

**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ráchel Sgallová

Termodynamika tvorby DNA vlásenek

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Václav Římal, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2019

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

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

V Praze dne 9. 5. 2019

Podpis autora

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Václavu Římalovi, PhD. za jeho podporu při vypracování této práce. Zvláště bych mu chtěla poděkovat za ochotu a trpělivost při vysvětlování principů studia DNA pomocí NMR a za obrovské množství času, které mi věnoval.

Mé poděkování patří také mé rodině za podporu během celého mého studia.

Název práce: Termodynamika tvorby DNA vlásenek

Autor: Ráchel Sgallová

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Václav Římal, Ph.D., Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: *Serum response factor* (SRF) je transkripční faktor vážící se na vysoce konzervovanou sekvenci DNA, tzv. CArG box. Vzhledem k sekvenci nukleotidů CArG boxu by mohlo docházet k tvorbě vlásenek, resp. kruciformy. V rámci této diplomové práce byla pomocí jaderné magnetické rezonance studována struktura CArG boxu v lidském genu *c-fos*. Byla změřena ^1H spektra v teplotním rozsahu 274–356 K a dvourozměrná spektra ^1H – ^1H NOESY a ^1H – ^{13}C HMBC sekvencí DNA o délce 12, 14 a 16 nukleotidů. Z naměřených teplotních závislostí byly získány termodynamické parametry tvorby sekundárních struktur ve zkoumaných vzorcích. Na základě spekter NOESY a nezávislosti teploty tání na koncentraci byla potvrzena tvorba vlásenek ve zkoumaných vzorcích. Odlišnost sekundární struktury od B–DNA by mohla být vysvětlením vysoké afinity SRF k CArG boxu.

Klíčová slova: DNA, vlásenka, NMR, CArG box

Title: The thermodynamics of DNA-hairpin formation

Author: Ráchel Sgallová

Department: Department of Low Temperature Physics

Supervisor: Mgr. Václav Římal, Ph.D., Department of Low Temperature Physics

Abstract: Serum response factor (SRF) is a transcription factor which binds to a highly conserved DNA sequence called the CArG box. According to the nucleotide sequence of CArG box it could form a hairpin structure or a cruciform. In this master thesis, the structure of the CArG box in a human gene *c-fos* was studied by nuclear magnetic resonance. ^1H spectra at temperatures 274–356 K, two-dimensional ^1H – ^1H NOESY spectra, and two-dimensional ^1H – ^{13}C HMBC spectra for DNA sequences with lengths of 12, 14 and 16 nucleotides were acquired. The thermodynamic parameters of formation of the secondary structure in the samples were determined from the measured temperature dependencies. The hairpin formation in the samples was confirmed based on the NOESY spectra and the lack of dependency of the melting temperature on concentration. The observed difference of the secondary structure from B-DNA could serve as a possible explanation of the high affinity of SRF to CArG box.

Keywords: DNA, hairpin, NMR, CArG box

Obsah

Úvod	3
1 Deoxyribonukleová kyselina	5
1.1 Struktura DNA	5
1.1.1 Primární struktura	5
1.1.2 Sekundární struktura DNA	5
1.1.3 Stabilizace struktury DNA	6
1.2 Transkripce	7
1.2.1 Transkripční faktory	8
1.2.2 Regulace exprese genu <i>c-fos</i>	8
1.3 Termodynamika tvorby sekundárních struktur DNA	9
1.3.1 Tvorba vlásenky	9
1.3.2 Tvorba duplexu ze dvou stejných molekul	10
2 Jaderná magnetická rezonance	12
2.1 Jaderný spin a magnetický moment	12
2.2 Interakce se statickým magnetickým polem	12
2.3 Interakce s proměnným magnetickým polem	13
2.3.1 Volná precese	14
2.3.2 Spinové echo	15
2.4 Chemický posuv	16
2.5 Přímá dipól-dipólová interakce	16
2.6 Nepřímá dipól-dipólová interakce	17
2.7 Chemická výměna	17
2.8 Pulzní experimenty NMR	17
2.8.1 Jednorozměrné experimenty	18
2.8.2 Dvourozměrné experimenty	19
2.9 NMR spektroskopie DNA	21
2.9.1 Strategie pro přiřazování ^1H rezonancí v NMR spektrech B-DNA	23
2.10 Analýza závislosti chemického posuvu na teplotě	24
3 Použité experimentální metody	26
3.1 Vzorky	26
3.1.1 Příprava vzorků	26
3.2 NMR spektroskopie	27
3.2.1 Spektrometr	27
3.2.2 ^1H spektra a jejich teplotní závislosti	27
3.2.3 Měření koncentrace DNA	27
3.2.4 2D spektroskopie	29
4 Výsledky experimentů a jejich diskuze	32
4.1 Určení koncentrace vzorků	32
4.2 Přiřazení vodíkových signálů ve spektrech zkoumaných vzorků	32
4.3 Rozdíly oproti B-DNA v naměřených spektrech NOESY	35

4.4	Srovnání chemických posuvů s predikcemi pro duplex	38
4.5	Srovnání chemických posuvů pro různé vzorky	38
4.6	Teplotní závislosti	40
4.6.1	Termodynamické parametry	40
4.6.2	Vliv změny koncentrace na teplotu tání	48
	Závěr	50
	Seznam použité literatury	52
	Seznam obrázků	55
	Seznam tabulek	57
	Seznam použitých zkratk	58
	A Přílohy	59

Úvod

Regulační segmenty DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je chemická sloučenina naprosto nezbytná pro život. Je základem pro předávání dědičných informací následujícím generacím i pro syntézu látek nezbytných pro každodenní fungování jednotlivých buněk. Její struktura byla rozluštěna už v roce 1953 [1] a od té doby je DNA předmětem zájmu mnoha vědců. I přesto stále zůstává mnoho otázek o fungování DNA v buňkách nezodpovězeno. Jednou z nich je otázka mechanismu rozeznávání specifických sekvencí DNA transkripčními faktory.

Během transkripce dochází k přepisu genetické informace z DNA do RNA. Pro hladký průběh transkripce a její regulaci je třeba celá řada látek, patří mezi ně i transkripční faktory (TF). TF jsou proteiny, které se specificky váží k určitým sekvencím DNA a hrají klíčovou roli při iniciaci transkripce. Jako nejjednodušší mechanismus vazby TF k DNA se nabízí vázání TF k náhodným sekvencím DNA a následná disociace, dokud nedojde k vazbě ke správné sekvenci DNA. Vzhledem k délce DNA by takovýto proces trval velmi dlouho a byl by proto značně neefektivní [2, 3]. Je proto pravděpodobné, že při vazbě TF k DNA hrají roli komplikovanější mechanismy.

Serum Response Factor (SRF) je TF, který se váže k sekvenci DNA nazývané CArG box nacházející se například v promotoru lidského genu *c-fos*. Při vazbě nejspíše hraje významnou roli strukturní flexibilita CArG boxu [4]. Tato sekvence DNA je vzhledem k sekvenci nukleotidů teoreticky schopná tvorby vlásenky, resp. kruciformy. Takto výrazná odchylka od dvoušroubovicové struktury by mohla značně urychlovat rozpoznávání CArG boxu a vysvětlovat vysokou afinitu SRF k CArG boxu.

Studium DNA pomocí NMR

Jednou z výhod NMR (jaderné magnetické rezonance) je, že jako sondu využívá jádra přirozeně přítomná ve studovaném vzorku, na rozdíl od některých jiných experimentálních metod není třeba přidávat žádná kontrastní činidla či vzorek jinak upravovat.

Rezonanční frekvence jádra závisí na jeho chemickém okolí. Pro studium nukleových kyselin to tedy znamená, že rezonanční frekvence závisí na typu nukleotidu, pozici atomu v daném nukleotidu, pozici nukleotidu v molekule DNA, ale i na struktuře celé molekuly. Zajímá-li nás struktura úseku DNA, NMR nám může poskytnout cenné informace.

Cíle práce

Cílem této práce je studovat krátké sekvence DNA se sekvencí odpovídající CArG boxu v lidském genu *c-fos* pomocí NMR a rozhodnout, zda lze prokázat tvorbu vlásenek. Prvním krokem je změření teplotních závislostí ^1H spekter v rozsahu 274–356 K a přiřazení signálů jednotlivým atomům ve studovaných vzorcích na základě analýzy dvourozměrných spekter ^1H – ^1H NOESY a ^1H – ^{13}C HMBC.

Dalším krokem je interpretace naměřených spekter z hlediska sekundárních struktur přítomných ve studovaných vzorcích a určení termodynamických parametrů těchto struktur, zejména teploty tání. Posledním krokem je vyhodnocení výsledků a rozhodnutí, zda lze tvorbu vlásenek pokládat za prokázanou, či nikoli.

1. Deoxyribonukleová kyselina

DNA je jedním ze základních stavebních kamenů života na planetě Zemi. V DNA jsou uloženy instrukce pro syntézu všech proteinů produkovaných v daném organismu, resp. v dané buňce. Dalším důvodem, proč je DNA nezbytná pro život, je dědičnost – přenos DNA a v ní obsažené genetické informace umožňuje přenos informací o specifické syntéze proteinů v daném organismu mezi generacemi.

Základními jednotkami DNA jsou nukleotidy skládající se z fosfátu, sacharidu a dusíkaté báze. V DNA se vyskytují čtyři typy dusíkatých bází – purinové báze guanin (Gua) a adenin (Ade) a pyrimidinové báze thymin (Thy) a cytosin (Cyt) [5]. Cukernou jednotkou v DNA je 2'-deoxyribóza, čímž se DNA odlišuje od RNA, ve které je ribóza. Nukleotidy se mezi sebou váží esterovou vazbou mezi deoxyribózou a fosfátem a tvoří dlouhé řetězce obsahující obrovské množství bází (například 22. lidský chromosom obsahuje $48 \cdot 10^6$ bázových párů [6]).

1.1 Struktura DNA

Struktura DNA má, stejně jako například struktura proteinů, několik úrovní. Z hlediska této práce jsou podstatné první dvě úrovně struktury DNA – primární a sekundární.

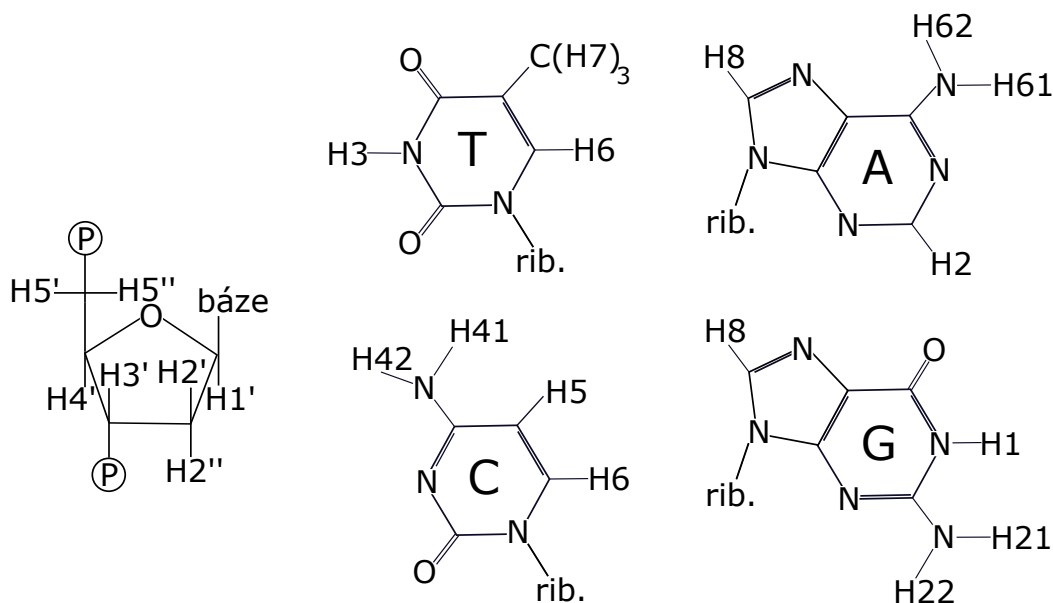
1.1.1 Primární struktura

Nejnižší úrovní struktury DNA je tzv. primární struktura, která je daná pořadím nukleotidů. Sekvence DNA se zapisuje obvykle ve směru od 5'-konce k 3'-konci, obvykle jakožto posloupnost nukleotidů. Jednotlivé nukleotidy jsou značeny počátečním písmenem dané báze a číslem značícím pořadí nukleotidu v dané sekvenci (vzestupně od 5'-konce k 3'-konci), označením A7 je tedy myšlen adenin, který je v sekvenci na pozici 7. Jednotlivé atomy se značí pomocí značky a čísla nukleotidu a značky a čísla atomu, například A7H2 znamená vodík č. 2 v 7. adeninu. Pro odlišení atomů v bázi a sacharidu jsou atomy v deoxyribóze označeny čárkou [7], například A7H1' je vodík č. 1 v deoxyribóze 7. adeninu (obr. 1.1). Označením H6(*i*) je myšlen vodík H6 v *i*-tém nukleotidu.

Chceme-li popisovat relativní pozice částí DNA vzhledem ke konkrétní sekvenci, lze využít pojmy „*upstream*“ a „*downstream*“. *Upstream* označuje část DNA předcházející dané sekvenci (ve smyslu směru sekvence od 5'-konce k 3'-konci), *downstream* část DNA následující.

1.1.2 Sekundární struktura DNA

Struktura bází nukleových kyselin umožňuje vznik vodíkových můstků mezi různými bázemi, díky čemuž může docházet k párování bází. Nejběžnější jsou tzv. Watsonovy-Crickovy páry bází (obr. 1.2), kdy dochází k tvorbě dvou vodíkových můstků v páru A–T a tří vodíkových můstků v páru C–G. Tvorba vodíkových můstků patří mezi interakce umožňující tvorbu sekundárních struktur DNA sestávajících z jednoho či více vláken. Nejčastější sekundární strukturou DNA je dvoušroubovice. Kromě nejstabilnější formy dvoušroubovice, tzv. B formy, jsou



Obrázek 1.1: Standardní číslování atomů vodíku v deoxyribóze (vlevo) a v bázích DNA dle [8], vodíky thiminového methylu lze souhrnně označit ThyM7, rib. označuje místo navázání báze k deoxyribóze.

dobře popsány další dvě varianty: A a Z. Formy A a B jsou pravotočivé, zatímco forma Z je levotočivá. Jednotlivé varianty se kromě točivosti liší i řadou dalších parametrů, mimo jiné jednotlivými torzními úhly (podrobněji například v [9]).

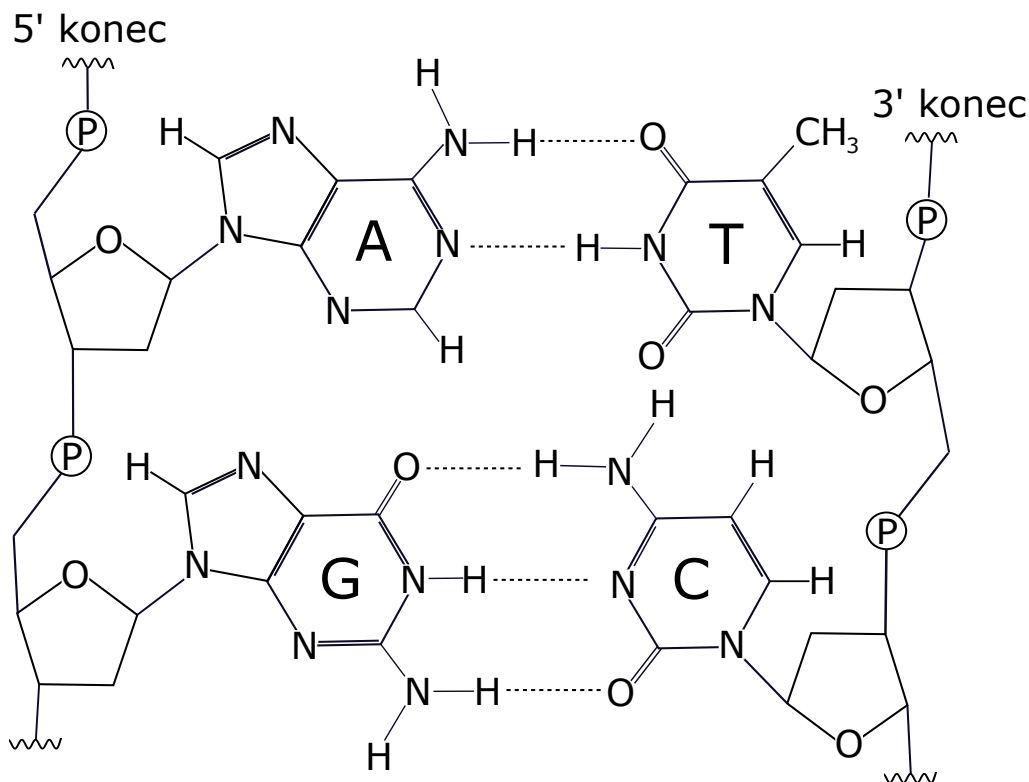
Kromě dvoušroubovic může DNA tvořit i méně obvyklé struktury. Mezi ně patří vlásenka, jedná se o jednovláknovou strukturu na částečně selfkomplementárním úseku DNA. V selfkomplementární části úseku dochází k párování bází v rámci jednoho vlákna, neselfkomplementární část sekvence dává vzniknout charakteristické hlavičce vlásenky (levá část obr. 1.3). Dojde-li k tvorbě vlásenky na obou vláknech dvojvláknové DNA, hovoříme o kruciformě. Kruciformy hrají podstatnou roli v celé řadě procesů zahrnujících DNA, včetně regulace genové exprese [10].

Méně obvyklé formy DNA mohou obsahovat i jiné typy bázeových párů, než Watsonovy-Crickovy. Jedná se například o Hoogsteenovo párování bází umožňující vznik triplexů nebo o guanosinové kvadruplexy [9].

1.1.3 Stabilizace struktury DNA

Výše zmíněné vodíkové vazby přispívají ke stabilitě DNA jen velmi málo [11], musí tedy existovat další interakce stabilizující strukturu DNA. První z nich je tzv. *stacking* neboli patrová interakce – ve dvoušroubovici jsou aromatické kruhy bází orientovány rovnoběžně a dochází mezi nimi k interakcím stabilizujícím strukturu. *Stacking* zvyšuje uspořádanost struktury, snižuje tedy entropii systému, jeho vznik proto musí být ethalpicky hnaná reakce [11].

