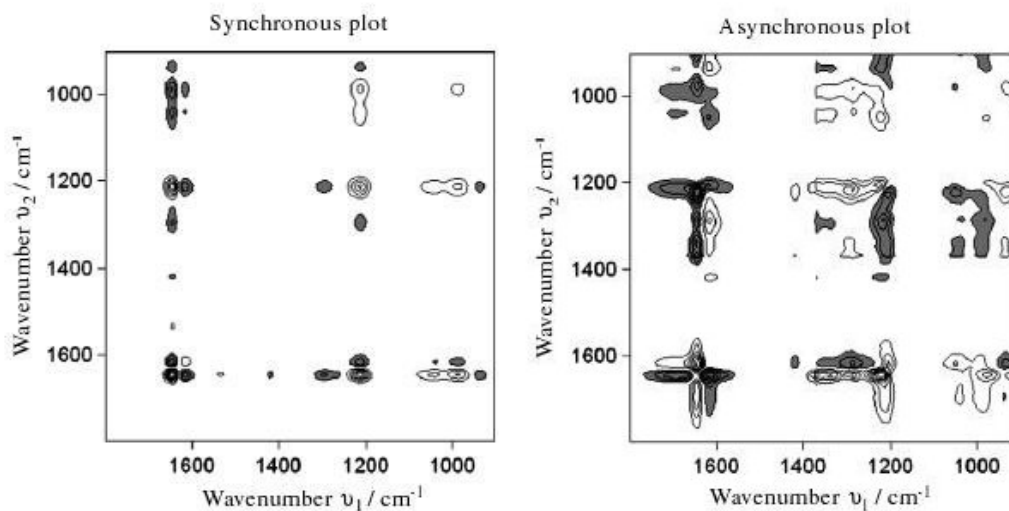
Z těchto spekter lze získat představu o reorientaci přechodového dipólového momentu a také o pohyblivosti chemických skupin a jejich vzájemných pohybech.

2D korelační spektroskopii lze použít také ve spojení s Ramanovou spektroskopií. Jednoduché spojení s UV Ramanovou spektroskopií lze nalézt například v Shasilov et al., 2007. Ti 2DKoS využili k odhalení pořadí a souvislosti rozbalování náhodného klubka a β -skládaného listu v lysozomu.

2.2.1 Ramanova optická aktivita

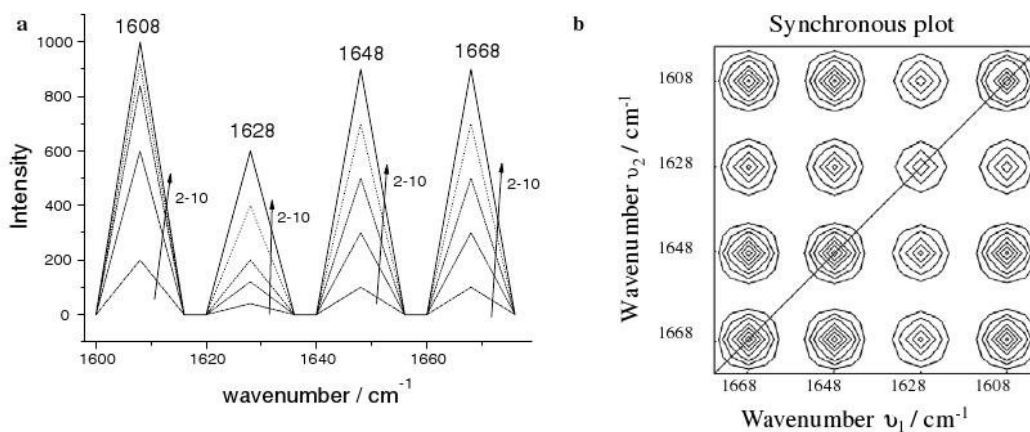
V současné době existuje rutinní metodika pro provádění a vyhodnocování výsledků 2DKoS pro metody optické spektroskopie, které obsahují ve spektru pouze kladné pásy. Pravidla pro vyhodnocování takovýchto korelačních spekter jsou někdy nazývána Nodova pravidla (Noda, 2002). V nedávné době proběhly první pokusy o rozšíření metodiky i na spektra ROA (Ashton et al., 2006a), která se od ostatních metod optické spektroskopie odlišuje tím, že současně obsahují kladné i záporné pásy. Výsledná metodika se poněkud liší od původních pravidel a je uvedena v Ashton et al., 2006a. ROA 2DKoS je také velmi citlivá na spektrální pozadí, kde i velmi malá změna pozadí značně ovlivní výsledné 2D spektrum, a proto je potřeba důkladně připravovat data pro zpracování. Doposud byla pomocí této metodiky proměřena pouze spektra jednoduchých

homo-polypeptidových řetězců (viz obr. 2.3) (Ashton et al., 2007; Ashton et al., 2006b).



Obrázek 2.3: Synchronní a asynchronní 2D ROA spektrum poly(L-lysinu). Převzato z Ashton et al., 2006a.

Výpracovaná metodika je popsána v Ashton et al., 2006a, ale spektra, která byla použita pro její vytvoření, obsahují pouze tři body na každý pás (viz obr. 2.4). Toto nastavení je sice dostatečné pro zjištění znamének, ale pro určení tvarů jednotlivých obrazců v 2D spektrech je naprosto nedostatečné. Z tohoto důvodu jsme se také uchýlili k důkladnému otestování těchto pravidel s využitím reálnějších tvarů pro spektrální pásy (viz kapitola 4.2)



Obrázek 2.4: Namodelované spektrum a jeho 2D spektra. Převzato z Ashton et al., 2006a.

3 Materiály a experimentální postupy

3.1 Materiál

Námi měřený vzorek lysozymu pocházel ze slepičího bílku (Fluka, No. 62971, mol. hmotnost 14,7 kDa) a byl rozpuštěn v deionizované vodě (Milli-Q) v koncentraci 400 mg/mL při pH 3,7. Před měřením byl vzorek centrifugován přes 0.22 μm filtr (Millipore).

Obě formy proteinu NKR-P1 pocházely z Katedry Biochemie PřF UK (připravil Daniel Rozbeský, diplomant prof. Bezoušky). NKR-P1A (mol. hmotnost 15991 Da) i NKR-P1C (mol. hmotnost 15409 Da) měly koncentraci 10,4 mg/ml (stanoveno Bradfordovou metodou (Bradford, 1976)) a byly rozpuštěny v 15mM Tris-HCl + 150mM NaCl při pH 8,0. Podrobný postup přípravy je popsán v Rozbeský 2009..

3.2 Faktorová analýza

Analýza hlavních komponent (Principal component analysis) je metoda umožňující redukovat prostor vícerozměrných dat. Na jejím vstupu je matice dat, kde jednotlivé sloupce reprezentují jednotlivá naměřená spektra a jednotlivé řádky odpovídají vlnočtu.

Máme tedy matici M o rozměru $n \times p$, kde n je počet spekter a p je funkcí vlnočtu. Chceme matici vyjádřit ve tvaru:

$$M = \Lambda f + \epsilon, \quad (3.1)$$

kde Λ je maticí tzv. faktorových vah, f jsou jednotlivá subspektra a ϵ je chyba způsobená konečným počtem subspekter.

Na matici M aplikujeme singulární rozklad (Singular value decomposition):

$$M = UWV^T, \quad (3.2)$$

kde U jsou statistické váhy (singulární čísla), W normalizované koeficienty zastoupení jednotlivých subspekter a V jsou jednotlivá subspektra.

Nalezneme vlastní čísla matice W , která jsou tzv. faktorové skóre a znamenají váhu jim příslušejícího vlastního vektoru v původní matici.

Pokud vyneseme vlastní čísla a jim odpovídající vlastní vektory do grafu, můžeme určit, které subspektrum ještě nese nějakou podstatnější informaci a které je již pouhým šumem. Obvykle se jako poslední užitečné spektrum volí poslední spektrum před lineárním poklesem vlastních čísel. Podrobnější informace ohledně metod faktorových analýz a jejich využití ve spektroskopii lze nalézt v Malinowski, 1991.

3.3 Ramanova spektroskopie

Ramanův rozptyl je dvoufotonový proces, při kterém dochází k nepružnému rozptylu dopadajícího fotonu. Rozptýlený foton má tedy jinou vlnovou délku. Tento jev má však velmi malý účinný průřez (z cca 10^6 fotonů se přibližně jeden rozptýlí nepružně, viz Mayo et al., 2003). Rozdíl mezi energií dopadajícího a rozptýleného fotonu ΔE je dán vztahem:

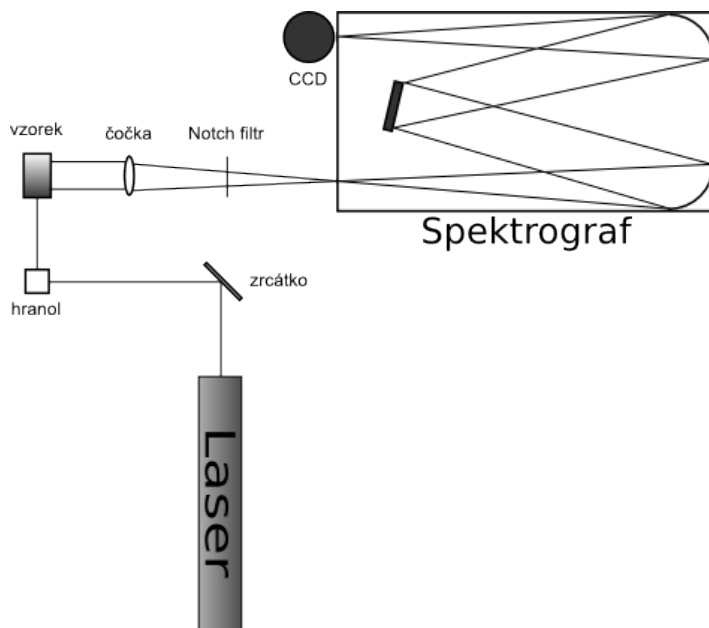
$$\Delta E = h(\nu_0 - \nu_r), \quad (3.3)$$

kde ν_0 je frekvence dopadajícího fotonu, ν_r je frekvence rozptýleného fotonu, h je Planckova konstanta.

V Ramanově spektroskopii jsou aktivní pouze ty vibrace, při kterých se mění polarizovatelnost molekuly.

3.3.1 Ramanův spektrometr

Měření byla prováděna na aparatuře znázorněné na obrázku 3.1. Je zde využito pravouhlé geometrie, která má lepší poměr signálu Raman/Rayleigh. Jako zdroj excitačního záření byl použit kontinuální Nd:YAG laser (Verdi V-2, Coherent Co.) o vlnové délce 532 nm. Celkový výkon na vzorku po průchodu optickou soustavou byl 300 mW.



Obrázek 3.1: Aparatura pro měření Ramanova rozptylu.

Laserový svazek odražený od zrcadla byl následně fokusován čočkou a pomocí hranolu nasměrován do kyvety. Z ní je rozptýlené záření sbíráno a přes holografický Notch filtr (Kaiser Optical), který slouží k potlačení Rayleighova rozptylu, fokusováno pomocí objektivu na vstupní štěrbinu monochromátoru (Spex 270M, Jobin-Yvon Co.), který je konstrukčně řešen jako dvojjadlový

s mřížkou na odraz. Jeho ohnisková vzdálenost je 270 mm a použitá mřížka má 1800 vrypů/mm. Spektrograf zobrazuje spektrálně rozložený svazek na plochu CCD detektoru (Princeton Instruments Co.), který má rozměry 1340×100 pixelů. Za účelem potlačení termálního šumu je chlazen kapalným dusíkem na teplotu ca – 120°C. Pro měření byly použity křemenné mikrokapilárové kyvety o objemu 5 μ l.

3.4 Ramanova optická aktivita

Ramanova optická aktivita je spektroskopická metoda, která měří rozdíly mezi Ramanovými spektry (viz kapitola 3.3) získanými pomocí levo- a pravotočivě polarizovaného světla. Tato metoda nám tedy umožňuje rozeznávat optickou aktivitu měřené molekuly a tím přináší nové možnosti do klasické Ramanovy spektroskopie. Rozdílnou odezvu chirální molekuly k levo- a pravotočivě kruhově polarizovanému záření lze v případě rozptylových měření charakterizovat pomocí tzv. *diferenční cirkulární intenzity*:

$$\Delta = \frac{(I^R - I^L)}{(I^R + I^L)}, \quad (3.4)$$

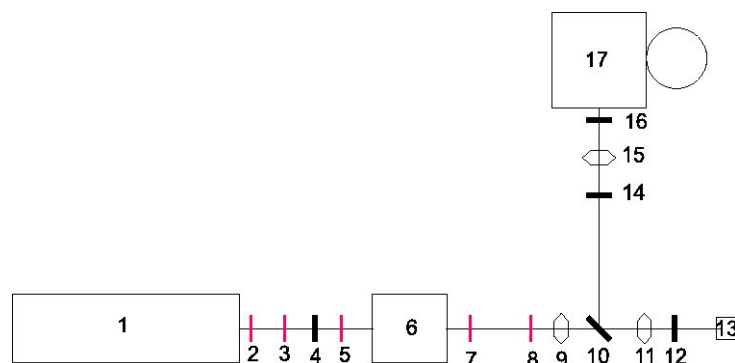
kde I^R je intenzita odezvy molekuly na pravotočivě kruhově polarizované záření a I^L je intenzita odezvy molekuly na levotočivě kruhově polarizované záření.

3.4.1 ROA aparatura

Aparatura, na které probíhalo měření, je vybudována na principu ICP (dopadající záření je kruhově polarizováno a detekujeme veškeré rozptýlené záření) a v geometrii zpětného rozptylu (Hanzlíková et al., 1999). Její schéma je na obrázku 3.2. Podrobnější popis je možné nalézt v Kapitán 2006.

Jako zdroj budícího záření byl použit argonový iontový laser (Innova 305, Coherent Co.) s vlnovou délkou 514,5 nm (výkon na vzorku po průchodu optickou soustavou byl 500 mW). Za ním byl umístěn polarizační filtr (GT 10, Leysop), který odstraní případné nestability v polarizaci svazku. Takto polarizovaný svazek vstupuje do elektrooptického modulátoru (EM 565, Leysop), kterým je podélná Pockelsova cela. Ta na základě přiloženého napětí budí buď levo- nebo pravotočivě kruhově polarizované záření. Kvůli odstranění možných dvojlomných posuvů vlivem změn teploty je elektrooptický modulátor umístěn v teplotně stabilizovaném pouzdře (CAL 3200). Kruhově polarizované světlo je fokusováno čočkou (Melles Griot 01LQP013, f=150 mm, průměr 25 mm) do prostoru vzorku. Mezi čočkou a vzorkem jsou umístěny vrtané prvky (45° zrcadlo, Lyotův depolarizátor a kolimační čočka). Kyveta se vzorkem je umístěna v teplotní cele napojené na termoregulační vodní lázeň RTE– 111 (Neslab Co.).

Po rozptylu na vzorku paprsek projde Lyotovým depolarizátorem (Leysop), který odstraňuje polarizační artefakty, a kolimační čočkou (f=25 mm, průměr 25 mm, Optická a sklářská dílna MFF UK). Depolarizovaný a kolimovaný svazek se odrazí od 45° zrcadla (Optická a sklářská dílna MFF UK) a projde



Obrázek 3.2: Schéma měřící aparatury. 1 – Laser, 2 – clonka s aperturou 5,0 mm, 3 – clonka s aperturou 4,5 mm, 4 – polarizátor, 5 – clonka s aperturou 4,0 mm, 6 – elektrooptický modulátor, 7 – clonka s aperturou 3,5 mm, 8 – irisová clonka, 9 – fokusační čočka, 10 – 45° zrcadlo, 11 – kolimační čočka, 12 – Lyotův depolarizátor, 13 – vzorek, 14 – notch filtr, 15 – objektiv, 16 – závěrka, 17 – spektrograf a CCD detektor.

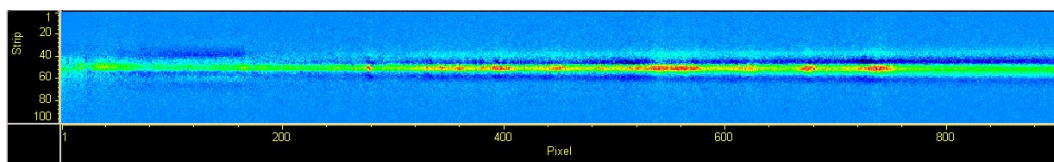
SuperNotch-Plus filtrem (Kaiser optical Systems, Inc.), který umožní odstranit Rayleighův rozptyl pro danou budící vlnovou délku. Nakonec je záření fokusováno objektivem (AF Nikkor 50 mm f/1,4D, Nikon) do spektrografu (Kaiser Optical Systems, HoloSpec f/1,4) a dopadá na dusíkem chlazený CCD čip o rozměrech 1340×100 obrazových bodů. Pro měření byly využity křemenné mikrokyvety o rozměru 5×5 mm (Helma).

Časová závislost Ramanových a ROA spekter lysozymu byla získána s akumulací signálu nastavenou na 2s. Celkem bylo měřeno 19 bloků po 900 akumulacích. Po dokončení celého měření bylo změřeno spektrum Ne výbojky, které sloužilo ke kalibraci škály Ramanova spektra. Časové měření bylo poté ještě jednou zopakováno pro ověření správnosti zvoleného časového kroku. V tomto druhém případě byla akumulace nastavena na 3s a bylo měřeno 32 bloků po 200 akumulacích. Tyto jednotlivé bloky byly následně zpracovány jednotlivě, po dvojicích a po trojicích.

Teplotní závislost Ramanových a ROA spekter lysozymu byla získána s akumulací signálu nastavenou na 2s. Měřen byl jeden blok s 900 akumulacemi. Po každém měření byla vodní lázeň nastavena na teplotu o 10 °C vyšší, ponechána pět minut na vyrovnání a poté bylo získáno další spektrum. Během ohřevu bylo změřeno kalibrační spektrum neonové výbojky.

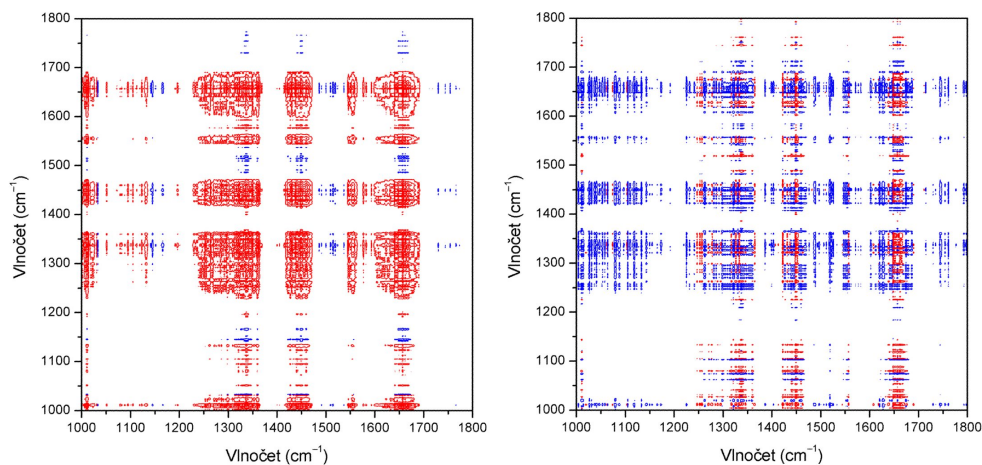
3.4.2 Zpracování spekter Ramanovy optické aktivity

Prvním krokem při zpracovávání ROA spekter je odstraňování signálu od Lyotova depolarizátoru, který vytváří silný polarizační artefakt. Jeho signál se nachází na $\sim 1088 \text{ cm}^{-1}$. Jeho odstraňování probíhá pomocí procedury CLEAN FIELD a je popsáno v Kapitán 2006. V našem případě tento postup nebyl nutný, protože spektrum výše zmíněný artefakt neobsahovalo (viz obr. 3.3).



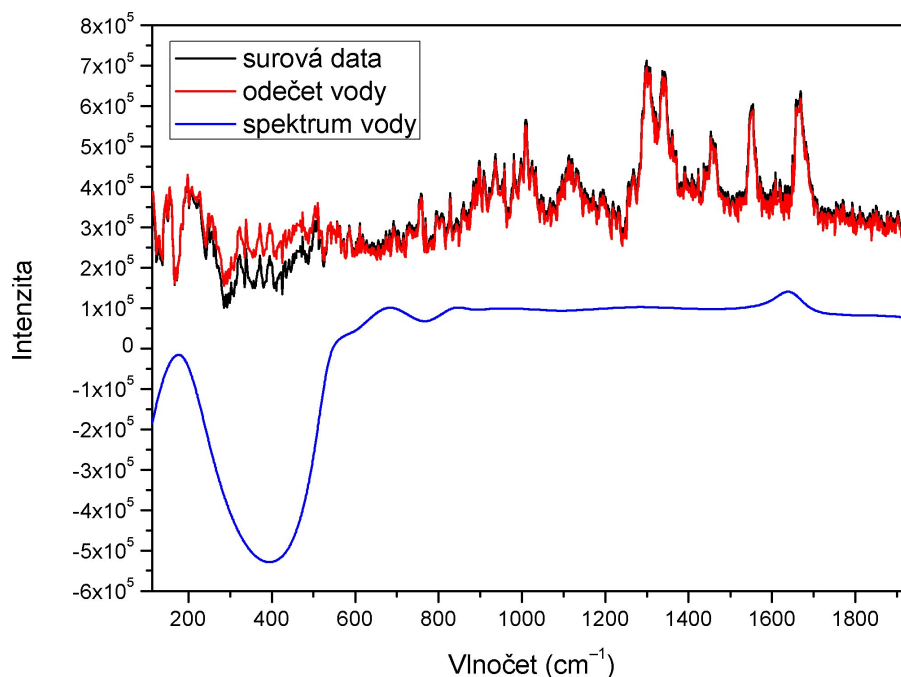
Obrázek 3.3: Naměřené spektrum lysozymu v obrazovém módu. Artefakt by se vyskytoval zhruba na pozici 500 pixelů.

Během zpracovávání jsme vyzkoušeli několik možných přístupů pro přípravu vstupních dat do 2D korelační analýzy. Prvním z nich bylo klasické zpracování pomocí Fourierovy filtrace (Kápitán et al., 2006), které však nevedlo k žádanému výsledku, protože výsledná ROA spektra byla stále příliš zašuměná a 2DKoS pozorovala pouze artefakty (viz obr. 3.4). Tyto artefakty jsou způsobené náhodnými fluktuacemi pozadí (Czarnecki, 1998) nebo tendenčními nárůsty intenzity pozadí (Czarnecki, 1998; Czarnecki, 2003) a je nutné tyto vady co nejvíce potlačit. Rozhodli jsme se tedy opustit snahu o vyhlazování spekter v obrazovém módu a provedli všechny další kroky potřebné k získání spekter. Bylo tedy nutné provést nejprve posčítání přes všechny řádky detektoru, po kterém z 2D obrazu detektoru získáme jednorozměrné spektrum. To bylo dále zkalibrováno pomocí již dříve změřeného spektra neonové výbojky a tím jsme získali surové spektrum. Všechny tyto úpravy byly prováděny pomocí rutin programu ROA.

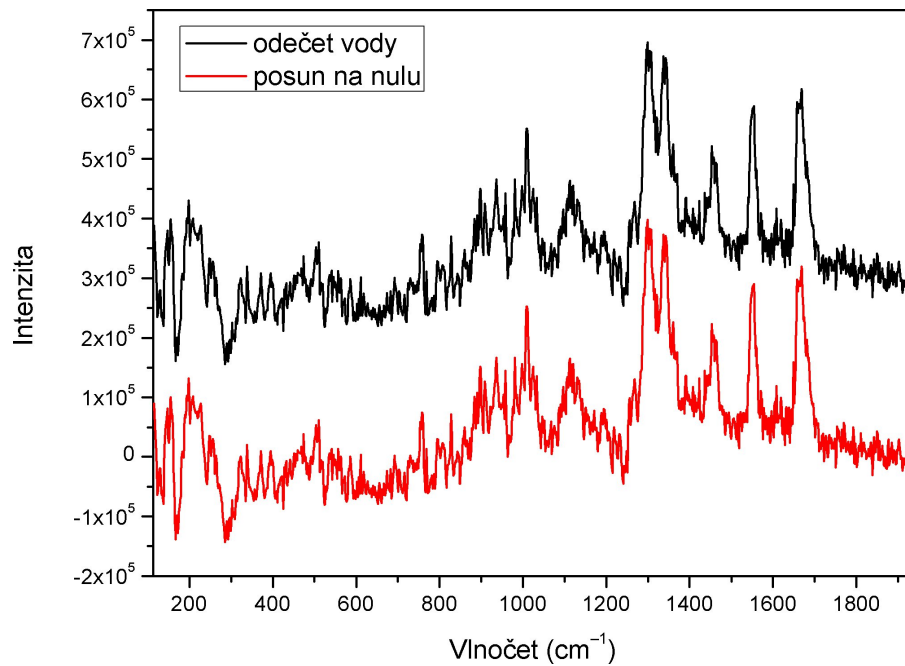


Obrázek 3.4: Výsledná 2D spektra (synchronní vlevo a asynchronní vpravo) po odstranění šumu pomocí Fourierovy filtrace.

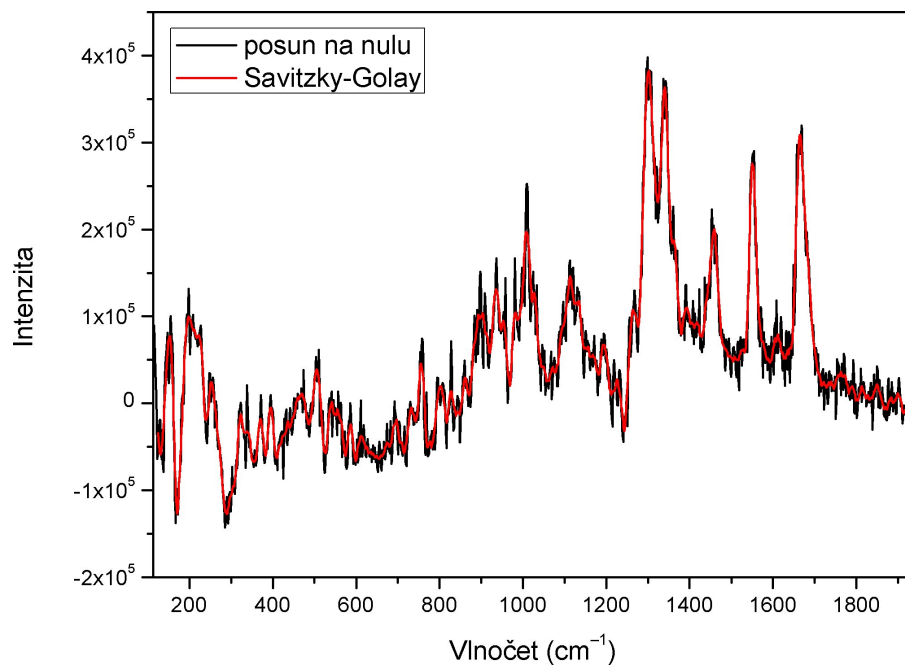
Další kroky byly prováděny v programu Grams/AI, kde bylo od ROA spekter odečteno „spektrum vody“, které obsahuje různé artefakty a přístrojovou funkci (viz obr. 3.5). Toto spektrum bylo vyhlazeno s využitím kubických splinů v programu Matlab/R2006 (MathWorks) a následně odečteno. Po tomto odečtení bylo upraveno odsazení spektra srovnáním hodnoty v bodě 1800 cm^{-1} na hodnotu nula (viz obr. 3.6). Tento bod byl zvolen z toho důvodu, že zde nepředpokládáme žádný ROA signál. Spektra byla zhlazena s využitím funkce Savitzkého-Golay přes 25 bodů (Savitzky et al., 1964) (viz obr. 3.7). Nevýhodou tohoto postupu je, že nezachovává integrální intenzitu, ale na rozdíl od zhlazení pomocí klouzavého průměru nezmění jeho pozici. Pozadí těchto spekter bylo upraveno pomocí faktorové analýzy provedené v programu Background (autor J. Palacký), který byl vytvořen v programu Matlab/R2006 (MathWorks). Program provede rozložení série spekter na jednotlivá subspektra pomocí FA a u nich umožní ruční odečtení pozadí. Takto opravená subspektra následně opět pomocí FA složí do opravené série spekter. Jednotlivá subspektra byla opravena polynomelem 5. stupně. Takto upravená data již byla vhodná pro analýzu pomocí 2DKoS.



Obrázek 3.5: Naměřená ROA data (černě), ROA spektrum vody vyhlazené pomocí splinů (modře) a spektrum po odečtení ROA spektra vody (červeně).



Obrázek 3.6: Spektrum po odečtení ROA spektra vody (černě) a následně spektrum sesazené na nulu (červeně).

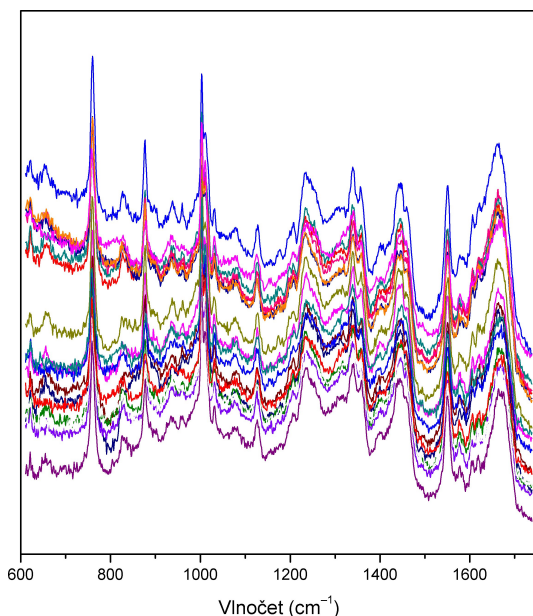


Obrázek 3.7: Spektrum po sesazení na nulu (černě) a jeho proložení Savitzkého-Golayovou funkcí.

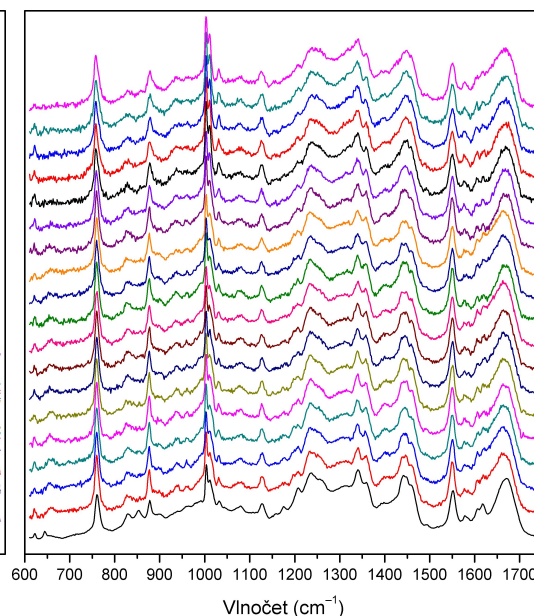
3.4.3 Zpracování Ramanových spekter

Zpracování Ramanových spekter bylo v případě lysozymu mnohem jednodušší, protože tato data nevyžadovala žádnou zvláštní úpravu. Bylo provedeno pouze posčítání přes všechny řádky detektoru, kalibrace a odečtení Ramanova spektra vody. Výsledná data byla již dostatečně hladká na to, aby mohla sloužit jako vstup pro 2DKoS. Pozadí těchto spekter bylo upraveno pomocí programu *pomlaska* (autoři J. Hanuš, P. Mojzeš, V. Kopecký, naprogramoval J. Vachoušek) polynomem 5. stupně. Program nejprve odečte přímku proloženou prvním a posledním bodem spektra, což odstraní příliš vysoké pozadí (v našem nastavení byla tato vlastnost vypnuta) a následně provádí fitování jednotlivých spekter daným polynomem pomocí metody nejmenších čtverců na první zadané spektrum a je zároveň schopen od těchto dalších spekter odečíst nechtěná spektra (v našem případě spektrum vody). Program také umožňuje přiřadit různým úsekům spektra různé váhové koeficienty, což umožňuje kvalitnější srovnání jednotlivých spekter.

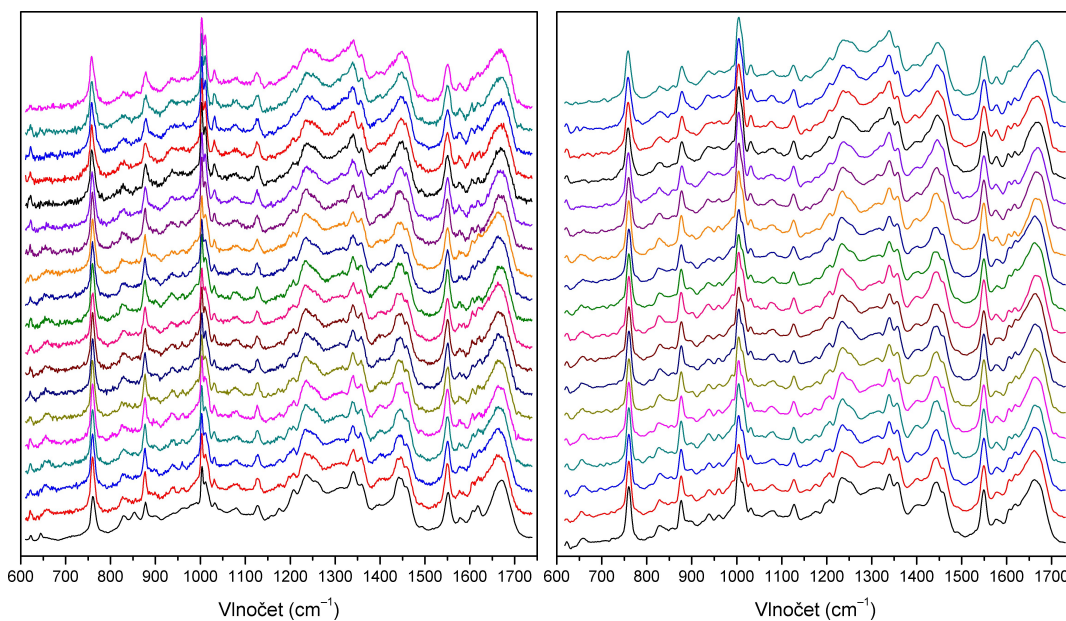
Pro zpracování spekter obou forem NKR–P1 bylo zapotřebí mnohem více kroků. Nejprve byl ze všech spekter odečten pufr změřený při příslušné teplotě (Obr. 3.8). Dále byla spektra srovnána pomocí programu *pomlaska* na spektrum získané pomocí DCDR, které nám zaručilo přirozenou podobu pozadí. Byl použit polynom 5. stupně a také odečteno spektrum skla (Obr. 3.9). Pro co nejlepší výsledek však bylo nutné experimentovat s váhovými koeficienty pro jednotlivé části spektra. Výsledná spektra však neměla dostatečnou kvalitu, takže bylo nutné provést odstranění šumu (Obr. 3.10).



Obrázek 3.8: Spektra NKR–P1C po odečtení spekter pufru.