Ve vodných roztocích je *stacking* podpořen hydrofobními silami. DNA se skládá z nepolárních bází a polární cukr-fosfátové kostry, dochází proto k orientaci hydrofobních částí molekuly směrem dovnitř a hydrofilních částí směrem ven.



Obrázek 1.2: Watsonovy-Crickovy páry bází DNA, tečkovaně jsou vyznačeny vodíkové vazby.

Dalším jevem podstatným pro stabilitu DNA je interakce s ionty. DNA obsahuje fosfát, který je v přirozených podmínkách záporně nabitý, celá molekula DNA má proto záporný náboj. Pokud by nedocházelo k odstínění tohoto náboje, elektrostatické odpuzování mezi molekulami DNA (i mezi jednotlivými částmi jedné molekuly) by způsobilo okamžitý rozpad sekundární struktury. V buňkách je tento náboj odstíněn kationty, například Mg^{2+} , Na^+ a K^+ . Koncentrace kationtů má výrazný vliv na teplotu tání, například pro Na^+ platí pro dlouhé úseky DNA vztah [11]:

$$T_m = 41.1X_{(G+C)} + 16.6 \log \frac{[\text{Na}^+]}{c_0} + 81.5, \quad (1.1)$$

kde T_m je teplota tání ve $^{\circ}\text{C}$, $X_{(G+C)}$ je molární zlomek G–C párů a c_0 je referenční koncentrace.

1.2 Transkripce

Transkripce je proces, při kterém dochází k přepisu genetické informace z DNA do RNA. Po transkripci následuje translace, kdy jsou na základě genetické informace v RNA syntetizovány proteiny. Regulace transkripce tedy přímo ovlivňuje charakter a množství látek syntetizovaných v buňce. To je pro organismy velmi podstatné, umožňuje to přizpůsobení se změnám vnějších podmínek i syntézu látek potřebných v dané fázi buněčného cyklu.

Při transkripci je RNA syntetizována enzymem RNA polymeráza [9], který se specificky váže na konkrétní sekvence v DNA, takzvané promotory. Promotor

tedy reguluje syntézu genů, které po něm následují v sekvenci DNA. Samotná syntéza RNA začíná po sestavení takzvaného aktivovaného transkripčního komplexu, jehož součástí je RNA polymeráza.

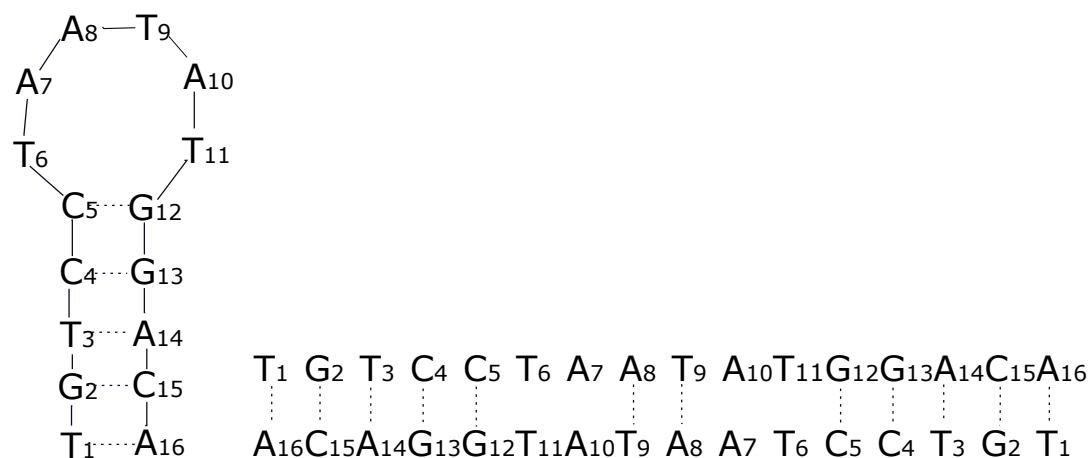
1.2.1 Transkripční faktory

Transkripční faktory (TF) jsou proteiny, které se selektivně váží ke specifickým sekvencím v DNA a ovlivňují tím rychlost iniciace transkripce. Specifita této vazby je velmi vysoká, afinita regulačních proteinů k jiným sekvencím DNA je nižší o 4–6 řádů [9]. Lze je rozdělit do tří skupin [11], do první skupiny patří obecné TF nezbytné k syntéze veškeré mRNA. U eukaryot se jedná například o TBP (*TATA-binding protein*), který se váže na vysoce konzervovanou sekvenci DNA nazývanou TATA box [9]. Druhou skupinu tvoří TF, které se váží ke specifickým sekvencím *upstream* od místa iniciace. Do poslední skupiny patří takzvané indukovatelné TF, které fungují podobně jako předchozí skupina, musí ale být aktivovány. Mezi ně patří SRF (*Serum Response Factor*), který se váže na sekvenci SRE (*Serum Respons Element*) v DNA, je aktivován fosforylací [12].

1.2.2 Regulace exprese genu *c-fos*

Gen *c-fos* patří mezi takzvané geny časně reakce (*early response genes*), které jsou aktivovány dlouho předtím, než buňka vstoupí do S fáze buněčného cyklu. Tento gen kóduje transkripční faktor *c-Fos*, který spolu s dalšími TF reguluje expresi mnoha genů kódujících proteiny nezbytné pro změny v buňce během buněčného cyklu [12]. Součástí promotoru genu *c-fos* je SRE, jehož částí je tzv. CArG box [4], což je vysoce konzervovaná sekvence DNA. Při vazbě SRF k CArG boxu nejspíše hraje významnou roli strukturní flexibilita CArG boxu [4].

Sekvence CArG boxu z lidského genu *c-fos* je částečně selfkomplementární, což teoreticky umožňuje tvorbu dvou typů sekundárních struktur (obr. 1.3). Prvním typem je duplex s několika nukleotidy neúčastnícími se Watsonových-Crickových bázevých párů v prostřední části, druhou možnou sekundární strukturou je vlá-



Obrázek 1.3: Možné sekundární struktury sekvence DNA promotoru lidského genu *c-fos*, čárkovaně jsou vyznačeny Watsonovy-Crickovy páry bází očekávané v dané struktuře.

senka. Z hlediska snahy o rozhodnutí, zda dochází k tvorbě vlásenek, či duplexů, jsou podstatné zejména dva zásadní rozdíly mezi těmito strukturami. Prvním je to, že se výrazně liší struktura prostřední části sekvence pro duplex a pro vlásenku. Lze tedy očekávat, že chemické okolí například A7 v duplexu bude značně odlišné od chemického okolí stejného nukleotidu ve vlásence. Druhým zásadním rozdílem je to, že duplex je bimolekulární struktura, zatímco vlásenka je unimolekulární, závislost jejich teploty tání na koncentraci se proto musí lišit.

1.3 Termodynamika tvorby sekundárních struktur DNA

Při zvyšování teploty dochází k postupnému změně podílu samostatných vláken a vláken s danou sekundární strukturou, relativní podíl samostatných molekul se označuje θ . Fyzikální veličinou podstatnou pro popis tohoto jevu je teplota tání T_m , kterou definujeme jako teplotu, při které přesně polovina molekul jsou samostatná vlákna, tedy $\theta = 0,5$. Výhoda této definice teploty tání je, že na rozdíl od některých jiných používaných definic dává stejné výsledky nehledě na použitou metodu zpracování dat [13].

Termodynamickým potenciálem vhodným pro popis chemických reakcí je Gibbsova volná energie G definovaná takto [14]:

$$G = H - TS, \quad (1.2)$$

kde T je teplota, H je enthalpie a S je entropie. Za konstantního tlaku a teploty pro spontánní reakce platí:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0, \quad (1.3)$$

kde Δ značí změny veličin během chemické reakce. Spontánní reakce lze rozdělit na reakce hnané entropicky a ethalpicky. Při ethaplicky hnaných reakcích je v rovnici (1.3) záporný člen ΔH , při entropicky hnaných reakcích člen $-T\Delta S$.

Termodynamika tvorby a rozpadu sekundární struktury DNA závisí na konkrétní sekundární struktuře. Z hlediska sekvence CArG boxu lidského genu *c-fos* je proto zajímavá tvorba vlásenky a duplexu sestávajícího ze dvou stejných molekul.

1.3.1 Tvorba vlásenky

Reakci tvorby a rozpadu vlásenky lze popsat rovnicí:



kde S je samostatné vlákno s rozpadlými bázovými páry, V je vlásenka, k_1 je rychlostní konstanta tvorby vlásenek a k_2 je rychlostní konstanta rozpadu vlásenek. Za předpokladu, že zastoupení částečně rozpadlých struktur je zanedbatelné, je celková koncentrace rovna součtu koncentrací samostatných vláken a vlásenek, a platí:

$$\theta = \frac{[S]}{[S] + [V]} = \frac{[S]}{c_t}, \quad (1.5)$$

kde hranatými závorkami značíme koncentraci a c_t je celková koncentrace DNA v roztoku. Rovnovážná konstanta K_a udává poměr koncentrace produktů a reaktantů v rovnováze, pro reakci (1.4) ji lze vyjádřit takto [13]:

$$K_a = \frac{[V]}{[S]}. \quad (1.6)$$

Závislost rovnovážné konstanty na teplotě popisuje van't Hoffova rovnice [15]:

$$\ln K_a(T) = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (1.7)$$

kde R je normální plynová konstanta. Závislost rychlostních konstant na teplotě je dána Eyringovou rovnicí [15]:

$$k_1(T) = \frac{kT}{h} e^{\Delta G_a/RT}, \quad (1.8)$$

kde k je Boltzmanova konstanta, h je Planckova konstanta a ΔG_a je Gibbsova aktivační energie.

Z rovnice (1.5) je zřejmé, že pro vlásenku při teplotě tání platí:

$$[S] = [V], \quad (1.9)$$

dosazením do rovnice (1.6) získáme:

$$K_a = 1. \quad (1.10)$$

Pro teplotu tání vlásenky tedy dle rovnice (1.7) platí:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S}. \quad (1.11)$$

Dosadíme-li do rovnice (1.5) za $[V]$ z rovnice (1.6), získáme rovnici pro závislost relativní koncentrace samostatných vláken na teplotě:

$$\theta(T) = \frac{1}{1 + K_a(T)}. \quad (1.12)$$

1.3.2 Tvorba duplexu ze dvou stejných molekul

Reakci tvorby a rozpadu duplexu ze dvou stejných molekul lze popsat rovnicí:



kde S je samostatné vlákno a D je duplex. Za předpokladu, že zastoupení částečně rozpadlých struktur je zanedbatelné, platí:

$$\theta = \frac{[S]}{[S] + 2[D]} = \frac{[S]}{c_t}. \quad (1.14)$$

Rovnovážnou konstantu K_a lze pro reakci (1.13) vyjádřit jako [13]:

$$K_a = \frac{[D]}{[S]^2}, \quad (1.15)$$

při teplotě tání tedy bude $K_a = \frac{1}{c_t}$. Dosazením do rovnice (1.7) získáme vztah pro teplotu tání selfkomplementárního duplexu:

$$T_m = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \frac{c_t}{c_0}}, \quad (1.16)$$

kde referenční koncentrace $c_0 = 1\text{M}$. Pro závislost relativní koncentrace samostatných vláken na teplotě lze z rovnic (1.14) a (1.15) odvodit vztah:

$$\theta(T) = \frac{\sqrt{1 + 8K_a(T)c_t} - 1}{4K_a(T)c_t}. \quad (1.17)$$

Srovnáme-li vztahy popisující termodynamiku vlásenky a duplexu, vidíme, že se liší. Nejvýraznějším rozdílem je to, že teplota tání i podíl samostatných vláken vlásenky nezávisí na koncentraci (rovnice (1.11) a (1.12)), zatímco pro duplex (rovnice (1.16) a (1.17)) jsou tyto veličiny koncentračně závislé. Pomocí analýzy termodynamických parametrů lze tedy tyto dva typy sekundárních struktur rozlišit.

2. Jaderná magnetická rezonance

NMR je metoda využívající interakce jaderných momentů vzorku vloženého ve statickém magnetickém poli s proměnným radiofrekvenčním polem. NMR je citlivá na chemické okolí daného jádra a proto je vhodná ke studiu struktury DNA.

2.1 Jaderný spin a magnetický moment

Vlastní moment hybnosti jádra se nazývá jaderný spin, značí se \mathbf{I} . Velikost průmětu spinu do směru osy z (resp. do směru libovolné osy, dále bez újmy na obecnosti budeme uvažovat průměty do směru osy z) je kvantovaná takto:

$$I_z = m\hbar, \quad (2.1)$$

kde m je magnetické kvantové číslo a \hbar je redukováná Planckova konstanta, přičemž platí:

$$m = -I, -I + 1, \dots, I - 1, I, \quad (2.2)$$

kde I je spinové kvantové číslo nabývající malých poločíselných hodnot $0, \frac{1}{2}, 1, \frac{3}{2}, \dots$. Z rovnic (2.1) a (2.2) tedy plyne, že možných projekcí spinu do směru osy z je $(2I + 1)$.

Nulový spin mají jádra se sudým počtem protonů i neutronů, tzv. sudo–sudá jádra [16], mezi ně patří například v přírodě nejhojněji zastoupený izotop uhlíku ^{12}C . Spinové kvantové číslo $\frac{1}{2}$ mají například izotopy ^1H , ^{13}C a ^{31}P .

Magnetický moment jádra $\boldsymbol{\mu}$ je přímo úměrný jadernému spinu, jeho průmět do osy z je určen vztahem:

$$\mu_z = \gamma I_z, \quad (2.3)$$

konstanta úměrnosti γ je tzv. gyromagnetický poměr. Makroskopickou jadernou magnetizaci \mathbf{M} poté definujeme takto:

$$\mathbf{M} = \sum_i \boldsymbol{\mu}_i, \quad (2.4)$$

přičemž sčítáme přes všechna jádra ve vzorku.

2.2 Interakce se statickým magnetickým polem

Bez přítomnosti magnetického pole je jaderná energetická hladina $(2I + 1) \times$ degenerovaná. K sejmutí této degenerace dochází, vložíme-li jádro do statického magnetického pole. Interakci statického magnetického pole \mathbf{B}_0 s jaderným magnetickým momentem popisuje tzv. Zeemanův hamiltonián:

$$H_Z = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B}_0. \quad (2.5)$$

Po vložení jádra do statického magnetického pole dochází k precesi jaderné magnetizace kolem směru statického magnetického pole [17], frekvence precese je tzv. Larmorova frekvence ω_L :

$$\omega_L = \gamma B_0. \quad (2.6)$$

Směr statického magnetického pole můžeme bez újmy na obecnosti pokládat za osu z , vlastní hodnoty energie systému popsaného rovnicí (2.5) jsou poté:

$$E_m = -\mu_z B_0 = -m\gamma\hbar B_0, \quad (2.7)$$

dochází tedy k rozštěpení na $(2I + 1)$ hladin. Tyto hladiny jsou ekvidistantní, energetický rozdíl mezi sousedními hladinami je

$$\Delta E = \gamma\hbar B_0. \quad (2.8)$$

Vzhledem k rozdílným energiím jednotlivých hladin nejsou tyto hladiny populovány rovnoměrně, distribuce populací popisuje Boltzmanovo rozdělení. Z tohoto důvodu dochází ke vzniku makroskopické magnetizace ve směru externího magnetického pole. Bude-li na systém působit záření o frekvenci

$$\omega_0 = \frac{\Delta E}{\hbar} = \gamma B_0, \quad (2.9)$$

dojde k indukování přechodů mezi těmito hladinami. Frekvence ω_0 se nazývá rezonanční a je shodná s Larmorovou frekvencí. NMR je založená na sledování přechodů mezi těmito hladinami. Z rovnice (2.7) je zřejmé, že ke štěpení vlivem magnetického pole dochází pro jádra s nenulovým spinem. Při studiu biologických vzorků pomocí NMR se proto velmi často detekuje signál vodíku ^1H . Nejhojněji zastoupený izotop uhlíku ^{12}C má nulový spin a není tedy v NMR detekovatelný, proto je často využíván izotop ^{13}C se spinem $\frac{1}{2}$. Vzhledem k jeho nízkému přirozenému zastoupení lze k měření použít vzorky izotopově obohacené ^{13}C , není to ale nezbytné pro všechny typy experimentů.

2.3 Interakce s proměnným magnetickým polem

Pokud chceme popsat interakci systému jaderných spinů v konstantním magnetickém poli B_0 s radiofrekvenčním pulzem, zajímá nás interakce spinového systému s proměnným magnetickým polem \mathbf{B} :

$$\mathbf{B}(t) = \mathbf{B}_0 + \mathbf{B}_{\text{rf}}(t), \quad (2.10)$$

kde časově závislá část magnetického pole je v případě harmonického radiofrekvenčního pulzu rovna:

$$\mathbf{B}_{\text{rf}}(t) = B_1 (\cos(\omega_{\text{rf}}t + \varphi); \sin(\omega_{\text{rf}}t + \varphi); 0). \quad (2.11)$$

Interakci proměnného magnetického pole se systémem jaderných spinů popisují Blochovy rovnice [18]:

$$\begin{aligned} \frac{dM_x(t)}{dt} &= \gamma(M_y B_z - M_z B_y) - \frac{M_x}{T_2}, \\ \frac{dM_y(t)}{dt} &= \gamma(M_z B_x - M_x B_z) - \frac{M_y}{T_2}, \\ \frac{dM_z(t)}{dt} &= \gamma(M_x B_y - M_y B_x) - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \end{aligned} \quad (2.12)$$

kde T_1 je podélná (longitudiální) relaxační doba a T_2 je příčná (transverzální) relaxační doba. Efektivní magnetické pole v soustavě souřadné korotující s radiofrekvenčním polem má tvar:

$$\mathbf{B}(t) = (B_1 \cos \varphi; B_1 \sin \varphi; -\Omega/\gamma), \quad (2.13)$$

kde $-\Omega/\gamma = -B_0 - \gamma\omega_{\text{rf}} = \gamma(\omega_0 - \omega_{\text{rf}})$ je efektivní magnetické pole v ose z . Jaderné spiny tedy cítí ve směru osy z menší magnetické pole, než v nepřítomnosti radiofrekvenčního pulzu.

Pulz délky τ způsobí rotaci magnetizace M_0 o úhel β [18]:

$$\beta = -\gamma B_1 \tau. \quad (2.14)$$

2.3.1 Volná precese

Magnetizace systému, který je v rovnováze s externím magnetickým polem, je rovnoběžná se směrem externího magnetického pole (osa z). Uvažujme jednoduchý experiment, kdy na systém v rovnováze zapůsobí pulz ve směru osy y (tj. $\varphi = \frac{\pi}{2}$ v rovnici (2.13)). Za předpokladu, že tento pulz je dostatečně krátký, abychom mohli zanedbat relaxační procesy během jeho působení, bude magnetizace bezprostředně po konci pulzu:

$$\mathbf{M}(0_+) = (M_0 \sin \beta; 0; M_0 \cos \beta). \quad (2.15)$$

Vývoj následující po jediném pulzu se nazývá FID (*Free Induction Decay*, česky signál volné precese), lze ho popsat pomocí vývoje složek magnetizace M_x a M_y v korotující soustavě souřadné (dle Blochových rovnic (2.12)):

$$\begin{aligned} M_x(t) &= M_0 \sin \beta \cos(\Omega t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right), \\ M_y(t) &= M_0 \sin \beta \sin(\Omega t) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \end{aligned} \quad (2.16)$$

Ke komplexnímu značení přejdeme zavedením $M^+(t)$:

$$M^+(t) = M_x(t) + iM_y(t) = M_0 \sin \beta \exp\left(i\Omega t - \frac{t}{T_2}\right) \quad (2.17)$$

a poté pomocí komplexní Fourierovy transformace získáme komplexní spektrum [18]:

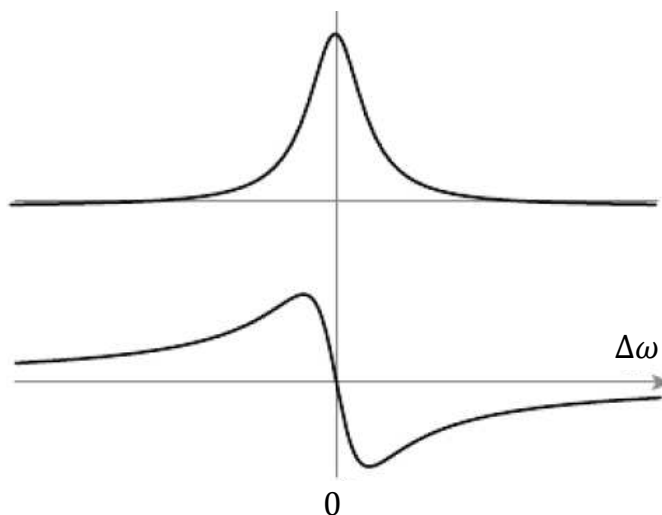
$$S(\omega) = v(\omega) + iu(\omega), \quad (2.18)$$

kde reálná a imaginární složka spektra jsou:

$$\begin{aligned} v(\omega) &= M_0 \sin \beta a(\Delta\omega), \\ u(\omega) &= -M_0 \sin \beta d(\Delta\omega), \end{aligned} \quad (2.19)$$

$\Delta\omega = \omega - \Omega$ je frekvence vyjádřená vzhledem k rezonanční frekvenci. Funkce $a(\Delta\omega)$ popisuje absorpční složku signálu a $d(\Delta\omega)$ je disperzní složka:

$$a(\Delta\omega) = \frac{1/T_2}{(1/T_2)^2 + (\Delta\omega)^2}, \quad d(\Delta\omega) = \frac{\Delta\omega}{(1/T_2)^2 + (\Delta\omega)^2}. \quad (2.20)$$



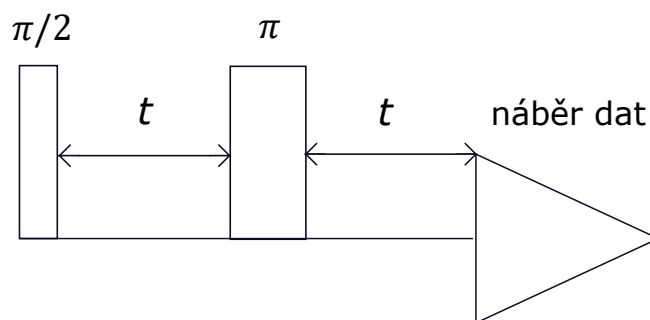
Obrázek 2.1: Absorpční a disperzní složka signálu, převzato z [19].

Z rovnice (2.19) je zřejmé, že nejvyšší intenzity signálu dosáhneme pro $\beta = \frac{\pi}{2}$, tedy v případě tzv. $\frac{\pi}{2}$ pulzu. Na obr. 2.1 je zobrazena absorpční a disperzní složka signálu. Maximální výška absorpční složky je v případě $\frac{\pi}{2}$ pulzu T_2 , šířka absorpční složky v polovině maxima (FWHM) je úměrná $1/T_2$. Vidíme tedy, že se zvyšující se rychlostí relaxace (tj. klesající T_2) dochází k rozšiřování signálu a snižování maximální intenzity a naopak.

2.3.2 Spinové echo

V předchozí části byla popsána interakce systému jaderných spinů s jediným pulzem. V praxi se běžně používají sekvence sestávající z více pulzů, nejjednodušší takovou sekvencí je tzv. spinové pulzní echo. Jedná se o sekvenci sestávající z jednoho $\frac{\pi}{2}$ pulzu a jednoho π pulzu (obr. 2.2). Zapůsobíme-li na systém jaderných spinů ve statickém magnetickém poli $\frac{\pi}{2}$ pulzem, dojde k vychýlení magnetizace ze směru statického magnetického pole do příčné roviny, přičemž po skončení pulzu bude magnetizace precesovat kolem směru statického magnetického pole. Rychlost precese pro jednotlivá jádra ve vzorku se mírně liší, proto dochází k postupnému rozfázování spinů a poklesu příčné složky magnetizace. Zapůsobíme-li v čase t na systém π pulzem, dojde k překlopení magnetizace o úhel π kolem směru pulzu. Po skončení tohoto pulzu budou spiny nadále precesovat, vzhledem k překlopení π pulzem dochází k postupnému vyrovnávání rozfázování. V čase $2t$ dojde ke sfázování všech spinů a tedy ke vzniku takzvaného spinového echa, které můžeme detekovat.

Výhodou spinového echa je, že tímto způsobem lze měřit i signál od jader s velmi krátkým signálem volné precese, u kterých dochází k velmi rychlému rozfázování. Při měření s jediným $\frac{\pi}{2}$ pulzem se měřitelný signál objevuje bezprostředně po konci pulzu, vzhledem k mrtvé době detektoru proto vždy část signálu ztrácíme, nelze tedy takto měřit jádra s krátkým signálem FID. Při měření pomocí spinového echa není třeba snímat signál bezprostředně po pulzu a tento problém odpadá.



Obrázek 2.2: Pulzní sekvence pro měření spinového echa.

2.4 Chemický posuv

Z rovnice (2.9) je zřejmé, že velikost rezonanční frekvence je přímo úměrná intenzitě magnetického pole B_0 . Ve skutečnosti je rezonanční frekvence jádra přímo úměrná intenzitě magnetického pole B_{loc} v místě daného jádra, které se může od externího magnetického pole mírně lišit. Důvodem je reakce elektronů na přítomnost externího magnetického pole, kdy v elektronovém oblaku dochází k indukování magnetického momentu, což ovlivňuje magnetické pole v místě jádra:

$$B_{\text{loc}} = B_0(1 - \sigma), \quad (2.21)$$

kde σ je chemické stínění. Změna magnetického pole v místě konkrétního jádra závisí na rozložení elektronů v jeho okolí, rezonanční frekvence se proto liší pro jádra s odlišným chemickým okolím.

Z rovnice (2.21) je zřejmé, že velikost stínění σ nezávisí na velikosti externího pole. Proto se v NMR spektrech rezonanční frekvence zobrazují pomocí chemického posuvu δ udávaného v ppm (*parts per million*):

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{\text{standard}}}{\omega_{\text{standard}}}, \quad (2.22)$$

kde ω je rezonanční frekvence daného jádra a ω_{standard} je rezonanční frekvence standardu. Pro měření vzorků rozpuštěných v pufru na vodní bázi se jako standard pro vodík ^1H i uhlík ^{13}C používá například 4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina (DSS). Z historických důvodů se chemický posuv v NMR spektrech zobrazuje rostoucí zprava doleva.

2.5 Přímá dipól-dipólová interakce

Atomové jádro se chová jako magnetický dipól, generuje proto magnetické pole závislé na směru spinu. Jsou-li dvě jádra poblíž sebe, dochází k interakci mezi magnetickým polem prvního jádra a spinem druhého jádra a naopak, tato interakce se nazývá přímá dipól-dipólová interakce. K této interakci dochází jak mezi jádry v rámci jedné molekuly, tak v různých molekulách. V izotropních kapalinách dochází k časovému vystředování této interakce na nulu, není proto viditelná přímo, vede ale k procesu tzv. kros-relaxace způsobující efekt NOE (*Nuclear Overhauser Effect*). Při NOE dochází k přenosu magnetizace mezi jádry, která spolu interagují přímou dipól-dipólovou interakcí. Její intenzita klesá se šestou

mocninou vzdálenosti mezi jádry, k měřitelnému NOE proto dochází mezi jádry ^1H , jejichž vzájemná vzdálenost je menší, než přibližně 5 Å. Tedy, dokážeme-li zjistit, mezi jakými dvojicemi jader dochází k NOE, zjistíme, která jádra jsou v prostoru blízko sebe, což je klíčový krok při studiu struktury molekul. Dvojice jader s NOE jsou viditelné ve spektrech NOESY (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*).

2.6 Nepřímá dipól-dipólová interakce

Nepřímá dipól-dipólová interakce neboli J-vazba je interakce mezi jadernými spiny zprostředkovaná elektrony. Na magnetické pole generované jádrem prvního atomu reagují elektrony. Díky tomu jádro druhého atomu spojeného chemickou vazbou s prvním atomem nepřímo cítí spinový stav prvního jádra, tato informace se může přenést i přes několik chemických vazeb. Jádro se spinem $\frac{1}{2}$ (například ^1H) má dvě možné projekce spinu do osy z , $+\frac{1}{2}\hbar$ a $-\frac{1}{2}\hbar$, signál jiného jádra svázaného s tímto jádrem J-vazbou se proto rozštěpí na dvě čáry, tzv. dublet. V případě DNA dochází k tomuto štěpení u cytosinového vodíků H6 díky interakci s vodíkem H5. U thyminového vodíku H6 dochází k rozštěpení na kvadruplet díky interakci s methylem M7, protože methyl obsahující tři vodíky ^1H má čtyři možné projekce spinu do osy z (z kvantově mechanických pravidel pro skládání momentů hybnosti víme, že složením tří spinů $\frac{1}{2}$ získáme systém s možnými magnetickými kvantovými čísly $+\frac{3}{2}$, $+\frac{1}{2}$, $-\frac{1}{2}$ a $-\frac{3}{2}$, podrobněji viz [20]).

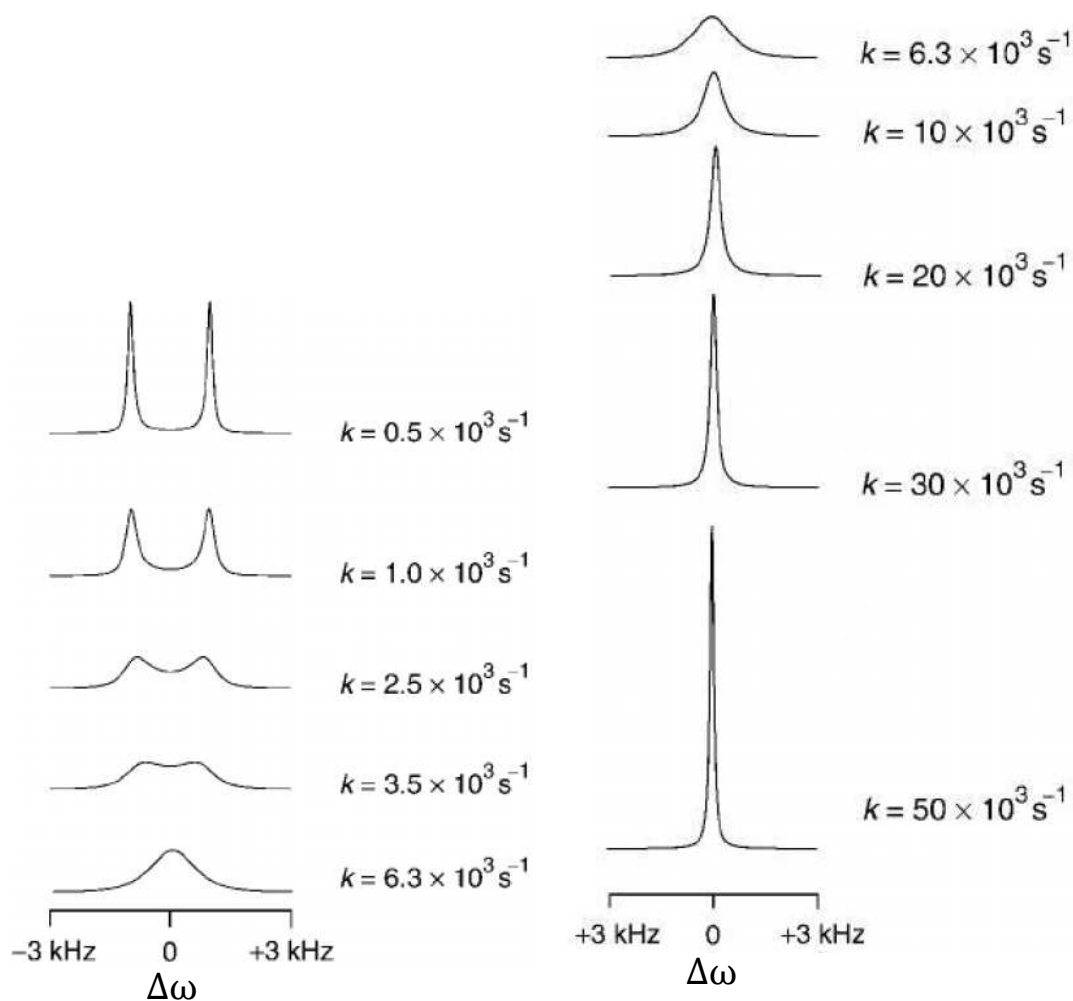
Pomocí dipól-dipólové interakce lze určit, které signály patří jádrům nacházejícím se ve stejné molekule. Na tomto principu funguje například pulzní sekvence HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*).

2.7 Chemická výměna

Chemická výměna je proces, při kterém dochází ke změně chemického okolí daného jádra, což vede k ovlivnění chemického posuvu daného jádra. V případě DNA se jedná například o tvorbu a rozpad sekundárních struktur. Vliv chemické výměny na spektra NMR závisí na poměru rychlosti chemické výměny a rozdílu frekvencí ve stavech, mezi kterými dochází k výměně. Pokud je rychlost výměny výrazně menší, než rozdíl frekvencí, ve spektru uvidíme dva signály, každý pro jeden přítomný stav. Při rychlé symetrické dvoustavové chemické výměně uvidíme ve spektru pouze jeden signál na pozici odpovídající průměrné frekvenci daného jádra v obou stavech (obr. 2.3).

2.8 Pulzní experimenty NMR

Základem pulzní metody NMR je využívání pulzních sekvencí sestávajících z jednoho či více pulzů. Dvě základní pulzní sekvence – jediný pulz a spinové echo – už byly zmíněny výše (sekce 2.3.1 a 2.3.2). Prvním typem experimentů jsou jednorozměrné experimenty. Druhým typem experimentů jsou dvourozměrné experimenty, ty lze dále rozdělit na experimenty homonukleární (například ^1H – ^1H NOESY) a heteronukleární (například ^1H – ^{13}C HMBC).



Obrázek 2.3: Nasimulovaná spektra pro symetrickou dvoustavovou chemickou výměnu, vlevo jsou spektra pro pomalou chemickou výměnu, vpravo pro rychlou, k je rychlost chemické výměny. Převzato z [19].

2.8.1 Jednorozměrné experimenty

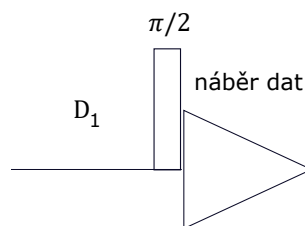
Jednorozměrné experimenty jsou základním typem NMR experimentů. Z naměřených dat získáme spektrum pomocí Fourierovy transformace. Výsledkem takového experimentu je takzvané jednorozměrné spektrum – jednorozměrnost se vztahuje k počtu frekvenčních os. Tato spektra tedy mají jednu osu s chemickým posuvem daného izotopu, druhá osa odpovídá intenzitě signálu.

Pulzní sekvence zg

Nejjednodušší pulzní sekvence pro měření jednorozměrných spekter je pulzní sekvence zg sestávající z jediného $\frac{\pi}{2}$ pulzu (obr. 2.4) popsaná v sekci 2.3.1.

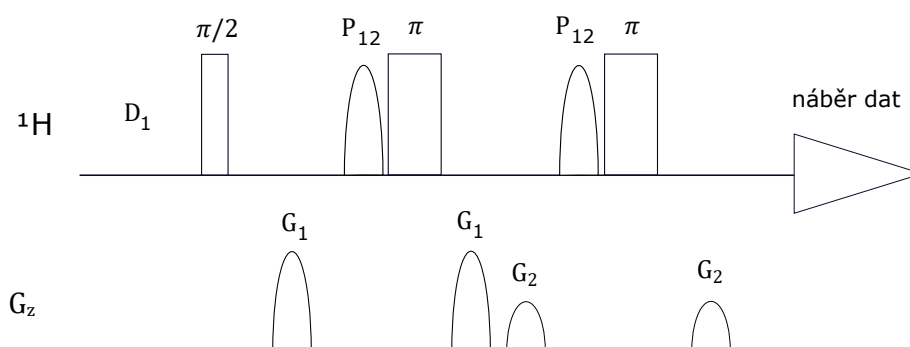
Pulzní sekvence $zgesgp$

Další pulzní sekvencí, kterou lze použít pro měření jednorozměrných spekter, je pulzní sekvence $zgesgp$ (obr. 2.5). Tato sekvence vychází ze sekvence pro měření spinového echa a navíc obsahuje blok pro potlačení signálu rozpouštědla [21].



Obrázek 2.4: Pulzní sekvence *zg*.