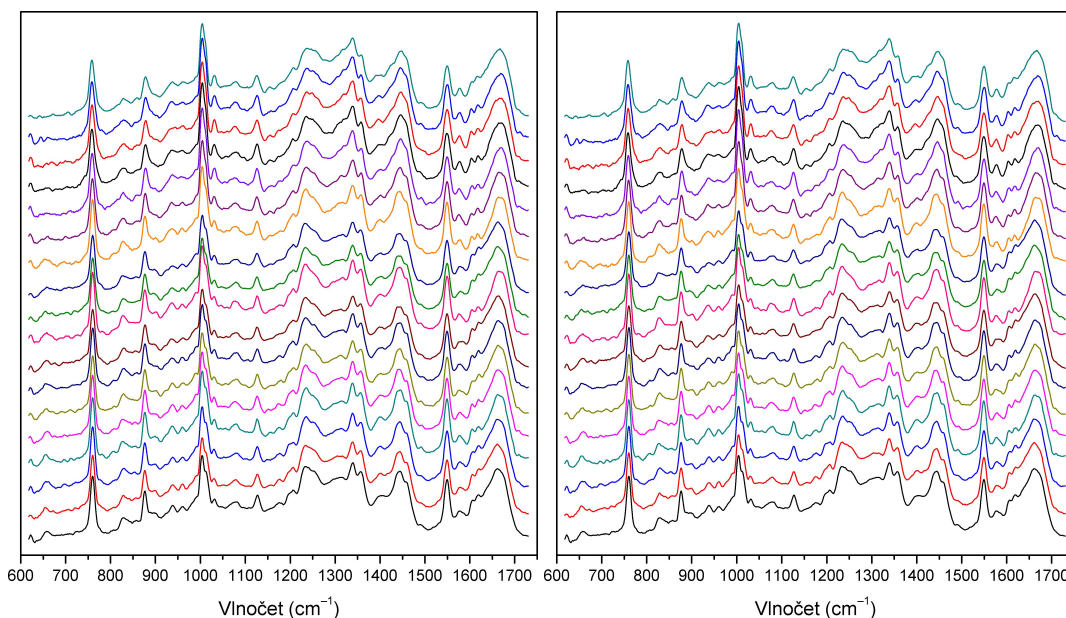


Obrázek 3.9: Spektra NKR–P1C po srovnání pozadí programem *pomlaska* pomocí polynomu 5. stupně a odečtení spektra skla.



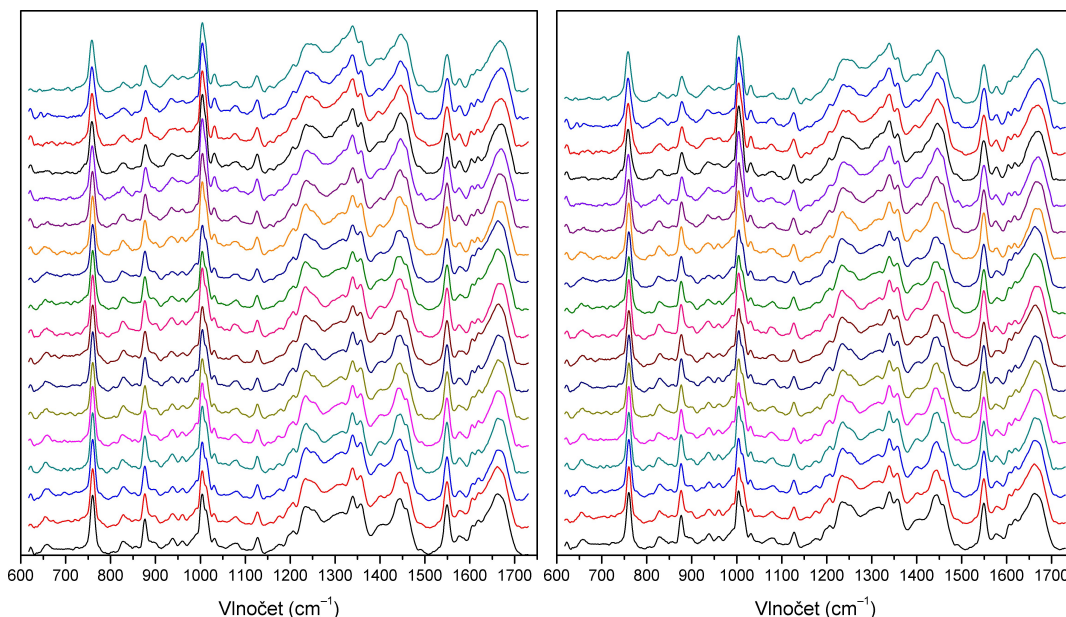
Obrázek 3.10: Spektra NKR-P1C po srovnání pozadí programem pomlaska pomocí polynomu 5. stupně a odečtení spektra skla. Při srovnávání byl aplikován váhový filtr.

Obrázek 3.11: Spektra NKR-P1C po vyhlazení pomocí funkce Savitzky-Golay přes 25 bodů.



Obrázek 3.12: Spektra NKR-P1C nornovaná na maximum amidu I.

Obrázek 3.13: Spektra NKR-P1C nornovaná na maximum amidu I po aplikaci pomlasky.



Obrázek 3.14: Spektra NKR–P1C po odstranění pozadí pomocí splinu aplikovaného na každé spektrum zvlášť.

Obrázek 3.15: Spektra NKR–P1C po odstranění pozadí pomocí splinu aplikovaného na 1. subspektrum.

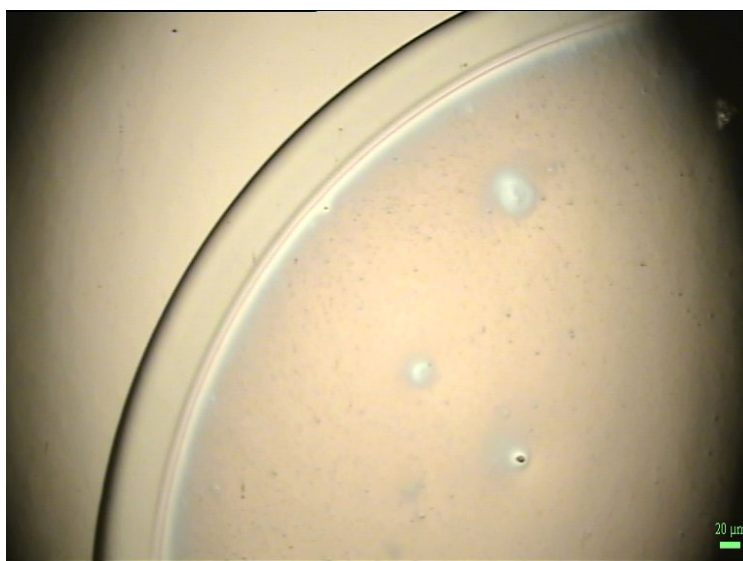
Nejprve jsme aplikovali faktorovou analýzu, ale ta neposkytla uspokojivé výsledky a tak bylo nutno, stejně jako v případě ROA spekter, použít vyhlazení pomocí Savitzkého-Golayovy funkce (opět přes 25 bodů) (Obr. 3.11). Takto vyhlazená spektra byla opět srovnána pomocí programu pomlázka na spektrum DCDR, ale výsledek nebyl uspokojivý. Docházelo k velmi silné variaci intenzity pásu amidu I. To je dáno tím, že během měření se protein srážel a tím docházelo k poklesu celkového signálu. Pokusili jsme se tedy spektra nanormovat na maximum pásu amidu I (1660 cm^{-1}) (Obr. 3.12), ale došlo k silné diskrepanci v intenzitách spekter a nepomohlo ani opětovné sesazení pomocí programu pomlázka (Obr. 3.13).

Rozhodli jsme se tedy od spekter odečíst spline, který by odstranil pozadí (způsobeno fluorescenčními nečistotami ve vzorku) a tím nám umožnil důkladnější srovnání. Nejprve jsme odečítali každé spektrum zvlášť (Obr. 3.14), což bohužel nedávalo kvalitní výsledky, a proto jsme na spektra aplikovali faktorovou analýzu a spline odečetli z prvního subspektra (Obr. 3.15). Spektra byla sestavena zpátky a opět bylo provedeno sesazení pomocí programu pomlázka. Tato spektra již výše zmíněným problémem netrpěla a bylo tedy možné přistoupit k jejich analýze. Kvůli jejich nízké kvalitě, která je způsobena krátkým akumulacním časem (vzhledem k tomu, že se jednalo o nevratný proces nebylo možné tuto dobu prodloužit), byla spektra rozdělena na oblast amidu I ($1640\text{--}1680\text{ cm}^{-1}$) a amidu III ($1220\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$). Tyto dvě oblasti byly dále zpracovávány samostatně a byly na ně opět aplikovány 2DKoS a faktorová analýza.

3.5 Ramanova spektroskopie kapkově nanášených povlaků

DCDR je spektroskopickou technikou, při které je kapka zkoumaného roztoku nanesena na vhodný hydrofóbní povrch, nechá se vyschnout a takto získaný povlak se zkoumá pomocí Ramanovy mikrospektrometrie.

Pro vodné roztoky dochází při odpařování k tokům kapaliny uvnitř kapičky směrem od středu k jejím okrajům. Tyto toky jsou natolik silné, že s sebou unášejí většinu rozpuštěných látek, které se pak usazují v kroužku na okraji kapky (Deegan et al., 1997) (Obr. 3.16). Tento efekt se nazývá efekt kávového kroužku (coffee-ring effect).



Obrázek 3.16: Fotografie proteinového kroužku při desetinásobném zvětšení.

Tento způsob měření je velice vhodný pro studium proteinů, protože dochází k velmi silnému zakoncentrování roztoku a také k odstranění Ramanova spektra vody. Vlivem rozdílné hmotnosti proteinu a možných fluorescenčních příměsí dochází také velmi často k odstranění (či potlačení vlivu) případných fluorescenčních příměsí. Spektra takto změřeného proteinu se velmi podobají spektrům proteinu v roztoku (Zhang et al., 2003).

3.5.1 Ramanův mikrospektrometr

Pro měření DCDR spekter byl využit integrovaný systém LabRAM HR 800 (Horiba Jobin Yvon), který využívá pro měření Ramanova rozptylu geometrii zpětného rozptylu. Jeho součástí je mikroskop, který je konfokálně napojený na spektrograf s asymetrickou montáží Czerny-Turner (ohnisková vzdálenost 800 mm).

Mikroskop obsahuje jako zdroj laserového svazku vnitřní He-Ne laser s vlnovou délkou 633 nm, ale pro naše měření jsme využili vnější Ar⁺ laser s vlnovou délkou 514,53 nm (Melles Griot Co.). Laserový paprsek je nejprve očištěn

od plazmových linií pomocí interferenčního filtru a následně je přes optickou soustavu fokusován na první konfokální štěrbinu, která slouží k vytvoření prostorového rozlišení. Následuje systém LIRS, který zajišťuje úplný odraz svazku směrem ke vzorku. Odražený svazek je pomocí objektivu mikroskopu zaostřen na vzorek a rozptýlené záření (Rayleighův i Ramanův rozptyl) je sbíráno objektivem a putuje stejnou cestou zpět na Notch filtr (součást systému LIRS), který odfiltruje Rayleighův rozptyl. Po průchodu Notch filtrem je svazek pomocí čočky fokusován na druhou konfokální štěrbinu, která je optickou soustavou zobrazena na vstupní štěrbinu spektrografu. Pro měření byla využita mřížka s 600 vrypů/mm. Spektrum je zobrazeno na dusíkem chlazený CCD detektor (Symphony Co.) o rozměrech 1024×256 pixelů. Zjednodušené schéma je na obrázku 3.17. Podrobnější popis lze nalézt v Šípová 2006.



Obrázek 3.17: Zjednodušené schéma mikrospektrometru HR800 (převzato z Šípová, 2006).

Mikroskopická část je dále vybavena mikroposuvným stolkem, který umožňuje přesnou manipulaci se vzorkem, a sadou objektivů (Olympus Co.). Do cesty svazku mohou být vloženy dva 50/50 děliče svazku, které slouží pro sledování vzorku TV kamerou a pro jeho osvětlení. Pro měření DCDR byly vzorky nanášeny na substrát SpectRIM™Slide (Tienta Sciences, Inc.) a ty upevněny do mikroskopového držáku. Pro nalezení vhodné oblasti byl využit objektiv se zvětšením $10\times$ a pro vlastní měření pak $50\times$.

3.6 Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

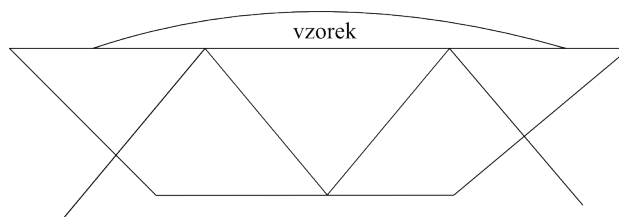
Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací je speciálním případem infračervené spektroskopie, ve které se měří intenzita absorpce záření, které prošlo interferometrem (nejčastěji Michelsonův). Z výsledné závislosti intenzity prošlého záření na dráhovém rozdílu paprsků se pomocí Fourierovy transformace vytvoří celkové absorpční spektrum zkoumané látky. Velkou výhodou

této metodiky je velká světelnost přístroje, měření všech vlnových délek v jednom okamžiku a stálost kalibrace přístroje, která je zajištěna vnitřním laserem.

V IR spektroskopii jsou aktivní ty vibrace, při kterých se mění dipólový moment molekuly.

Zeslabená úplná reflexe

ATR je metoda IR, která umožňuje měření vzorků, které silně absorbují. Tato technika je založena na násobném úplném odrazu na rozhraní krystalu s vysokým indexem lomu a měřeného vzorku (Obr. 3.18). Záření částečně proniká do měřeného vzorku. Pokud vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, bude tato frekvence v odraženém svazku zeslabena.



Obrázek 3.18: Schéma ATR krystalu.

3.6.1 Zpracování FTIR spekter

Zpracování FTIR spekter vyžadovalo nejprve odečíst spektrum pufru změřeného při odpovídající teplotě (Dousseau et al., 1989) a následně odečtení spektra vodních par. Takto upravená spektra byla nejprve srovnána aplikací pomlázka na spektrum ATR a pro lepší výsledek byl opět aplikován váhový filtr. Toto sesazení však nevedlo ke kýženým výsledkům, a proto jsme od použití ATR spektra jako reference upustili a spektra srovnali na první změřené spektrum.

Vzhledem k nízké kvalitě všech spekter (způsobeno přístrojovou závadou - odstranění vodních par ze sušeného vzduchu, který slouží k profukování přístroje bylo nedostatečné) jsme přistoupili ke zpracovávání pouze amidu I, a to v oblasti $1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$. Z těchto spekter byla spočtena 2DKoS a faktorová analýza.

Dále byla na spektrech provedena druhá derivace (Savitzky-Golay přes 25 bodů). Z těchto spekter byla opět provedena 2DKoS a faktorová analýza.

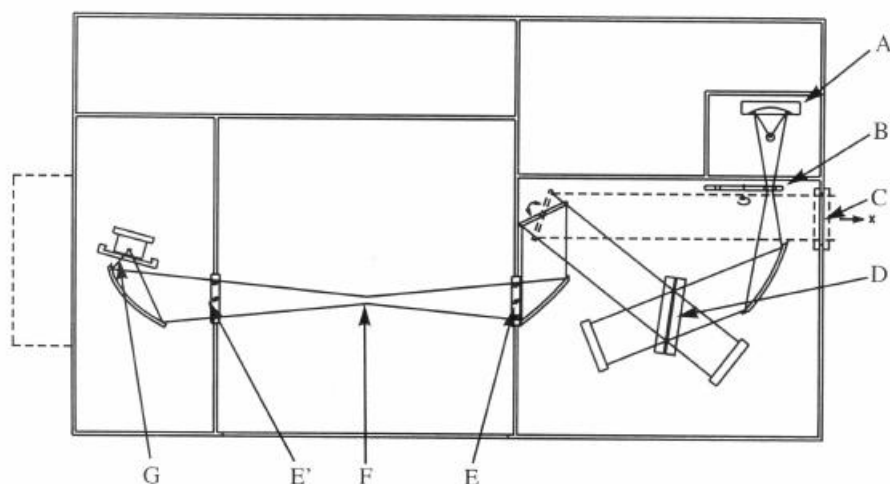
3.6.2 FTIR spektrometr

Pro měření spekter infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací byl použit přístroj Vector 33 (Bruker). Schéma je znázorněno na obrázku 3.19. Spektrometr je v uspořádání zvaném ROCKSOLID, které spočívá v tom, že

místo dvou kmitajících zrcadel je použito dvou koutových odražečů, které kmitají ve svislém směru. Toto uspořádání je stabilnější a odolnější vůči mechanickým vlivům. Zdrojem laserového záření pro vnitřní kalibraci je He–Ne laser s vlnovou délkou 633 nm. Zdrojem infračerveného záření je globar (lisovaný práškový karbid křemíku žhavený elektrickým proudem). Jako detektory byly použity DTGS a MCT detektory.

Pro měření FTIR spekter byly využity CaF_2 kyvety (Chevtchenko Optics) o tloušťce okénka 8 a 10 μm . Při měření teplotní dynamiky byl využit nástavec BioJACK™ (BioTools, Inc., USA) napojený na termoregulační vodní lázeň RTE–111 (Neslab Co.). Měření absorbance bylo prováděno v jednonábovém módu s rozlišením 2 cm^{-1} , jako apodizační funkce byla použita Blackman–Harris 3 Term funkce.

Pro měření ATR spekter bylo využito nástavce MIRacle™ AG–single reflection diamond horizontal ATR (Pike technologies Co.).

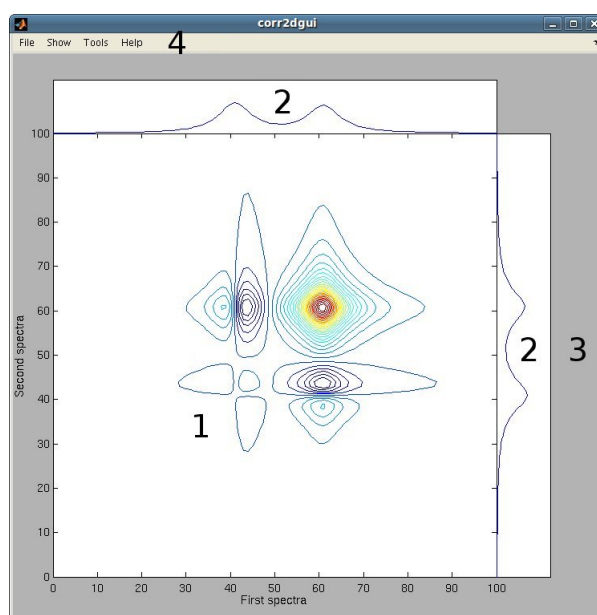


Obrázek 3.19: Optické schéma spektrometru: A – zdroj záření, B – karusel s aperturami, C – okénko pro vstup externí svazku, D – dělič svazku záření, E, E' – okénka vzorkového prostoru, F – ohnisko, kde je umístěn držák vzorku, G – detektor (převzato z Hlídek 2007).

4 Výsledky a diskuze

4.1 Vytvoření programu na 2DKoS s grafickým uživatelským prostředím

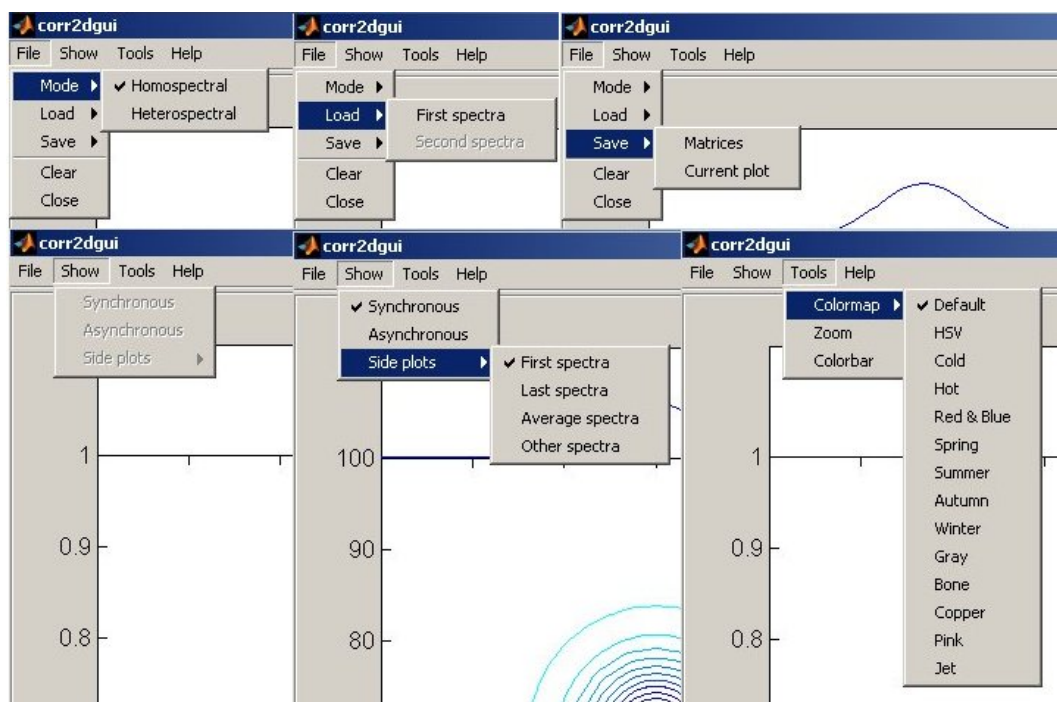
Představovaný program má všechny potřebné ovládací prvky a možnosti pro provádění 2DKoS na zvolené sadě experimentálních dat. Umožňuje zobrazovat a ukládat výsledky. Program je založen na algoritmech prezentovaných v kapitole 2.1.1.



Obrázek 4.1: Okno GUI s vyznačením hlavních ovládacích prvků.

Návrh programu je zaměřen na maximální přehlednost a efektivitu. Vlastní grafické uživatelské prostředí (GUI) je zobrazeno na obrázku 4.1 s vyznačenými hlavními prvky. Vlastní 2D spektrum je zobrazeno v (1), jedno spektrum z měřené sady dat je zobrazeno v (2) (v případě homo-spektrální korelace jsou obě spektra identická), barevná škála (pokud je aktivní) je zobrazena v (3) a všechny potřebné ovládací prvky jsou sdruženy na liště (4).

Všechny ovládací prvky jsou sdruženy do nabídek podle jejich funkce a seřazeny podle předpokládaného pořadí použití. Jednotlivé položky se stávají aktivní až po splnění všech podmínek nutných pro jejich bezpečné spuštění. Všechny funkce programu jsou popsány v příložené nápovědě (anglicky). Detaily jednotlivých nabídek jsou na obrázku 4.2.



Obrázek 4.2: GUI s jednotlivými nabídkami a podnabídkami.

4.2 Testování rutin a rozšíření metodiky

Funkčnost algoritmů i vlastního programu byla otestována na sériích různých spekter. Ta simulují různé jevy, které mohou nastat ve spektrech. První sada testovacích spekter obsahuje Gaussovské pásy, které jsou popsány rovnicí:

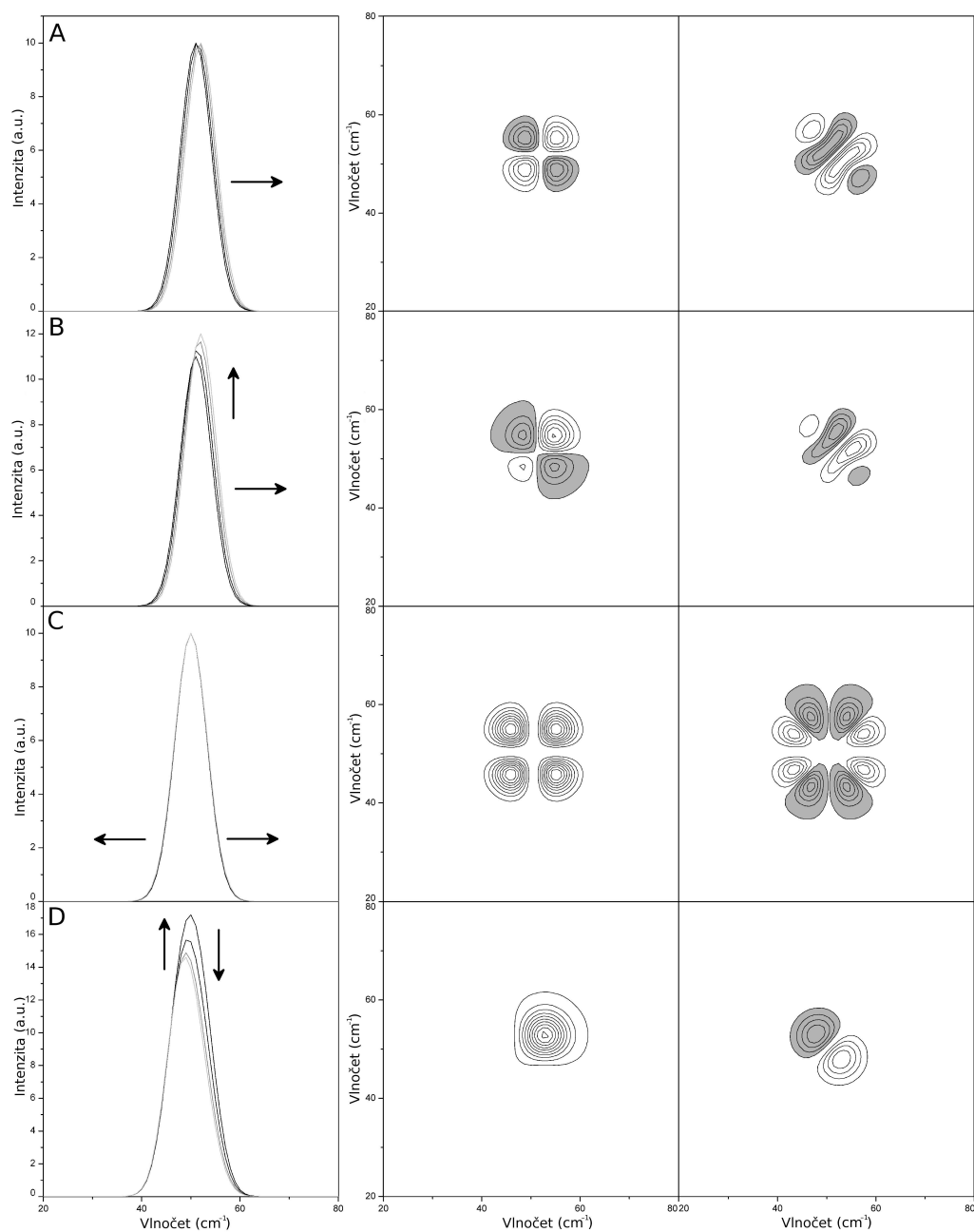
$$G = a \cdot e^{-\frac{(x-pos)^2}{b}} \quad (4.1)$$

kde a je amplituda pásu, pos je jeho pozice a b je funkcí pološířky pásu. Vždy podle potřeby byl do těchto proměnných přidán parametr k , který se měnil s pořadím spektra v rozsahu od 1 do 2.

Nejprve jsme testovali chování samostatných pásů (Obr. 4.3), protože jejich 2D korelační analýzy jsou již ověřeny a publikovány (Noda, 2002) a lze tak tedy snadno ověřit správnost použitých algoritmů.

První spektrum obsahuje jediný pás, který se posouvá směrem k vyšším vlnočtům a jeho intenzita se nemění. Lze ho charakterizovat hodnotami: $a = 10$, $pos = 50 + k$ a $b = 20$. Celé namodelované spektrum i s výsledky lze vidět na Obr. 4.3A. Z obou spekter lze vidět, že pro 2DKoS se posuv pásu jeví jako dva různé pásy, a to na původní pozici a na konečné pozici pásu. Ze záporných znamének v synchronním spektru vyplývá, že jeden pás roste a druhý klesá, což je zcela logické. Asynchronní spektrum je v tomto případě charakteristické a obsahuje dva protáhlé pásy na vnitřní straně a dva klasické pásy na vnější straně. Tento tvar umožňuje odlišit posuv ve spektru od jiných případů.

Druhé spektrum je složitější formou předchozího případu, kdy se k posunu pásu přidá ještě vzrůst intenzity. Celé spektrum pak můžeme charakterizovat



Obrázek 4.3: Simulované pochody ve spektrech pomocí Gaussovských tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) jeden pás posouvající se k vyšším vlnocetům (z pozice 51 cm^{-1} na 52 cm^{-1}) B) jeden pás měnící zároveň pozici (stejně jako v případě A) i intenzitu (z 11 a.u. na 12 a.u.) C) pás neměící svoji polohu a měnící svoji pološířku (z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$) D) dva překrývající se pásy (na pozicích 48 a 52 cm^{-1}), z nichž jeden roste a druhý klesá (oba lineárně, první z 11 na 12 a.u. a druhý z 10 a.u. na 5 a.u.).

pomocí proměnných: $a = 10 + k$, $pos = 50 + k$ a $b = 20$. Namodelované spektrum i s výsledky lze vidět na Obr. 4.3B. Je vidět, že obě spektra jsou velmi podobná těm předchozím, ale růst intenzity lze snadno identifikovat podle nestejně intenzity pásů (jak autokorelačních, tak kroskorelačních). V asynchronním spektru lze oproti předchozí situaci pozorovat zvýšení intenzity ve směru posuvu.

Třetím prezentovaným příkladem je rozšiřující se pás, kterému se nemění ani pozice ani intenzita a lze ho tedy popsat pomocí proměnných: $a = 10$, $pos = 50$ a $b = 20 + k$. Spektrum i výsledky jsou na Obr. 4.3C. Ze synchronního spektra není možné usoudit, o jakou spektrální změnu se jedná, ale asynchronní spektrum je v tomto případě také velmi typické a snadno poslouží k identifikaci.

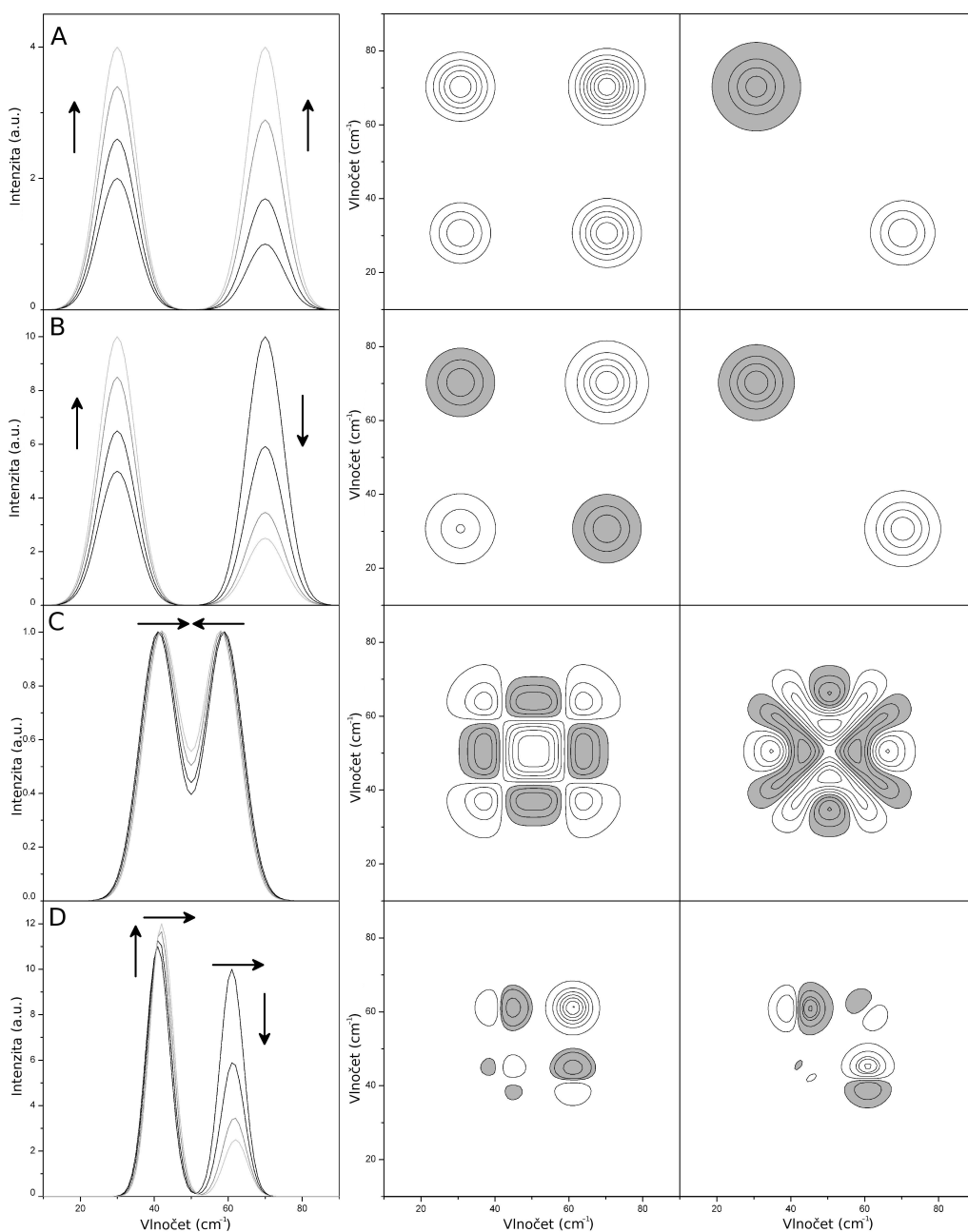
Poslední zástupce z této kategorie je pás, který je vlastně obálkou dvou velmi blízkých pásů s proměnnou intenzitou. Tyto pásy lze popsat pomocí: $a_1 = 10 + k$, $pos_1 = 48$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10/k$, $pos_2 = 52$, $b_2 = 20$. Spektrum i výsledky jsou na Obr. 4.3D. Na tomto příkladu lze snadno demonstrovat dekonvoluční schopnost 2DKoS, protože z pouhého pohledu na spektrum by se dalo usuzovat i na příklad zobrazený na Obr. 4.3B, ale asynchronní spektrum tuto možnou záměnu vyvrací.

Dále jsme se zaměřili na spektrální změny týkající se dvou pásů ve spektru (Obr. 4.4). Prvním příkladem je dvojice pásů, které mění svoji intenzitu podle předpisů: $a_1 = 2 \cdot k$, $pos_1 = 30$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 1 \cdot k^2$, $pos_2 = 70$, $b_2 = 20$. Spektrum i s výsledky je zobrazeno na Obr. 4.4A. Analogickým příkladem je druhé spektrum (Obr. 4.4B), které zobrazuje pásy měnící se opačným směrem podle předpisů: $a_1 = 5 \cdot k$, $pos_1 = 30$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 1/k^2$, $pos_2 = 70$, $b_2 = 20$.

Další příklad je již složitějším příkladem spektrálních změn. Je to vlastně rozšíření případu z Obr. 4.3A, kdy dva takovéto pásy necháme pohybovat proti sobě. Lze je charakterizovat pomocí: $a_1 = 1$, $pos_1 = 40 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 1$, $pos_2 = 60 - k$, $b_2 = 20$. Ze synchronního spektra je patrné, že jsou detekovány tři pásy: první a poslední jsou na původních pozicích a prostřední pás je silná změna intenzity v oblasti kolem 50 cm^{-1} , kde dochází ke spojování pásů. Asynchronní spektrum obsahuje čtyři podkovovité pásy, mezi jejichž rameny se nachází další klasický pás opačného znaménka.

Poslední případ je kombinací Obr. 4.4B a C, ale s tím rozdílem, že pásy se nepohybují k sobě, ale od sebe. Spektrum lze zapsat jako: $a_1 = 10 + k$, $pos_1 = 40 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10/k^2$, $pos_2 = 60 + k$, $b_2 = 20$. Synchronní i asynchronní spektrum nesou určité znaky ze spekter pohybujícího se pásu (Obr. 4.3A) a lze si také povšimnout detekce posuvu pásu v kroskorelačních pásech.

Všechny tyto provedené testy byly ve velmi dobré shodě s již dříve publikovanými výsledky (Noda 2004) a tedy můžeme předpokládat, že námi použitý algoritmus pro výpočet 2D spekter je správný. Vzhledem k tomu, že chceme 2D korelační analýzu aplikovat na metody vibrační spektroskopie, která má ve spektru jak kladné, tak i záporné pásy, provedli jsme důkladné otestování i u těchto typů spekter (Obr. 4.5). Dříve již byly provedeny práce, které se tomuto tématu věnovaly (Ashton et al. 2006), ale v testovacích spektrech byly použity pásy složené ze tří bodů.