Nejprve je magnetizace sklopena neselektivním $\frac{\pi}{2}$ pulzem do příčné roviny, poté dochází k rozfázování magnetizace gradientním pulzem G_1 . Další částí sekvence je dlouhý selektivní π pulz na frekvenci rozpouštědla, který překlápí magnetizaci jader s chemickým posuvem odpovídajícím rozpouštědлу, magnetizace ostatních jader daného izotopu se nezmění. Následuje neselektivní π pulz, který překlápí magnetizaci všech jader daného izotopu, magnetizace rozpouštědla se tedy na rozdíl od ostatních jader vrací do směru, ve kterém byla bezprostředně po gradientním pulzu. Druhý gradientní pulz G_1 proto magnetizaci rozpouštědla ještě více rozfázuje, zatímco u ostatních jader dochází ke sfázování, a tedy k návratu do stavu před prvním gradientním pulzem. Blok obsahující gradientní pulzy G_2 také rozfázuje magnetizaci rozpouštědla, u magnetizace ostatních jader opět dochází ke sfázování. Díky tomu dochází k výraznému potlačení signálu rozpouštědla, je tedy možné například měřit ^1H spektra při použití vody jakožto rozpouštědla.



Obrázek 2.5: Pulzní sekvence *zgesgp* pro měření jednorozměrných spekter s potlačením rozpouštědla, kde ^1H označuje kanál na frekvenci daného izotopu a G_z označuje kanál gradientů ve směru osy z . Obdélníky jsou neselektivní pulsy se sklápěcím úhlem π , resp. $\frac{\pi}{2}$, pulzy P_{12} jsou selektivní π pulzy na frekvenci rozpouštědla.

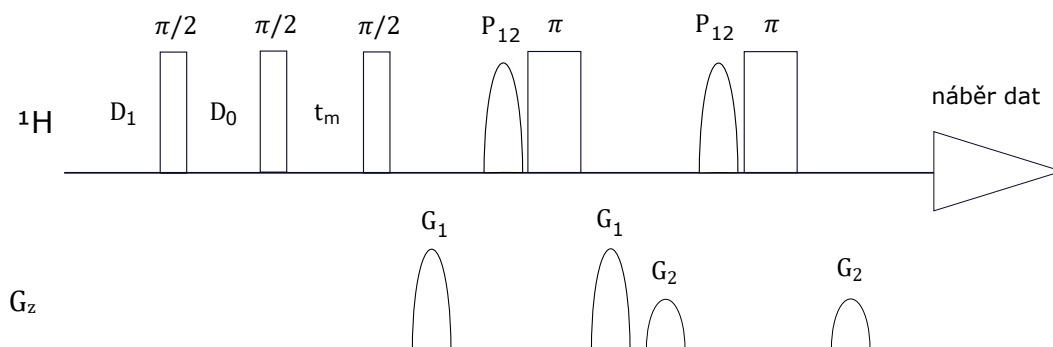
2.8.2 Dvourozměrné experimenty

Další rozměr ve spektrech získáme tak, že změříme mnoho spekter (několik desítek) pomocí pulzní sekvence lišící se vždy v jednom parametru (například s různou prodlevou mezi dvěma pulzy). Nabraná data pro každý řádek (měření s jednou hodnotou proměnného parametru) zvlášť zpracujeme Fourierovou transformací a poté provedeme Fourierovu transformaci v tzv. nepřímé dimenzi podle

parametru lišícího se pro jednotlivé řádky. Výsledkem je spektrum s dvěma frekvenčními osami a jednou intenzitní osou. V případě homonukleárních experimentů odpovídají obě frekvenční osy chemickým posuvům stejného izotopu, v případě heteronukleárních experimentů odpovídá každá frekvenční osa chemickým posuvům jiného izotopu.

^1H - ^1H NOESY

Experiment ^1H - ^1H NOESY je homonukleární experiment zviditelňující dvojice jader s NOE [17]. První částí jeho pulzní sekvence *noesyegpph* (obr. 2.6) je blok NOESY skládající se ze tří $\frac{\pi}{2}$ pulzů. Čas t_m se nazývá směšovací čas, během kterého dochází k vývoji NOE, čas D_0 se liší pro jednotlivé řádky. Druhou částí pulzní sekvence je blok pro potlačení signálu vody fungující stejně, jako potlačení signálu rozpouštědla v sekvenci *zgesgp*.

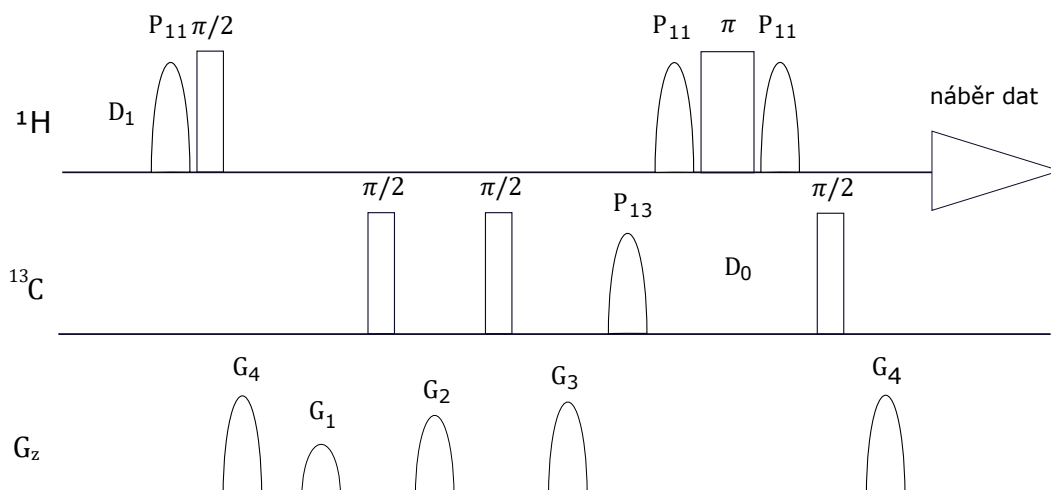


Obrázek 2.6: Pulzní sekvence *noesyegpph* pro měření ^1H - ^1H NOESY spekter, kde ^1H označuje vodíkový kanál a G_z označuje kanál gradientů ve směru osy z . Obdélníky jsou neselektivní pulzy se sklápěcím úhlem π , resp. $\frac{\pi}{2}$, pulzy P_{12} jsou selektivní π pulzy na frekvenci vody.

Mimodiagonální krosníky ve dvourozměrném spektru NOESY odpovídají dvojícím jader s NOE. Je-li tedy ve spektru krosník na pozici $(\delta_1; \delta_2)$, znamená to, že mezi vodíky s chemickým posuvem δ_1 a δ_2 dochází k měřitelnému NOE a jejich vzájemná vzdálenost je menší, než přibližně 5 Å. Tato informace je klíčová při přiřazování signálů ve spektrech jednotlivým vodíkům v molekule a při určování struktury. Intenzita jednotlivých krosníků je nepřímo úměrná šesté mocnině vzdálenosti mezi jádry, což může pomoci při určování struktury.

^1H - ^{13}C HMBC

^1H - ^{13}C HMBC experiment je heteronukleární experiment zviditelňující nepřímou dipól-dipólovou interakci mezi jádry ^{13}C a ^1H , mezi kterými dochází k přenosu polarizace na vzdálenost více vazeb. K jeho měření lze využít pulzní sekvenci *shmbcgpl2ndwg* [22], která pro potlačení signálu vody využívá sekvenci WATERGATE [23]. První dva $\frac{\pi}{2}$ pulzy na frekvenci ^{13}C fungují jako filtr, přes který neprojdou korelace přes jednu chemickou vazbu. Ve výsledném spektru proto uvidíme pouze signály odpovídající dvojícím jader, mezi kterými je J-vazba přes více chemických vazeb. Ve spektru HMBC jsou tedy krosníky na frekvencích



Obrázek 2.7: Pulzní sekvence *shmbcgp12ndwg* pro měření ^1H - ^{13}C HMBC spekter, kde ^1H označuje vodíkový kanál, ^{13}C označuje uhlíkový kanál a G_z označuje kanál gradientů ve směru osy z. Obdélníky jsou neselektivní pulsy se sklápěcím úhlem π , resp. $\frac{\pi}{2}$, pulzy P_{11} jsou selektivní π pulzy na frekvenci vody, pulz P_{13} je selektivní $\frac{\pi}{2}$ pulz pro ^{13}C , G_1 - G_4 jsou gradientní pulzy.

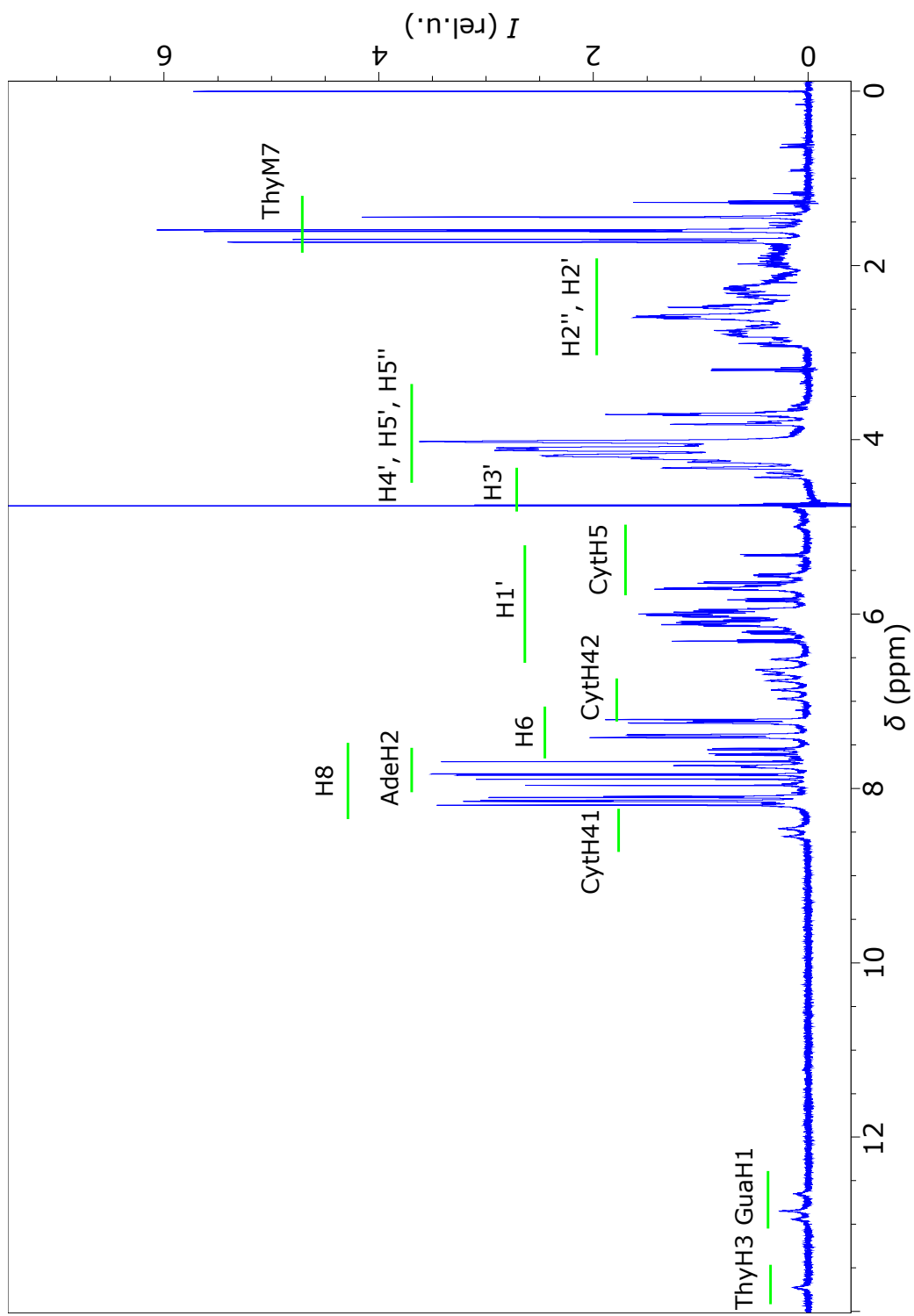
odpovídajících dvojicím ^{13}C a ^1H , které jsou v jedné molekule a jsou od sebe vzdáleny dvě nebo tři vazby. Pro podrobný popis této sekvence je třeba použít plně kvantový přístup (např. v [16]).

2.9 NMR spektroskopie DNA

Z hlediska studování vlastností DNA jsou podstatné zejména dvě oblasti ^1H spektra (obr. 2.8). První oblastí je část spektra obsahující signály s chemickými posuvy mezi 7,0 ppm a 8,5 ppm. V této oblasti jsou signály vodíků H6/H8, Ade H2, Cyt H41 a Cyt H42. Tato oblast je zajímavá, protože obsahuje alespoň jeden signál pro každý nukleotid v sekvenci, přičemž tyto signály jsou dobře rozlišitelné v celém rozsahu teplot zajímavém z hlediska studia tání DNA. Mezi další výhody této části spektra patří to, že obsahuje výrazně méně překryvů, než jiné oblasti, což je mimo jiné způsobeno tím, že signály v této oblasti jsou výrazně méně často štěpené J-vazbou, než části spektra obsahující signály z deoxyribózy. Signály GuaH8, AdeH8 a AdeH2 jsou singlety, signál CytH6 je dublet a signál ThyH6 je slabě štěpený kvartet. Další oblastí s dobře odlišenými signály je oblast mezi 1 ppm a 2 ppm obsahující signály thyminových methylů ThyM7.

Pro studium termodynamických vlastností DNA jsou signály vodíků H6/H8, AdeH2 a ThyM7 zajímavé, protože díky jejich dobré rozlišitelnosti lze z jejich přiřazení při jedné teplotě určit přiřazení i pro ostatní teploty, není tedy třeba pracně určovat přiřazení pro každou teplotu zvlášť.

Nejvyšší chemický posuv mají iminovodíky, ve spektrech jsou vidět ThyH1 a GuaH3. Tyto vodíky se účastní vodíkových vazeb ve Watsonových-Crickových párech bází, znamená to tedy, že ve spektru v této oblasti vidíme jeden signál na každý bázevý pár. Při vyšších teplotách se kvůli chemické výměně s vodou



Obrázek 2.8: ^1H spektrum vzorku s2fos16a při 300 K s vyznačenými typickými chemickými posuny jednotlivých vodíků v DNA (dle [24])

vytrácí ze spektra, na rozdíl od dříve zmíněných vodíků je proto nelze sledovat v celém rozsahu teplot zajímavém z hlediska tání DNA.

Signály vodíků deoxyribózy se nachází mezi 2 ppm a 7 ppm. Z obr. 2.8 je patrné, že u nich dochází k výrazným překryvům, což je způsobeno mimo jiné i četným štěpením. Na rozdíl od vodíků H6/H8, AdeH2 a ThyM7 proto ne vždy lze jednoznačně z přiřazení při jedné teplotě určit jejich přiřazení i při ostatních teplotách.

Chemické posuvy jsou ovlivněny strukturou DNA, existuje například strategie pro předpovědi chemických posuvů jednotlivých vodíků v dané sekvenci pro případ B-DNA [25, 26, 27]. Tyto predikce vychází z publikovaných hodnot chemických posuvů vodíků v B-DNA a zohledňují kromě pozice jádra v nukleotidu a typu nukleotidu také dva sousední nukleotidy, přičemž chemický posuv vodíků v krajních nukleotidech je zpřesněn korekcí. Udávaná přesnost této metody je 0,032 ppm [25].

2.9.1 Strategie pro přiřazování ^1H rezonancí v NMR spektrech B-DNA

Pro přiřazování vodíkových rezonancí v NMR spektrech B-DNA existují standardní strategie [28, 29]. Pro tento účel jsou nejvhodnější spektra ^1H - ^1H NOESY [28], nejzajímavější je pro přiřazování část spektra obsahující krosníky aromatických H6/H8 s H1' (obr. 2.9). Tato oblast kromě intraresiduálních krosníků H6/H8(i) \times H1'(i) obsahuje i sekvenční krosníky H6/H8(i) \times H1'($i - 1$) [29]. Díky tomu lze přiřadit rezonance H6/H8 k jednotlivým bázím a celou sekvenci takzvaně vytrasovat.

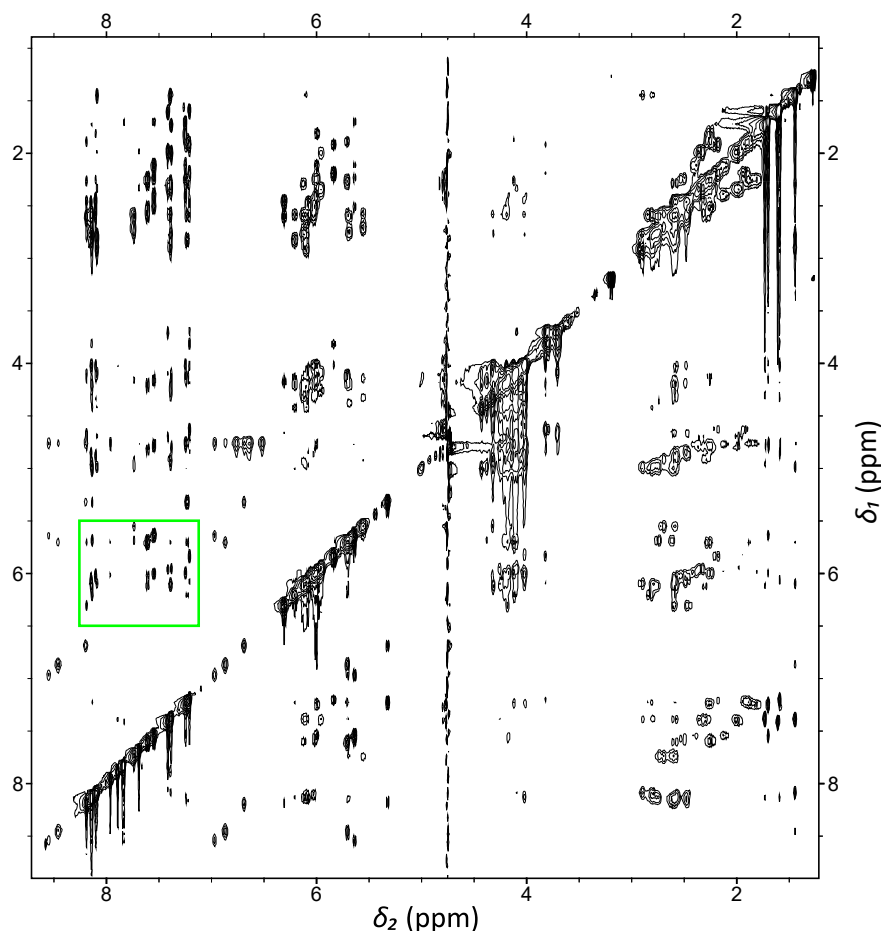
Pro rozhodnutí nejasností při vytrasování sekvence v oblasti krosníků H6/H8 s H1' lze využít i další části spektra. Mezi ně patří oblast krosníků H2'/H2''(i) s H6/H8($i, i + 1$), ve které lze sekvenci rovněž vytrasovat. Přiřazení H2'/H2'' a H1' lze potvrdit pomocí intraresiduálních krosníků H2'/H2''(i) s H1'(i). Dalším typem vodíků se zřetelnými krosníky jsou thyminové methyly M7, k jejich přiřazení lze využít krosníky M7(i) s H6(i) a H6/H8 ($i - 1$) a krosníky M7(i) \times H1'($i - 1$).

Dalším zdrojem informací ve spektrech NOESY je část spektra pod diagonálou. Vzhledem k časové náročnosti získávání vyššího rozlišení v nepřímé dimenzi je rozlišení v přímé dimenzi vždy výrazně lepší. V oblasti krosníků H6/H8 s H1' nad diagonálou je proto výrazně lepší rozlišení mezi sousedními H6/H8 než mezi H1'. Pod diagonálou je situace opačná, čehož lze při přiřazování využít.

V oblasti krosníků H6/H8 s H1' se vyskytují ještě krosníky cytosinových H6 s H5 [29] – jedná se vždy o jeden velmi silný krosník pro každý cytosin. Dalším typem krosníků v této oblasti jsou krosníky adeninových H2 s H1', které ale nejsou vždy snadno identifikovatelné.

Mezi další vodíky, které lze na základě spekter NOESY přiřadit, patří vodíky cytosinových aminoskupin H42 a H42, které lze přiřadit dle velmi silných intraresiduálních krosníků s H5 a H6.

Velmi podstatnou informaci obsahují signály iminovodíků – jedná se o thyminové H3 a guaninové H1, které se účastní vodíkových můstků ve Watsonových-Crickových párech bází. Díky této pozici jsou velmi blízko některým vodíkům z protější báze, ve spektrech můžeme najít krosníky ThyH3 s AdeH2 pro případ bázevého páru A-T a pro případ bázevého páru C-G krosníky GuaH1 s CytH41,



Obrázek 2.9: ^1H - ^1H NOESY spektrum vzorku s2fos16b při teplotě 300 K, zeleně je vyznačena oblast obsahující krosníky H6/H8 \times H1' vhodná k vytrasování sekvence.

CytH42 a CytH5 [29].

Při přiřazování AdeH2 lze kromě krosníků AdeH2 s AdeH1' a s ThyH3 také využít toho, že vodíky AdeH2 i AdeH8 mají J-vazbu na uhlík AdeC4 [22]. Ve spektrech ^1H - ^{13}C HMBC proto v oblasti krosníků AdeH2 a AdeH8 s uhlíky pozorujeme krosníky AdeH2 \times AdeC4 a AdeH8 \times AdeC4. Známe-li přiřazení AdeH8, můžeme přiřadit signály AdeC4 a poté AdeH2.

2.10 Analýza závislosti chemického posuvu na teplotě

Uvažujme sekvenci DNA, jejíž sekundární struktura je vlásenka, jejíž tvorbu lze popsat rovnicí (1.4). Závislost chemického posuvu signálu atomu v takovéto molekule na teplotě lze v případě rychlé chemické výměny popsat rovnicí:

$$\delta(T) = p_V \delta_V(T) + p_S \delta_S(T), \quad (2.23)$$

kde p_V je relativní koncentrace vlásenek ve vzorku, p_S je relativní koncentrace volných vláken,

$$\begin{aligned}\delta_V(T) &= a + bT \\ \delta_S(T) &= c + dT\end{aligned}\tag{2.24}$$

jsou nízkoteplotní, resp. vysokoteplotní, limita popisující chemický posuv vlásenek, resp. volných vláken, modelované jako lineární funkce T s parametry a a b , resp. c a d . Relativní koncentrace lze vyjádřit pomocí θ :

$$p_S = \theta, \quad p_V = 1 - \theta,\tag{2.25}$$

což lze dle rovnice (1.12) vyjádřit takto:

$$p_S = \frac{1}{1 + K_a}, \quad p_V = \frac{K_a}{1 + K_a}\tag{2.26}$$

Dosadíme-li do rovnice (2.23) dle vztahu (2.26), získáme výsledný vztah pro závislost chemického posuvu signálu vodíku z vlásenky na teplotě:

$$\delta(T) = \frac{\delta_S(T) + \delta_V(T)K_a}{1 + K_a},\tag{2.27}$$

přičemž pro rychlostní konstantu K_a platí dle van't Hoffovy rovnice (1.7):

$$K_a = e^{-\Delta H/RT - \Delta S/R}.\tag{2.28}$$

Parametry a , b , c , d , ΔH a ΔS lze určit pomocí nafitování naměřených závislostí chemického posuvu jednotlivých vodíků na teplotě. Z hodnot ΔH a ΔS lze dle rovnice (1.11) určit teplotu tání pro jednotlivé vodíky. Obdobný vztah lze odvodit i pro případ duplexu ze dvou stejných vláken.

3. Použité experimentální metody

3.1 Vzorky

V rámci této práce byly studovány krátké úseky DNA z promotoru k lidského genu *c-fos*. Délka studovaných sekvencí byla 12, 14 a 16 nukleotidů, nejdelší sekvence byla zkoumána ve dvou různých koncentracích (tab. 3.1). Delší vzorek obsahuje vždy o jeden nukleotid více na obou koncích, tyto nukleotidy tvoří bázeový pár (na obr. 1.3 jsou zobrazeny možné sekundární struktury nejdelšího vzorku). Vzorky byly syntetizovány, čištěny pomocí HPLC a opakovaně lyofilizovány firmou AtdBio.

Tabulka 3.1: Sekvence a koncentrace studovaných vzorků.

vzorek	sekvence	počet nukleotidů	c^a (μM)
s2fos12	TCCTAATATGGA	12	797 \pm 4
s2fos14	GTCCTAATATGGAC	14	933 \pm 5
s2fos16a	TGTCCTAATATGGACA	16	866 \pm 4
s2fos16b	TGTCCTAATATGGACA	16	161 \pm 1

^akoncentrace byla určena z fosforových spekter

3.1.1 Příprava vzorků

Lyofilizované vzorky byly rozpuštěny v pufru, jehož složení je v tabulce 3.2. Jako rozpouštědlo byla použita směs 90 % deionizované vody a 10 % D₂O, jako standard byla použita DSS. Pufr byl vytvořen smícháním dvou roztoků. První roztok kromě rozpouštědla a standardu obsahoval Na₂HPO₄ a NaCl, druhý NaH₂PO₄ a NaCl, koncentrace Na a P v obou roztocích byly shodné s koncentracemi ve výsledném pufru. Roztoky byly smíchány v takovém poměru, aby pH pufru bylo 7, přičemž pH bylo v průběhu míchání měřeno. Vzorky DNA byly rozpuštěny v 0,6 ml pufru.

Tabulka 3.2: Složení pufru.

složka	c (mM)
P	25
Na ⁺	200
DSS	0,1

3.2 NMR spektroskopie

V této práci byla pro studium DNA využita celá řada NMR experimentů, a to jak jednodimenzionálních, tak i dvoudimenzionálních. V tabulce 3.3 je seznam všech izotopů, jejichž spektra byla v rámci této práce měřena.

Tabulka 3.3: Parametry izotopů, jejichž spektra byla v rámci této práce měřena [30].

izotop	I	frekvence ^a (MHz)	zastoupení v přírodě (%)
¹ H	$\frac{1}{2}$	500,13	99,9885
¹³ C	$\frac{1}{2}$	125,76	1,07
³¹ P	$\frac{1}{2}$	202,46	100,00

^av magnetickém poli 11,7 T

3.2.1 Spektrometr

Pro měření všech spekter byl použit spektrometr Bruker Avance III HD s magnetickým polem 11,7 T, což odpovídá rezonanční frekvenci 500,13 MHz pro vodík ¹H. Tento spektrometr je vybaven nástrojem TopShim pro automatické nastavování homogenity magnetického pole pomocí korekčních cívek, což umožňuje dosažení vysoké homogenity magnetického pole v celém objemu vzorku.

Byla využita sonda BBFO, která obsahuje kromě kanálu pro ¹H také kanál pro ²D využívaný pro tzv. lock. Třetím kanálem této sondy je širokopásmový laditelný kanál využívaný v rámci této práce pro ¹³C a ³¹P.

3.2.2 ¹H spektra a jejich teplotní závislosti

Pro měření ¹H spekter byla použita sekvence *zgesgp* (obr. 2.5), parametry měření jsou v tabulce 3.4. ¹H spektra byla změřena pro všechny vzorky v rozsahu teplot 274–356 K s krokem 2 K (to odpovídá 42 spektrům pro každý vzorek). Mezi změnou teploty a následujícím měřením byl vždy časový úsek 15 minut dostatečný pro ustálení tepelné rovnováhy ve vzorku.

3.2.3 Měření koncentrace DNA

Pro určení koncentrace DNA lze využít fosforu přirozeně obsaženého v DNA. Pokud je v pufru, ve kterém je rozpuštěná DNA, obsažený fosfor, lze pomocí ³¹P spektra (obr. 3.1) zjistit díky známé koncentraci fosforu v pufru určit koncentraci DNA. Spektra ³¹P byla měřena pomocí pulzní sekvence *zg* (obr. 2.4) při teplotě 298 K, parametry pulzní sekvence jsou v tabulce 3.4. Aby byly naměřené integrální intenzity přímo úměrné koncentraci fosforu, byla měření provedena s dlouhou opakovací dobou (součet D1 a AQ).

Tabulka 3.4: Parametry při měření 1D spekter.

parametr	značka	¹ H spektra	³¹ P spektra
pulzní sekvence	PULPROG	zgesgp	zg
počet nabíraných bodů	TD	32 768	16 384
šířka spektra (ppm)	SWH	19,99	19,98
doba akvizice (s)	AQ	1,64	2,03
zisk detektoru	RG	28,5	203
prodleva mezi skeny (s)	D1	1,0	60
počet dummy skenů	DS	4 ^a 0 ^b 64 ^c	0
počet skenů	NS	256 ^d 1280 ^e	128
frekvence (MHz)	SFO1	500,13	202,46
střed spektra (ppm)	O1	4,72	3,50
délka tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (μ s)	P1	10	20
délka selektivního π pulzu (ms)	P12	4,0	–
výkon tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (W)	PLW1	29	19
výkon selektivního π pulzu (W)	SPW1	0,004	–
intenzita gradientu G ₁ (%)	GPZ1	31	–
intenzita gradientu G ₂ (%)	GPZ2	11	–
délka gradientních pulzů (ms)	P16	1,0	–

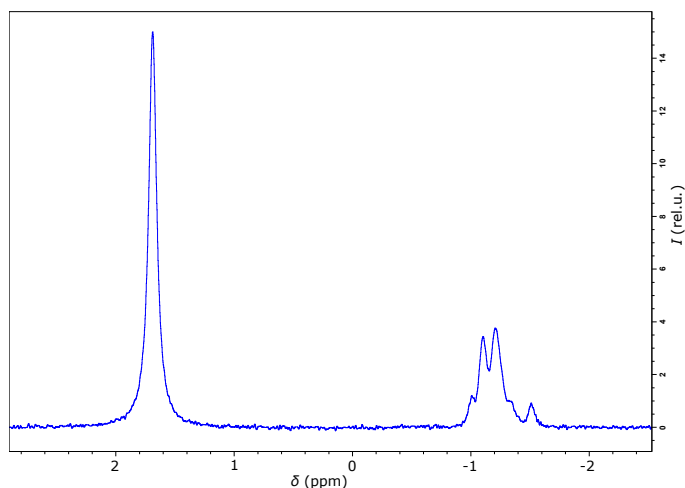
^aVzorky s2fos14, s2fos16a a s2fos16b

^bVzorek s2fos12

^cVzorky s2fos12, s2fos14 a s2fos16a

^dVzorek s2fos16b, spektra při teplotě 274–304 K

^eVzorek s2fos16b, spektra při teplotě 306–356 K



Obrázek 3.1: ³¹P spektrum vzorku s2fos16 pro určení koncentrace, intenzivnější signál s chemickým posuvem 1,7 ppm patří fosforu v pufru, signál s chemickým posuvem $-0,9$ ppm až $-1,6$ ppm patří DNA.

3.2.4 2D spektroskopie

Vzhledem k možným sekundárním strukturám studovaných vzorků (obr. 1.3) lze očekávat, že pro část sekvence odpovídající krajům duplexu, resp. stonku vlásenky, se struktura nebude příliš lišit od B-DNA. Na druhou stranu je zjevné, že struktura prostřední části sekvence bude značně odlišná od B-DNA, zejména v této části nemůže být párování bází shodné s běžným párování v B-DNA. Lze tedy předpokládat, že strategie pro přiřazování vodíkových rezonancí v NMR spektrech B-DNA dle spekter NOESY [28, 29] budou dobře fungovat pro kraje sekvence, zatímco pro střední část sekvence bude docházet k určitým odchýlkám.

Tabulka 3.5: Parametry při měření spekter společné pro všechna spektra ^1H - ^1H NOESY.

parametr	značka	1. dimenze ^a	2. dimenze ^b
pulzní sekvence	PULPROG	noesyegpph	
počet nabíraných bodů	TD	4096	512
šířka spektra (ppm)	SW	19,99	19,99
doba akvizice (s)	AQ	0,2048	0,0256
zisk detektoru	RG	203	
prodleva mezi skeny (s)	D1	1,0	
počet dummy skenů	DS	16	
frekvence (MHz)	SFO	500,13	500,13
střed spektra (ppm)	O	4,72	4,72
délka tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (μs)	P1	10	
délka selektivního π pulzu (ms)	P12	4,0	
výkon tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (W)	PLW1	29	
výkon selektivního π pulzu (W)	SPW1	0,003	
intenzita gradientního pulzu G_1 (%)	GPZ1	31	
intenzita gradientního pulzu G_2 (%)	GPZ2	11	
délka gradientních pulzů (ms)	P16	1,0	

^aPřímá dimenze, ^bnepřímá dimenze

Tabulka 3.6: Parametry při měření spekter ^1H - ^1H NOESY lišící se pro jednotlivá spektra.

vzorek	NS	t_m (ms)	T (K)
s2fos12	100	500	300
	100	250	300
	24	500	308
s2fos14	80	500	300
	80	500	284
s2fos16a	110	500	300

Vzhledem ke zjevným odchylkám párování bází ve střední části sekvence je zřejmé, že nebude možné přiřadit signály AdeH2 díky krospektrům s ThyH3. Z tohoto důvodu je třeba využít spektra HMBC.

Prvním typem 2D spekter využitých ke studiu struktury DNA v rámci této práce jsou spektra NOESY. Pro měření těchto spekter byla použita pulzní sekvence *noesyegpph* (obr. 2.6), parametry jednotlivých měření jsou uvedeny v tabulkách 3.5 a 3.6.

Tabulka 3.7: Parametry při měření spekter ^1H - ^{13}C HMBC společné pro všechny vzorky.

parametr	značka	1. dimenze ^a	2.dimenze ^b
pulzní sekvence	PULPROG	shbmcgpl2ndwg	
počet nabíraných bodů	TD	2048	^c
šířka spektra (ppm)	SW	19,99	^c
doba akvizice (s)	AQ	0,1024	^c
zisk detektoru	RG	203	
prodleva mezi skeny (s)	D1	1,0	
počet dummy skenů	DS	4	
počet skenů	NS	1800	
frekvence (MHz)	SF0	500,13	125,78
střed spektra (ppm)	O	4,72	^c
délka tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (μs)	P1/P3	8,5	9,5
délka selektivního π pulzu (ms)	P11	2,0	–
výkon tvrdého $\frac{\pi}{2}$ pulzu (W)	PLW1/PLW2	29	100
výkon selektivního π pulzu (W)	SPW1	25,23	–
délka selektivního $\frac{\pi}{2}$ pulzu (ms)	P13	–	4,0
výkon selektivního $\frac{\pi}{2}$ pulzu (W)	SPW14	–	0,0016
intenzita gradientního pulzu G_1 (%)	GPZ1	15	
intenzita gradientního pulzu G_2 (%)	GPZ2	-10	
intenzita gradientního pulzu G_3 (%)	GPZ3	-5	
intenzita gradientního pulzu G_4 (%)	GPZ4	-31	
délka gradientních pulzů (ms)	P16	1,0	

^aPřímá dimenze, ^bnepřímá dimenze

^cHodnoty pro jednotlivé vzorky jsou v tabulce 3.8

Druhým typem 2D spekter měřených v rámci této práce jsou spektra ^1H - ^{13}C HMBC. Jedná se o heteronukleární spektra využívající kromě vodíku ^1H i uhlík ^{13}C měřená pomocí pulzní sekvence *shbmcgpl2ndwg* (obr. 2.6), parametry měření jsou v tabulkách 3.7 a 3.8. Tato měření byla použita pro přiřazení signálů AdeH2 po předchozím přiřazení signálů AdeH8 z NOESY. Za povšimnutí stojí to, že bylo možné tato měření provést a získat z nich potřebné informace i přes velmi nízké zastoupení izotopu uhlíku ^{13}C v přírodě (tab. 3.3) bez nutnosti použít vzorky tímto izotopem obohacené.

Vzhledem k četným překryvům ve spektrech nelze vždy najít teplotu, při které by byly všechny signály H8/H6 rozlišené, pro vzorky s2fos12 a s2fos14 bylo proto nezbytné změřit spektra NOESY při více různých teplotách.

Tabulka 3.8: Parametry při měření spekter ^1H - ^{13}C HMBC lišící se pro jednotlivé vzorky.

parametr	značka	s2fos12	s2fos14	s2fos16a
šířka spektra ^a (ppm)	SW	3,0	3,0	2,5
střed spektra ^a (ppm)	O	149,30	148,18	147,95
počet nabíraných bodů ^a	TD	32	38	64
teplota (K)	TE	308	300	300
doba akvizice ^a (s)	AQ	0,0424	0,0504	0,1018

^aV nepřímé dimenzi

4. Výsledky experimentů a jejich diskuze

4.1 Určení koncentrace vzorků

Koncentrace jednotlivých vzorků byla určena z fosforových spekter měřených při pokojové teplotě. Všechny naměřené koncentrace byly minimálně $1,25 \times$ vyšší, než koncentrace udávané výrobcem (tab. 4.1).