Obrázek 4.4: Simulované pochody ve spektrech pomocí Gaussovských tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice pásů rostoucí stejným směrem a neměnící svoje pozice (první pás roste lineárně z 2 a.u. na 4 a.u. a druhý roste kvadraticky z 1 a.u. na 4 a.u.), B) dvojice opačně se pohybujících pásů neměnících svoje pozice (první pás lineárně roste z 5 a.u. na 10 a.u. a druhý kvadraticky klesá z 10 a.u. na 2 a.u.), C) dva pásy pohybující se k sobě beze změny intenzity (lineární pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}), D) dvojice pásů, která kombinuje změny z případů B a C (změna pozice stejná jako u C, změna intenzity lineárně z 11 a.u. na 12 a.u. a kvadraticky z 10 a.u. na 2 a.u.).

Zde jsme si za první příklad zvolili dva pásy opačných intenzit a oba jsme nechali růst směrem k vyšším absolutním hodnotám. Jejich pozici a změnu lze zapsat pomocí: $a_1 = -5k$, $pos_1 = 30$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 2k^2$, $pos_2 = 70$, $b_2 = 20$. Zobrazené spektrum i s výsledky je na Obr. 4.5A. Z porovnání s obrázkem 4.4B je patrné, že synchronní spektrum je v obou případech stejné. Z toho lze snadno usoudit, že pokud máme ve spektru dva pásy s opačným znaménkem, je nutné Nodova pravidla obrátit, protože 2DKoS zaznamená pouze odlišnost směrů pohybu, nikoliv změnu v intenzitách.

Dalším simulovaným případem bylo slévání takového dubletu, které je možné popsat pomocí: $a_1 = -1$, $pos_1 = 40 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 1$, $pos_2 = 60 - k$, $b_2 = 20$. Z pohledu na synchronní spektrum je zde vidět analogie se spektrem na Obr. 4.4C. V tomto případě však díky pásům s odlišnými znaménky vzniká poněkud složitější obrazec. Jsou zaznamenány celkem tři spektrální pásy. První a poslední jsou na původních pozicích a prostřední je v jejich těžišti. Obrazce v asynchronním spektru připomínají asynchronní spektrum pohybujícího se pásu (viz obr. 4.3A) a vznikly jejich složením.

Třetím případem je stěhování celého dubletu. Tento pohyb je možné popsat pomocí: $a_1 = -10$, $pos_1 = 45 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10$, $pos_2 = 55 + k$, $b_2 = 20$. Spektrum i s výsledky je zobrazeno na Obr. 4.5C. Je zde tedy také analogie se situací na Obr. 4.4C a je tak vidět, že synchronní spektra se v obou případech shodují. Asynchronní spektrum je v tomto případě podobnější pohybujícímu se pásu (viz obr. 4.3A).

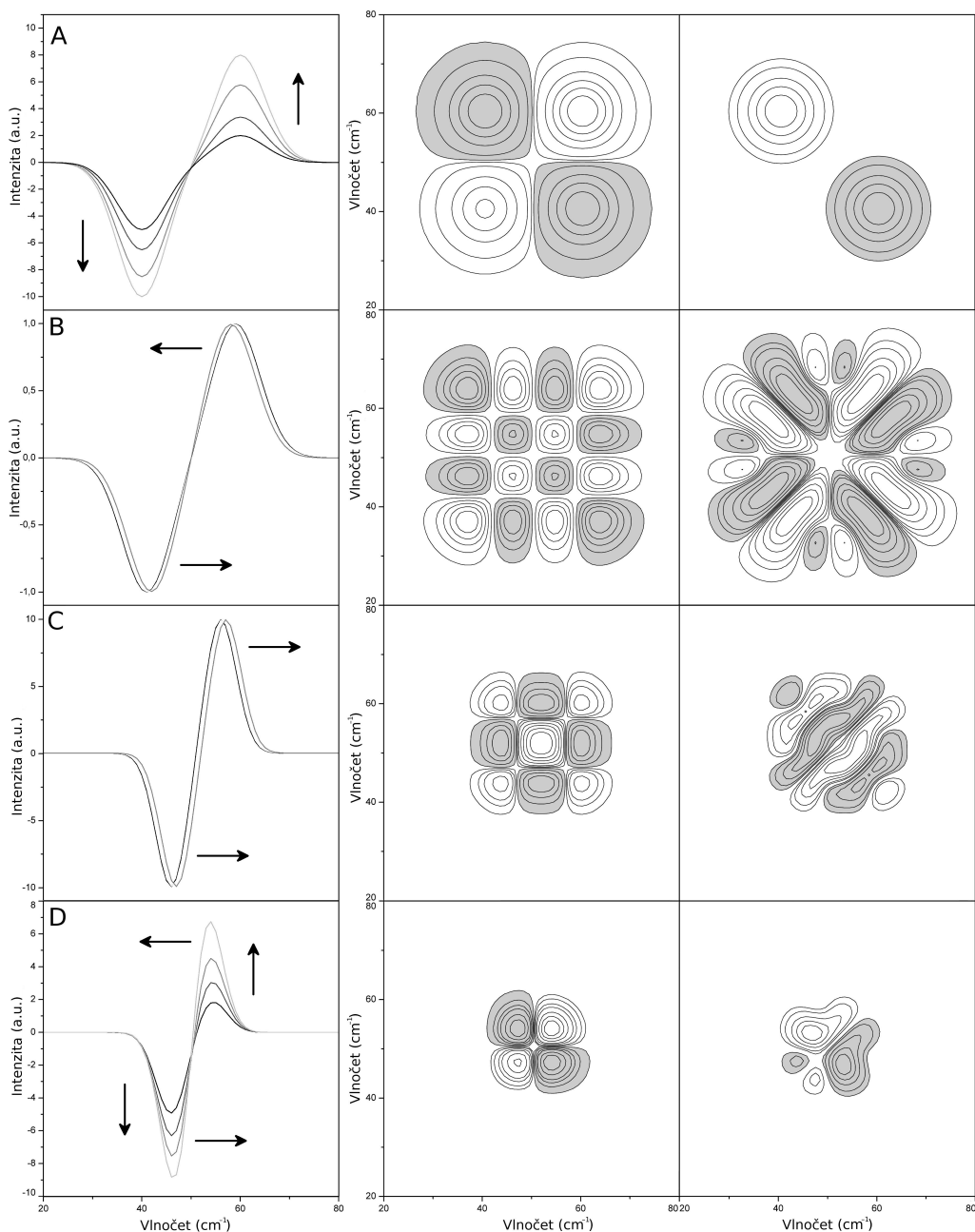
Posledním případem je kombinace případů na Obr. 4.5A a B, kdy necháme dva VOA pásy pohybovat k sobě, zatímco se mění jejich intenzita. Spektrum i s výsledky je zobrazeno na Obr. 4.5D. V synchronním spektru jsou detekovány pouze dva pásy, pravděpodobně díky velké změně intenzity, která přehluší změnu pozice, ale v asynchronním je detekována už i poziční změna.

Jako poslední testovací sadu jsme si vzali spektrální jevy, které jsou nějakým způsobem podobné těm již testovaným a sledovali jsme, zda o této podobnosti bude vypovídat i 2D spektrum (Obr. 4.6).

Prvním simulovaným případem je kombinace dvou pásů, které se rozšiřují. Je to tedy prosté složení případu na obr. 4.3C. Toto spektrum je popsáno pomocí parametrů: $a_1 = 10$, $pos_1 = 40/(20 + k)$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10$, $pos_2 = 60/(20 + k)$, $b_2 = 20$. Ze synchronního i asynchronního spektra vidíme, že se jedná o prostou kombinaci obrazců pro jeden rozšiřující se pás. V tomto případě se tedy předpoklad o podobnosti potvrdil.

Dalším simulovaným spektrem je tentýž jev, ale aplikovaný na VOA spektrum. Tímto jsme chtěli ověřit předpoklady o chování pásů při změně znaménka. Spektrum lze popsat pomocí: $a_1 = -1$, $pos_1 = 40/(20 + k)$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 1$, $pos_2 = 60/(20 + k)$, $b_2 = 20$. Z pohledu na synchronní spektrum je patrné, že pásy jsou na stejných místech jako v předchozím případě (obr. 4.6A), ale některé z nich mají prohozená znaménka. Jedná se o pásy, které přísluší mimodiagonálním blokům a jedná se tak o vzájemné korelace obou pásů. Obrazec samotného pásu změnou znaménka nijak ovlivněn není.

Dále jsme si vzali opět zdvojení případu na obr. 4.3A, tedy posuv dvou pásů, které se nacházejí v těsné blízkosti. Parametrizováno jako: $a_1 = 10$,



Obrázek 4.5: Simulované pochody ve spektrech VOA pomocí Gaussovských tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice VOA pásů měnících své intenzity v „opačném“ směru (první z -5 a.u. na -10 a.u. a druhý z 2 a.u. na 8 a.u.), B) dvojice VOA pásů, které se pohybují směrem k sobě beze změny intenzity (pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a druhý z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}), C) dvojice VOA pásů, které se společně pohybují jedním směrem (pohyb z 46 cm^{-1} na 47 cm^{-1} a druhý pás z 56 cm^{-1} na 57 cm^{-1}), D) dvojice VOA pásů, které kombinují spektrální změny z B a C (první roste lineárně z -5 a.u. na -10 a.u. a posouvá se z 46 cm^{-1} na 47 cm^{-1} a druhý kvadraticky z 2 a.u. na 8 a.u. a posouvá se z 54 cm^{-1} na 53 cm^{-1}).

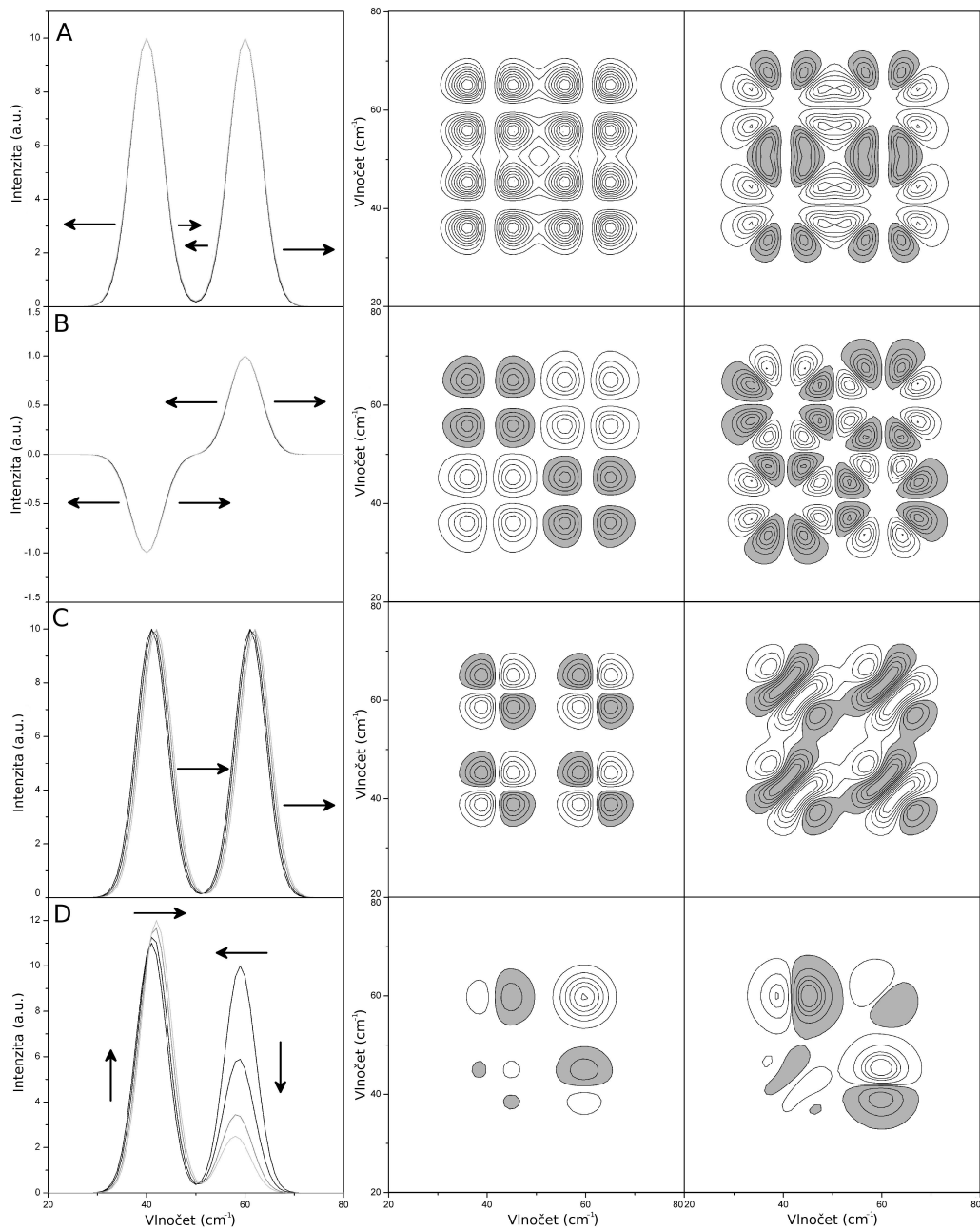
$pos_1 = 40 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10$, $pos_2 = 60 + k$, $b_2 = 20$. Z pohledu na synchronní spektrum je vidět, že obrazec je opět prostým složením případu jednoho posouvajícího se pásu. Asynchronní spektrum je o něco složitější, ale to je dáno přílišnou blízkostí obou původních pásů, čímž došlo ke slití několika oblastí v 2D spektru.

Jako poslední modelový příklad jsme si vzali lehkou obměnu jevu na obrázku 4.4D. V tomto případě se oba pásy pohybují směrem k sobě a nikoliv stejným směrem. Tento posuv lze parametrizovat následovně: $a_1 = 10 + k$, $pos_1 = 40 + k$, $b_1 = 20$ a $a_2 = 10/k^2$, $pos_2 = 60 - k$, $b_2 = 20$. U synchronního spektra nevidíme žádný rozdíl oproti příkladu na obrázku 4.4D, ale asynchronní spektrum má drobnou změnu ve znaménku dvou pásů. Jsou to pásy, které přísluší korelaci pásu na 60 a.u. se sebou samým po posuvu. Došlo zde ke změně znaménka, což v sobě zahrnuje pořadí změn a tedy nám odhaluje, že se pás pohybuje jiným směrem.

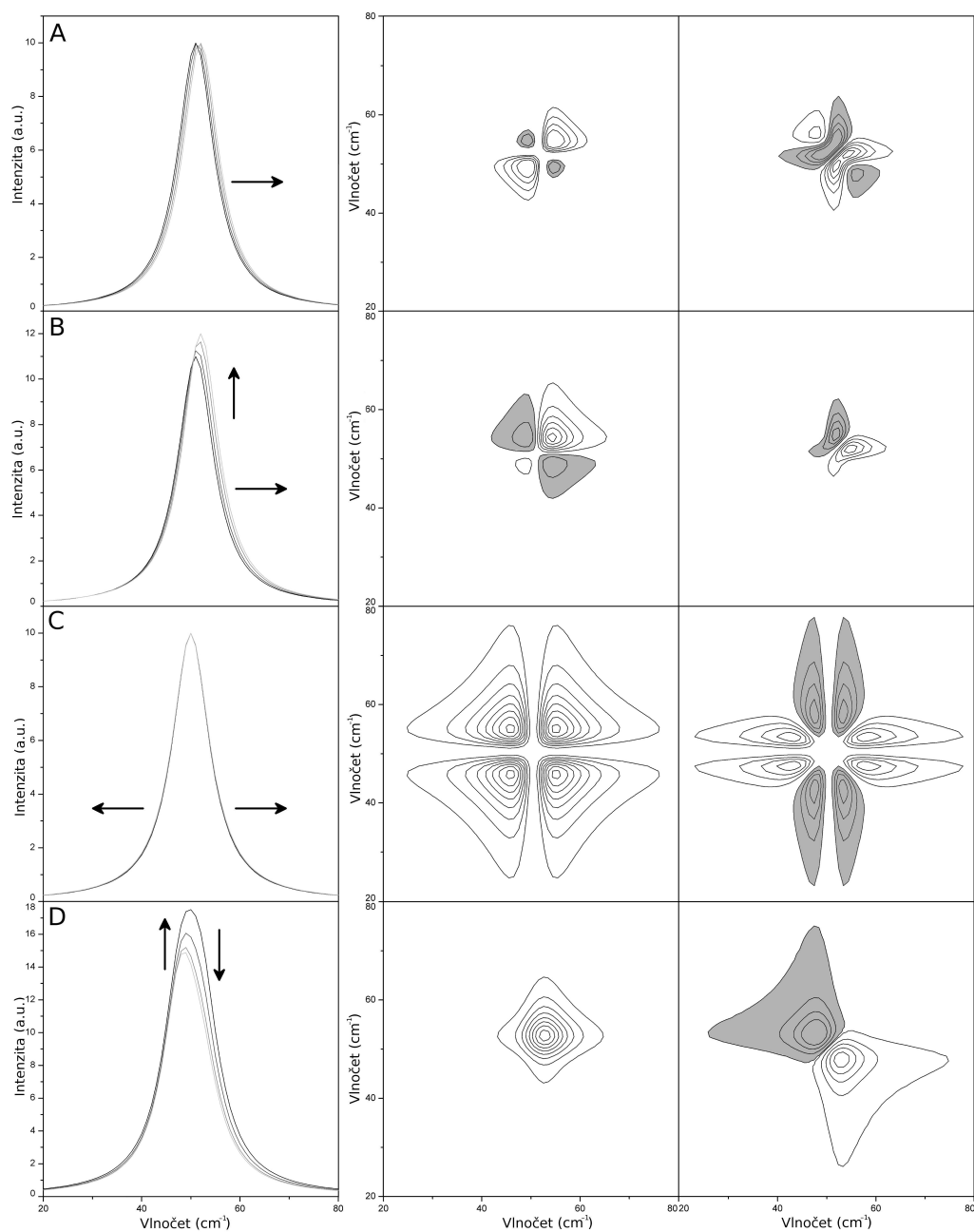
Všechny tyto spektrální události jsme namodelovali také pomocí Lorentzových pásů.

$$L = k \frac{1}{1 + \frac{(x-pos)^2}{20}} \quad (4.2)$$

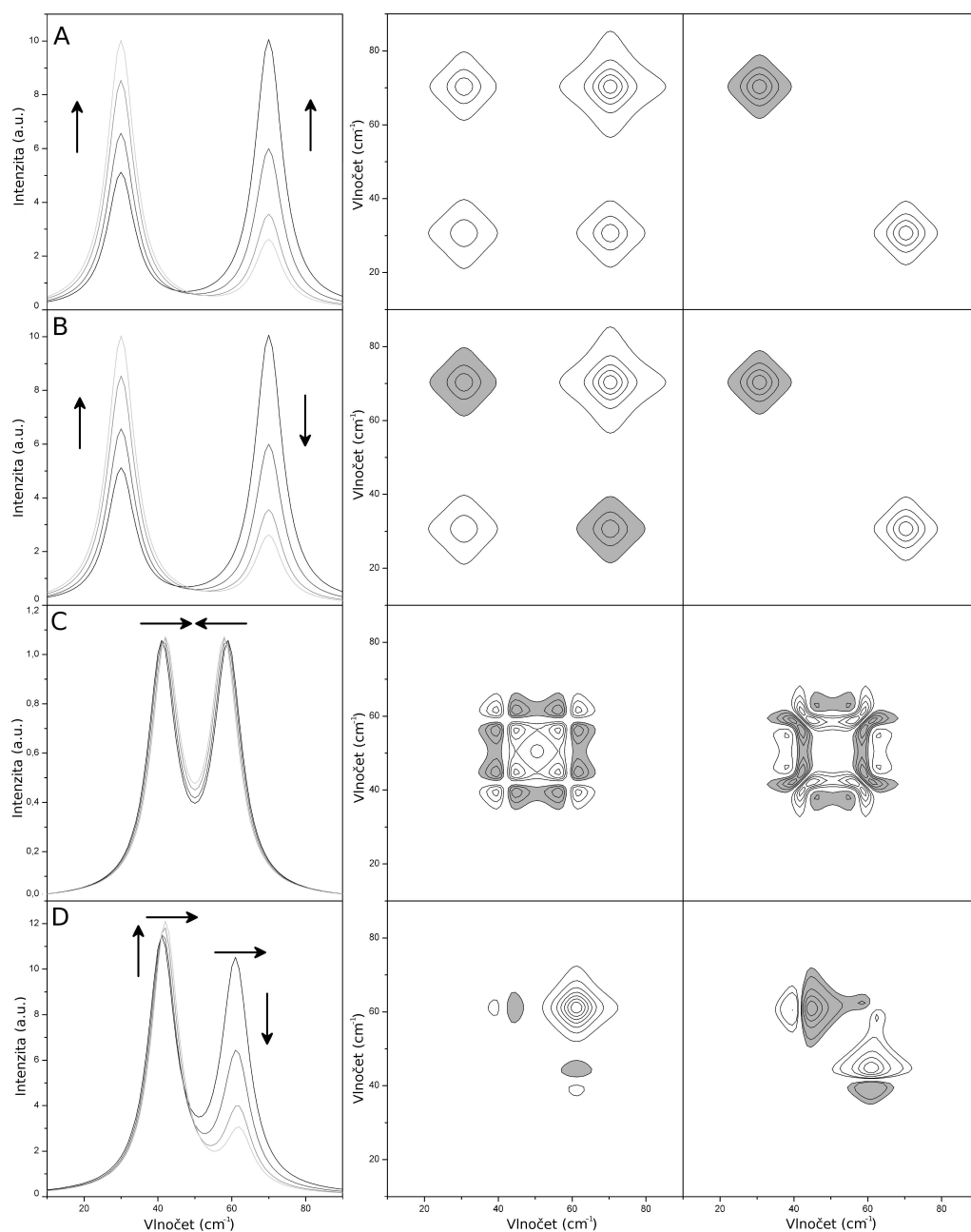
Důvodem byla skutečnost, že v případě čistých vibrací by tvar spektrálních pásů byl dán právě Lorentzovým pásem. Ve spektrech proteinů jsou však čisté vibrace spíše vzácností a skutečná spektra se svým tvarem blíží Gaussovým pásům - pás je pak směsí obou tvarů. Proto je důležité znát obrazce pro oba tvary spekter. Pro modelování jsme použili stejné parametry pro snadné porovnání výsledků. Jak je vidět z obrázků 4.7, 4.8, 4.9 a 4.10, jsou korelační obrazce Lorentzových pásů poněkud odlišné, ale můžeme na ně přirozeně aplikovat stejná rozhodovací pravidla.



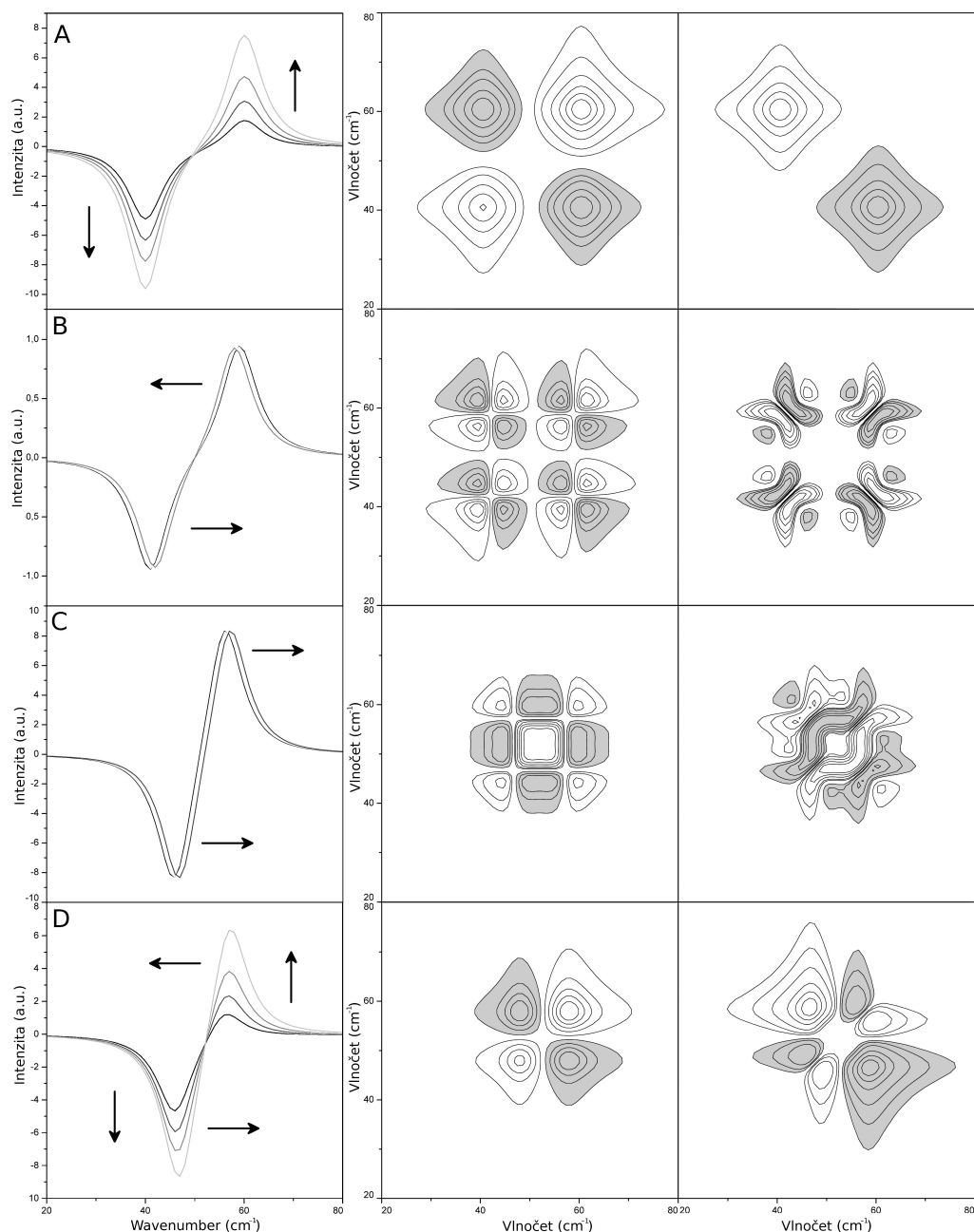
Obrázek 4.6: Simulované pochody ve spektrech pomocí Gaussovských tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice rozšiřujících se pásů (oba z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$), B) dvojice VOA pásů, které mění svoji pološírku (oba z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$), C) dvojice pásů, které se společně pohybují jedním směrem (pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a druhý pás z 61 cm^{-1} na 62 cm^{-1}), D) dvojice pásů, z nichž jeden roste a zároveň se pohybuje (roste lineárně z 11 a.u. na 12 a.u. a posouvá se z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1}) a druhý klesá a zároveň se pohybuje opačným směrem (klesá kvadraticky z 10 a.u. na 2,5 a.u. a posouvá se z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}).



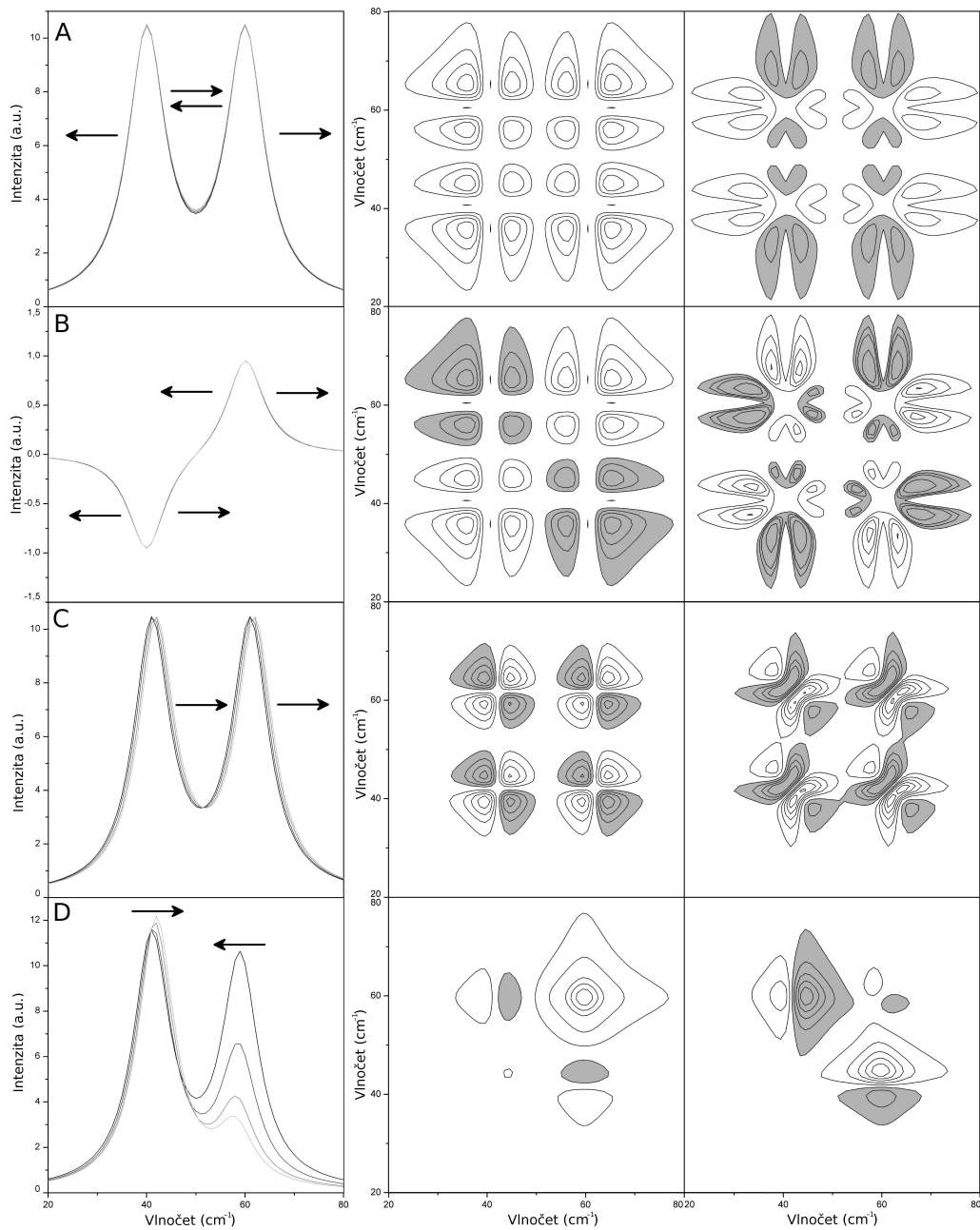
Obrázek 4.7: Simulované pochody ve spektrech pomocí Lorentzových tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) jeden pás posouvající se k vyšším vlnočtům (z pozice 51 cm^{-1} na 52 cm^{-1}), B) jeden pás měnící zároveň pozici (stejně jako v případě A) i intenzitu (z 11 a.u. na 12 a.u.), C) pás neměící svoji polohu a měnící svoji pološířku (z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$), D) dva překrývající se pásy (na pozicích 48 a 52 cm^{-1}), z nichž jeden roste a druhý klesá (oba lineárně, první z 11 na 12 a.u. a druhý z 10 a.u. na 5 a.u.).



Obrázek 4.8: Simulované pochody ve spektrech pomocí Lorentzových tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice pásů rostoucí stejným směrem a neměnící svoje pozice (první pás roste lineárně z 2 a.u. na 4 a.u. a druhý roste kvadraticky z 1 a.u. na 4 a.u.), B) dvojice opačně se pohybujících pásů neměnících svoje pozice (první pás lineárně roste z 5 a.u. na 10 a.u. a druhý kvadraticky klesá z 10 a.u. na 2 a.u.), C) dva pásy pohybující se k sobě beze změny intenzity (lineární pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}), D) Dvojice pásů, která kombinuje změny z případů B a C (změna pozice stejná jako u C, lineární pokles intenzity z 11 a.u. na 12 a.u. a kvadratický pokles intenzity z 10 a.u. na 2 a.u.).



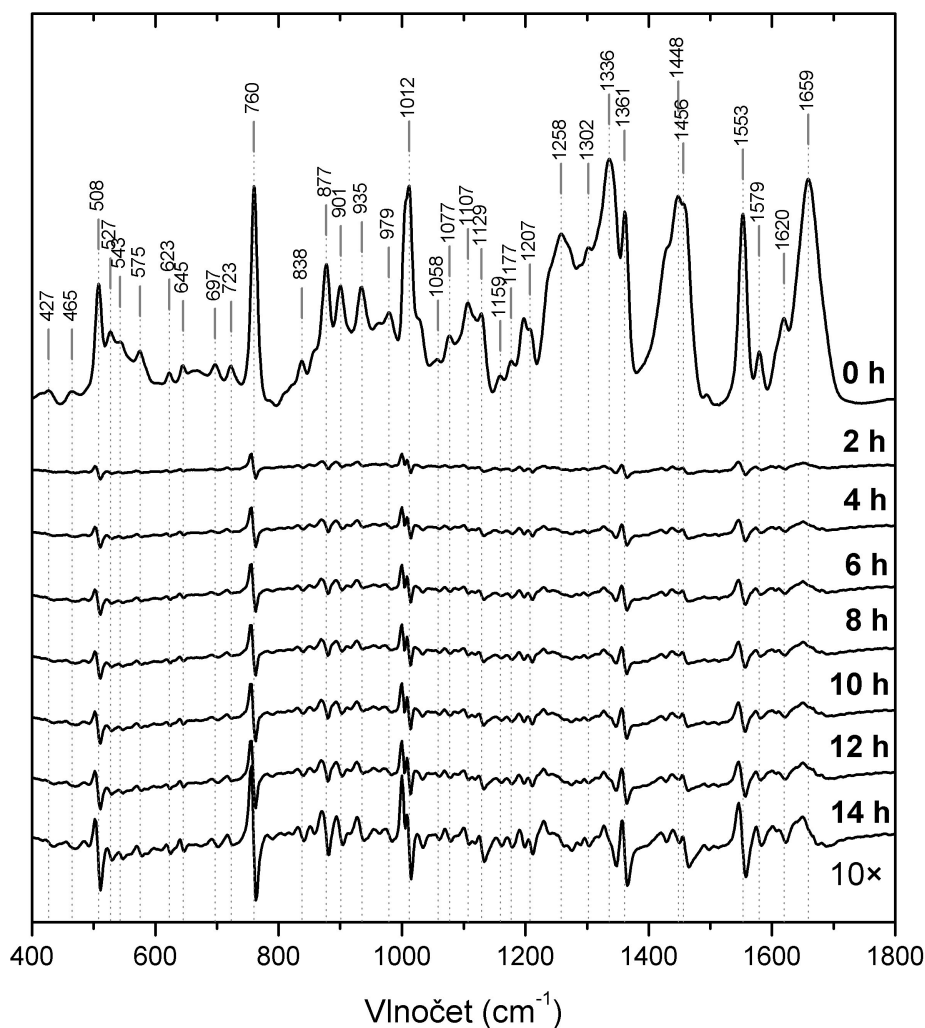
Obrázek 4.9: Simulované pochody ve spektrech VOA pomocí Lorentzových tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice VOA pásů měnících své intenzity v „opačném“ směru (první z -5 a.u. na -10 a.u. a druhý z 2 a.u. na 8 a.u.), B) dvojice VOA pásů, které se pohybují směrem k sobě beze změny intenzity (pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a druhý z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}), C) dvojice VOA pásů, které se společně pohybují jedním směrem (pohyb z 46 cm^{-1} na 47 cm^{-1} a druhý pás z 56 cm^{-1} na 57 cm^{-1}), D) dvojice VOA pásů, které kombinují spektrální změny z B a C (první roste lineárně z -5 a.u. na -10 a.u. a posouvá se z 46 cm^{-1} na 47 cm^{-1} a druhý kvadraticky z 2 a.u. na 8 a.u. a posouvá se z 54 cm^{-1} na 53 cm^{-1}).



Obrázek 4.10: Simulované pochody ve spektrech pomocí Lorentzovských tvarů spolu s jejich synchronními a asynchronními 2D korelačními spektry. Ve všech případech bylo namodelováno 11 spekter. A) dvojice rozšiřujících se pásů (oba z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$), B) dvojice VOA pásů, které mění svoji pološírku (oba z $7,65 \text{ cm}^{-1}$ na $7,84 \text{ cm}^{-1}$), C) dvojice pásů, které se společně pohybují jedním směrem (pohyb z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1} a druhý pás z 61 cm^{-1} na 62 cm^{-1}), D) dvojice pásů, z nichž jeden roste a zároveň se pohybuje (roste lineárně z 11 a.u. na 12 a.u. a posouvá se z 41 cm^{-1} na 42 cm^{-1}) a druhý klesá a zároveň se pohybuje opačným směrem (klesá kvadraticky z 10 a.u. na 2,5 a.u. a posouvá se z 59 cm^{-1} na 58 cm^{-1}).

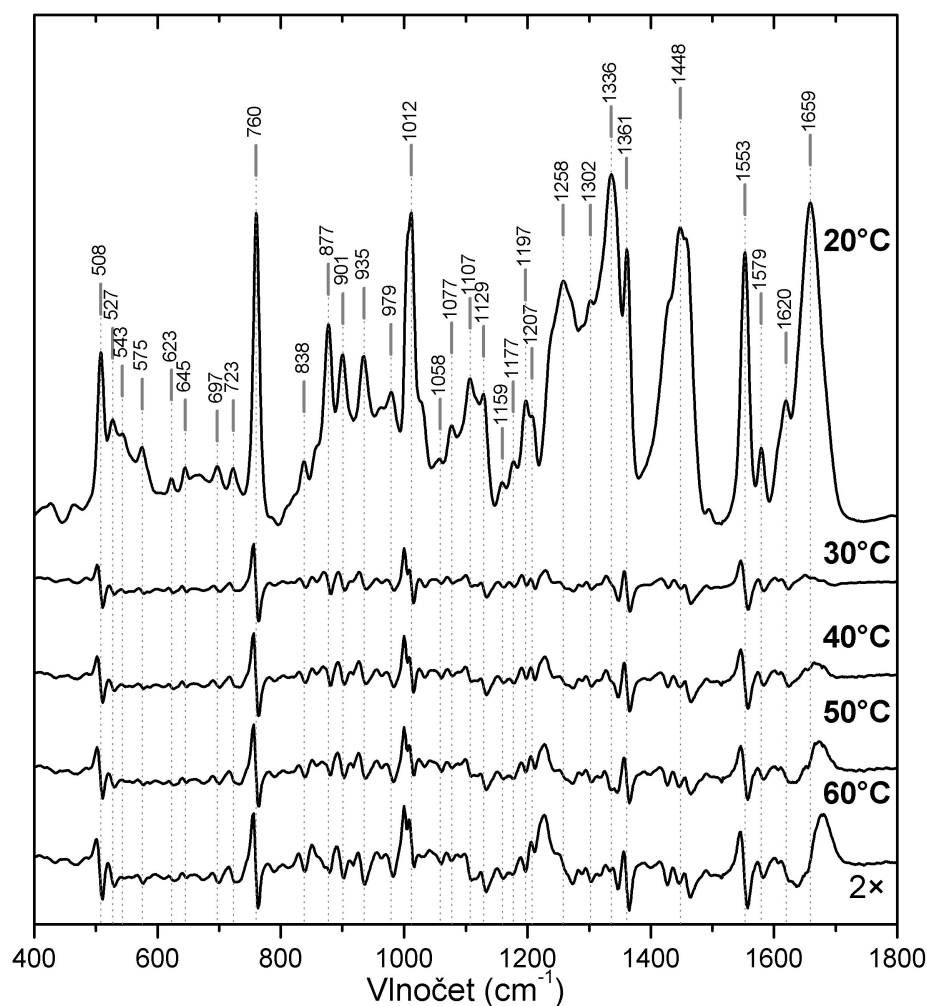
4.3 Ramanova spektra lysozymu

Naměřená data byla zpracována postupem uvedeným v kapitole 3.4.3. Z těchto výsledků vytvoříme diferenční spektra proteinu pro časovou i teplotní závislost (obr. 4.11 a 4.12). Pokaždé bylo od aktuálního spektra odečteno první naměřené a celkový rozdíl byl vynásoben faktorem 10, respektive 2 pro časovou, respektive teplotní závislost.



Obrázek 4.11: Diferenční spektra pro časovou závislost Ramanových spekter lysozymu. Diferenční spektra byla vytvořena odečtením prvního spektra a pro snadnější zobrazení vynásobena faktorem 10.

Při opakovaném měření se bohužel ukázalo, že změny, které jsou pozorovatelné v časové závislosti (obr. 4.11), jsou sice částečně reálné, ale bohužel jsou natolik malé, že jsou překryty artefaktem, který vzniká vlivem posunu kalibrace. To může být způsobeno nepatrnými fluktuacemi teploty v laboratoři (a to i přes použití klimatizace). Z časové závislosti Ramanových spekter tedy nelze získat žádnou podstatnou informaci a tudíž jsme ani neprováděli 2DKoS.



Obrázek 4.12: Diferenční spektra pro teplotní závislost Ramanových spekter lysozymu. Diferenční spektra byla vytvořena odečtením prvního spektra a pro snadnější zobrazení vynásobena faktorem 2.

Naproti tomu změny v teplotní závislosti jsou dostatečně zřetelné a již z těchto diferenčních spekter lze říci něco o změnách, které ve spektru probíhají. Ze změny tvaru a intenzity pásu na 1659 cm^{-1} lze usoudit, že dochází ke vzrůstu obsahu β -skládaných listů a poklesu α -helixů (Tensmeyer et al., 1996). Dále jsou patrné posuvy v pásech, které přísluší aromatickým postranním řetězcům: tryptofan na 1553 cm^{-1} a 760 cm^{-1} a tryptofan a fenylalanin v oblasti 1012 cm^{-1} . Dále je patrný posuv pásu příslušející disulfidovému můstku v konformaci gauche-gauche-gauche na 508 cm^{-1} (to znamená, že fragment $C_{\alpha}-C_{\beta}-S-S-C_{\beta}-C_{\alpha}$ zaujímá takovou konformaci, kdy torzní úhel S-S vazby je cca 90° a velikosti obou dihedrálních úhlů mezi koncovým uhlíkem a vzdálenějším atomem síry jsou přibližně 60°).

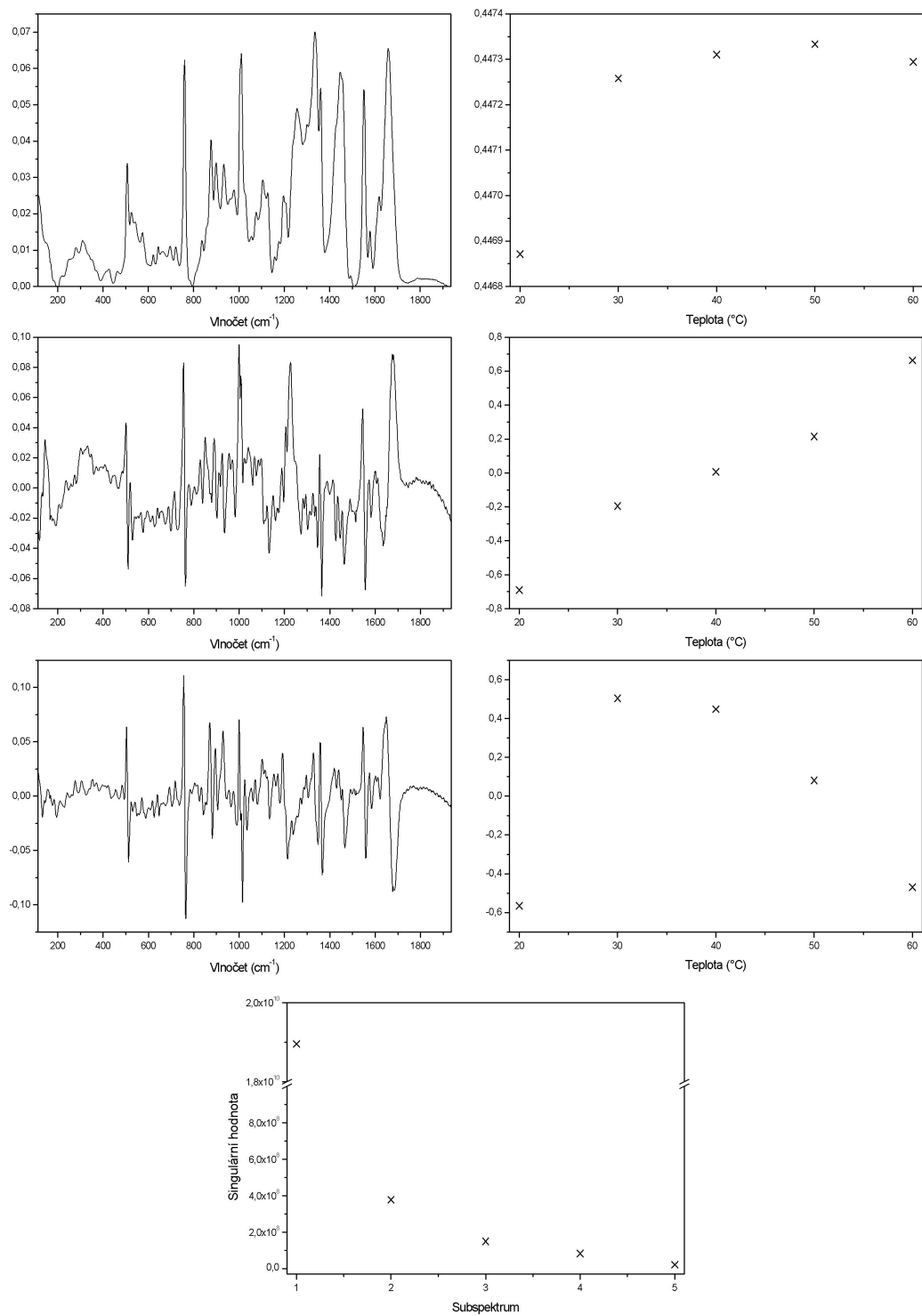
Na teplotní závislost byla také aplikována faktorová analýza, jejíž výstup je na obrázku 4.13. Je zde vidět, že při ohřívání dojde nejprve k výrazné změně ve spektru, která se poté zpomalí. Druhé subspektrum zachycuje nějakou pozvol-

nou změnu, která probíhá po celou dobu zahřívání přibližně stejně rychle. Třetí subspektrum poté zachycuje pravděpodobně spektrum fibrilovaného proteinu, protože se jeho přítomnost ve spektru nejprve zvýší a poté postupně ubývá. Dochází tedy k rozpadu fibrilární struktury a převládá agregovaná forma lysozymu, což také zachycovala předchozí subspektra.

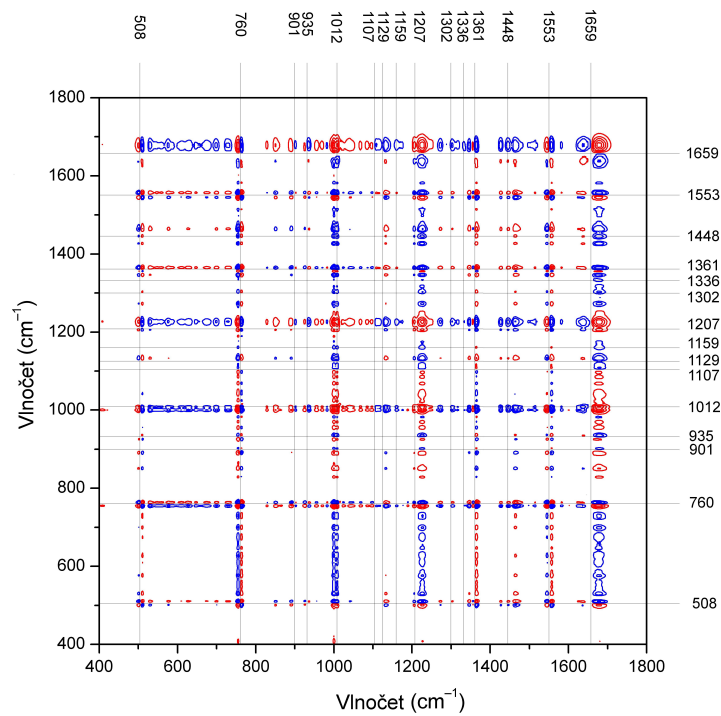
Dále byla provedena 2DKoS z teplotní závislosti, jejíž výsledky jsou na obrázcích 4.14 a 4.15. Změny pásů jsou shrnuty v tabulce 4.1. V 2D spektru si lze povšimnout několika velkých změn. Ta nejpatrnější je v oblasti okolo 1660 cm^{-1} a odhaluje dva pásy, které se mění v opačném směru. Jedná se o přelévání intenzity mezi pásy na ca 1680 a 1640 cm^{-1} , přičemž pás na 1680 cm^{-1} roste. Jedná se tedy o vzrůst podílu β -skládaného listu a pokles podílu α -helixu (Tensmeyer et al., 1996), což potvrzuje výsledky z diferenčních spekter a také předchozí studie (Shasilov et al., 2007; Shasilov et al., 2008). Dále je z těchto výsledků vidět, že rozbalování proteinu je víceúrovňové. Nejprve dochází k nárůstu obsahu β -skládaných listů (pás na 1680 cm^{-1}), následuje úbytek obsahu α -helikální struktury (pás na 1640 cm^{-1}) a posledním krokem je opět nárůst obsahu β -skládaných listů (pás na 1229 cm^{-1}). Zároveň také dochází k vystavování tryptofanu vlivu vodního prostředí (poměr pásů 1360 a 1340 cm^{-1} se snižuje –Overman et al., 1995). Toto vystavování předchází vzrůstu obsahu druhé části β struktur, ale již bohužel nelze říci, v jakém časovém vztahu je k ostatním změnám.

ν_1 (cm^{-1})	ν_2 (cm^{-1})	S	A
1680 (β -skl. 1. ¹)	1640 (α -helix ¹)	–	+
1680 (β -skl. 1. ¹)	1448 (δ CH_2 , CH_3 , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	–	–
1680 (β -skl. 1. ¹)	1229 (β -skl. 1. ¹)	+	+
1680 (β -skl. 1. ¹)	1129 (Ile, Val, Leu, Trp ^{2,3})	–	–
1640 (α -helix ¹)	1229 (β -skl. 1. ¹)	–	–
1448 (δ CH_2 , CH_3 , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	1229 (β -skl. 1. ¹)	–	×
1361 (Trp dublet ^{1,2,3})	1229 (β -skl. 1. ¹)	–	+
1229 (β -skl. 1. ¹)	1129 (Ile, Val, Leu, Trp ^{2,3})	–	–

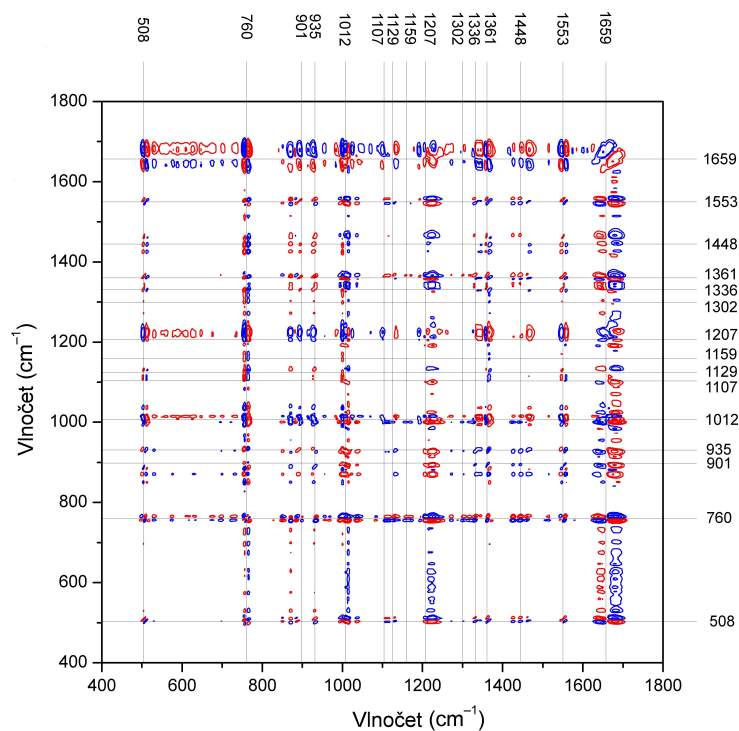
Tabulka 4.1: Korelační tabulka pro teplotní závislost Ramanových spekter lysozymu (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu a × značí, že pás se v daném spektru nevyskytuje). Přiřazení pásů byla provedena podle: ¹ – Tensmeyer et al., 1996; ² – Overman et al., 1999; ³ – Tuma, 2005.



Obrázek 4.13: Výsledky faktorové analýzy pro teplotní závislost Ramanových spekter lysozymu.



Obrázek 4.14: Synchronní spektrum 2DKoS teplotní závislosti Ramanových spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).

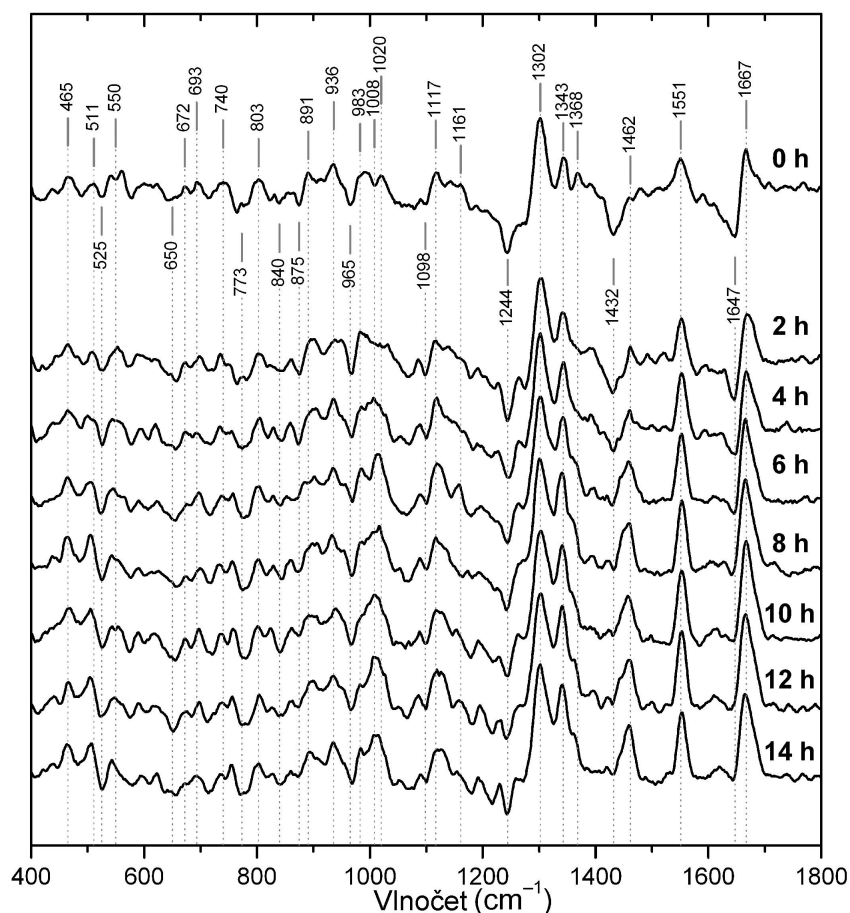


Obrázek 4.15: Asynchronní spektrum 2DKoS teplotní závislosti Ramanových spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).

4.4 Spektra Ramanovy optické aktivity lysozymu

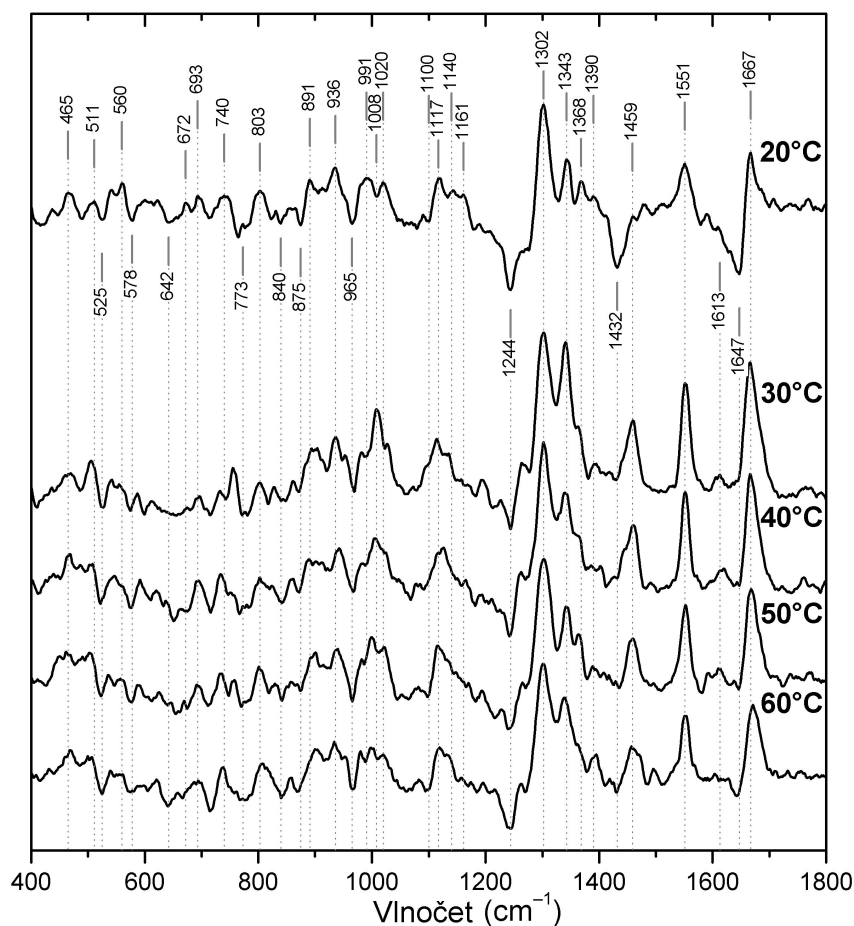
Tyto výsledky byly získány zároveň s měřením Ramanových spekter. Data byla zpracována postupy uvedenými v kapitole 3.4.2.

Získaná spektra časové závislosti jsou zobrazena na obrázcích 4.16 a 4.17. Za povšimnutí stojí skutečnost, že spektrum v čase $T = 18\text{h}$ je velmi podobné spektru při teplotě $t = 30^\circ\text{C}$. Z toho lze usoudit, že při teplotním měření proběhl nejprve velmi zrychleně celý proces fibrilace, který je zachycen v časovém měření a poté došlo k rozkladným procesům při denaturaci a pravděpodobnému vzniku oligomerních struktur. Tomu nasvědčuje i fakt, že spektrum při teplotě $t = 60^\circ\text{C}$ svým tvarem připomíná spektra z nižších časů.



Obrázek 4.16: Série naměřených ROA spekter lysozymu pro časovou závislost.

Nejprve byla na výsledky časové závislosti fibrilace lysozymu aplikována faktorová analýza, a to jak na původní výsledky, tak na výsledky přeměřené. Výstupy jsou vidět na obrázcích 4.23, 4.24 a 4.25. Z obrázku 4.24 je patrné, že takto malý časový krok (40 min.) není vhodný, protože ve vzorku dochází k silným fluktuacím. Pravděpodobně pozorujeme lokální tvorbu a rozpad fibril. Je proto vhodnější zvolit poněkud delší časový úsek, kde by došlo k vystředování těchto dějů. Z obrázku 4.25 je vidět, že při zdvojnásobení časového kroku (80 min.) dojde k částečnému vyrovnání těchto fluktuací a pokud zvolíme

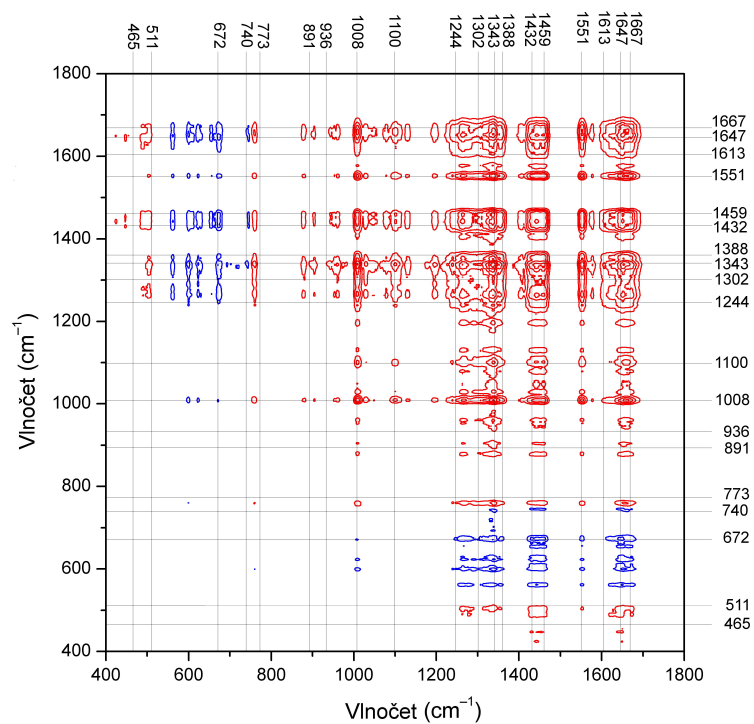


Obrázek 4.17: Série naměřených ROA spekter lysozymu pro teplotní závislost.

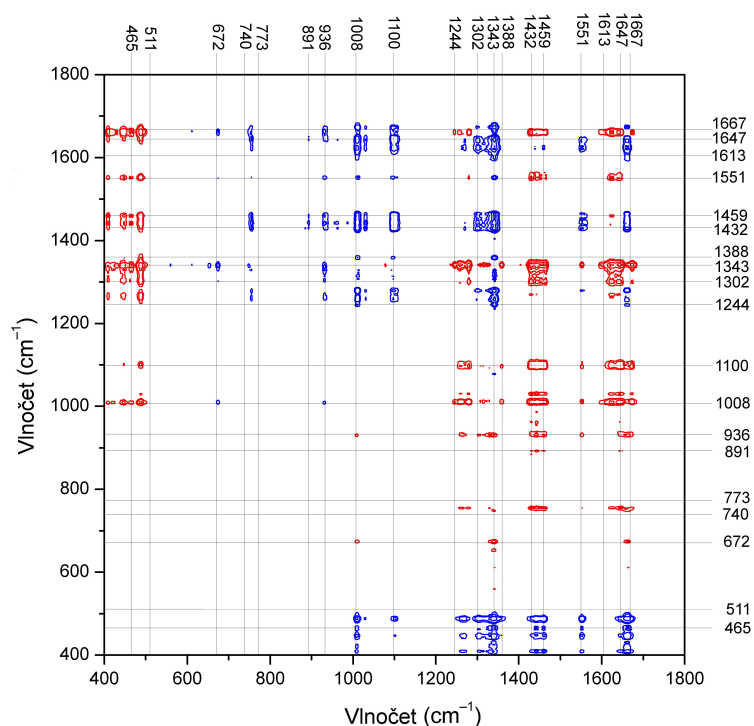
časový krok 2 h (viz obr. 4.23 a 4.26), je průběh tvorby těchto fibril již dostatečně lineární. Z toho lze nahlédnout, že u prvního měření byl časový krok zvolen správně. U druhého měření se v čase 4 h objevuje zářez, který by mohl být způsoben několika faktory. Jednou možností je tvorba usazeniny, která se následně rozpustila, nebo také mohlo jít o nečistotu ve vzorku, která způsobila lokální ohřev a rozpuštění vytvořených fibril. Vzhledem k této nekvalitě opakovaného měření jsme se při zpracování věnovali pouze prvnímu měření, u kterého se tato chyba neobjevuje.

Pro další zpracování bylo vzato jen prvních 8 spekter, protože ta se nacházejí na náběžné hraně křivky v koeficientech prvního subspektra. Tato spektra tedy zachycují tvorbu fibril a zbylá spektra zachycují sedimentaci vzorku a nenesou tedy žádnou informaci o procesu fibrilace. Výsledky 2DKoS jsou zobrazeny na obrázcích 4.18 a 4.19 a shrnuty v tabulce 4.3.

Ze spekter teplotní závislosti byla také provedena faktorová analýza, jejíž výstup je na obrázku 4.22. Z pohledu na průběh koeficientů prvního subspektra je zřejmé, že hlavní děj proběhne velmi rychle jedním směrem a poté pomalu probíhá opačným směrem. To potvrzuje domněnku, že při tomto měření nejprve proběhne fibrilace a poté proces denaturace vlivem teploty. Toto tvrzení



Obrázek 4.18: Synchronní spektrum 2DKoS teplotní závislosti ROA spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).



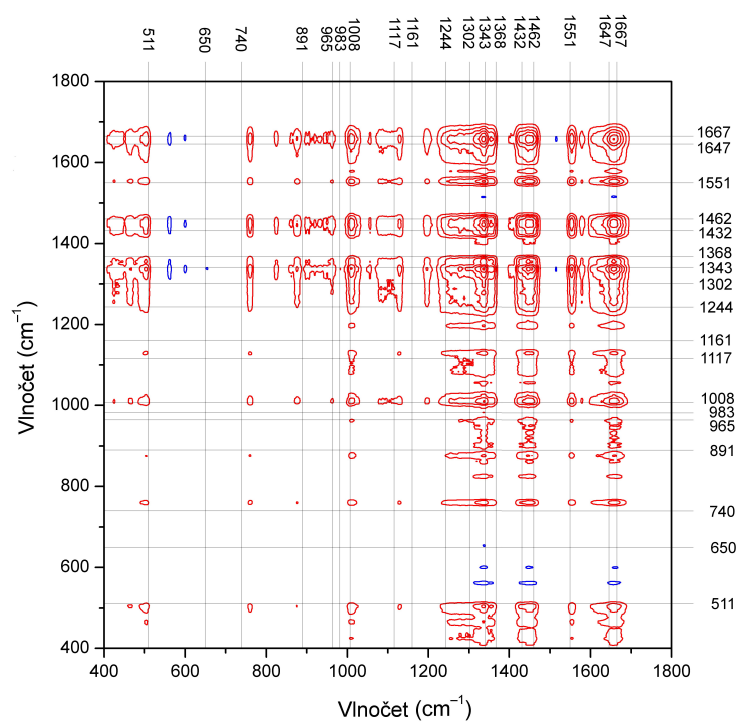
Obrázek 4.19: Asynchronní spektrum 2DKoS teplotní závislosti ROA spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).

se však neshoduje s předpokladem, že denaturace a fibrilace jsou stejné procesy (Arnaudov et al., 2005). Skutečnost, že se jedná o rozdílné procesy by také vysvětlovala výsledek pozorování z předchozí práce autorů (Arnaudov et al., 2003), ve které zjistili, že fibrily vytvořené zahřátím vzorku lze po krátké době vrátit zpět, ale u starších fibril již to není možné. Autoři usuzují, že po delší době dochází k upevnění vazeb, ale naše zjištění napovídají spíše denaturaci vzorku.

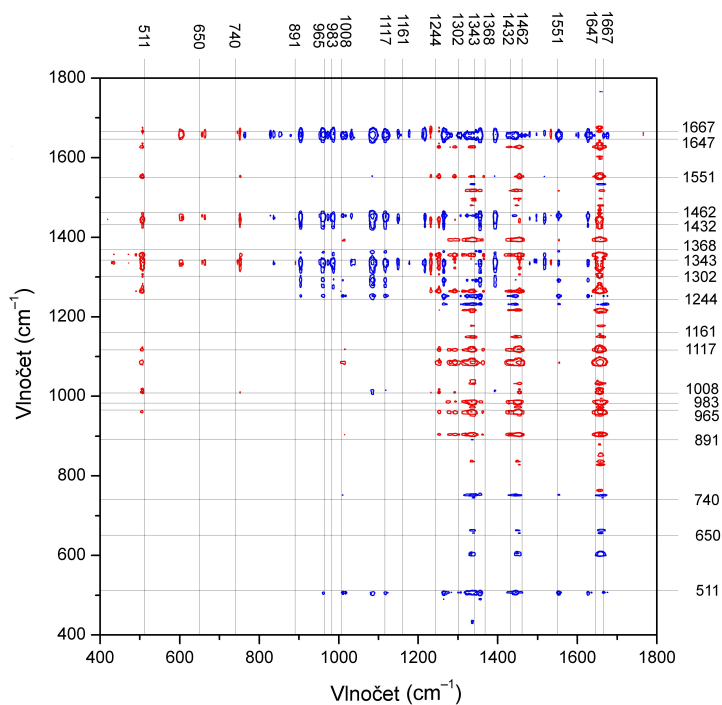
Z těchto dat byla provedena 2DKoS, jejíž výsledky jsou na obrázcích 4.20 a 4.21. Přehledně jsou pak shrnuty v tabulce 4.2.