Tabulka 4.1: Určení koncentrace jednotlivých vzorků.

vzorek	N_P^a	$I_{DNA}(\text{rel.u.})^b$	$c_{DNA}(\mu\text{M})$	k^c
s2fos12	11	0,3508	797 ± 4	1,25
s2fos14	13	0,4854	933 ± 5	1,26
s2fos16a	15	0,5193	866 ± 4	1,27
s2fos16b	15	0,0965	161 ± 1	1,53

^aPočet atomů fosforu v jedné molekule DNA,

^bRelativní integrální intenzita signálu ^{31}P normalizovaná vzhledem k $I_{\text{pufr}}=1$

^cPoměr koncentrace určené z fosforových spekter a koncentrace udávané výrobcem (firmou AtdBio)

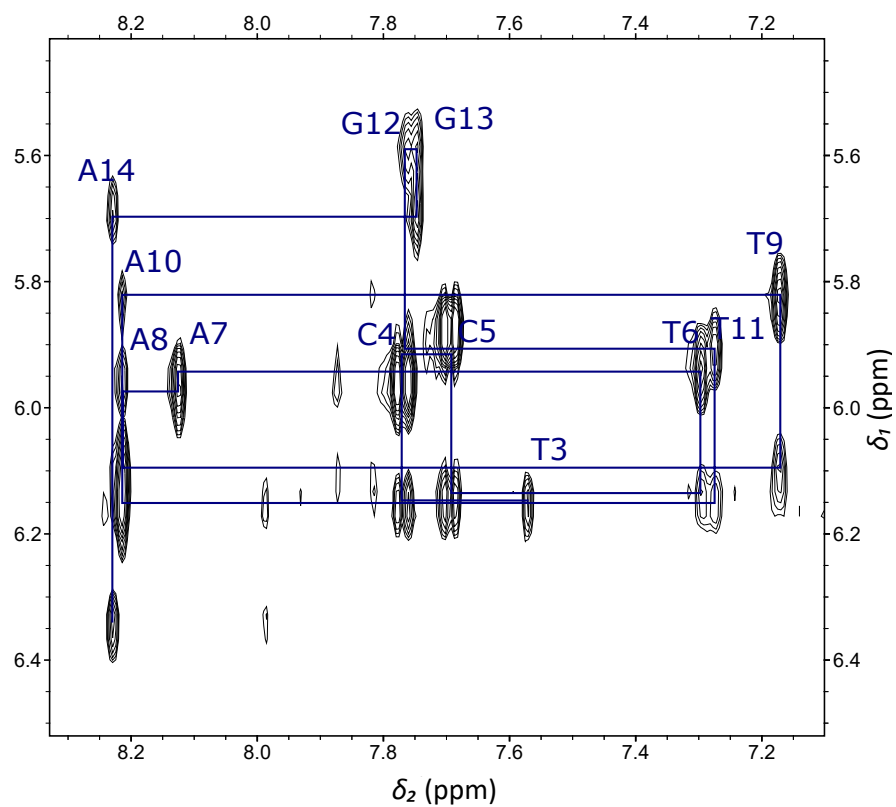
4.2 Přiřazení vodíkových signálů ve spektrech zkoumaných vzorků

Celé přiřazování bylo provedeno v programu Sparky.

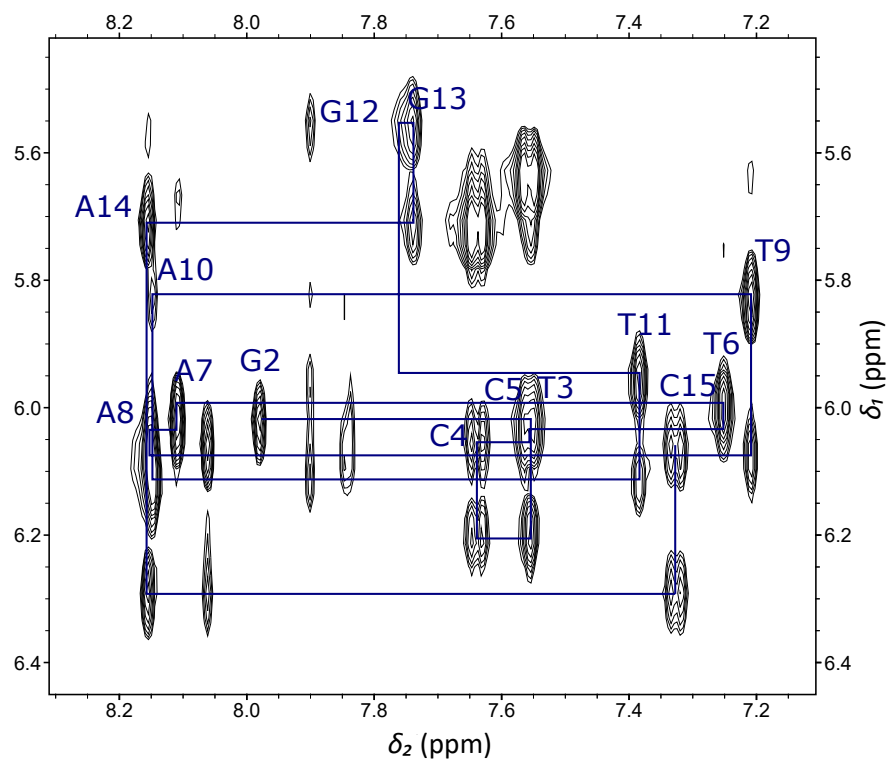
Na obrázcích 4.1–4.3 je zobrazeno vytrasování krosníků H6/H8 s H1' pro všechny tři studované sekvence DNA. Vzhledem k četným překryvům jak v oblasti H6/H8, tak v oblasti H1', nebylo možné provést jednoznačné vytrasování jen na základě této oblasti. U vzorku s2fos12 ve spektru NOESY při 300 K bylo možné rozlišit A8H1' a T9H1' díky krosníku T9M7 \times A8H1'. Pro přiřazení C4H6 a C5H6, které mají ve všech vzorcích velmi blízký chemický posuv, byla podstatná oblast krosníků thyminových methylů M7(*i*) s H6(*i*) a H6/H8(*i* – 1). Jejich odlišení bylo možné díky krosníkům s T6M7, protože ve spektru je přítomný krosník C5H6 s T6M7 mezi sousedícími bázemi, C4H6 obdobný krosník nemá, protože je příliš daleko od T6M7.

Vodíky CytH5 bylo možné přiřadit díky intraresiduálním krosníkům CytH6 \times CytH5. Ve výřezu ze spektra vzorku s2fos16a (obr. 4.3) jsou vidět pouze dva takovéto krosníky, přestože tento vzorek obsahuje tři cytosiny. Jedná se o dva intenzivní krosníky s chemickým posuvem v přímé dimenzi $\delta_2 \in (7,60; 7,80)$ a v nepřímé dimenzi $\delta_1 \in (5,80; 6,05)$. Třetí krosník se nachází mimo výřez, protože chemický posuv C15H5 je o něco nižší, než chemický posuv C4H5 a C5H5.

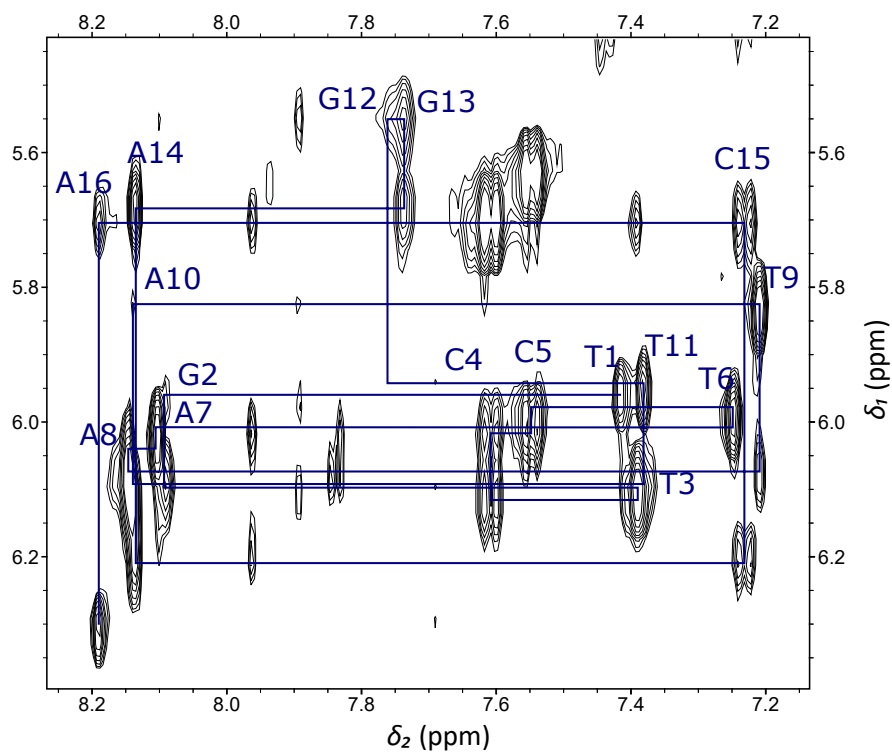
Ve výřezech s vytrasováním sekvencí je vidět značné množství krosníků AdeH2 s H1' s chemickým posuvem v přímé dimenzi $\delta_2 \in (7,80; 8,00)$ a v ne-



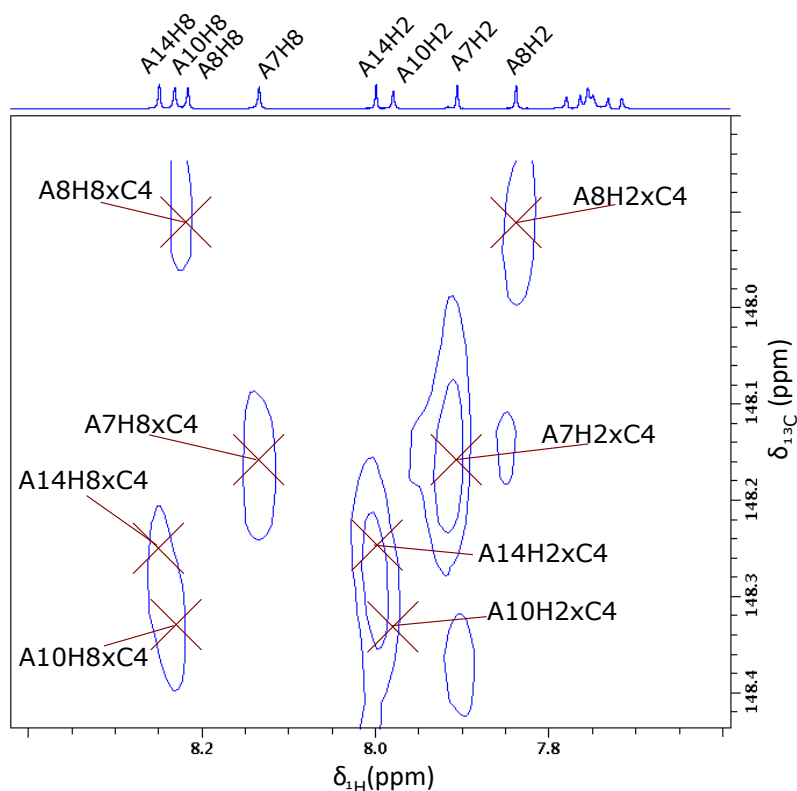
Obrázek 4.1: Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos12 při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.



Obrázek 4.2: Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos14 při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.



Obrázek 4.3: Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos16a při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.



Obrázek 4.4: Spektrum ^1H - ^{13}C HMBC vzorku s2fos12 při teplotě 308 K s vyznačeným mechanismem přiřazování AdeH2.

přímé dimenzi s chemickými posuvy v celém rozsahu chemických posuvů H1'. I přes jejich nízkou intenzitu je bylo možné použít k potvrzení přiřazení AdeH2 ze spekter HMBC.

Z výřezu ze spektra vzorku s2fos12 (obr. 4.1) je vidět, že při teplotě 300 K dochází překryvu signálů A8H8 a A10H8, na základě tohoto spektra je proto nebylo možné rozlišit. K rozhodnutí o přiřazení proto bylo využito spektrum NOESY změřené při teplotě 308 K, zejména jeho část obsahující krosplíky AdeH8 s thyminovými methyly M7.

Pro přiřazení signálů AdeH2 ve spektrech vzorku s2fos12 bylo při teplotě 308 K změřeno spektrum $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ HMBC (obr. 4.4), pro vzorky s2fos14 a s2fos16a byla změřena spektra HMBC při teplotě 300 K.

Pro všechny vzorky bylo získáno při teplotě 300 K, resp. 300 K a 308 K pro vzorek s2fos12, přiřazení signálů všech vodíků H6, H8, AdeH2 a ThyM7, na obr. 4.5 je zobrazen výsledek přiřazení signálů vodíků H6/H8 a AdeH2 při teplotě 300 K pro vzorek s2fos16a. Na základě tohoto přiřazení bylo poté možné přiřadit signály v celém rozsahu teplot.

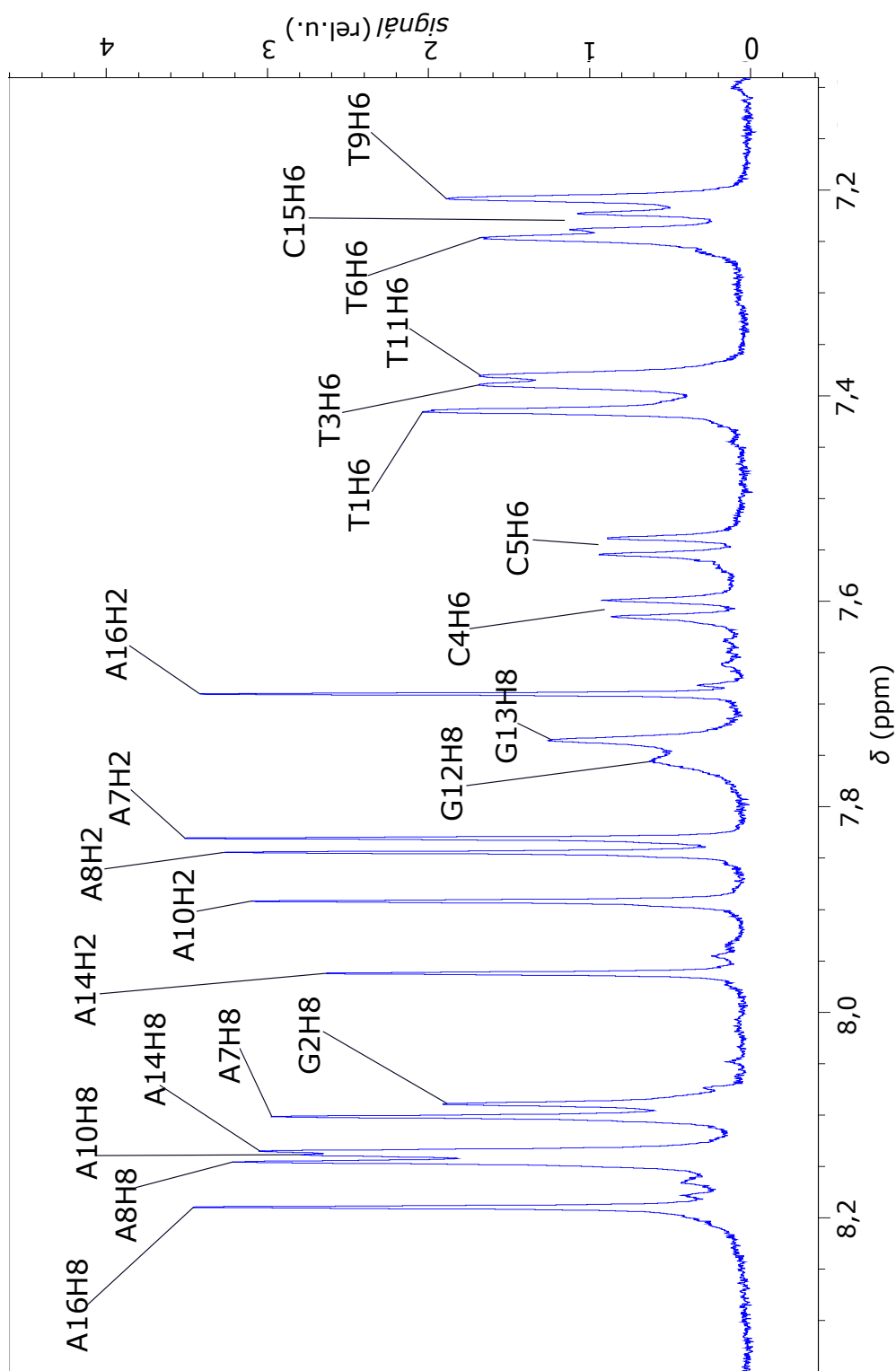
4.3 Rozdíly oproti B-DNA v naměřených spektrech NOESY

Při zpracovávání spekter studovaných vzorků byla nalezena celá řada odchylek od běžných spekter B-DNA. Prvním typem odchylek ve spektrech NOESY jsou málo intenzivní nebo úplně chybějící signály. Ve všech spektrech (jednorozměrných i NOESY) je vzhledem k ostatním H6/H8 velmi málo intenzivní signál G12H8, krosplík G12H8 \times T11H1' dokonce ve spektru vzorku s2fos16a chybí úplně. Další málo intenzivní krosplík je krosplík T9H1' \times A10H8, ve spektru vzorku s2fos16a je už téměř nerozlišitelný od šumu.