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	Synch.	Asynch.
1667 (α -helix)	1647 (α -helix)	+	-
1667 (α -helix)	1613 (α -helix)	+	-
1667 (α -helix)	1459 (CH ₂ , CH ₃)	+	-
1667 (α -helix)	1432 (CH ₂ , CH ₃)	+	-
1667 (α -helix)	1343 (α -helix)	+	+
1667 (α -helix)	1117	+	+
1667 (α -helix)	1008	+	+
1647 (α -helix)	1551 (Trp)	+	+
1647 (α -helix)	1343 (α -helix)	+	+
1647 (α -helix)	1302 (α -helix)	+	+
1647 (α -helix)	1117	+	+
1647 (α -helix)	1008	+	+
1613	1343 (α -helix)	+	+
1613	1008 (α -helix)	+	+
1551 (Trp)	1432 (CH ₂ , CH ₃)	+	-
1551 (Trp)	1343 (α -helix)	+	+
1551 (Trp)	1008	+	+
1459 (CH ₂ , CH ₃)	1343 (α -helix)	+	-
1459 (CH ₂ , CH ₃)	1302 (α -helix)	+	+
1459 (CH ₂ , CH ₃)	1117	+	+
1459 (CH ₂ , CH ₃)	1008	+	+
1432 (CH ₂ , CH ₃)	1343 (α -helix)	+	+
1432 (CH ₂ , CH ₃)	1302 (α -helix)	+	+
1432 (CH ₂ , CH ₃)	1117	+	+
1432 (CH ₂ , CH ₃)	1008	+	+
1343 (α -helix)	1244 (β -vlákna)	+	-
1244 (β -vlákna)	1008	+	-

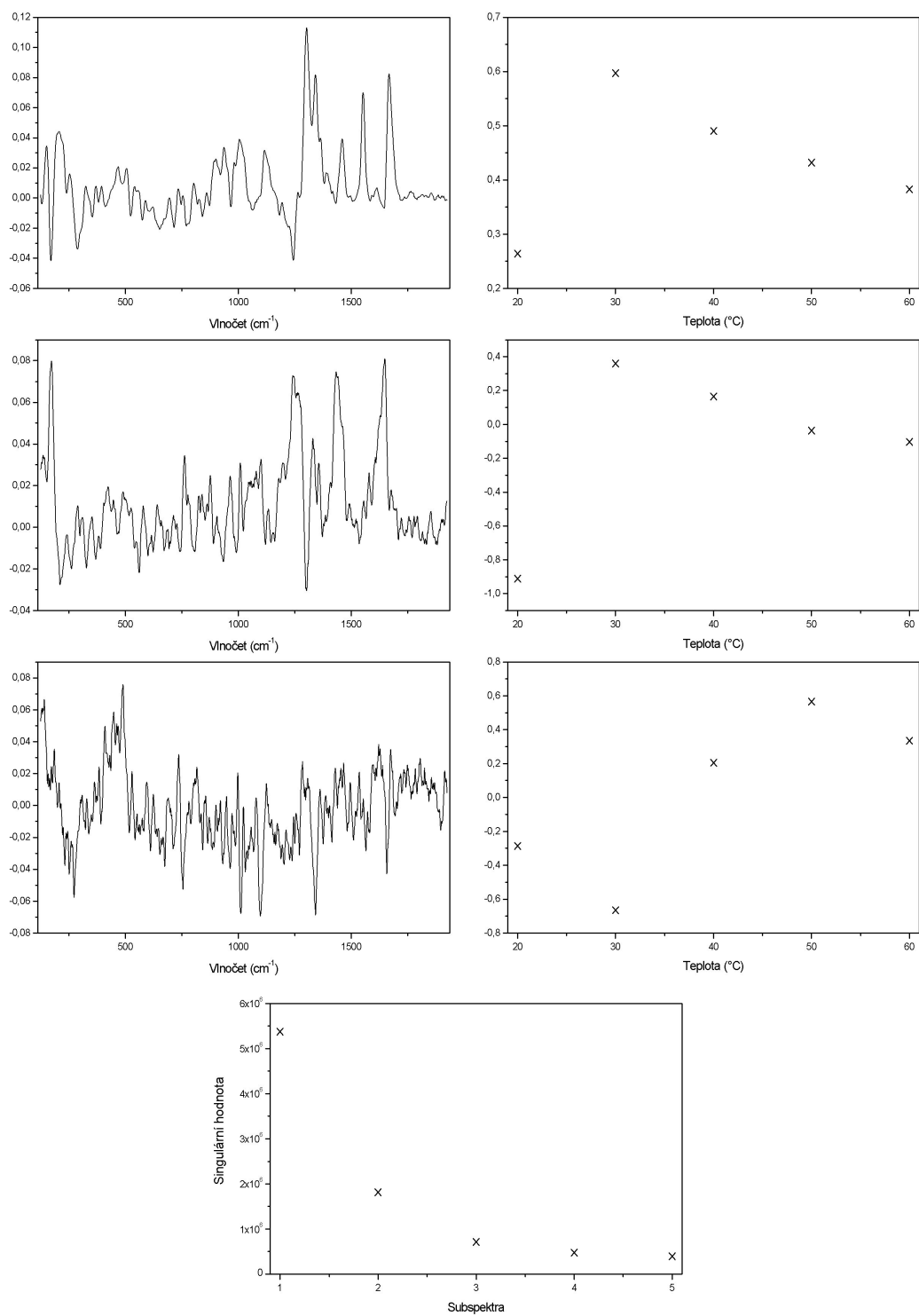
Tabulka 4.2: Korelační tabulka pro teplotní závislost ROA spekter lysozymu (+ a - značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů bylo provedeno podle Barron et al., 2000.



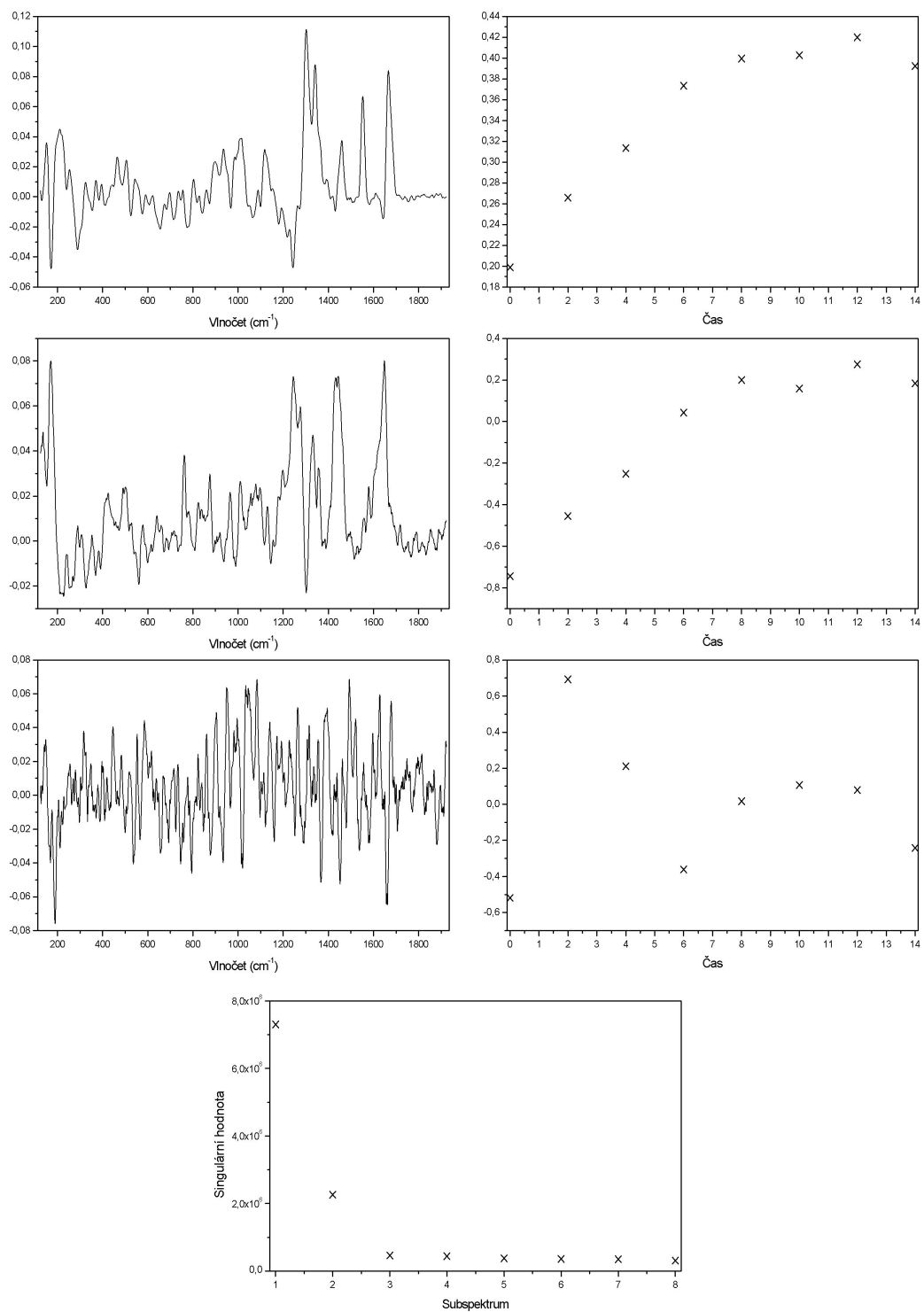
Obrázek 4.20: Synchronní spektrum 2DKoS časové závislosti ROA spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).



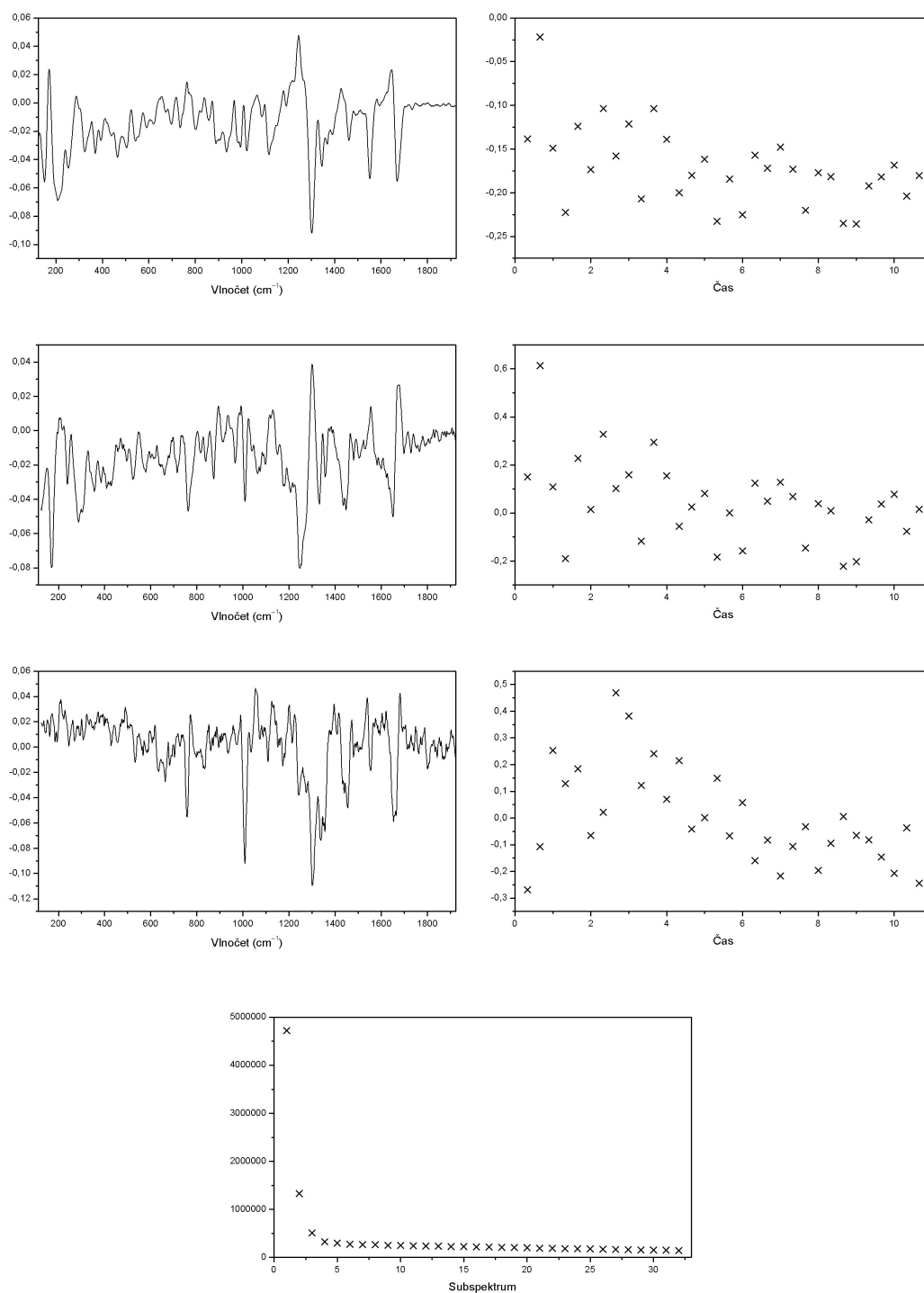
Obrázek 4.21: Asynchronní spektrum 2DKoS časové závislosti ROA spekter lysozymu (kladné pásy jsou značeny červeně a záporné modře).



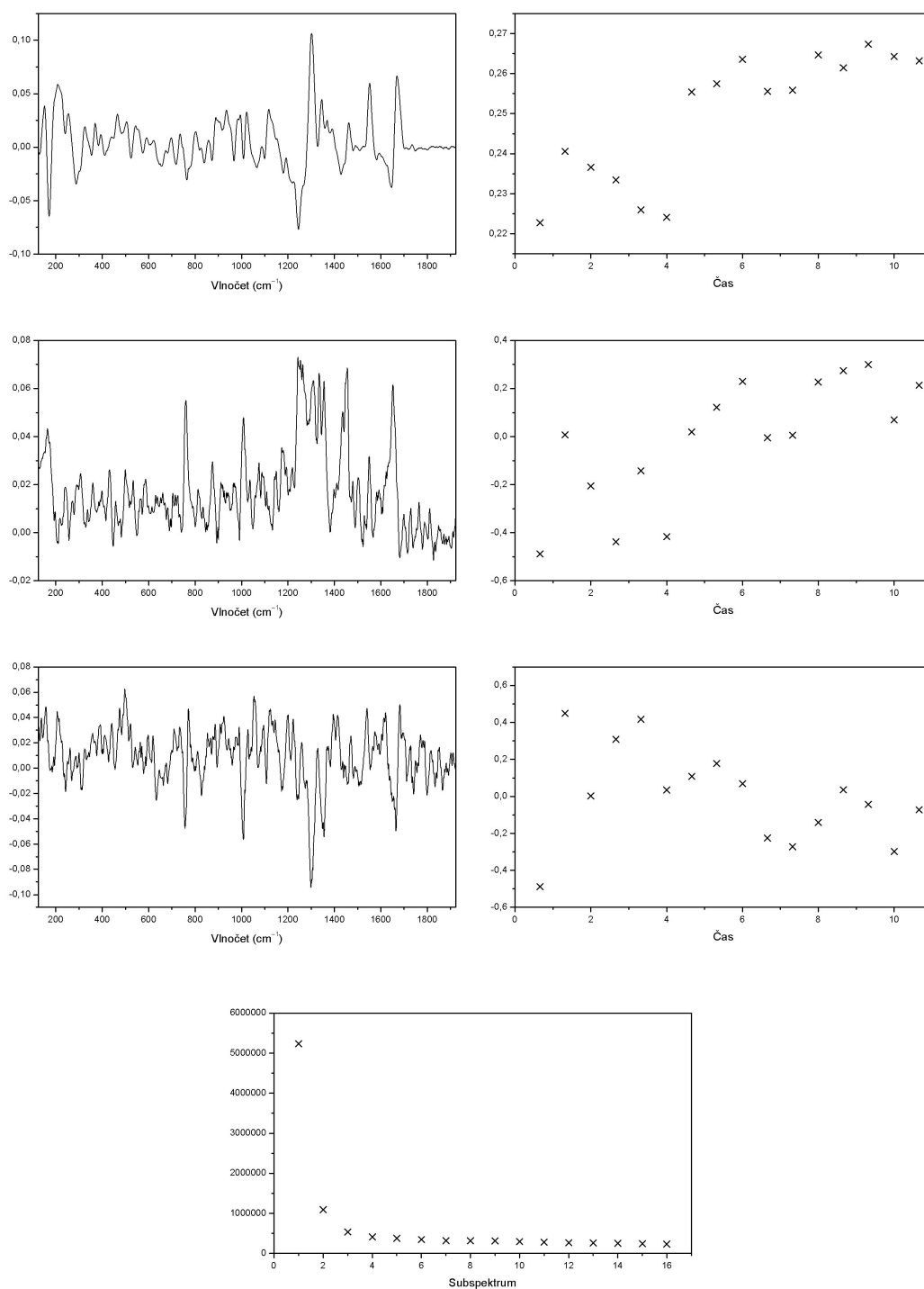
Obrázek 4.22: Výsledky faktorové analýzy pro teplotní závislost ROA spekter lysozymu.



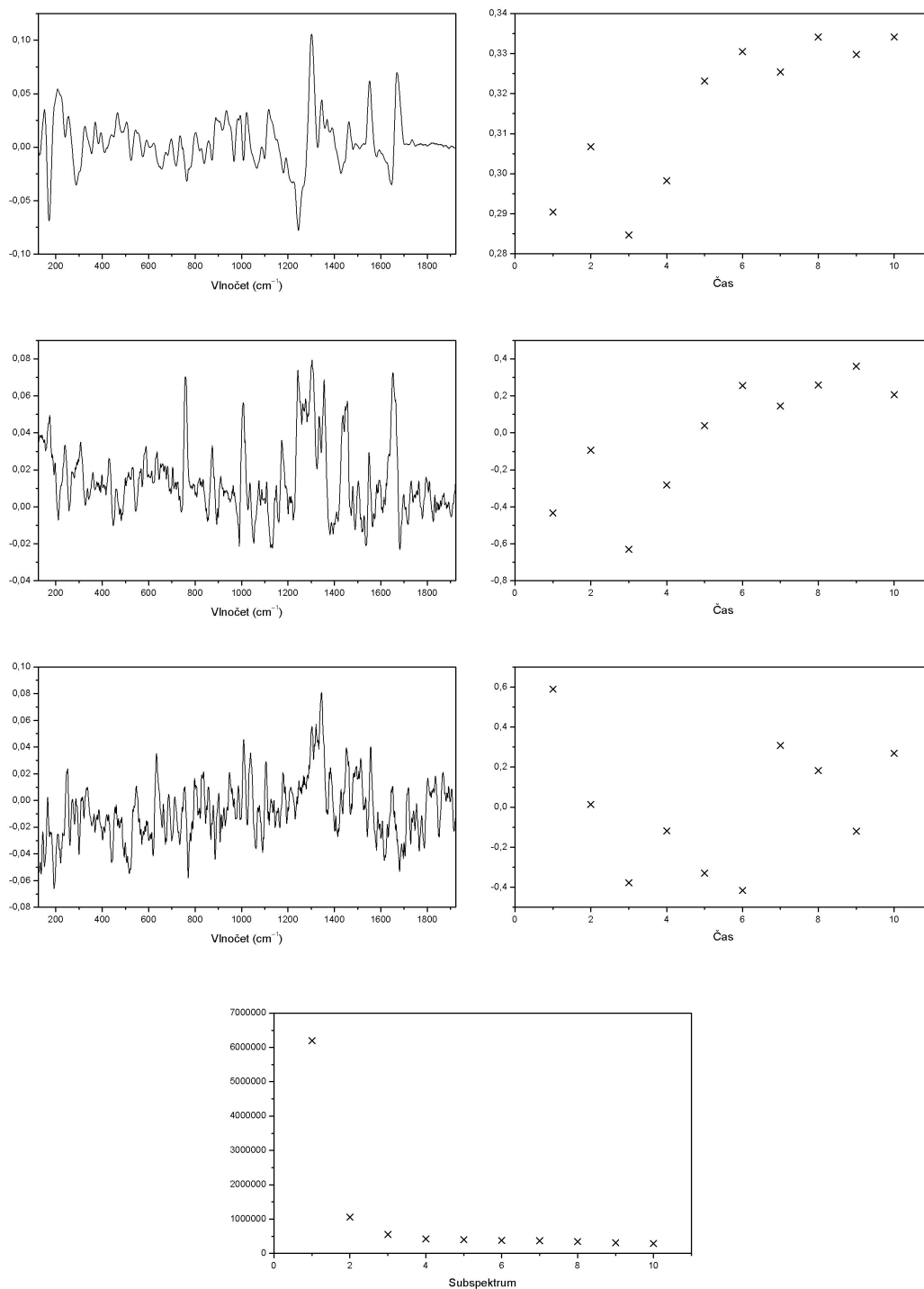
Obrázek 4.23: Výsledky faktorové analýzy pro časovou závislost ROA spekter lysozymu (měřeno s časovým krokem 2 h).



Obrázek 4.24: Výsledky faktorové analýzy pro časovou závislost přeměřených ROA spekter lysozymu, u nichž byly bloky vzaty samostatně (doba akumulace 40 min.).



Obrázek 4.25: Výsledky faktorové analýzy pro časovou závislost přeměřených ROA spekter lysozemu, u nichž byly bloky spojeny po dvojicích (doba akumulace 80 min.).



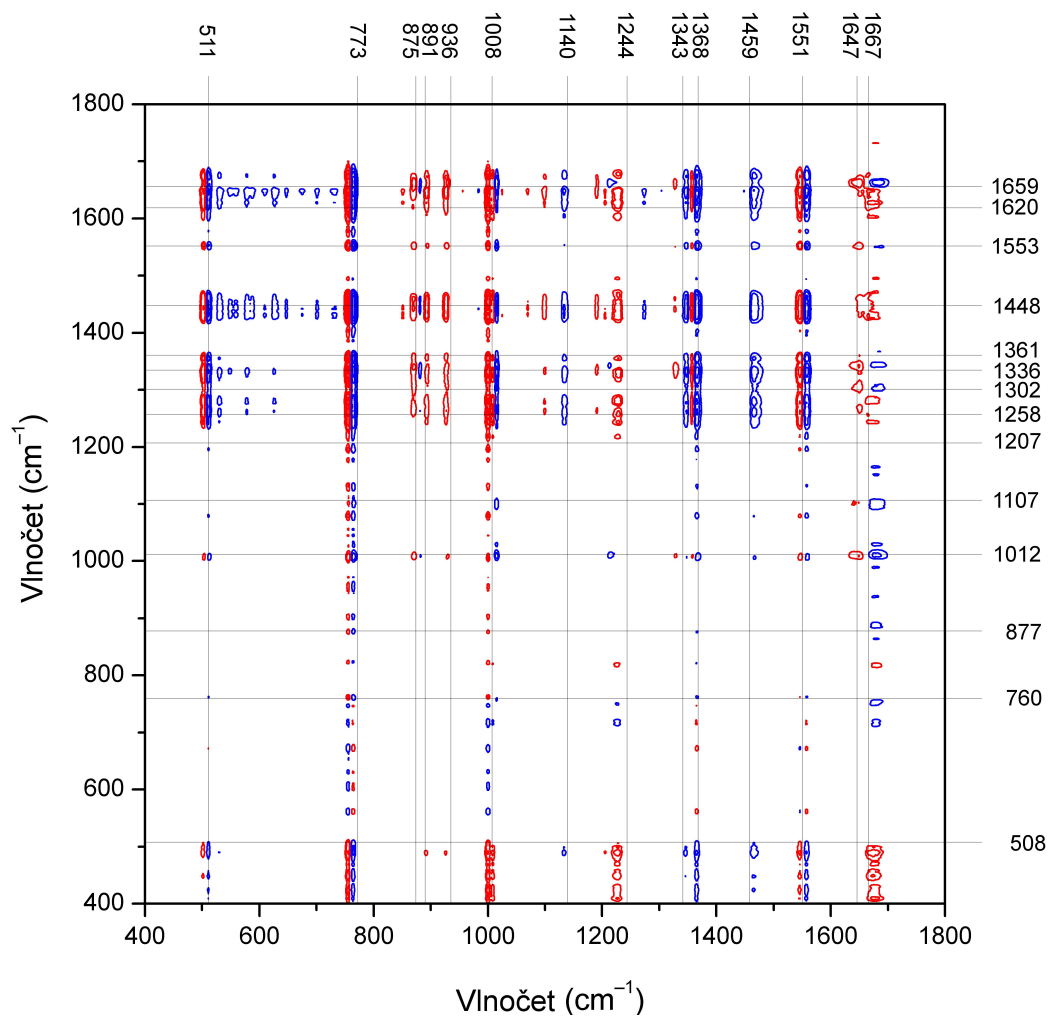
Obrázek 4.26: Výsledky faktorové analýzy pro časovou závislost přeměřených ROA spekter lysozymu, u nichž byly bloky spojeny po trojicích (doba akumulace 2 h).

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	Synch.	Asynch.
1667 (α -helix)	1647 (α -helix)	+	+
1667 (α -helix)	1551 (Trp)	+	+
1667 (α -helix)	1432 (CH ₂ , CH ₃)	+	+
1667 (α -helix)	1343 (α -helix)	+	+
1667 (α -helix)	1302 (α -helix)	+	+
1667 (α -helix)	1117	+	+
1667 (α -helix)	1008	+	+
1667 (α -helix)	983	+	+
1667 (α -helix)	965	+	+
1667 (α -helix)	891	+	+
1551 (Trp)	1462	+	-
1462 (CH ₂ , CH ₃)	1117	+	+
1462 (CH ₂ , CH ₃)	983	+	+
1462 (CH ₂ , CH ₃)	965	+	+
1343 (α -helix)	1244 (β -vlákna)	+	-
1343 (α -helix)	983	+	+

Tabulka 4.3: Korelační tabulka pro časovou závislost ROA spekter lysozymu (+ a - značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů bylo provedeno podle Barron et al., 2000.

Dále jsme se pokusili o využití hlavní výhody 2DKoS, tedy o její heterospektrální variantu. Jako vstupní data jsme si vzali teplotní závislost ROA a Ramanových spekter lysozymu. Výsledek heterospektrální korelace je zobrazen na obrázku 4.27 a změny ve spektru jsou přehledně shrnuty v tabulce 4.4. Tato metodika nám umožní přenést vysvětlení některých pásů z Ramanova spektra na jejich pravděpodobné ekvivalenty v ROA spektru.

Je zde kupříkladu vidět, že jsou spolu korelovány pásy v Ramanově spektru na pozicích okolo 500 cm⁻¹ (disulfidové můstky – Tensmeyer et al., 1996) s pásy v ROA spektru na stejné pozici. To by potvrzovalo hypotézu, že na stejné pozici by se měly nacházet signály od těchto můstků i v ROA spektrech (Zhu et al., 2005; Kapitán et al., 2005; Kapitán et al., 2006b). V současné době existují teoretické výpočty modelových molekul s disulfidovými můstky, které tuto teorii potvrzují (Bednářová et al., 2009). Toto měření by se tedy dalo považovat za první potvrzení této teoretické předpovědi u reálného proteinu.



Obrázek 4.27: Heterospektrální korelace teplotní závislosti Ramanových (svislá osa) a ROA (vodorovná osa) spekter lysozymu.

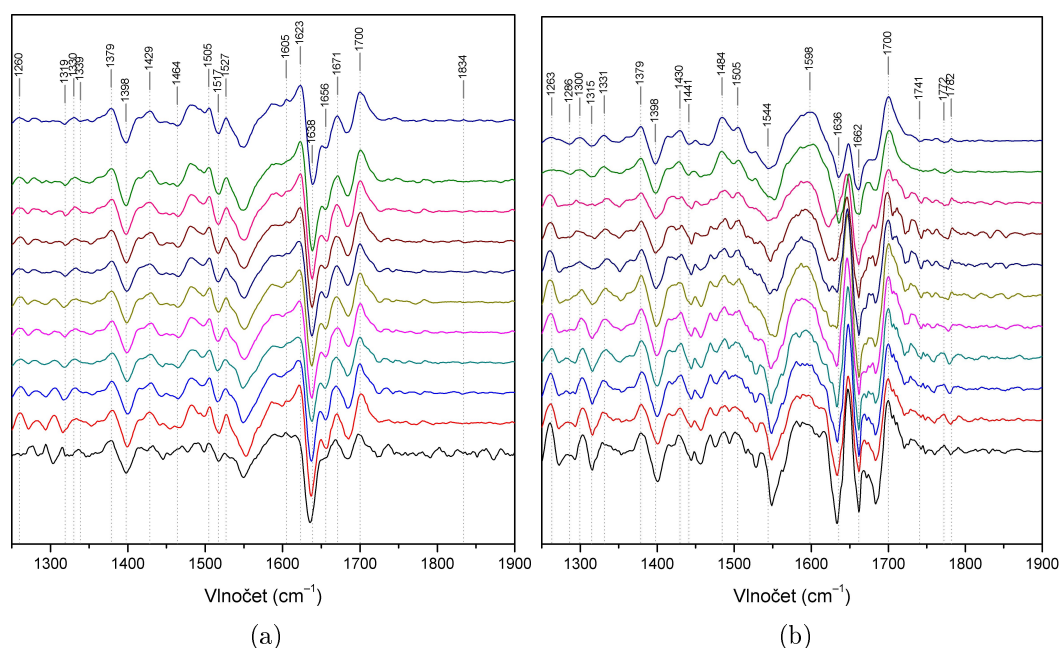
ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	Synch.
1667 (α -helix ⁵)	1680 (β -vlákna ¹)	–
1667 (α -helix ⁵)	1012	–
1647 (α -helix ⁵)	1680 (β -vlákna ¹)	+
1462 (CH ₂ , CH ₃ ⁵)	1640 (α -helix ¹)	–
1462 (CH ₂ , CH ₃ ⁵)	1553 (Trp W3 ⁴)	–
1462 (CH ₂ , CH ₃ ⁵)	1448 (δ CH ₂ , CH ₃ , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	–
1462 (CH ₂ , CH ₃ ⁵)	1336 (Trp dublet ^{1,2,3})	–
1462 (CH ₂ , CH ₃ ⁵)	1258 (amide III, Trp ^{2,3})	–
1368	1680 (β -vlákna ¹)	–
1368	1640 (α -helix ¹)	–
1368	1553 (Trp W3 ⁴)	–
1368	1448 (δ CH ₂ , CH ₃ , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	–
1368	1336 (Trp dublet ^{1,2,3})	–
1368	1258 (amide III, Trp ^{2,3})	–
1343 (α -helix ⁵)	1680 (β -vlákna ¹)	–
1343 (α -helix ⁵)	1640 (α -helix ¹)	–
1343 (α -helix ⁵)	1553 (Trp W3 ⁴)	–
1343 (α -helix ⁵)	1448 (δ CH ₂ , CH ₃ , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	–
1343 (α -helix ⁵)	1336 (Trp dublet ^{1,2,3})	–
1343 (α -helix ⁵)	1258 (amide III, Trp ^{2,3})	–
1008	1680 (β -vlákna ¹)	–
1008	1448 (δ CH ₂ , CH ₃ , Lys, Ile, Leu ^{2,3})	+

Tabulka 4.4: Korelační tabulka pro heterospektrální teplotní závislost ROA (ν_1) a Ramanových (ν_2) spekter lysozymu (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů byla provedena podle: ¹ – Tensmeyer et al., 1996; ² – Overman et al., 1999; ³ – Tuma, 2005; ⁴ – Miura et al., 1995; ⁵ – Barron et al., 2000.

4.5 FTIR spektra NKR–P1

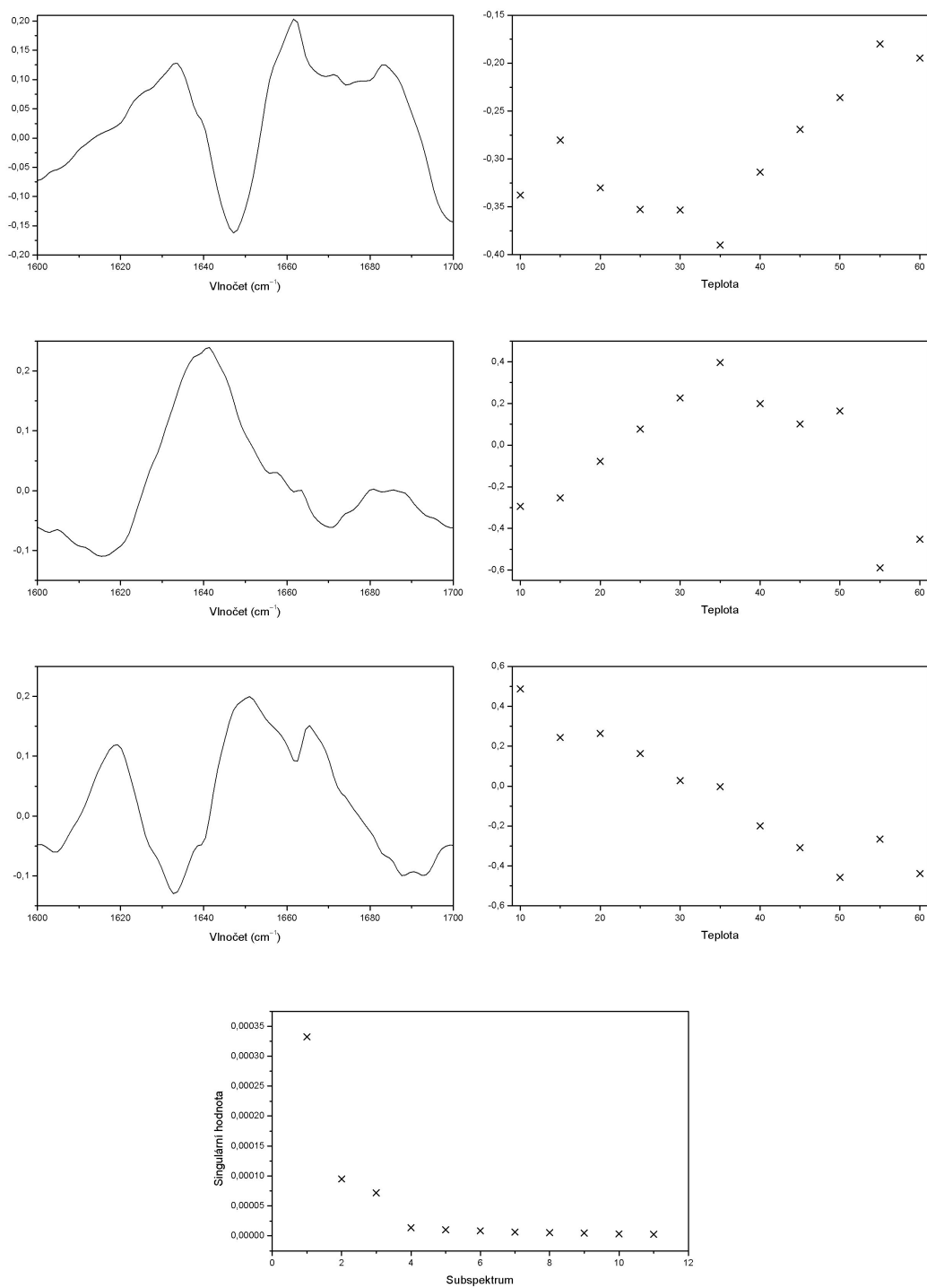
Z FA spekter druhých derivací FTIR spekter proteinu NKR–P1C (viz obr. 4.29) vidíme, že proces denaturace probíhá ve dvou fázích. K přechodu dochází při teplotě ca 35 °C. Zastoupení prvního subspektra je nejprve konstantní a poté dojde k poklesu jeho obsahu. Záporný pás na pozici 1655 cm⁻¹ odpovídá poklesu přítomnosti α –helixu nebo neuspořádané struktury (Tensmeyer et al., 1996). Tyto struktury od sebe nelze rozlišit bez dodatečného měření v D₂O. Vzhledem k tomu, že struktura tohoto proteinu není známá, nemůžeme ani usuzovat, které z těchto struktur tento úbytek náleží. Obsah obou struktur je pravděpodobně v proteinu přibližně stejný, a proto se zde budou uplatňovat oba příspěvky. Kladné pásy, které jsou přítomny na 1632 resp. 1662 cm⁻¹, odpovídají nárůstu obsahu β –skládaných listů resp. neuspořádané struktury (Tensmeyer et al., 1996). Druhé subspektrum obsahuje pouze jeden významný pás na pozici ca 1640 cm⁻¹. Jeho zastoupení postupně vzrůstá až do teploty 35 °C a pak dochází k postupnému poklesu. To by naznačovalo tvorbu tepelně indukovaných struktur, které se pak s postupnou denaturací proteinu začínají rozpadat. Třetí subspektrum má klesající tendenci a jedná se tedy pravděpodobně o nějaké teplotně závislé procesy.

Celkově lze tedy usuzovat, že denurační procesy jsou zde spojeny s nárůstem obsahu β -struktur.



Obrázek 4.28: Druhá derivace FTIR spekter (vyhlazeno Savitzki–Golayovou funkcí přes 25 bodů) proteinu NKR–P1A (a) a NKR–P1C (b).

Při pohledu na FA nederivovaných spekter (viz obr. 4.30) je patrné, že došlo ke změně spekter u teplot 55 a 60 °C. Hlubší změny těchto spekter však bohužel nejsou patrné, a proto jsme se nederivovaným spektrům dále nevěnovali a pro provedení 2D korelace jsme si dále vzali pouze spektra druhých derivací. Tyto výsledky jsou na obrázcích 4.33(a) a 4.33(b). Přehledně jsou shrnuty



Obrázek 4.29: Faktorová analýza druhých derivací (vyhlazeno Savitzki–Golayovou funkcí přes 25 bodů) FTIR spekter proteinu NKR–P1C v oblasti amidu I.

v tabulce 4.5. Bohužel však vzhledem k nízké objasněnosti FTIR spekter nebylo možné přiřadit dostatečné množství pásů, a tudíž ani interpretace těchto výsledků není dost dobře možná.

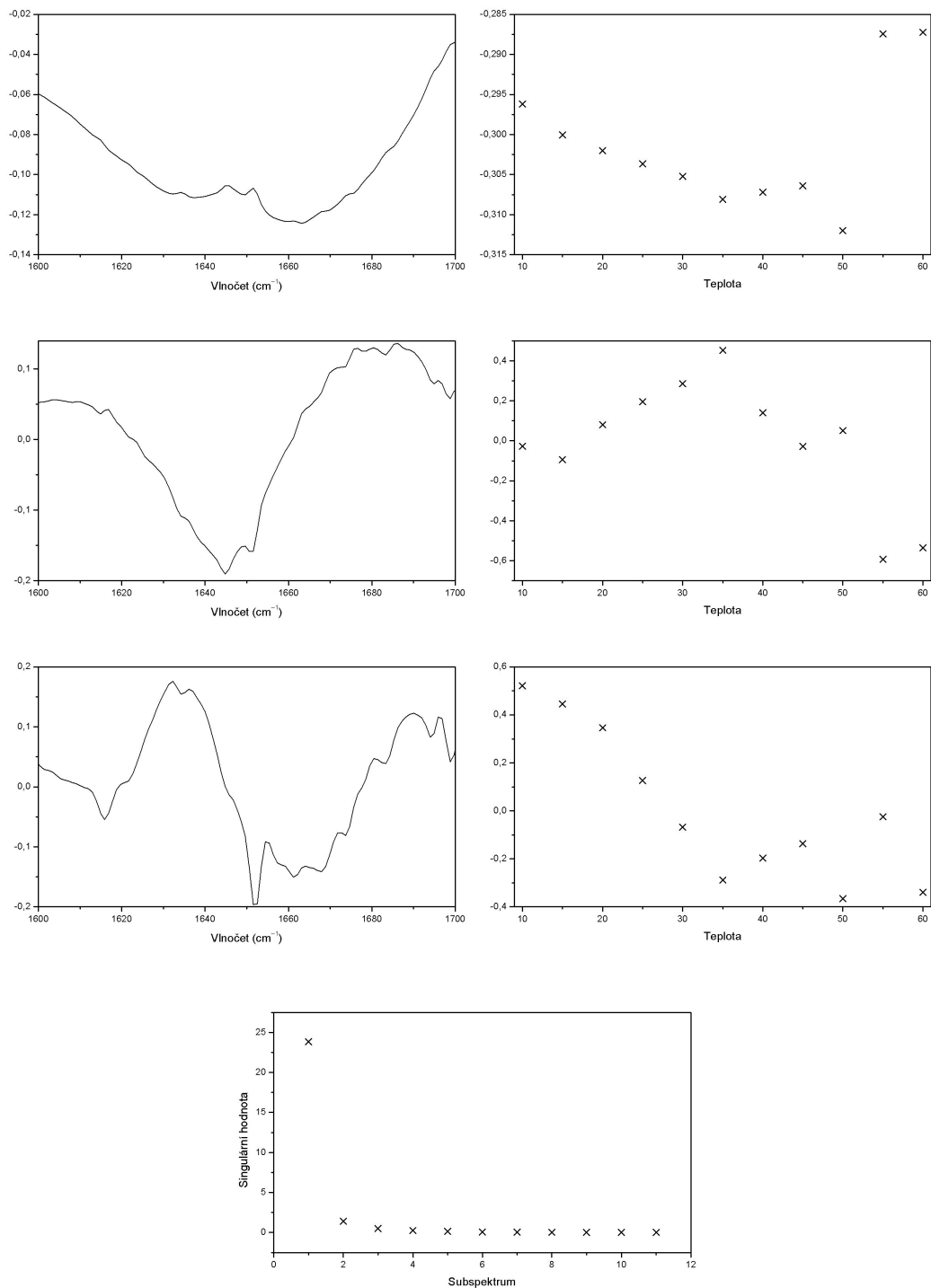
ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S	A
1685 (Asn, ν (C=O), β -skl. l. ¹)	1670 (otočky ¹)	+	-
1685 (Asn, ν (C=O), β -skl. l. ¹)	1635 (Arg, ν_s (CN ₃ H ₅ ⁺) ²)	-	+
1685 (Asn, ν (C=O), β -skl. l. ¹)	1615	+	-
1668 (otočky ¹)	1648	-	-
1662 (otočky ¹)	1635 (Arg, ν_s (CN ₃ H ₅ ⁺) ²)	+	+
1648	1635 (Arg, ν_s (CN ₃ H ₅ ⁺) ²)	+	-
1648	1615	-	+

Tabulka 4.5: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu I spekter druhých derivací FTIR spekter NKR-P1C (+ a - značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů provedeno podle: ¹ – Barth et al., 2002; ² – Barth, 2000.

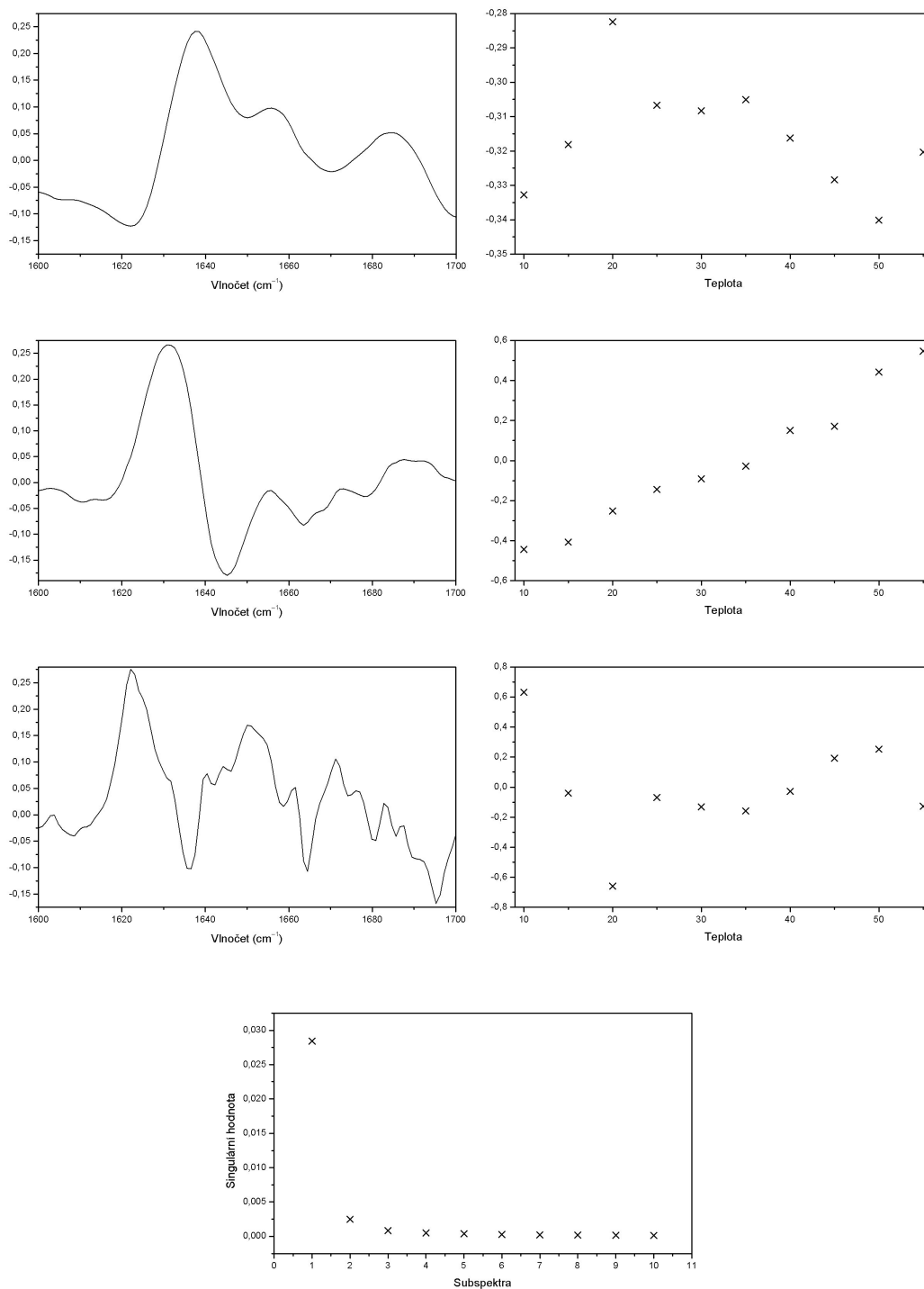
Z FA spekter druhých derivací FTIR spekter proteinu NKR-P1A (viz obr. 4.31) vidíme, že proces denaturace také probíhá ve dvou fázích. K přechodu dochází při teplotě ca. 30 °C. Zastoupení prvního subspektra nejprve roste a při teplotě ca. 30 °C dochází ke klesání. Subspektrum obsahuje výrazný pás na 1635 cm⁻¹, který vyjadřuje zastoupení β -skládaných listů, případně argininu a valenční vibraci CN₃H₅⁺. Další pás je na 1657 cm⁻¹, který odpovídá obsahu α -helixu a neuspořádané struktury (Tensmeyer et al., 1996). Poslední významný pás je na 1685 cm⁻¹, který odpovídá obsahu β -skládaných listů, případně aspariginu a valenční C=O vibraci (Barth et al., 2002). Zastoupení druhého subspektra pomalu roste po celou dobu ohřívání a vyjadřuje tedy pravděpodobně proces denaturace. Obsahuje kladný výrazný pás na 1635 cm⁻¹, který odpovídá obsahu β -skládaných listů, případně argininu a valenční vibraci CN₃H₅⁺ a záporný pás na 1645 cm⁻¹. Třetí subspektrum se ve všech spektrech vyskytuje se zhruba stejným zastoupením a také jeho tvar odpovídá spíše náhodným změnám než nějaké tendenci ve spektru.

Opět je z těchto výsledků možné usuzovat na spojení nárůstu obsahu β -struktur a procesu denaturace.

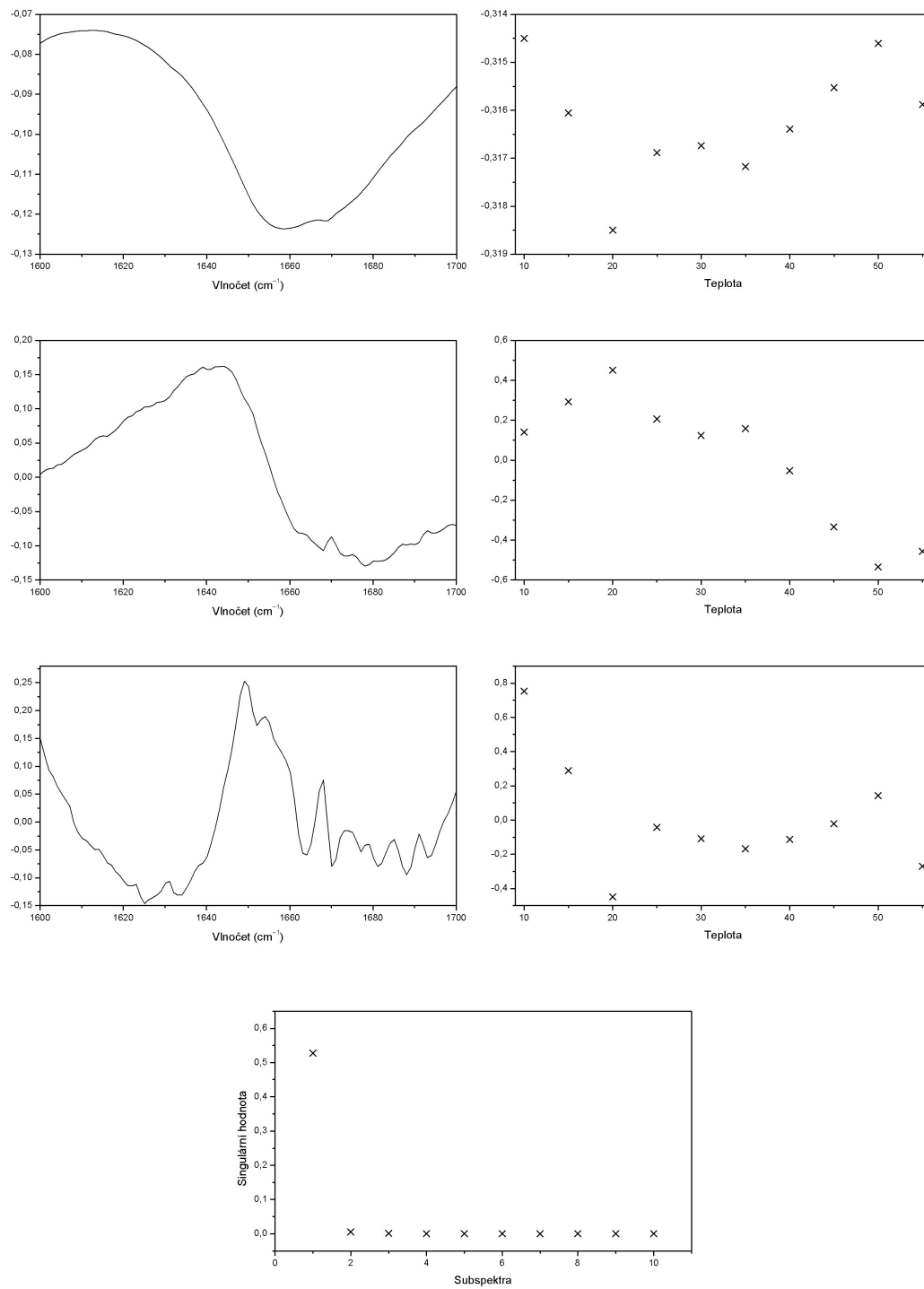
Z FA nederivovaných spekter proteinu NKR-P1A (viz obr. 4.32) opět nelze získat hlubší informace, a proto jsme 2D korelační analýzu opět provedli pouze z derivovaných spekter (viz obr. 4.34(a) a 4.34(b)). Její výsledky jsou přehledně shrnuty v tabulce 4.6. Opět není možné dostatečně dobře interpretovat spektra a jejich změny. Lze však konstatovat, že změny u obou forem proteinu probíhají poněkud jiným způsobem. To je patrné zejména na posunu většiny 2D obrazců směrem k nižším vlnovým u proteinu NKR-P1A. To však může být do jisté míry dáno jejich rozdílnou sekvencí a tedy i strukturou, což je také patrné i na samotných spektrech (viz obr. 4.28).



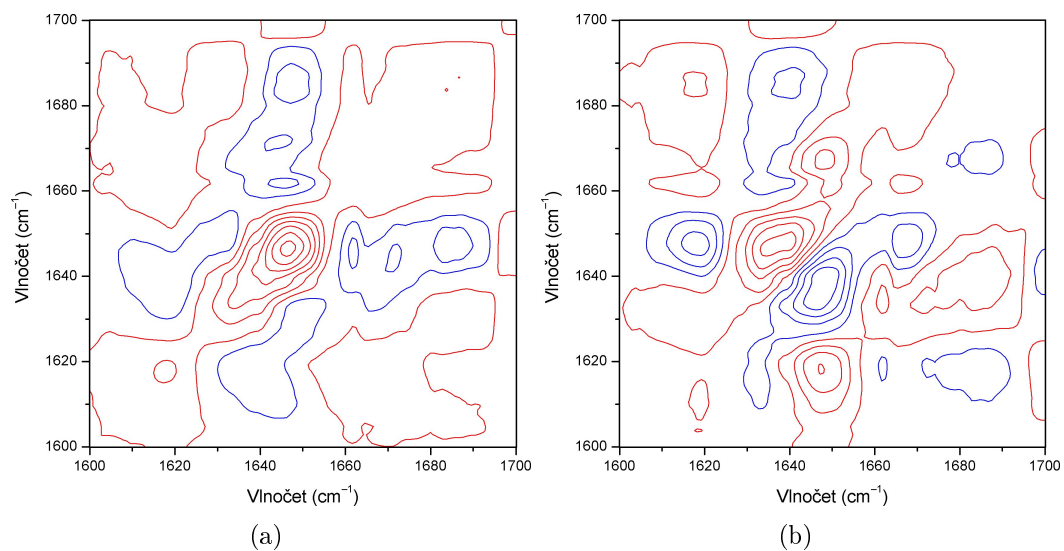
Obrázek 4.30: Faktorová analýza oblasti amidu I FTIR spekter proteinu NKR-P1C.



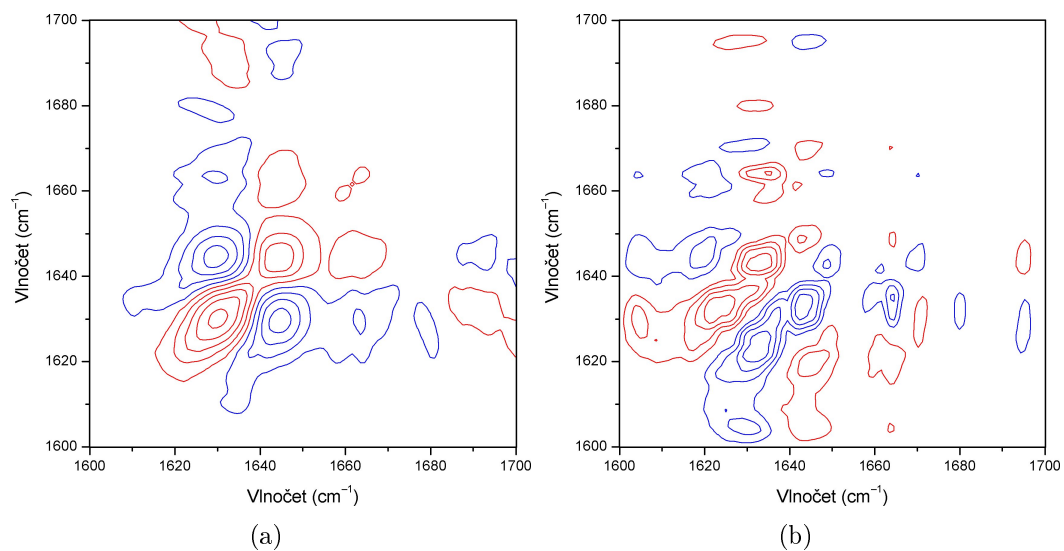
Obrázek 4.31: Faktorová analýza druhých derivací (vyhlazeno Savitzki–Golayovou funkcí přes 25 bodů) FTIR spekter proteinu NKR-P1A v oblasti amidu I.



Obrázek 4.32: Faktorová analýza oblasti amidu I FTIR spekter proteinu NKR-P1A.



Obrázek 4.33: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu I druhých derivací (vyhlazeno Savitzki–Golayovou funkcí přes 25 bodů) FTIR spekter proteinu NKR–P1C.



Obrázek 4.34: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu I druhých derivací (vyhlazeno Savitzki–Golayovou funkcí přes 25 bodů) FTIR spekter proteinu NKR–P1A.

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S	A
1690 (β -skl. l. ¹)	1645	–	×
1690 (β -skl. l. ¹)	1652	+	×
1662 (otočky ¹)	1645	+	×
1662 (otočky ¹)	1630 (HisH ₂ ⁺ , ν (C=C) ^{1,2})	–	–
1645	1630 (HisH ₂ ⁺ , ν (C=C) ^{1,2})	–	–
1635 (Arg, ν_s (CN ₃ H ₅ ⁺ 2))	1610	–	–

Tabulka 4.6: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu I spekter druhých derivací FTIR spekter NKR–P1A (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu a × značí, že se pás ve spektru nevyskytuje). Přiřazení provedeno podle: ¹ – Barth et al., 2002; ² – Barth, 2000.

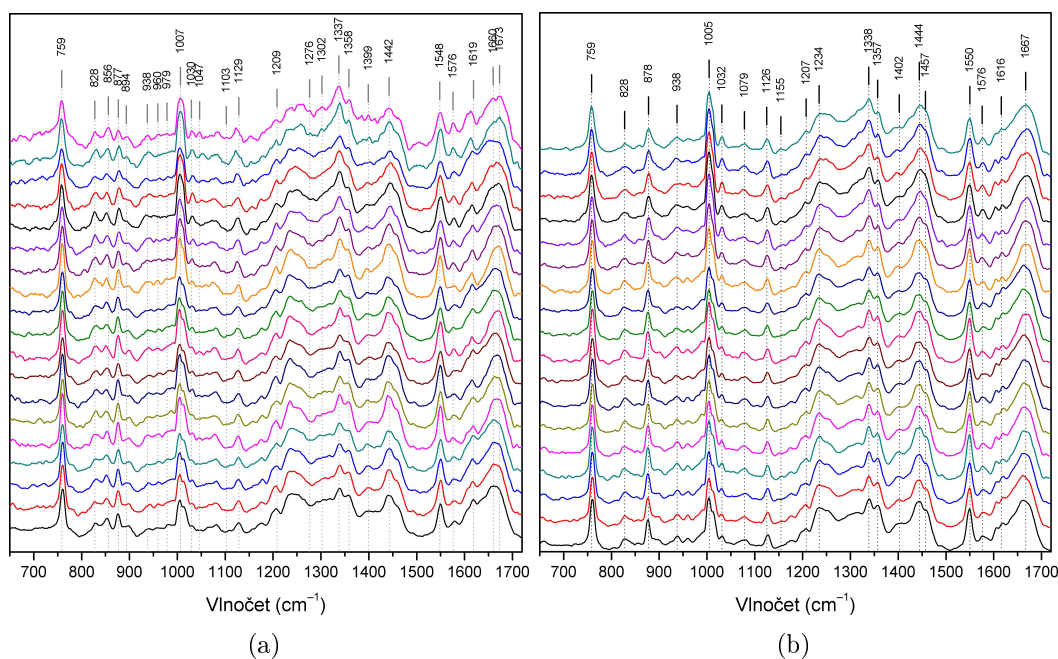
4.6 Ramanova spektra NKR–P1

Z FA Ramanových spekter proteinu NKR–P1A v oblasti amidu I (viz obr. 4.36) lze nahlédnout, že probíhající změny jsou poměrně chaotické. První subspektrum obsahuje výrazný pás na pozici 1665 cm⁻¹ (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995) a dále menší pás na 1615 cm⁻¹. Zastoupení tohoto subspektra je však velmi neuspořádané a nevykazuje žádnou významnější tendenci. Druhé subspektrum obsahuje výrazný pás na pozici 1628 cm⁻¹ a na pozici 1680 cm⁻¹ (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995). Tyto pásy mají opačné znaménko a samotné zastoupení tohoto subspektra také silně osciluje okolo nuly a tedy naznačuje nějaké náhodné oscilace ve vzorku. Pouze třetí subspektrum vykazuje výraznější tendenci, kdy u vyšší teploty klesá jeho zastoupení. Toto spektrum obsahuje výrazné kladné pásy na pozicích 1622 cm⁻¹, 1638 cm⁻¹ a 1665 cm⁻¹. Dále obsahuje záporné pásy na pozicích 1610 cm⁻¹ a 1690 cm⁻¹.

Z těchto výsledků bohužel nelze kvůli jejich náhodné tendenci získat žádné podrobnější informace o procesu změn ve vzorku. Zdá se však, že je opět možné spojit denaturační procesy s tvorbou β -struktur.

Při analýze výsledků FA v oblasti amidu III (viz obr. 4.38) si povšimneme výrazného pásu na pozici 1235 cm⁻¹ (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995) v prvním subspektru. Zastoupení tohoto subspektra je poměrně stálé až na teploty 85 a 90 °C, kdy dojde k poklesu jeho zastoupení. Druhé subspektrum obsahuje záporný pás na stejné pozici a také kladný pás na pozici 1278 cm⁻¹. Zastoupení tohoto subspektra je nejprve konstantní, ale od teploty 60 °C začne jeho podíl stoupat. To naznačuje, že toto spektrum zachycuje změny související s denaturací. Poslední subspektrum obsahuje velké množství dubletů, které tak pravděpodobně zachycují posuvy pozic některých pásů v této oblasti. Dále obsahuje také některé menší změny ve spektru.

Z FA Ramanových spekter proteinu NKR–P1C v oblasti amidu I (viz obr. 4.37) je vidět, že k denaturačnímu přechodu dochází zhruba v oblasti ca. 40 až 60 °C. První subspektrum obsahuje výrazný záporný pás na pozici 1665 cm⁻¹ (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995) a dva drobnější záporné pásy na pozicích 1618 a 1605 cm⁻¹. Druhé subspektrum obsahuje záporný pás na pozici 1625 cm⁻¹ a kladný pás na 1680 cm⁻¹ (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995). Jeho profil zastoupení kopíruje zastoupení prvního subspektra.



Obrázek 4.35: Ramanova spektra teplotních závislostí proteinů NKR-P1A (a) a NKR-P1C (b). Značeny jsou pásy nativního proteinu (černě). Teplotní krok je 5 °C a rozsah teplot je 5–95 °C pro NKR-P1A a 5–90 °C pro NKR-P1C.

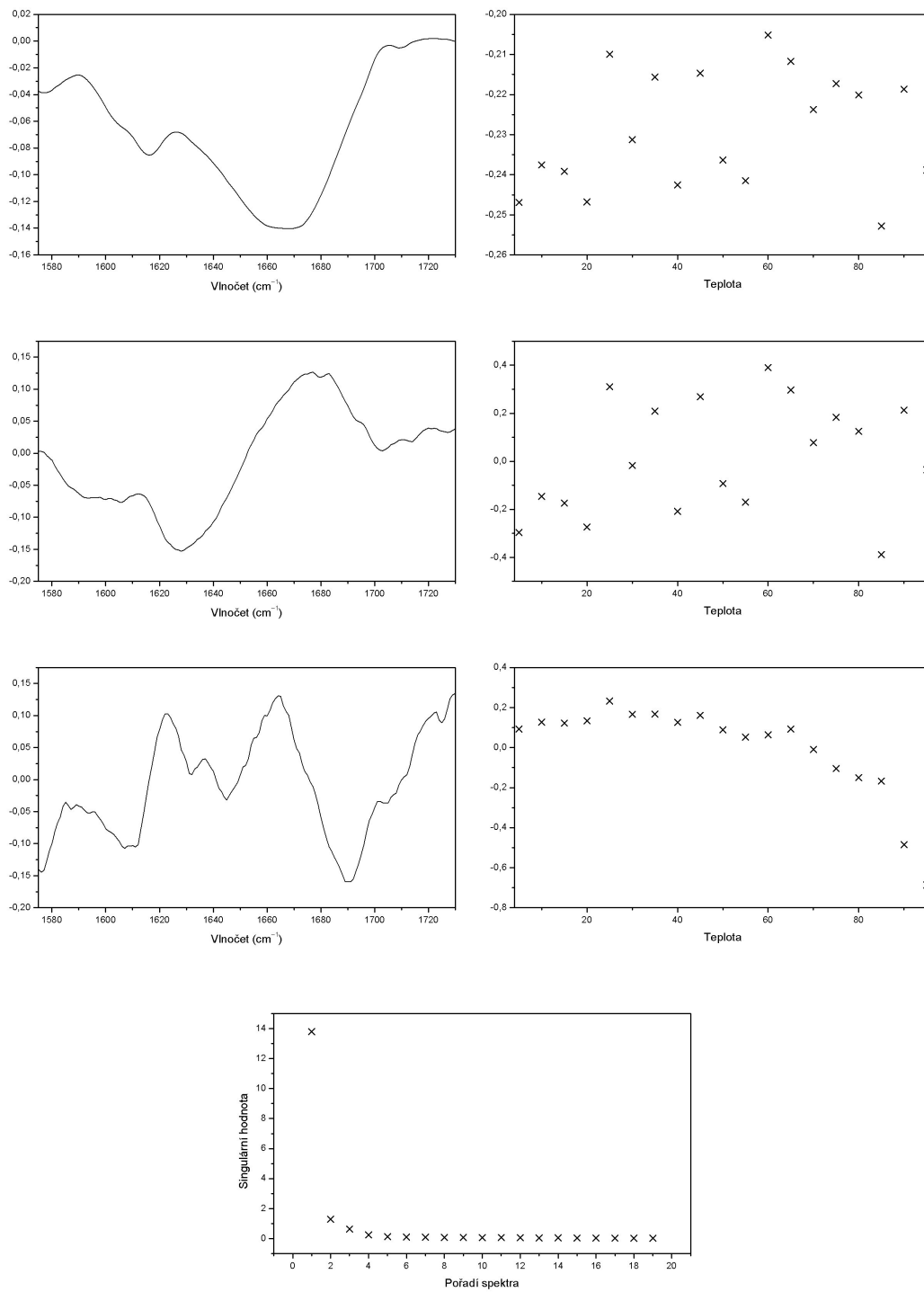
Poslední subspektrum obsahuje několik dubletů, které vyjadřují posuvy pásů a jeho zastoupení postupně od teploty ca. 60 °C klesá.

Opět se zde potvrzuje, že denaturace proteinu je spojena s tvorbou β -struktur.

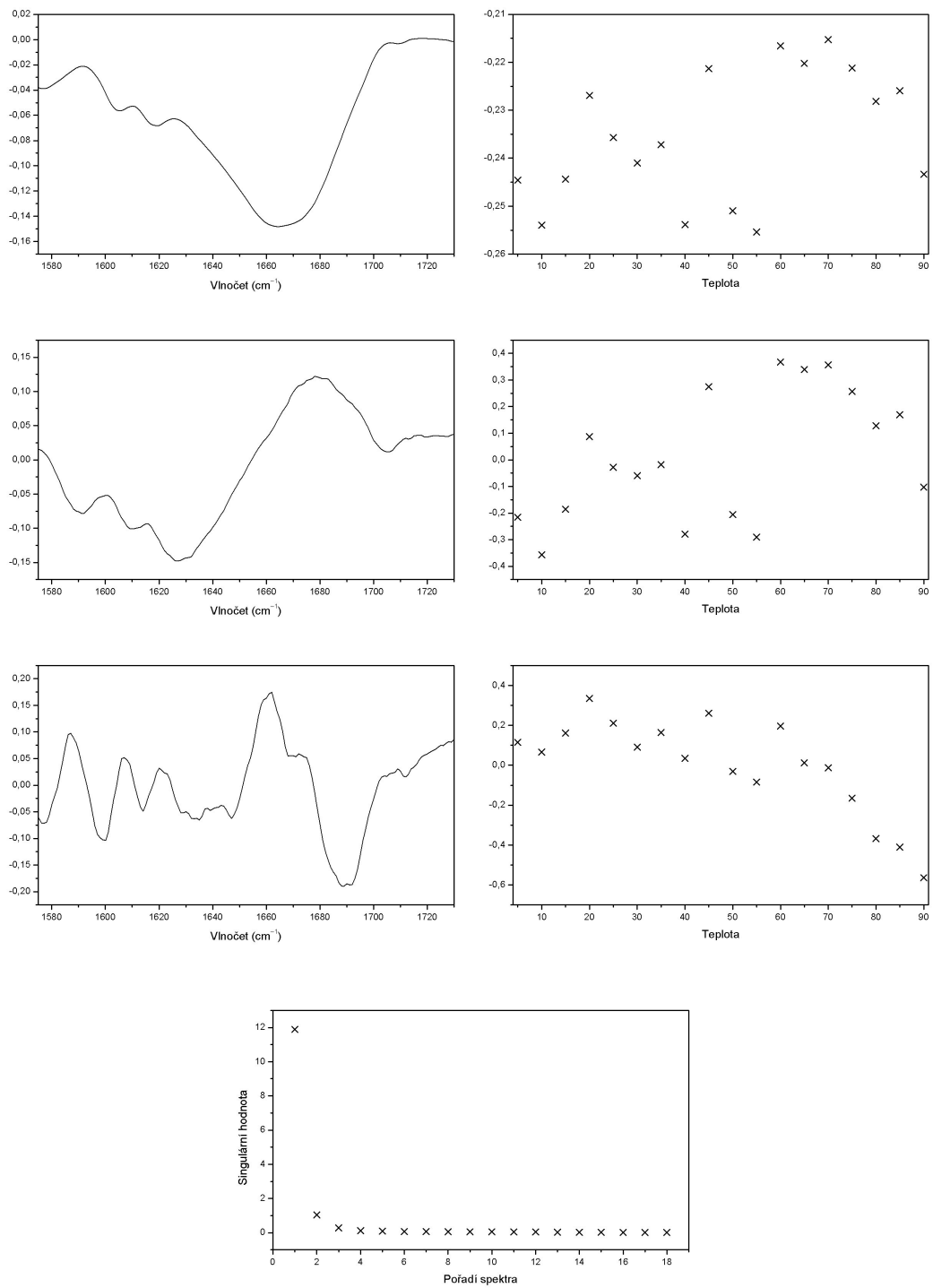
Při analýze výsledků FA v oblasti amidu III (viz obr 4.39) se v prvním subspektru nacházejí záporné pásy na pozicích 1235 (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995) a 1252 cm^{-1} . Zastoupení tohoto subspektra je velmi neuspořádané a nesleduje žádný rozumný trend. Odchylky od průměrné hodnoty zastoupení jsou však poměrně malé, a proto můžeme obsah tohoto subspektra považovat za konstantní. Druhé subspektrum obsahuje záporný pás na pozici 1230 cm^{-1} (β -skládané listy – Tensmeyer et al., 1995) a další slabý záporný pás na pozici 1293 cm^{-1} . Zastoupení tohoto spektra je až do teploty 65 °C konstantní a pak začíná pomalu narůstat. Třetí subspektrum obsahuje poměrně významný pás na pozici 1218 cm^{-1} . Zastoupení tohoto subspektra pomalu vzrůstá ze záporných hodnot ke svému maximu okolo teplot 55 °C a poté si již drží víceméně konstantní hodnotu.

Opět se zde potvrzuje, že denaturace proteinu je spojena s tvorbou β -struktur.