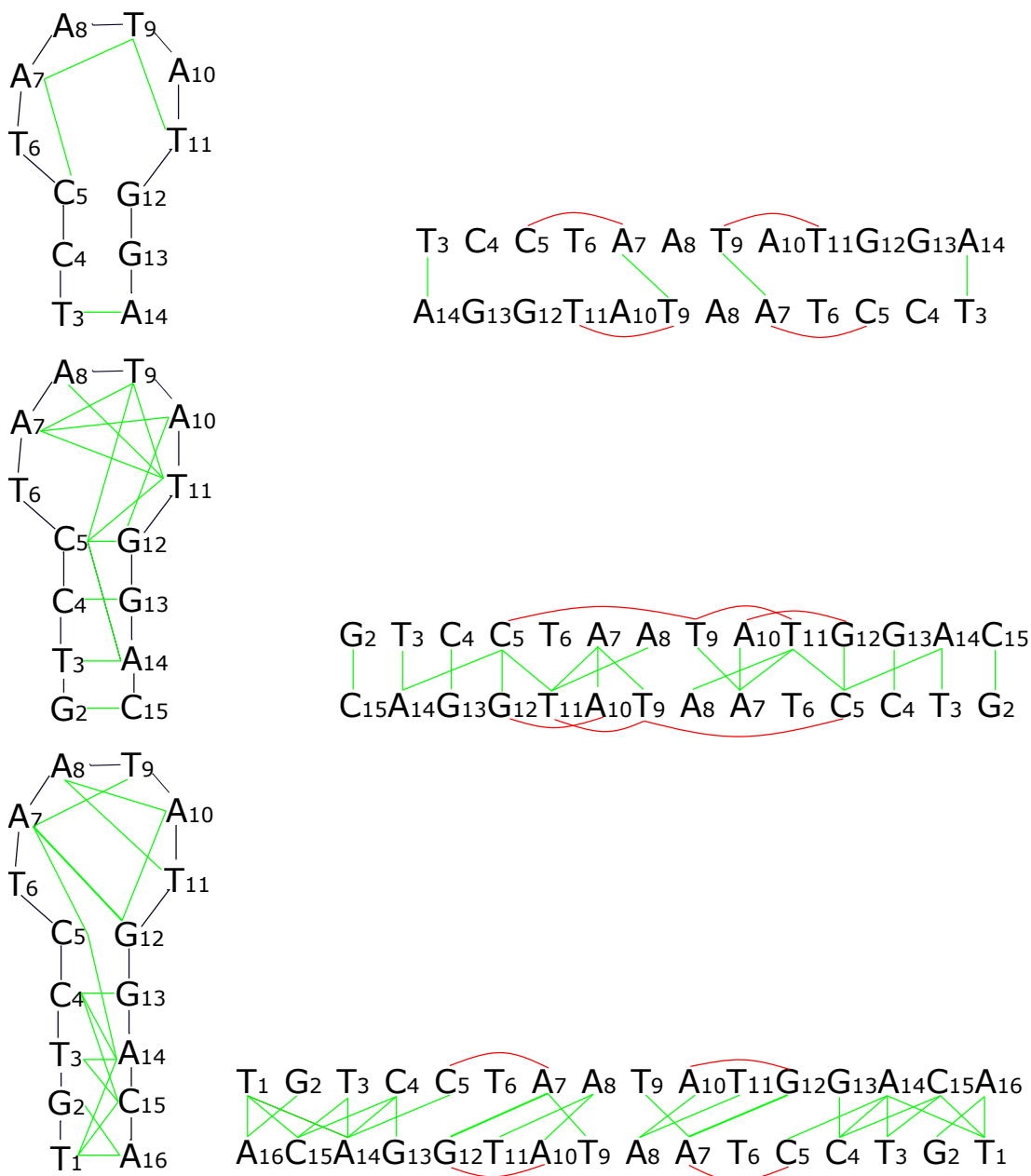
Ve spektru vzorku s2fos16a je málo intenzivní řada krosplíků H2'/H2''(i) \times H8/H6(i+i) mezi nukleotidy v možné hlavičce vlásenky, resp. středu duplexu, konkrétně T9H2' \times A10H8, T9H2'' \times A10H8, T11H2' \times G12H8 a T11H2'' \times G12H8.

Veškeré málo intenzivní či úplně chybějící signály se týkají nukleotidů v prostřední části sekvence – tedy v hlavičce vlásenky nebo ve středu duplexu. U nukleotidů ve stonku vlásenky resp. kraji duplexu žádné takovéto anomálie nepozorujeme.

Druhým typem odchylek jsou krosplíky na neočekávaných pozicích – například mezi vodíky, které by v B-DNA byly od sebe vzdáleny natolik, že by mezi nimi neměl být měřitelný krosplík (tabulky A.1 až A.3 a obrázek 4.6). Tyto krosplíky vykazují několik zajímavých vlastností. Ve spektrech všech vzorků je řada krosplíků, které jsou pro duplexovou strukturu značně nepravděpodobné a naopak rozumně vysvětlitelné pro vlásenku. Zejména to platí pro krosplíky C5H5 \times T9H6 a C5H42 \times T9M7 ve spektrech vzorku s2fos14, jedná se o krosplíky v případě duplexu mezi nukleotidy, které mezi sebou mají tři další nukleotidy (pokud by se jednalo o krosplík v rámci jednoho vlákna duplexu) nebo dva nukleotidové páry (pokud by se jednalo o krosplík mezi protějšími vlákny duplexu). Ve vlásenkové struktuře by byly tyto nukleotidy naproti sobě v hlavičce, krosplíky mezi nimi jsou proto pravděpodobnější než v duplexu.



Obrázek 4.5: Výřez z ¹H spektra vzorku s2fos16a při 300 K obsahující signály H6/H8 a AdeH2 s jejich vyznačeným přiřazením.



Obrázek 4.6: Vyznačení naměřených krosníků v sekvenci nesousedících nukleotidů vzhledem k možným sekundárním strukturám studovaných vzorků, přičemž krosníky, které lze vzhledem ke vzdálenostem v dané struktuře očekávat, jsou vyznačeny zeleně, červeně jsou vyznačeny krosníky nepravděpodobné pro danou strukturu. Nejvýše je schéma vzorku s2fos12, uprostřed s2fos14 a dole s2fos16.

Na krajích duplexu, resp. ve stonku vlásenky jsou velmi časté krosníky mezi nukleotidy na protějších řetězcích, resp. na opačných koncích sekvence (např. $G_2 \times C_{15}$ a $T_1 \times C_{15}$). V hlavičce, resp. středu duplexu, je takovýchto krosníků výrazně méně – v žádném ze spekter nebyly nalezeny například krosníky $T_6 \times A_{10}$, $T_6 \times T_{11}$ nebo $T_6 \times G_{12}$.

Pro thyminové methyly jsou v B-DNA typické krosníky typu $M_7(i) \times H_6/H_8(i-1)$, v naměřených spektrech ale jsou i některé krosníky typu $M_7(i) \times H_6/H_8(i+1)$ nebo i s vodíky ze vzdálenějších bází, často s AdeH2. Tyto

krospíky pozorujeme zejména u methylů thyminů ve střední části sekvence (T6, T9 a T11). To nasvědčuje tomu, že v hlavičce vlásenky, resp. středu duplexu, jsou vzájemné pozice nukleotidů výrazně odlišné od B-DNA, konformace cukr-fosfátové páteře je tedy zřejmě v této části sekvence výrazně odlišná od B-DNA.

Přítomnost velkého počtu krospíků AdeH2 ve střední části sekvence (A10, A8 a A7) s vodíky z jiných nukleotidů ve střední části sekvence znamená, že vzdálenosti mezi AdeH2 a jinými vodíky v dalších nukleotidech v této části sekvence jsou dostatečně malé, aby mezi nimi docházelo k měřitelnému NOE. Například ve spektru vzorku s2fos16a jsou krospíky A10H2 mimo jiné s vodíky A8H2', T9H1', T9H2', T9M7, A10H1', T11H1', T11H2', T11M7 a G12H1', tedy s vodíky z pěti různých nukleotidů. Všechny tyto vodíky tedy musí být blízko A10H2, což nasvědčuje výrazné odchylce od struktury B-DNA v této oblasti, možným vysvětlením je hlavička vlásenky s bázemi směřujícími doprostřed hlavičky.

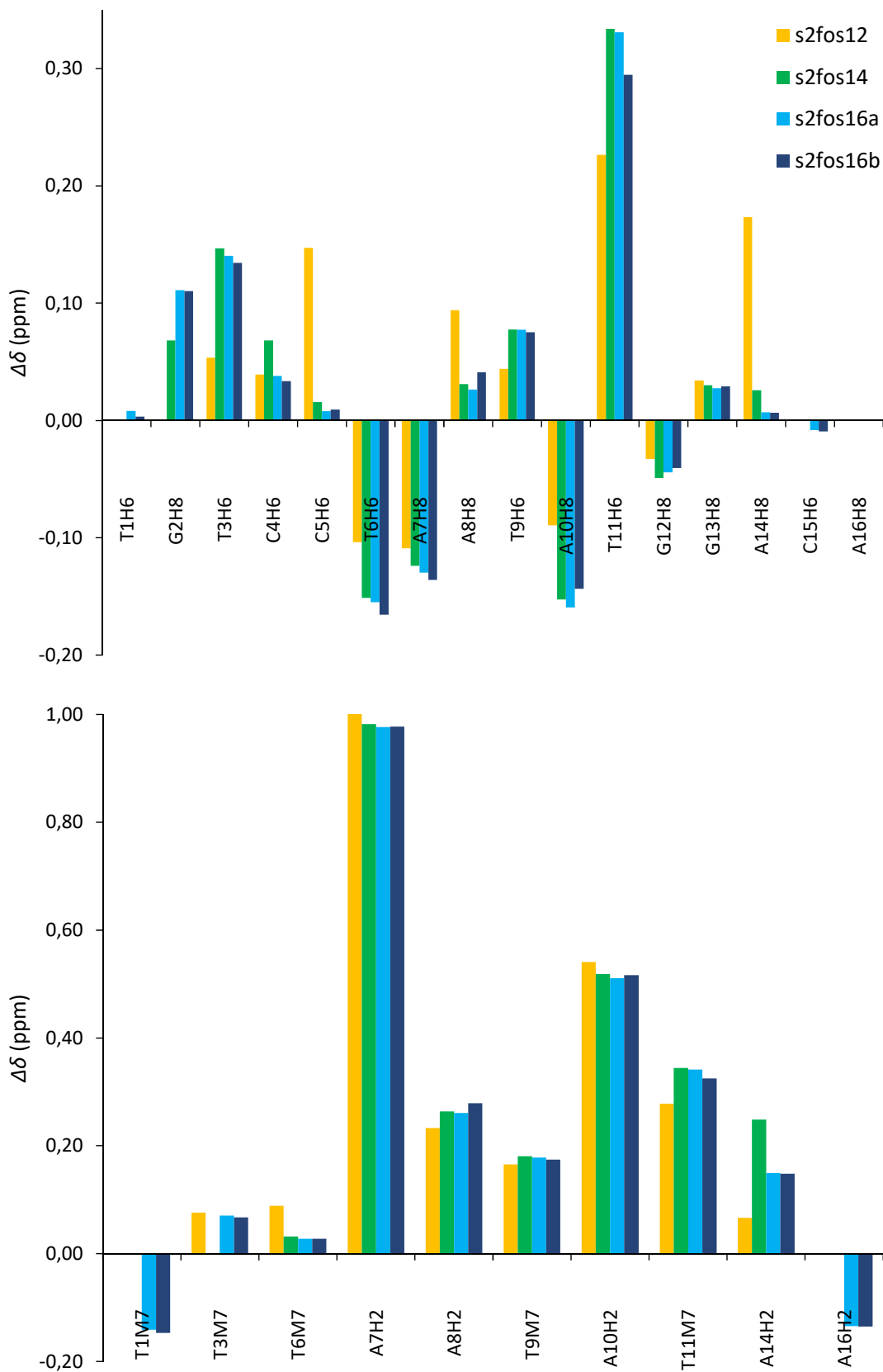
4.4 Srovnání chemických posuvů s predikcemi pro duplex

Z grafu 4.7 je vidět, že rozdíly naměřených chemických posuvů vodíků H6/H8, ThyM7 a AdeH2 při teplotě 298 K a predikcí pro duplex [25, 26, 27] jsou pro většinu vodíků značné. S predikcí se dobře shodují posuvy většiny vodíků v selfkomplementárních částech sekvence (neplatí to pro G2H8 a T3H6). Nejvýrazněji se od predikce pro duplex liší posuvy AdeH2, které jsou v duplexu blízko vodíkových vazeb a jsou proto citlivé na změny sekundární struktury. Tento rozdíl je největší u A7H2 (1,0 ppm) a A10H2 (0,5 ppm), které jsou uprostřed sekvence. Od predikce se také výrazně liší chemické posuvy T9M7 a T11M7, které jsou rovněž ve středu sekvence. Tyto výsledky nasvědčují tomu, že na krajích sekvence dochází k uspořádání nukleotidů odpovídajícímu B-DNA, struktura středu sekvence se oproti tomu od B-DNA výrazně liší, což nasvědčuje tvorbě vlásenky.

4.5 Srovnání chemických posuvů pro různé vzorky

V grafech 4.8–4.13 je srovnání chemických posuvů jednotlivých vodíků pro různé vzorky a predikcí chemických posuvů v duplexu. Vidíme, že u vodíků ve stonku vlásenky, resp. kraji duplexu, dochází často k výrazné změně chemického posuvu při změně délky vzorku, tato změna je nejvýraznější u nukleotidu T3 u obou studovaných vodíků H6 a M7, jedná se o změnu o několik desetin ppm. V hlavičce, resp. středu duplexu, nejsou změny většinou tak výrazné, k největší změně z těchto vodíků dochází u T11H6, u kterého se při změně délky vzorku ze 12 na 14 nukleotidů chemický posuv při pokojové teplotě mění přibližně o 0,1 ppm. U některých vodíků v hlavičce vlásenky, resp. středu duplexu, se chemický posuv se změnou délky vzorku téměř nemění (například u T9H6). To odpovídá předpokladu, že se změnou délky vzorku dochází pro vodíky v hlavičce vlásenky, resp. středu duplexu, k výrazně menší změně chemického okolí, než pro vodíky ve stonku, resp. krajích duplexu.

Chemické posuvy vodíků ze vzorků s2fos16a a s2fos16b se i přes výraznou



Obrázek 4.7: Rozdíly naměřených chemických posuvů vodíků H6/H8 (nahore), ThyM7 a AdeH2 (dole) při teplotě 298 K a predikcí pro duplex [25, 26, 27], kladné jsou hodnoty pro vodíky, jejichž naměřený chemický posuv je vyšší, než predikce.

změnu koncentrace příliš neliší, pro vodíky ve stonku vlásenky, resp. na kraji duplexu, dochází k dokonalé shodě. Signály některých vodíků v hlavičce vlásenky, resp. středu duplexu, se mírně liší, nejvýraznější rozdíl je u vodíků A7H8 a A10H8.

4.6 Teplotní závislosti

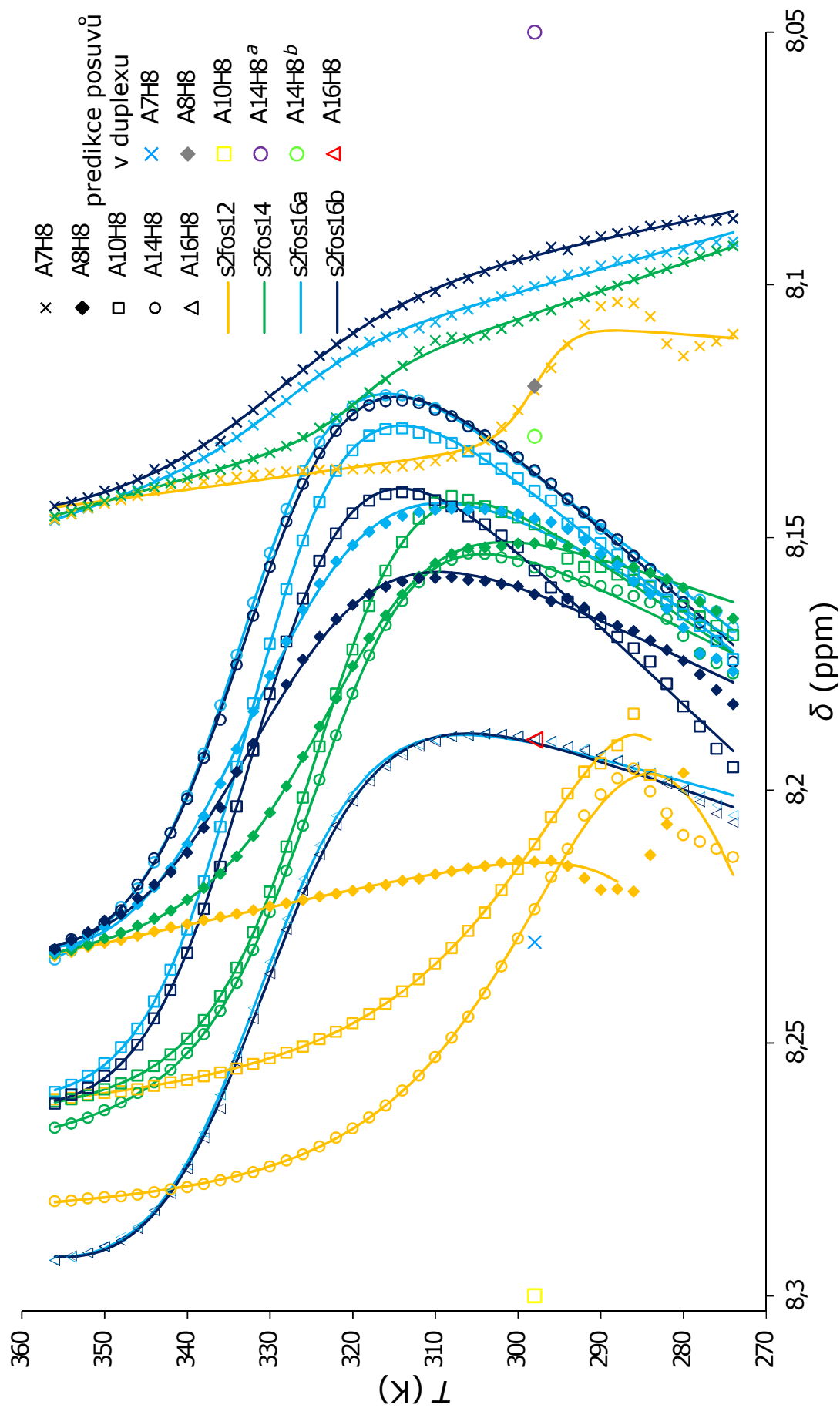
Z naměřených teplotních závislostí jednotlivých vzorků (obr. A.1–A.8) je vidět, že se změnou teploty dochází ke změně chemických posuvů vodíků, což ukazuje na přítomnost chemické výměny. Pološířka signálů všech studovaných vodíků (tj. H6/H8, AdeH2 a ThyM7) je pro většinu teplot velmi malá, zvyšuje se pouze pro nejnižší teploty (nejvýraznější je rozšíření pro vzorek s2fos12 – obr. A.1). Toto rozšíření je výrazně menší, než by bylo rozšíření způsobené pomalou chemickou výměnou, chemickou výměnou proto můžeme považovat za rychlou v celém měřeném rozsahu teplot. Spektra naměřená pro jednotlivé teploty byla nafitována pomocí toolboxu *Asymxfit* [31] v programu MATLAB. Jednotlivé peaky byly fitovány lorentzovskými křivkami. Fitování křivkami zohledňujícími chemickou výměnu by v tomto případě nebylo přínosné, protože změna pološířky signálů způsobená chemickou výměnou je při rychlé chemické výměně příliš malá a z výsledků fitů by proto nebylo možné určit aktivační energii.