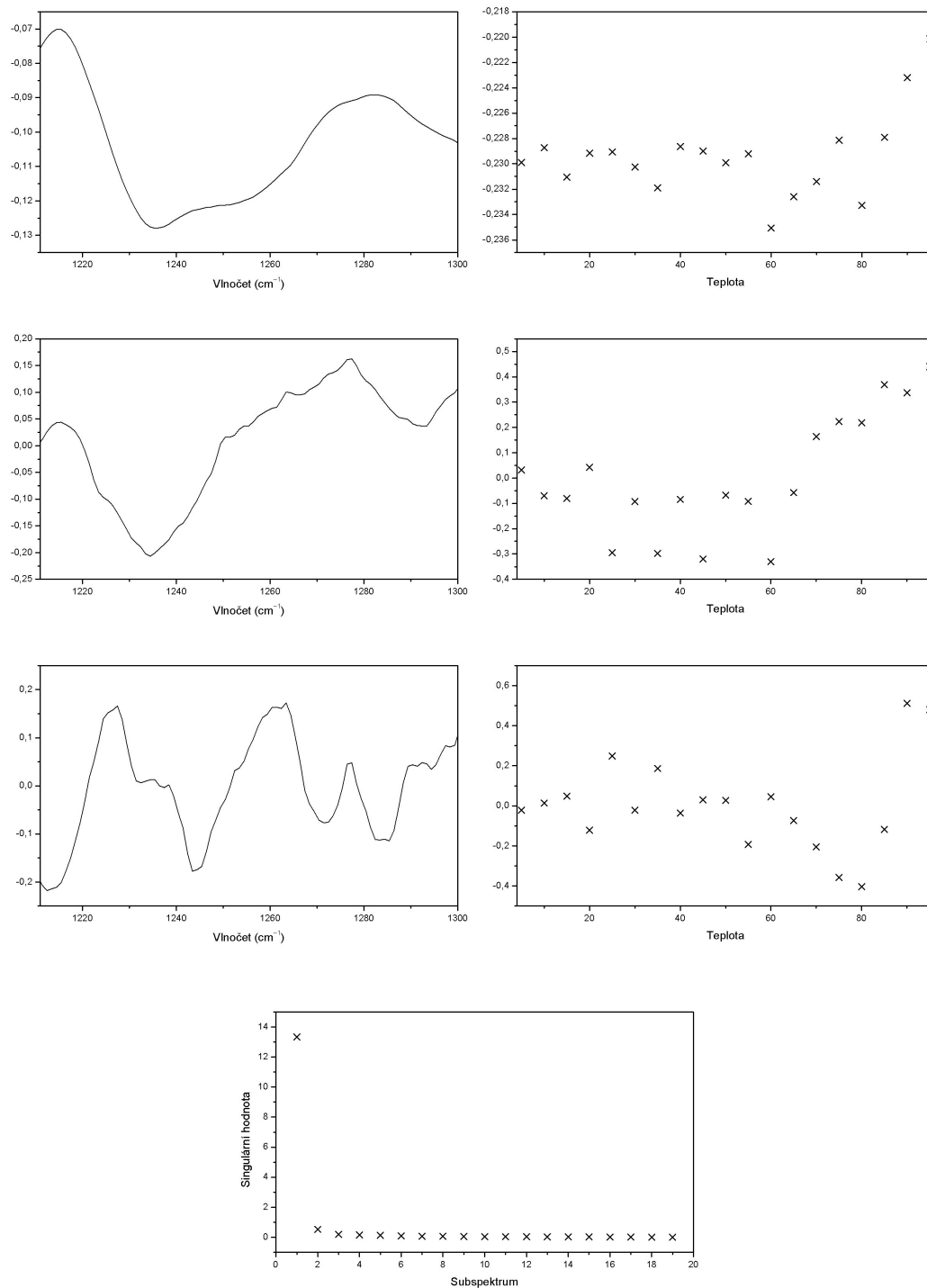
Výsledky 2DKoS pro oblast amidu I, resp. amidu III pro protein NKR-P1A jsou zobrazeny na obrázku 4.40, resp. 4.41. Přehledně jsou pak shrnuty v tabulce 4.7, resp. 4.8. Bohužel v oblasti amidu I nelze přiřadit spolehlivě všechny pásy k příslušným sekundárním strukturám a není tedy možné určit jednotlivé kroky denaturačního procesu. V oblasti amidu III je situace s přiřazením sice



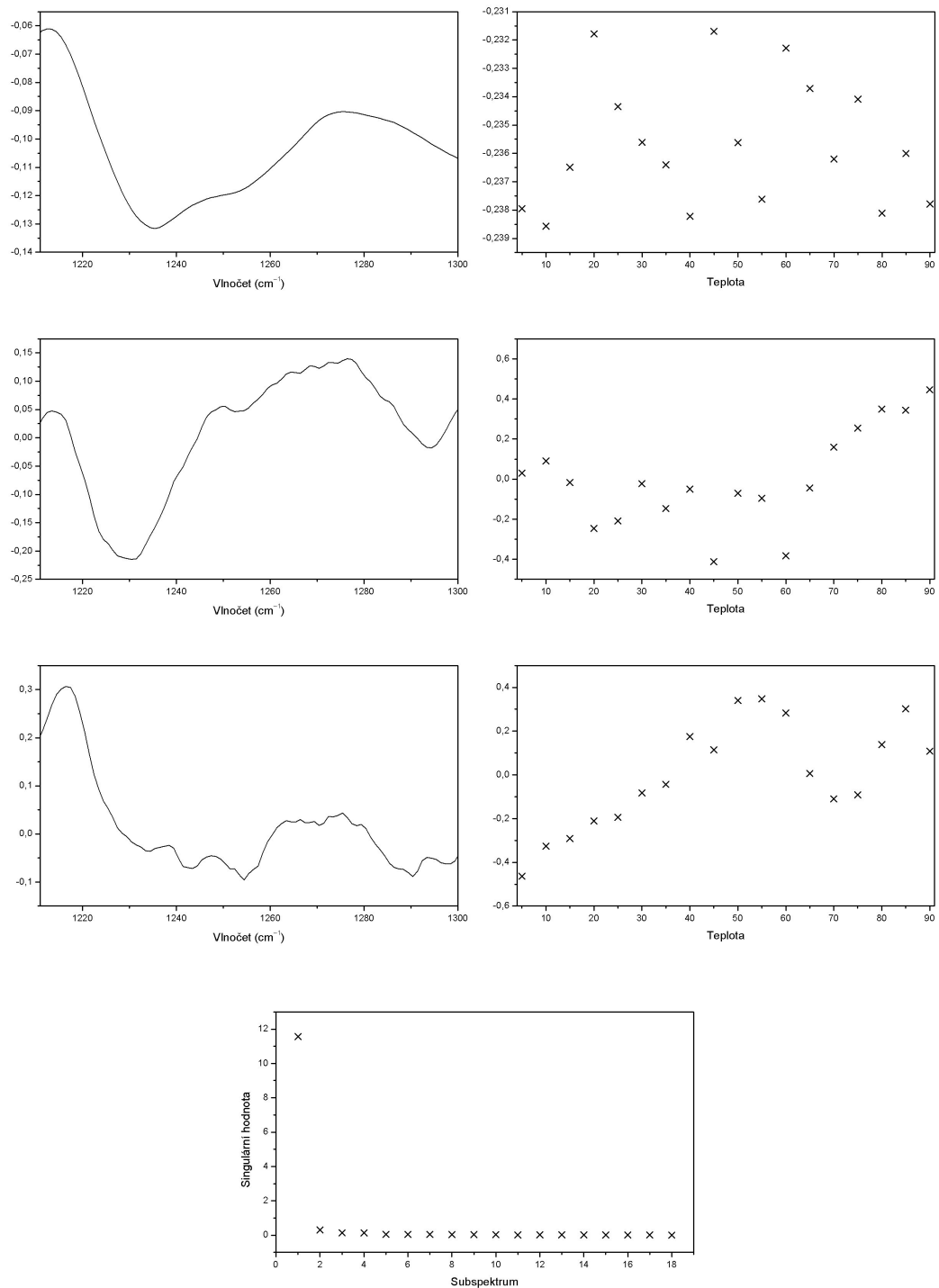
Obrázek 4.36: Faktorová analýza oblasti amidu I Ramanových spekter proteinu NKR-P1A.



Obrázek 4.37: Faktorová analýza oblasti amidu I Ramanových spekter proteinu NKR-P1C.



Obrázek 4.38: Faktorová analýza oblasti amidu III Ramanových spekter proteinu NKR-P1A.



Obrázek 4.39: Faktorová analýza oblasti amidu III Ramanových spekter proteinu NKR-P1C.

lepší, ale na přiřazení α -helikálních struktur nelze spoléhat, protože mohou být překryty vibracemi postranních řetězců (Tensmeyer et al., 1995).

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S.	A.
1685 (β -skl. l. ¹)	1625	–	–
1642 (α -helix ¹)	1625	+	–
1642 (α -helix ¹)	1590 (Trp, Phe ^{2,3})	+	–
1630	1625	+	–
1625	1600	+	+

Tabulka 4.7: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu I Ramanových spekter NKR–P1A (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů provedeno podle: ¹ – Tensmeyer et al.; ² – Overman et al., 1999; ³ – Tuma, 2005.

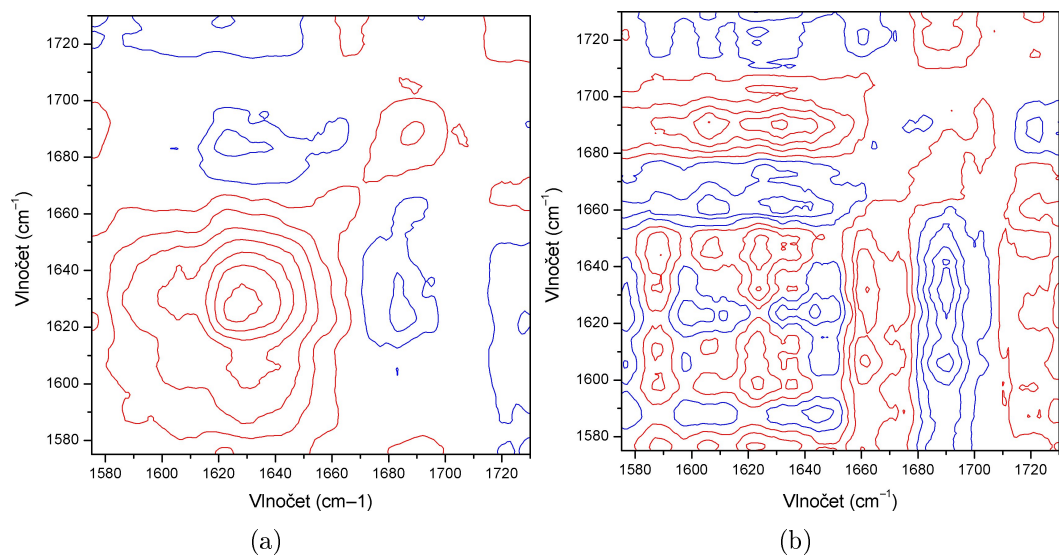
ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S.	A.
1277 (α -helix, Tyr ^{1,2})	1235 (β -skl. l. ¹)	–	+
1265 (α -helix ¹)	1235 (β -skl. l. ¹)	–	+
1245 (neusp. struktura ¹)	1225	+	+
1235 (β -skl. l. ¹)	1215 (Phe, Tyr, Trp ^{1,2})	+	–

Tabulka 4.8: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu III Ramanových spekter NKR–P1A (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů provedeno podle: ¹ – Overman et al., 1999; ² – Tuma, 2005.

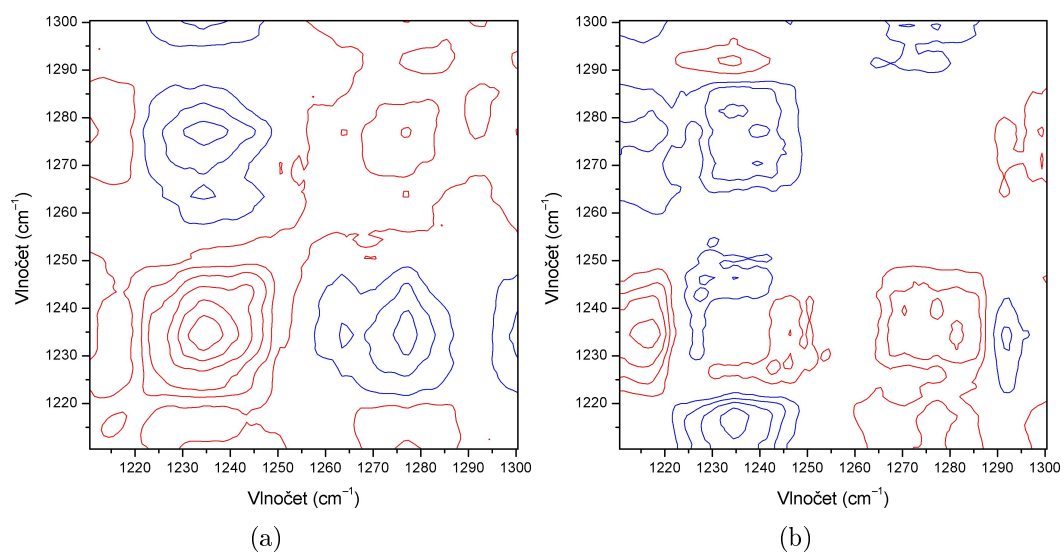
Výsledky 2DKoS pro oblast amidu I, resp. amidu III pro protein NKR–P1C jsou zobrazeny na obrázku 4.42, resp. 4.43. Přehledně jsou pak shrnuty v tabulce 4.9, resp. 4.10. Situace ohledně přiřazení jednotlivých pásů je zde velmi podobná jako u první formy tohoto proteinu. Opět nelze spolehlivě rozhodnout o pořadí jednotlivých procesů. Z těchto výsledků je ale opět vidět, že změny v těchto oblastech probíhají u obou forem proteinu poněkud jiným způsobem.

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S.	A.
1690 (β -skl. l. ¹)	1630	–	–
1660 (neusp. struktura ¹)	1630	+	+
1610	1600 (Phe, Tyr ^{2,3})	+	+
1600 (Phe, Tyr ^{2,3})	1590 (Trp, Phe ^{2,3})	+	–

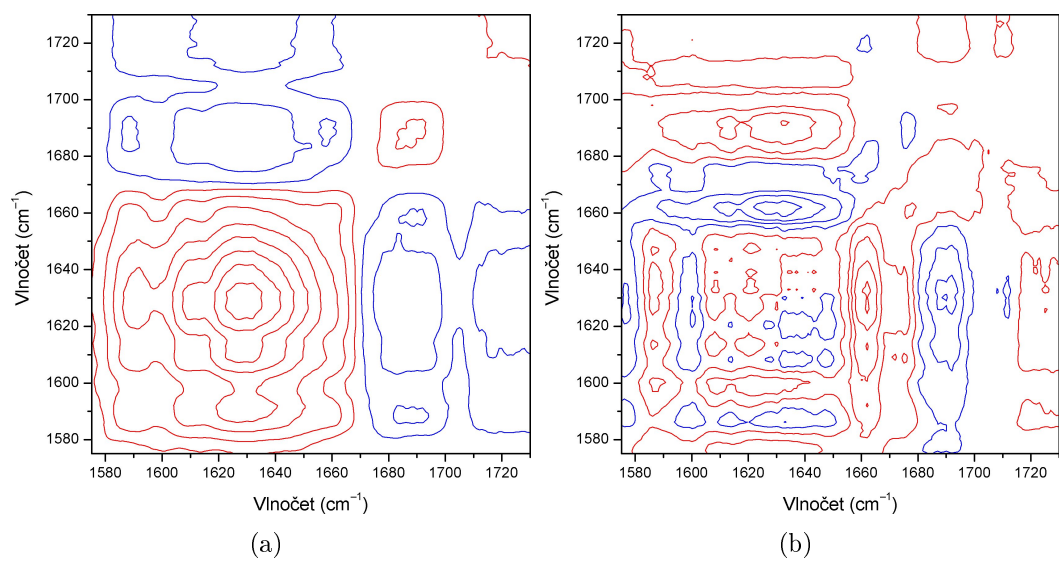
Tabulka 4.9: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu I Ramanových spekter NKR–P1C (+ a – značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů provedeno podle: ¹ – Tensmeyer et al.; ² – Overman et al., 1999; ³ – Tuma, 2005.



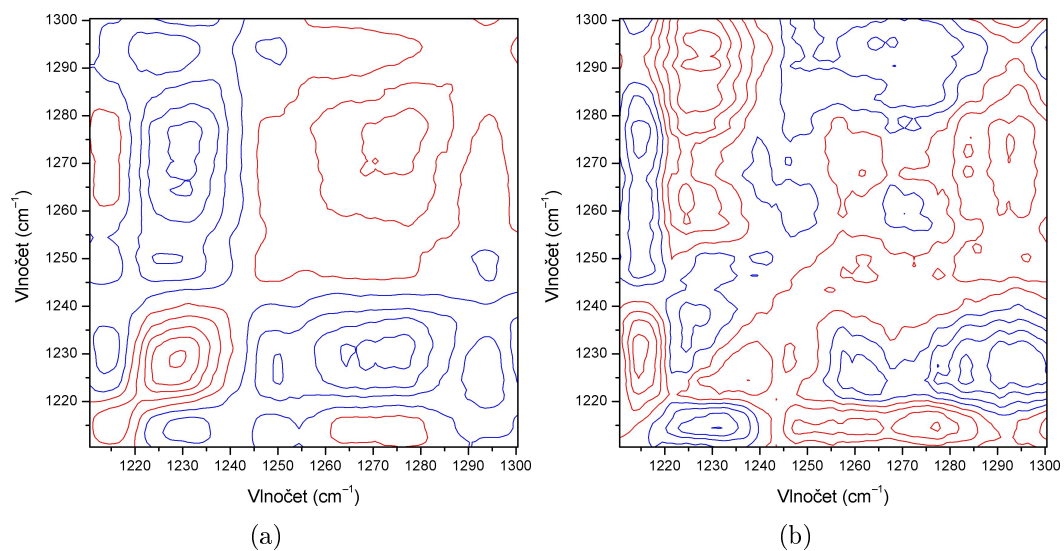
Obrázek 4.40: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu I Ramanových spekter proteinu NKR-P1A.



Obrázek 4.41: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu III Ramanových spekter proteinu NKR-P1A.



Obrázek 4.42: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu I Ramanových spekter proteinu NKR-P1C.



Obrázek 4.43: Synchronní (a) a asynchronní (b) spektrum oblasti amidu III Ramanových spekter proteinu NKR-P1C.

ν_1 (cm ⁻¹)	ν_2 (cm ⁻¹)	S.	A.
1295 (α -helix ¹)	1275 (α -helix ¹)	+	+
1295 (α -helix ¹)	1225	-	-
1283 (α -helix, Tyr ^{1,2})	1225	-	-
1277 (α -helix ¹)	1215 (Phe, Tyr, Trp ^{1,2})	+	+
1230 (β -skl. I. ¹)	1215 (Phe, Tyr, Trp ^{1,2})	-	-

Tabulka 4.10: Korelační tabulka pro teplotní závislost oblasti amidu III Ramanových spekter NKR-P1C (+ a - značí znaménko kroskorelačního pásu). Přiřazení pásů provedeno podle: ¹ – Overman et al., 1999; ² – Tuma, 2005.

5 Závěr

V průběhu diplomové práce bylo vytvořeno grafické uživatelské prostředí jako nadstavba pro již existující rutiny pro 2D korelační spektroskopii (viz kap. 4.1). Dále bylo provedeno jejich důkladné otestování a rozšíření metodiky pro použití na spektra vibrační optické aktivity (viz kap. 4.2). Tento program byl spolu s rozšířením metodiky prezentován na mezinárodní konferenci Technical Computing Prague 2008 (viz Příloha 1a a 1b).

Podařilo se změřit spektra Ramanovy optické aktivity (ROA) a Ramanova spektra lysozymu v časové a teplotní závislosti. Na těchto výsledcích byla následně provedena 2D korelační spektroskopie (2DKoS) a faktorová analýza (FA) (viz kap. 4.3). Z Ramanových spekter teplotní závislosti bylo usouzeno na možný postup při denaturaci proteinu. K té dochází pravděpodobně ve třech stupních, kdy se nejprve zvyšuje obsah β -skládaných listů, poté dojde k úbytku α -helixu a nakonec opět k nárůstu obsahu β -skládaných listů. Dále se podařilo potvrdit domněnku, že denaturace lysozymu a jeho fibrilace jsou dva rozdílné procesy. Pomocí heterospektrální analýzy se podařilo pravděpodobně potvrdit přítomnost signálu S-S můstků v ROA spektrech. Tyto výsledky byly prezentovány na konferenci ECSBM 2009 (viz Příloha 2).

Dále byla změřena spektra infračervené absorpční spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) a Ramanova spektra teplotní závislosti proteinů NKR-P1A a NKR-P1C. Z FTIR spekter byla pro oblast amidu I vypočtena 2DKoS a také byla aplikována FA. Pro Ramanova spektra bylo učiněno totéž, ale pro oblasti amidu I i amidu III. Nízká kvalita FTIR spekter však neumožnila dostatečně interpretovat průběh strukturních změn při procesu denaturace. Lze pouze konstatovat, že tyto změny u obou forem probíhají odlišně a jsou spojené s nárůstem obsahu β -skládaných listů. Do stejné situace jsme se dostali i při vyhodnocování Ramanových spekter. Opět šlo pouze konstatovat, že změny se dějí lehce odlišným způsobem a jejich spojení s obsahem β -skládaných listů. Potíže při interpretaci pořadí spektrálních změn jsou dány tím, že oba vzorky proteinu NKR-P1 byly nekomerčního původu a nebylo je možné získat v dostatečné čistotě a koncentraci. Navíc samotné vlastnosti proteinu naznačují, že denaturační procesy jsou velmi rychlé a souvisí s vystavením hydrofóbní β -struktury.

Literatura

Alberts, B.; Bray, D.; Hopkin, K.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K.; Walter, P. (1998) *Základy buněčné biologie*, Garland Publishing, Inc., New York.

Arnaudov, L. N.; de Vries, R. ; Ippel, H. ; van Mierlo, C. P. M. (2003) Multiple steps during the formation of β -lactoglobulin fibrils, *Biomacromolecules*, 4, 1614–1622.

Arnaudov, L. N.; de Vries R. (2005) Thermally induced fibrillar aggregation of hen egg white lysozyme, *Biophys. J.*, 88, 515–526.

Ashton, L.; Czarnik-Matuszewicz, B.; Blanch, E. W. (2006a) Application of two-dimensional correlation analysis to Raman optical activity, *J. Mol. Struct.*, 799, 61–71.

Ashton, L.; Barron, L. D.; Czarnik-Matuszewicz, B.; Hecht, L.; Hyde, J.; Blanch, E. W. (2006b) Two-dimensional correlation analysis of Raman optical activity data on the α -helix-to- β -sheet transition in poly(L-lysine), *Mol. Phys.*, 104, 1429–1445.

Ashton, L.; Barron, L. D.; Hecht, L.; Hyde, J.; Blanch, E. W. (2007) Two-dimensional Raman and Raman optical activity correlation analysis of the α -helix-to-disordered transition in poly(L-glutamic acid), *Analyst*, 132, 468–479.

Barron, L. D.; Hecht, L.; Blanch, E. W.; Bell, A. F. (2000) Solution structure and dynamics of biomolecules from Raman optical activity, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 73, 1–49.

Barth, A. (2000) The infrared absorption of amino acid side chains, *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 74, 141–173.

Barth, A.; Zscherp, Ch. (2002) What vibrations tell us about proteins, *Q. Rev. Biophys.*, 35, 369–430.

Bednářová, L.; Bouř, P.; Maloň, P. (2009) Vibrational and electronic optical activity of the chiral disulphide group: Implications for disulphide bridge conformation, *Chirality*, in press.

- Booth, D. R.; Sunde, M.; Bellotti, V.; Robinson, C. V.; Hutchinson W. L.; Fraser, P. E.; Hawkins, P. N.; Dobson, C. M.; Radford, S. E.; Blake, C. C. F.; Pepys, M. B. (1997) Instability, unfolding and aggregation of human lysozyme variants underlying amyloid fibrillogenesis, *Nature*, 385, 787–793.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Czarnecky, M. A. (1998) Interpretation of two-dimensional correlation spectra: science or art?, *Appl. Spectrosc.*, 52, 1583–1590.
- Czarnecky, M. A. (2003) Some comments on the application of two-dimensional correlation spectroscopy and normalization of the dynamic spectra, *Appl. Spectrosc.*, 57, 107–109.
- Deegan, R. D.; Bajakin, O.; Dupont, T. F.; Huber, G.; Nagel, S. R.; Witten, T.A. (1997) Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops, *Nature*, 389, 827–829.
- Dobson, C. M. (2003) Protein folding and misfolding, *Nature*, 426, 884–890.
- Dousseau, F.; Therrien, M.; Pézolet, M. (1989) On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins, *Appl. Spectrosc.*, 43, 538–542.
- Filosa, A.; Wang, Y.; Ismail, A. A.; English A. M. (2001) Two-dimensional infrared correlation spectroscopy as a probe of sequential events in the thermal unfolding of cytochromes c, *Biochemistry*, 40, 8256–8263.
- Hanzlíková, J.; Praus, P.; Baumruk, V. (1999) Raman optical activity spectrometer for peptide studies, *J. Mol. Struct.*, 481, 431–435.
- Hlídek, P. (2007) *Infračervená spektroskopie, Studijní text k základním praktikům*, Fyzikální ústav Matematicko-Fyzikální fakulty University Karlovy.
- Hu, H.; Larson, R.G. (2006) Marangoni effect reverses coffee-ring depositions, *J. Phys. Chem. B*, 110, 7090–7094.
- Chambers, W. H.; Vujanovic, N. L.; DeLeo, A. B.; Olszowy, M. W.; Herberman, R. B.; Hiserodt, J. C. (1989) Monoclonal antibody to a triggering structure expressed on rat natural killer cells and adherent lymphokine-activated killer cells, *J. Exp. Med.*, 169, 1373–1389.
- Jung, Y. M.; Czarnik-Matusiewicz, B.; Ozaki, Y. (2000) Two-dimensional infrared, two-dimensional Raman, and two-dimensional infrared and Raman heterospectral correlation studies of secondary structure of β -lactoglobulin in buffer solutions, *J. Phys. Chem. B*, 104, 7812–7817.

Kapitán, J.; Baumruk, V.; Gut, V.; Hlaváček, J.; Dlouhá, H.; Urbanová, M.; Wünsch, E.; Maloň, P. (2005) Raman optical activity of the central part of hinge peptide, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 70, 403–409.

Kapitán, J. (2006) Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako metody studia biomolekul ve vodném prostředí, *Disertační práce*, Fyzikální ústav Matematicko-Fyzikální fakulty University Karlovy, Praha 2006, 23–47.

Kapitán, J.; Baumruk, V.; Huláčková, H.; Maloň, P. (2006) Raman optical activity of the hinge peptide, *Vibr. Spectrosc.*, 42, 88–92.

Krebs, M. R. H.; Wilkins, D. K.; Chung, E. W.; Pitkeathly, M. C.; Chamberlain, A. K.; Zurdo, J.; Robinson, C. V.; Dobson, C. M. (2000) Formation and seeding of amyloid fibrils from wild-type hen lysozyme and peptide fragment from the beta-domain, *J. Mol. Biol.*, 300, 541–549.

Lecomte, S.; Hilleriteau, C.; Forgerit, J. P.; Revault, M.; Baron, M.; Hildebrandt, P.; Soulimane, T. (2001) Structural changes of cytochrome *c*₅₅₂ from *Thermus thermophilus* adsorbed on anionic and hydrophobic surfaces probed by FTIR and 2D-FTIR spectroscopy, *Chembiochem*, 2, 180–189.

Malinowski, E. R. (1991) *Factor analysis in chemistry*, John Wiley, New York – Chichester.

Mayo, D. W.; Miller, F. A.; Hannah, R. W. (2003) *Course notes on the interpretation of infrared and Raman spectra*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Miura, T.; Thomas Jr., G. J. (1995) Raman spectroscopy of proteins and their assemblies. In *Subcellular Biochemistry*, vol. 24, *Proteins: Structure, Function, and Engineering*, Biswas B. B., Roy S. (Eds.), Plenum Press, New York, 55–99.

Noda, I. (1990) Two-dimensional infrared (2D IR) spectroscopy: Theory and applications, *Appl. Spectrosc.* 44, 550–561.

Noda, I. (1993) Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman, and other types of spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1329–1336.

Noda, I.; Dowrey, A.E.; Marcott, C. (1993) Recent developments in two-dimensional infrared (2D IR) correlation spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1317–1323.

Noda, I. (2000) Determination of two-dimensional correlation spectra using Hilbert transform, *Appl. Spectrosc.* 54, 994–999.

- Noda, I. (2002) General theory of two-dimensional (2D) analysis, Handbook of vibrational spectroscopy (Eds. Chalmers, J. M., Griffiths, P. R.), vol. 3, 2123–2134.
- Overman, S. A.; Thomas Jr., G. J. (1999) Raman markers of nonaromatic side chains in an α -helix assembly: Ala, Asp, Glu, Gly, Ile, Leu, Lys, Ser, and Val residues of phage *fd* subunits, *Biochemistry*, 38, 4018.
- Ozaki, Y. (2002) 2D Correlation spectroscopy in vibrational spectroscopy, Handbook of vibrational spectroscopy (Eds. Chalmers, J. M., Griffiths, P. R.), vol. 3, 2136–2172.
- Rozbeský, D. (2009) Rekombinantní exprese a studium receptorů mNKR-P1A a C, Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta University Karlovy.
- Savitzky, A.; Golay, M. J. E. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures, *Anal. Chem.*, 36, 1627.
- Selkoe, D. J. (2003) Folding proteins in fatal ways, *Nature*, 426, 900–904.
- Shashilov, V.; Xu, M.; Ermolenkov, V. V.; Fredriksen, L.; Lednev, I. K. (2007) Probing a fibrillation nucleus directly by deep ultraviolet Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 6972–6973.
- Shasilov, V.; Lednev, I. K. (2008) 2D correlation deep UV resonance Raman spectroscopy of early events of lysozyme fibrillation: kinetic mechanism and potential interpretation pitfalls, *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 309–317.
- Šípová H. (2006) Studium biomolekul pomocí SERS spektroskopie na pevných kovových nanosubstrátech, Bakalářská práce, Fyzikální ústav Matematicko-Fyzikální fakulty University Karlovy.
- Sunde, M.; Blake, C. C. F. (1998) From the globular to the fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation, *Q. Rev. Biophys.*, 31, 1–39.
- Tensmeyer, L. G.; Kaufmann, E. W. (1996) Protein structure as revealed by nonresonance Raman spectroscopy, *Spectroscopic methods for determining protein structure in solution* (Ed. Havel, H. A.), VCH Publishers, Inc., New York, 69–93.
- Tuma, R. (2005) Raman spectroscopy of proteins: from peptides to large assemblies, *J. Raman Spectrosc.*, 36, 307.
- Vivier, E.; Tomasello, E.; Baratin, M.; Walzer, T.; Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells, *Nat. Immunol.*, 9, 503–510.

Wang, Y.; Murayama, K.; Myojo, Y.; Tsenkova, R.; Hayashi, N.; Ozaki, Y. (1998) Two-dimensional Fourier transform near-infrared spectroscopy study of heat denaturation of ovalbumin in aqueous solutions, *J. Phys. Chem. B*, 102, 6655–6662.

Zhang D., Xie Y., Mrozek M. F., Ortiz C., Davisson J., Ben-Amotz D. (2003) Raman detection of proteomic analytes, *Anal. Chem.*, 75, 5703–5709.

Zhu, F.; Isaacs, N. W.; Hecht, L.; Barron, L. D. (2005) Raman optical activity: A Tool for protein structure analysis, *Structure*, 13, 1409–1419.

2D Correlation spectroscopy and its application using MATLAB

Pazderka T., Kopecký V.

*Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University,
Ke Karlovu 5, Prague 2, CZ-121 16, Czech Republic*

Technical Computing Prague 2008

Moller et al. (Eds.)

Humusoft and Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic,
November 11, 2008

ISBN 978-80-7080-692-0, p. 81.

2D CORRELATION SPECTROSCOPY AND ITS APPLICATION IN VIBRATIONAL SPECTROSCOPY USING MATLAB

T. Pazderka, V. Kopecký Jr.

Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, Prague 2, 121 16, Czech Republic

Two dimensional correlation spectroscopy (2DCoS) is a powerful tool of modern spectroscopy. 2DCoS originates in NMR spectroscopy but nowadays it is using a different approach. Instead of using femtosecond lasers and pulse measurement, the system of interest is perturbed by some external variable (pressure, pH, temperature, etc.) and then analyzed by one or more spectroscopic techniques. Obtained series of spectra are then treated by special mathematical algorithms and converted into a two-dimensional spectra. There are two kinds of 2DCoS – homo- and heterospectral correlations between two spectra of the same and different kind of spectroscopic techniques, respectively.

This 2D spectrum contains a lot of information about the system. First part of the spectrum, the synchronous spectrum, contains simultaneous or coincidental changes of measured spectral series. Direct computation is used for this part of the spectra: $\phi = A' \cdot B$, where A is a first spectral matrix and B is a second spectral matrix. The second part is the asynchronous spectrum, which represents sequential or successive changes of measured spectral series. So called Hilbert-Noda transformation is used for this part of the spectra: $\psi = A \cdot N \cdot B'$, where N is a Hilbert-Noda matrix, which is a Hilbert matrix multiplied by $\frac{1}{(\pi(k-j))}$. Hilbert-Noda matrix is bringing into a time delay between two changes. When they are too far away or happen in the same time, they are considered not correlated (zeros in the matrix), but when they happen in a very short time, they are correlated. When two bands are strongly correlated together they probably have the same origin. This is a very powerful feature of this technique, especially in case of the heterospectral correlation.

Here we present a Matlab based application which provides a certain comfort when performing a 2DCoS. The program has routines for homo- and heterospectral analysis. It performs 2DCoS and both synchronous and asynchronous spectra can be displayed, edited or saved (also in a matrix form). Problems with application of 2DCoS in the field of vibrational spectroscopy will be discussed.

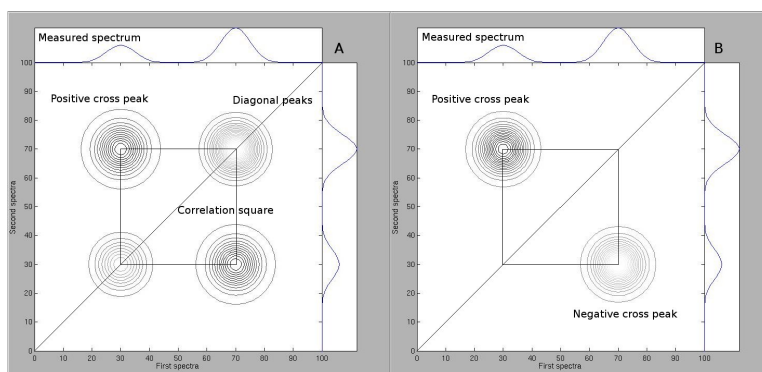


Figure 1: Synchronous (A) and asynchronous (B) spectra with marked correlation squares and peaks.

Acknowledgments: The Ministry of Education and the Grant Agency of the Czech Republic are acknowledged for support (Nos. MSM 0021620835, 202/06/P208, GA202/07/0732).

2D Correlation spectroscopy and its application using MATLAB

T. Pazderka, V. Kopecký Jr.

*Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University,
Ke Karlovu 5, Prague 2, CZ-121 16, Czech Republic*

Technical Computing Prague 2008, supplement on CD

Moller et al. (Eds.)

Humusoft and Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic,
November 11, 2008

ISBN 978-80-7080-692-0, p. 1–12.

2D CORRELATION SPECTROSCOPY AND ITS APPLICATION IN VIBRATIONAL SPECTROSCOPY USING MATLAB

T. Pazderka, V. Kopecký Jr.

Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, Prague 2, 121 16, Czech Republic

Abstract

Two dimensional correlation spectroscopy is a powerful tool for spectral analysis. It is able to reveal correlations between spectral changes and to deconvolve overlapping peaks. It is easily applicable in a study of biomolecules. Here presented program was created for easy accessibility of all necessary operations. Presented algorithm was deeply tested on regular spectra as well as on a spectra of vibrational optical activity. Basic mathematics needed for understanding and performing two-dimensional correlation spectroscopy was also presented.

1 Two dimensional correlation spectroscopy

Two dimensional correlation spectroscopy (2DCoS) originated in a NMR spectroscopy. There were efforts to use it in different methods of optical spectroscopy since its development. The main reason is that 2DCoS has an ability to determine an order of bands and also has superior deconvolution abilities. This effort has run into troubles with a time scale because very short light pulses are needed for excitation. That wasn't possible until construction of femtosecond lasers and therefore existed an effort for creating a generalised form of 2DCoS. Practical use of so called Generalised 2DCoS was enabled in 1986 when Noda [1] utilised its basic theory. In Generalised 2DCoS external impulses (pH, temperature, concentration etc.) are used to stimulate the system instead of short excitation pulses. Excited system is then analysed by one or more spectroscopic techniques. This spectra are then processed by a correlation function into a 2D spectra.

This method allows us to study the response of our system on different physical-chemical impulses with use of conventional spectrometers and without need of femtosecond lasers and optical stimulation [2]. It also provides information about order of spectral bands in dependency on external impulse and has very strong deconvoluting abilities.

The first part of this spectra (so called synchronous) is representing simultaneous or coincidental changes of measured spectral series. This spectrum is always symmetrical along the diagonal and has peaks on the diagonal. Intensity of these peaks (also called autocorrelation) is representing a strength of the band. The peaks off the diagonal are called cross-peaks and are representing a degree of correlation. When this peak is positive then both peaks are changing in the same direction (both increasing or both decreasing). When negative, peaks are changing in the different way (one is decreasing and the other is increasing). These rules are reversed when these peaks have different signs.

Second part of this spectra (asynchronous) is representing sequential or successive changes of measured spectral series. It is always antisymmetrical along the diagonal and there are no peaks on the diagonal. When the cross-peak is positive then a band from the first spectra is growing earlier or more intensive than a band from second spectra and vice versa.

2DCoS can be performed in two ways. First of them is called homospectral correlation and there are two identical assemblies of data (spectra) on the input. This method can be used to deconvolve and to determine correlations between bands in the spectra. The second one is called heterospectral correlation and there are two different sets of data on the input. They

are obtained by measuring the system with different spectroscopic techniques. This is the most powerful variant because when we know the explanation of some peaks in one type of spectra and we see that this band is strongly correlated with another band in the second spectra it is most probable that these two bands have the same origin.

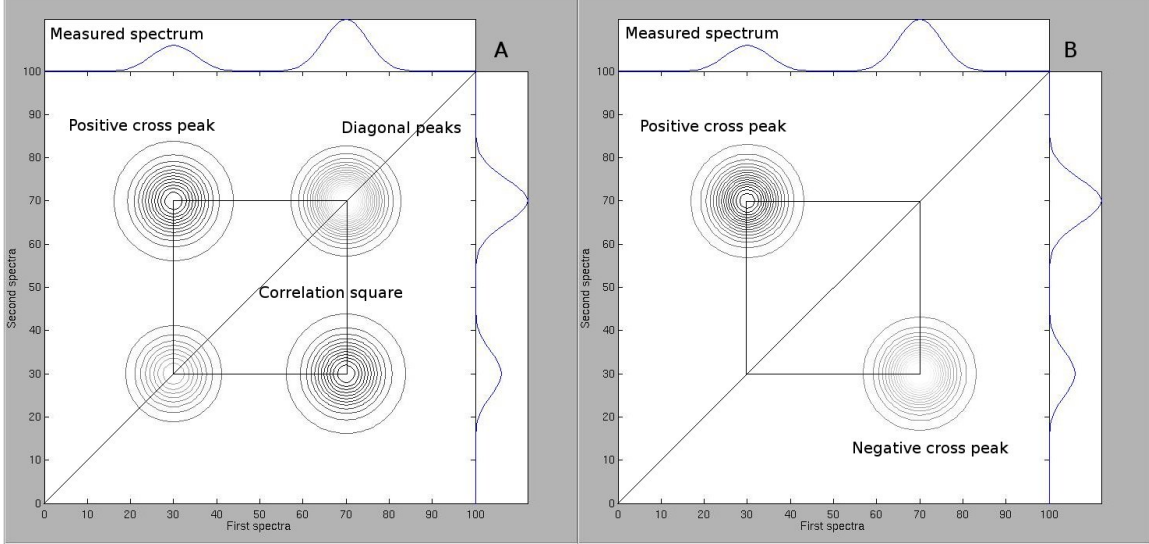


Figure 1: Synchronous (A) and asynchronous (B) spectra with marked correlation squares and peaks.

Some basic properties of correlation spectra are marked on figure 1. We can see diagonal peaks in the synchronous part and a symmetrical positive cross-peak which indicates that both bands are changing in the same way. There are no diagonal peaks in the asynchronous part and from negative peak in the lower right corner we can say that band on 70 is changing slower than band on 30 (positive peak in the upper left corner is saying the same). In both cases we can draw so called correlation square which is connecting all peaks belonging to two correlating bands.

2 Computation of 2D spectra

First of all we need a set of spectra measured on a system which was induced by some external impulse. Spectral intensities of this set can be expressed as $I(\nu, t)$ where ν is a spectral characteristic (wavenumber, wavelength or Raman shift) and t is a parameter of an external impulse. That can be an evolution in time, temperature, pH, concentration etc. Only certain range of t can be measured and therefore a dynamical spectrum is implemented as [3]:

$$\tilde{y}(\nu, t) = \begin{cases} y(\nu, t) - \tilde{y}(\nu) & \text{if } T_{min} \leq t \leq T_{max}, \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad (1)$$

where $\tilde{y}(\nu)$ is a reference spectrum of the system. An average spectrum is usually picked as a reference spectrum but any reasonable spectrum can be chosen. Correlation spectrum is then defined as:

$$\chi(\nu_1, \nu_2) = \langle \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) \rangle \quad (2)$$

where the symbol $\langle \rangle$ is a crosscorrelation function defined as:

$$C(t, \tau) = \langle \Phi(\tau) | \Psi(t) \rangle \quad (3)$$

This spectra expresses a functional dependency between ν_1 and ν_2 during the interval of external variable t . We will treat this function as a complex one for further simplifying and divide it into a synchronous and asynchronous part [4]:

$$\chi(\nu_1, \nu_2) = \Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) \quad (4)$$

and formal definition of 2D correlation spectra is given by:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) + i\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{\pi(T_{max} - T_{min})} \times \int_0^\infty \tilde{Y}_1(\omega) \cdot \tilde{Y}_2(\omega) d\omega \quad (5)$$

The expression $\tilde{Y}_1(\omega)$ is a Fourier transformation of spectral intensity variations $\tilde{y}_1(\nu_1, t)$ measured in certain spectral variable ν_1 during an external impulse t . It can be written as:

$$\tilde{Y}_1(\omega) = \int_{-\infty}^\infty \tilde{y}(\nu_1, t) e^{-i\omega t} dt \quad (6)$$

As it is clear from Eq. 1, this Fourier transformation is related with a strict interval of an external impulse between T_{min} and T_{max} . $\tilde{Y}_2(\omega)$ is defined in a similar way but it is an inverse Fourier transform.

It is possible, with use of classical timeseries analysis and Wiener-Khintchinsky theorem [5], to express synchronous and asynchronous part:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{y}(\nu_2, t) dt \quad (7)$$

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{T_{max} - T_{min}} \int_{T_{min}}^{T_{max}} \tilde{y}(\nu_1, t) \cdot \tilde{z}(\nu_2, t) dt \quad (8)$$

where $\tilde{z}(\nu_2, t)$ is defined as follows:

$$\tilde{z}(\nu_2, t) = \frac{1}{\pi} \int_{-\infty}^\infty \frac{\tilde{y}(\nu_2, t')}{t' - t} dt \quad (9)$$

But this direct computation is very time consuming and therefore is used very rarely. Some simplification can be made when the data are equidistantly spaced.

For synchronous part we will start from the equation (7) and rewrite it as follows [6]:

$$\Phi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \sum_{j=1}^m \tilde{y}(\nu_1) \cdot \tilde{y}(\nu_2) \quad (10)$$

where m is a number of spectra equidistantly measured between T_{min} and T_{max} with growth defined by:

$$\Delta t = \frac{T_{max} - T_{min}}{m-1} \quad (11)$$

It is even more simple when written in a Matlab notation:

```
synch = data(:,2:n) * data(:,2:n)' / (n-2);
```

Computation of asynchronous part is a little bit more complicated. First of all we need so called Hilbert–Noda matrix defined as:

$$N_{jk} = \begin{cases} 0 & \text{for } j = k \\ \frac{1}{\pi(k-j)} & \text{otherwise} \end{cases} \quad (12)$$

written in a Matlab notation:

```

N = zeros(n-1);
for i=2:(n-1)
    N(1,i) = 1/(pi * (i-1));
end
for i=2:(n-2)
    for j=i:(n-1)
        N(i,j) = N(i-1,j-1);
    end;
end
for i=2:(n-1)
    for j=1:i
        N(i,j) = -N(j,i);
    end;
end
end

```

Hilbert–Noda matrix is a slightly modified Hilbert matrix. This matrix is bringing into a time delay between two changes in a spectrum.

With use of Hilbert–Noda matrix we can compute asynchronous spectra using this prescription:

$$\Psi(\nu_1, \nu_2) = \frac{1}{m-1} \tilde{y}(\nu_1)^T N \tilde{y}(\nu_2) \quad (13)$$

and in a Matlab notation:

```
asynch = data(:,2:n) * N * data(:,2:n)' / (n-2);
```

3 Graphics User Interface

Here presented program has all necessary controls and abilities to perform 2DCoS on a custom set of data and to present and save the output results. It is based on the algorithms presented in chapter 2. It's design is focused on maximum lucidity and efectivity. GUI is pictured in figure 2 with all important places marked. Main plot of 2D spectra is placed in (1) and one of the spectra from each spectral set is placed in (2) (both spectra are identical in case of homospectral correlation). Colorbar (when active) is placed in (3) and all necessary controls are grouped in (4).

All controls are integrated into menus acording to their functions. They are arranged in an assumed order of use. Particular items become active only after all prerequisites for their save execution are met. All functions are described in the included help file. Details are in figure 3.

4 Testing of the program

Functionality of these algorithms and program itself was tested on series of different spectra. They are simulating a lot of situations which can occur in spectra. The first testing spectra contains two Gaussian peaks which were described by function:

$$G = k \cdot e^{-\frac{(x-pos)^2}{20}} \quad (14)$$

where pos is a position of a peak and k is changing with an order of spectra ($5i$ and $\frac{10}{i^2}$).

The whole set of spectra can be seen on figure 4 and the output of 2DCoS can be seen on figure 5.

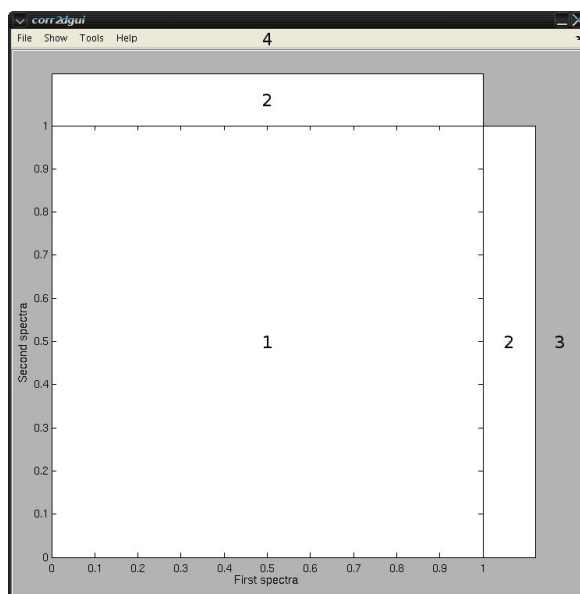


Figure 2: GUI window with marked main controls.

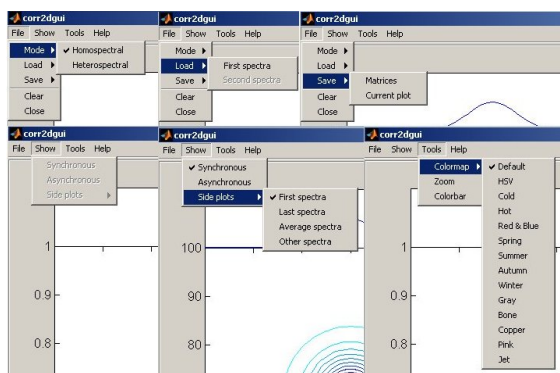


Figure 3: GUI with some of menus and submenus.

As the second testing spectra we selected Lorentzian peaks (fig 6) which are described by the equation:

$$L = k \frac{1}{1 + \frac{(x-pos)^2}{20}} \quad (15)$$

As can be seen from fig 7 their correlation peaks are sharper and has slightly different shape but same rules described previously can be applied. We will focus on Lorentzian peaks further because they are more related to the real bands in spectra.

All performed tests (data not shown) were with a very good agreement with previously published results [7] and therefore we can assume that our algorithm is working correctly.

5 Problems with vibrational optical activity

Currently exists the methodology for performing and scoring results 2DCos for optical spectroscopy which contains bands of only one sign. Rules for scoring this correlation spectra are sometimes called Noda rules [6]. An attempt to extend this methodology also to spectra of Raman optical activity (ROA) was conducted recently [8] and first use of 2DCoS in ROA was in a last year [8] but only simple polyaminoacid chains were measured [9, 10] without working

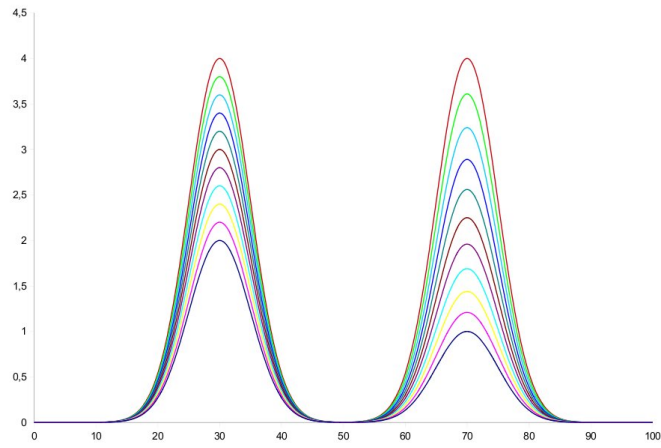


Figure 4: Set of spectra representing 2 growing Gaussian peaks.

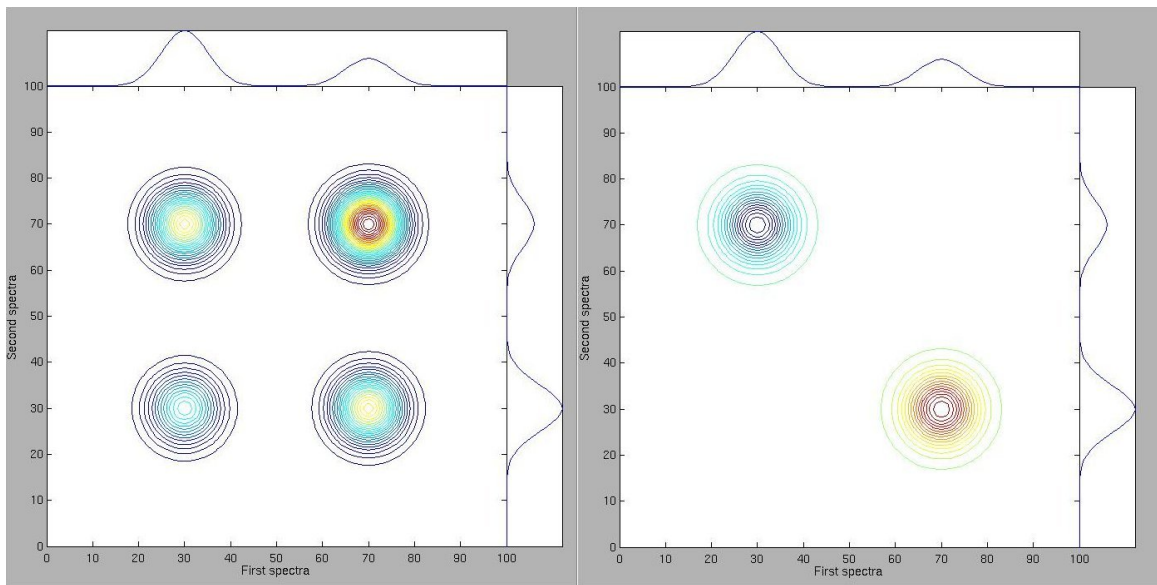


Figure 5: Synchronous and asynchronous 2D spectra of 2 growing Gaussian peaks.

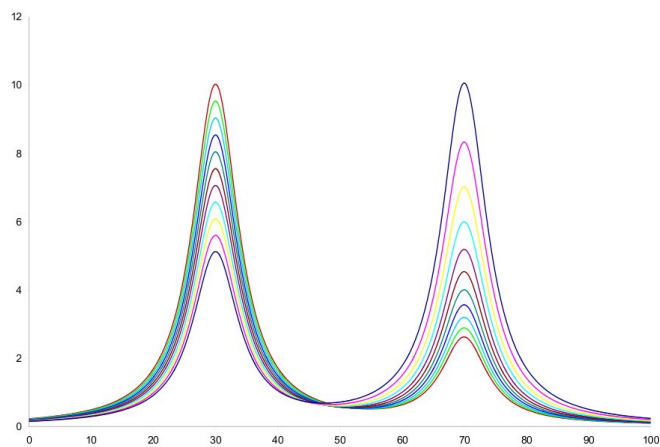


Figure 6: Set of spectra representing 2 growing Lorentzian peaks.

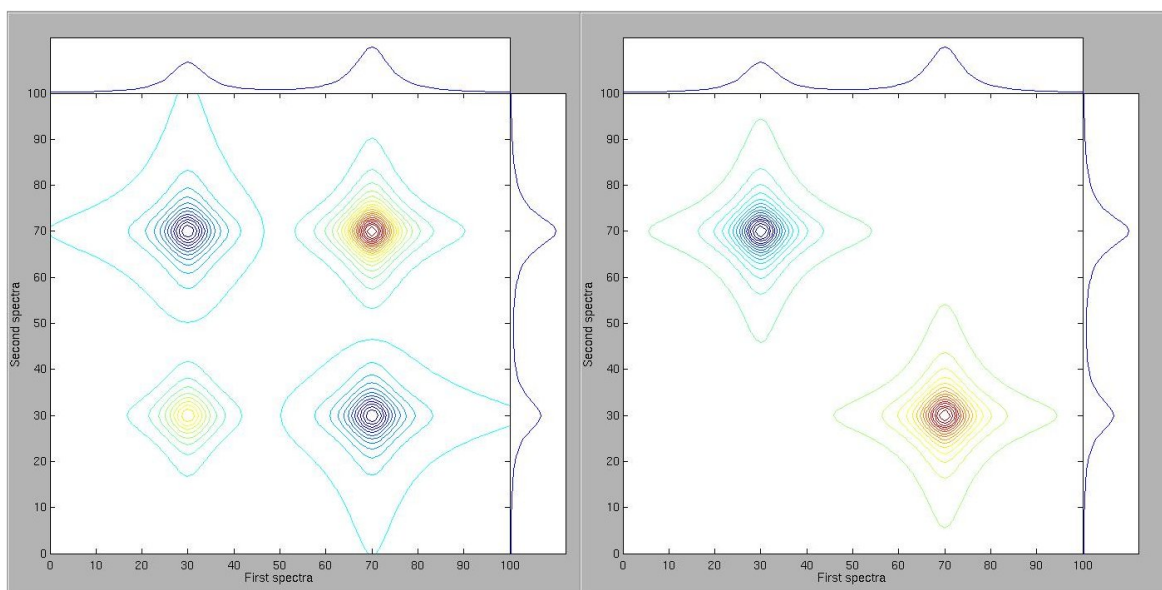


Figure 7: Synchronous and asynchronous 2D spectra of 2 growing Lorentzian peaks.

out a detailed methodology. ROA and vibrational circular dichroism (VCD) are different from other spectroscopic techniques because they are differential methods and so they have bands of both polarity in spectra. The final methodology is a little bit different from the original rules and is listed in [8].

Ashton et al. have also conducted some theoretical test for verifying this methodology but these tests were very simple. Used peaks were constructed from only three points and only growing or decreasing in magnitude were tested. So we have decided to make a proper testing which can be also applied on VCD. We picked the most simple ROA spectra as a test subject. It contains two bands of opposite polarity, one of them placed on 40 and the other one on 60.

The first set of spectra (fig 8) has both bands growing as we can see from the synchronous part (fig 9). Cross-peaks in asynchronous part of the spectra tell us that the band on 60 is growing more rapidly than the one on 40.

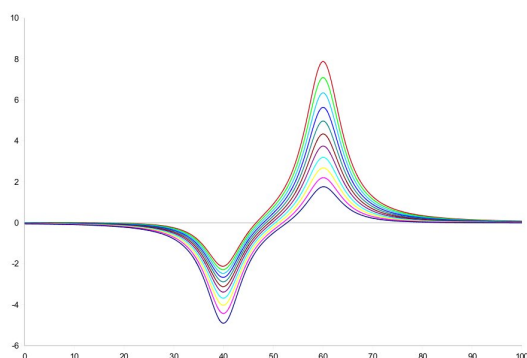


Figure 8: Set of spectra representing 2 growing ROA/VCD Lorentzian peaks.

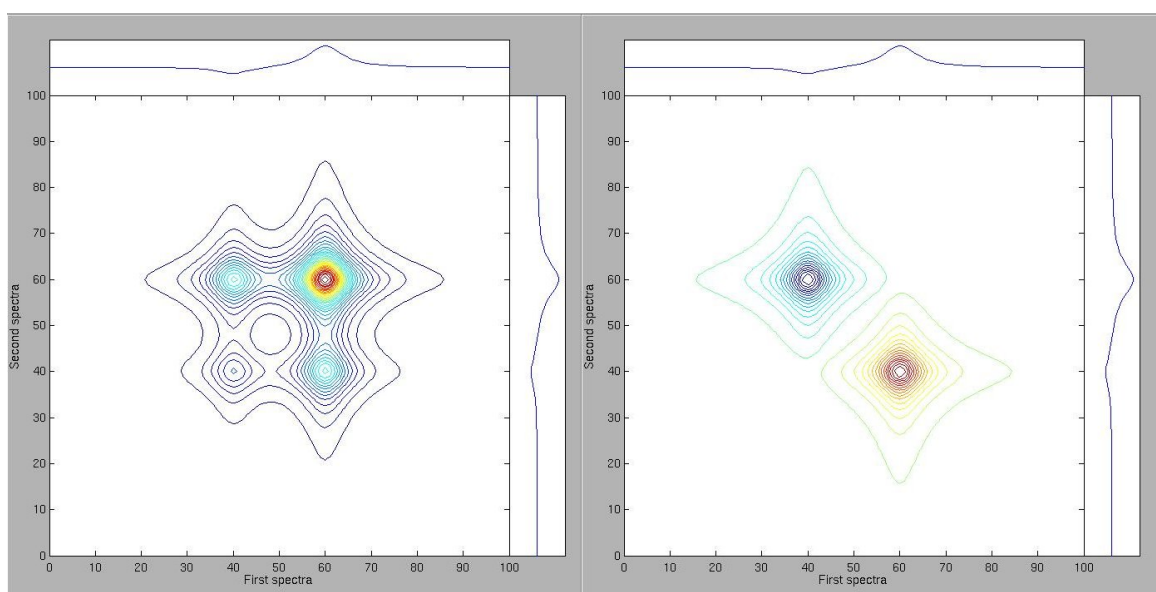


Figure 9: Synchronous and asynchronous 2D spectra of 2 growing ROA/VCD Lorentzian peaks.

The second set of spectra (fig 10) has bands changing in an opposite direction because the cross-peaks in a synchronous part are negative. From the asynchronous part we can say that the band on 40 is changing more rapidly than the band on 60.

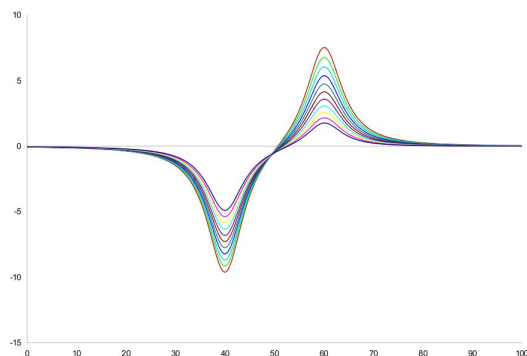


Figure 10: Set of spectra representing 2 ROA/VCD Lorentzian peaks changing in an opposite direction.

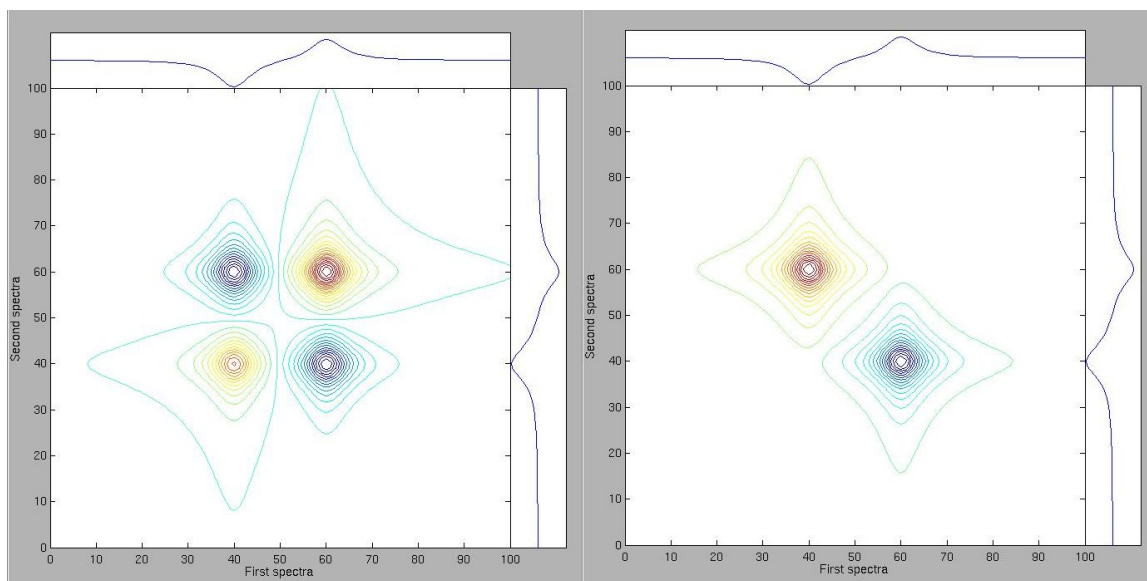


Figure 11: Synchronous and asynchronous 2D spectra of 2 ROA/VCD Lorentzian peaks changing in an opposite direction.

Another set of spectra (fig 12) has bands which are moving towards each other without changing magnitude. Both 2D spectra (fig. 13) are becoming more complicated.

The biggest disadvantage of ROA 2DCoS is its high sensitivity for spectral background, even small change has a great effect on an output 2D spectrum and so precise data treatment is needed.

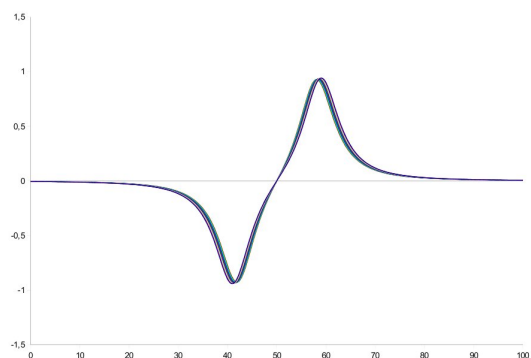


Figure 12: Set of spectra representing 2 ROA/VCD Lorentzian peaks moving towards each other.

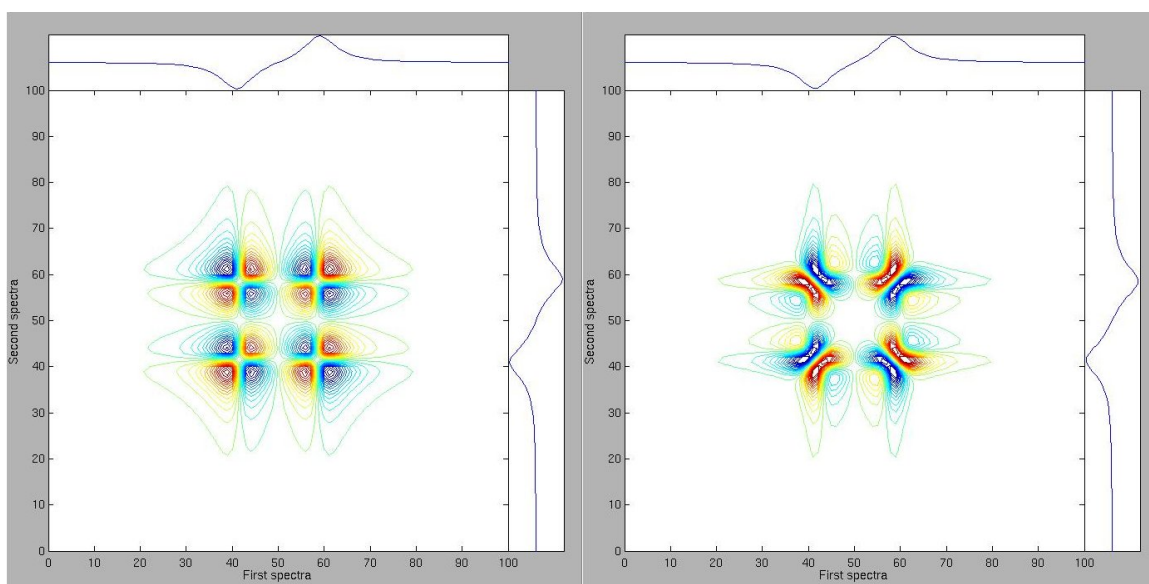


Figure 13: Synchronous and asynchronous 2D spectra of 2 ROA/VCD Lorentzian peaks moving towards each other.

6 Conclusions and future work

Two-dimensional correlation spectroscopy is a useful tool in studying dynamic changes in spectra or for deconvolving overlapping peaks. It can analyze a spectral set under some perturbation and find any correlations or coincidences between spectral changes. It can also analyze different spectra under the same type of perturbation and then transfer explanation from one type of spectra to another type of spectra. This method is applicable on study of biomolecules and their interactions.

Future work will be focused on optimizing the code and on expanding capabilities of this program to cover even some simple data treatment methods and to enhance its current abilities. We will also focus on practical use of this program in studying protein dynamics.

Acknowledgments: The Grant Agency of the Czech Republic and the Ministry of Education of the Czech Republic are gratefully acknowledged for support (No. 202/06/P208, No. GA202/07/0732 and No. MSM 0021620835, respectively).

References

- [1] Noda, I. (1986) Two-dimensional infrared (2-D IR) spectroscopy of synthetic and biopolymer. *Bull. Am. Phys. Soc.*, 31, 520
- [2] Noda, I. (1990) Two-dimensional infrared (2DIR) spectroscopy: theory and applications, *Appl. Spectrosc.*, 44, 550–561
- [3] Noda, I. (1993) Generalized two-dimensional correlation method applicable to infrared, Raman, and other types of spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1329–1336
- [4] Noda, I.; Dowrey, A. E.; Marcott, C. (1993) Recent developments in two-dimensional infrared (2D IR) correlation spectroscopy, *Appl. Spectrosc.*, 47, 1317–1323
- [5] Noda, I. (2000) Determination of two-dimensional correlation spectra using Hilbert transform, *Appl. Spectrosc.* 54, 994–999
- [6] Noda, I. (2002) General theory of two-dimensional (2D) analysis, in *Handbook of vibrational spectroscopy* (Eds. Chalmers, J. M., Griffiths, P. R.), vol. 3, 2123–2134
- [7] Noda, I.; Ozaki, Y. (2004) *Two-dimensional correlation spectroscopy: Applications in vibrational and optical spectroscopy*, John Wiley and Sons
- [8] Ashton, L.; Czarnik-Matusiewicz, B.; Blanch, E. W. (2006) Application of two-dimensional correlation analysis to Raman optical activity, *J. Mol. Struct.*, 799, 61–71
- [9] Ashton, L.; Barron, L. D.; Hecht, L.; Hydec, J.; Blanch, E. W. (2007) Two-dimensional Raman and Raman optical activity correlation analysis of the α -helix-to-disordered transition in poly(L-glutamic acid), *Analyst*, 132, 468–479
- [10] Ashton, L.; Barron, L. D.; Czarnik-Matusiewicz, B.; Hecht, L.; Hyde, J.; Blanch, E. W. (2006) Two-dimensional correlation analysis of Raman optical activity data on the α -helix-to- β -sheet transition in poly(L-lysine), *Molecular Physics*, 104, 1429–1445

Vladimír Kopecký Jr.

Address:

Institute of Physics of Charles University
Faculty of Mathematics and Physics

Charles University in Prague
Ke Karlovu 5, 121 16 Praha 2
Czech Republic
E-mail:
kopecky@karlov.mff.cuni.cz

Two-dimensional Raman and Raman optical activity correlation and factor analysis of lysozyme fibrillation

T. Pazderka¹, V. Kopecký Jr.¹, K. Hofbauerová^{1,2}, V. Baumruk¹

1. *Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University, Ke Karlovu 5, Prague 2, CZ-121 16, Czech Republic*

2. *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, CZ-142 20, Czech Republic*

XIII European Conference on the Spectroscopy of Biological Molecules

Cupane et al. (Eds.)

University of Palermo, Palermo, Italy, August 28 - September 2, 2009

p. 348 (PB - 102)

Two-dimensional Raman and Raman optical activity correlation and factor analysis of lysozyme fibrillation

T. PAZDERKA¹, V. KOPECKÝ JR.¹, K. HOFBAUEROVÁ^{1,2} AND V. BAUMRUK¹

1. Institute of Physics, Faculty of Mathematics and Physics, Charles University in Prague, Ke Karlovu 5, Prague 2, CZ-121 16, Czech Republic

2. Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Vídeňská 1083, Prague 4, CZ-142 20, Czech Republic

Understanding of processes of amyloid fibrils formation is one of the key tasks in searching for proteins structural origin of human neurodegenerative diseases. Therefore, hen egg white lysozyme (HEWL) can serve as a good model of amyloid fibril formation. Furthermore, this protein is homologous to human lysozyme, which is one of the proteins that cause amyloid diseases [1]. Raman optical activity (ROA) and Raman spectroscopy are very powerful techniques for study unfolded proteins and promising experiments on lysozyme has been done [2]. Firstly, we model changes of ROA band shapes and positions and investigate characteristic patterns in 2D correlation spectra (2DCoS) [3]. Subsequently, temporal and thermal spectral changes in ROA and Raman spectra of HEWL (Fig. 1) were analyzed by means of factor analysis and 2DCoS. It gave us an opportunity to study delicate details of HEWL fibrillation and denaturation.

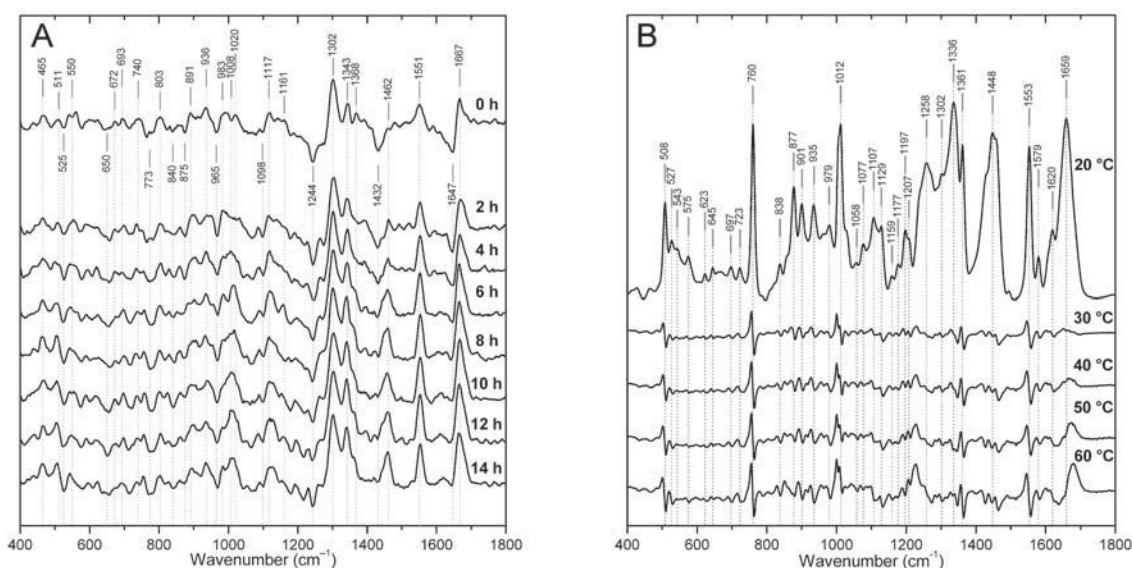


Fig. 1 – A) ROA time dependency of hen egg white lysozyme (400 mg/mL, pH 3.7) fibrillation, B) lysozyme thermal denaturation monitored by Raman spectroscopy

References

- [1] D. R. Booth, M. Sunde, V. Bellotti et al., *Nature* **385**, 787–793 (1997).
- [2] E. W. Blanch, L. A. Morozova-Roche, D. A. E. Cochran et al., *J. Mol. Biol.* **301**, 553–563 (2000).
- [3] I. Noda, Y. Ozaki, *Two dimensional correlation spectroscopy: applications in vibrational and optical spectroscopy*, Chichester: Wiley (2004).