Na obr. A.9–A.11 jsou zobrazeny výřezy ze spekter vzorků s2fos14, s2fos16a a s2fos16b pro nízké teploty obsahující signály iminovodíků. Ve spektrech vzorku s2fos12 tyto vodíky nejsou vidět. Signály iminovodíků jsou ve spektrech přítomné, pokud se účastní vodíkových můstků, proto jsou pro delší vzorky s vyšší teplotou tání zřetelné i při vyšších teplotách než pro kratší vzorek. Ve spektrech jsou vidět signály čtyř iminovodíků patřících nukleotidům G2, T3, G12 a G13, což odpovídá čtyřem bázevým párům ve stonku vlásenky, resp. kraji duplexu. Ani pro nejdelší vzorky nejsou ve spektrech rozlišitelné signály žádných dalších iminovodíků, které by mohly odpovídat bázevému páru A8 s T9 nebo jinému páru ve středu duplexu. To nasvědčuje tomu, že ani při nízkých teplotách v této části sekvence k watson–crickovskému párováníází nedochází.

4.6.1 Termodynamické parametry

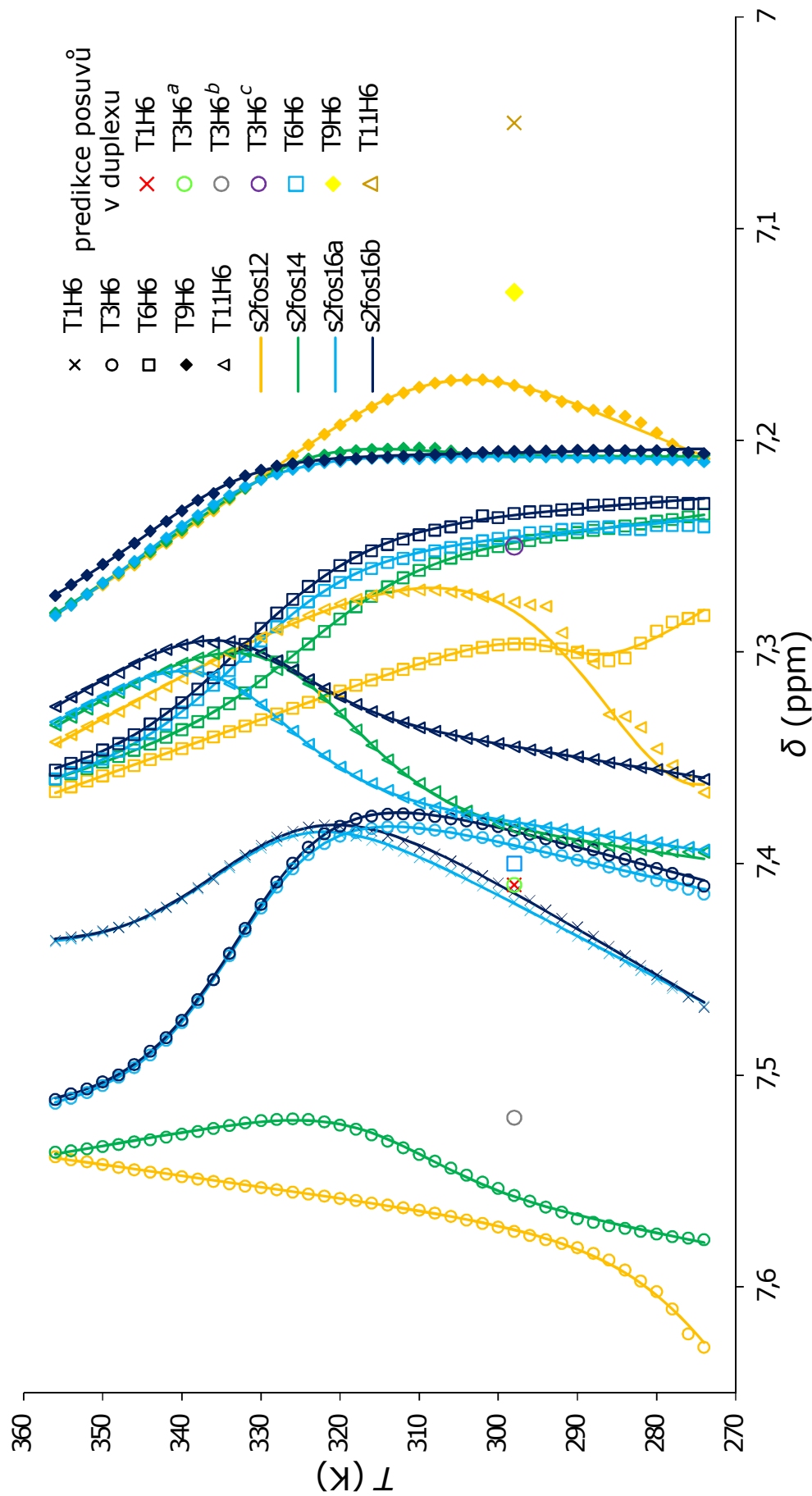
Chemické posuvy jednotlivých vodíků byly nafitovány sigmoidální závislostí popisující tání vlásenky dle rovnice (2.27) (obr. 4.8–4.13). Z fitů byly získány termodynamické parametry pro jednotlivé vodíky, v grafech na obr. 4.14 je zobrazena teplota tání pro jednotlivé vodíky, hodnoty všech určených termodynamických parametrů jsou v tabulkách A.4 až A.7. Vynechány jsou vodíky, jejichž závislost chemického posuvu na teplotě nebylo možné nafitovat s přesností dostatečnou pro určení termodynamických parametrů.

Teplota tání se pro jednotlivé nukleotidy v rámci jednoho vzorku příliš neliší. Výraznější rozdíly mezi jednotlivými vodíky jsou jen u vzorku s2fos12, důvodem je nižší přesnost výsledků fitů pro jednotlivé vodíky způsobená nemožností přesně určit nízkoteplotní limitu kvůli nízké teplotě tání. Z obr. 4.14 je zřejmé, že teplota tání roste s délkou vzorku, což odpovídá očekávání pro duplex i vlásenku. Srovnáme-li dva spodní grafy na obr. 4.14, zjistíme, že teplota tání vzorků s2fos16a a s2fos16b se neliší, což nasvědčuje tvorbě vlásenky.



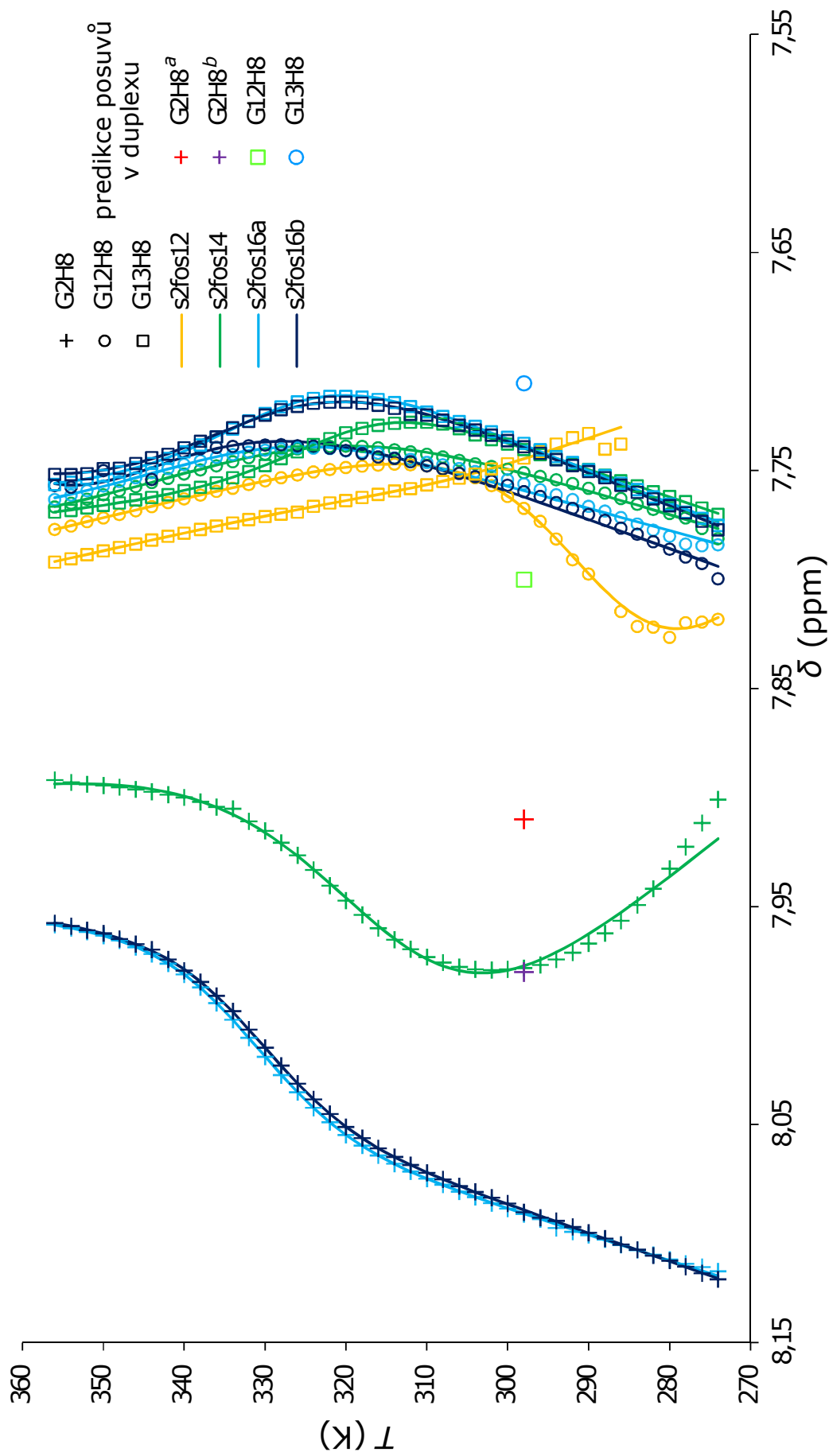
^aPredikce pro vzorek s2fos12, ^bPredikce pro vzorek s2fos14, s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.8: Naftované posuvy AdeH8 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



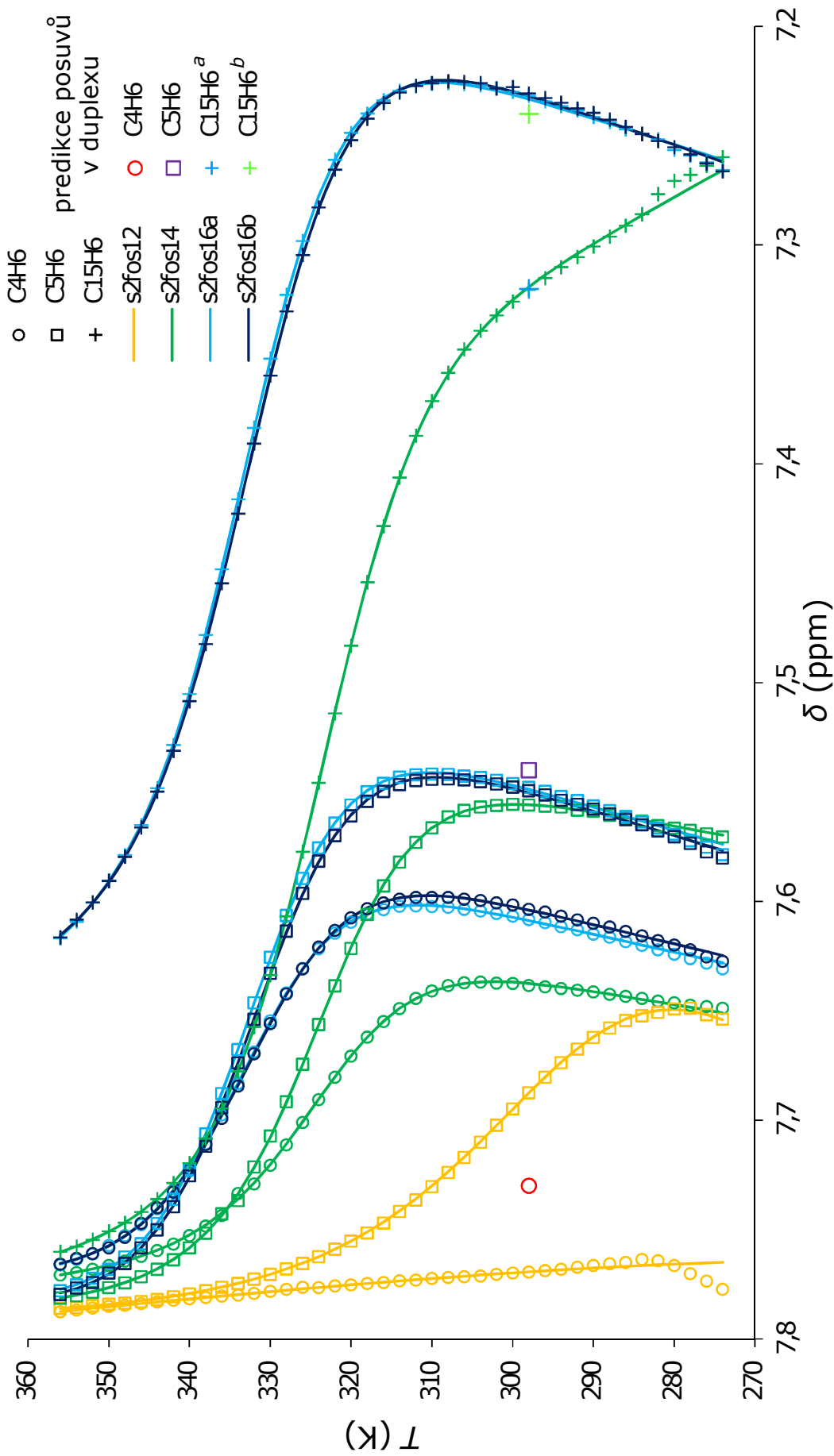
^aPredikce pro vzorek s2fos12, ^bPredikce pro vzorek s2fos14, ^cPredikce pro vzorky s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.9: Naftované posuvy ThyH6 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



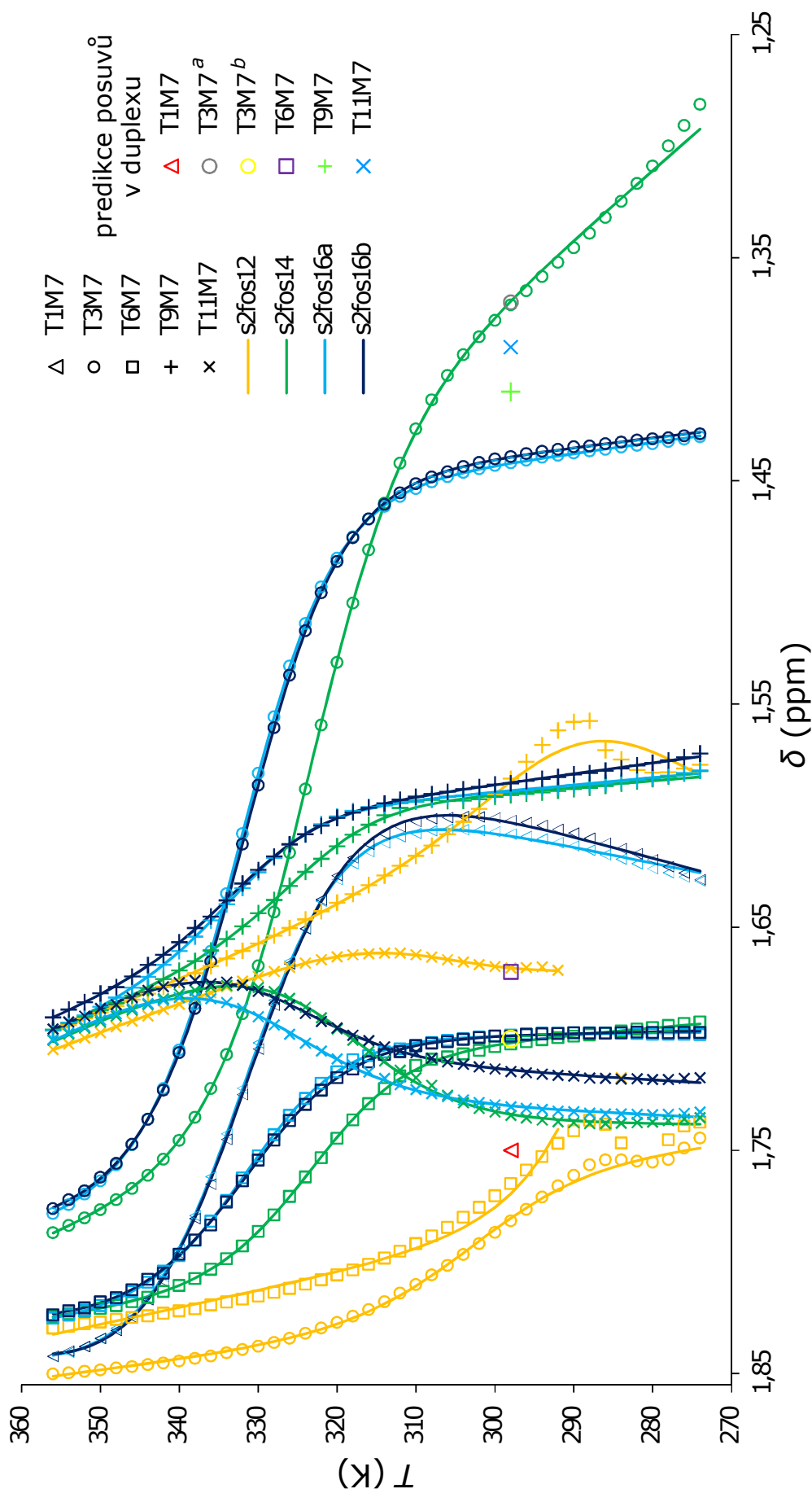
^aPredikce pro vzorek s2fos14, ^bPredikce pro vzorek s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.10: Nařítované posuvy GuaH8 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



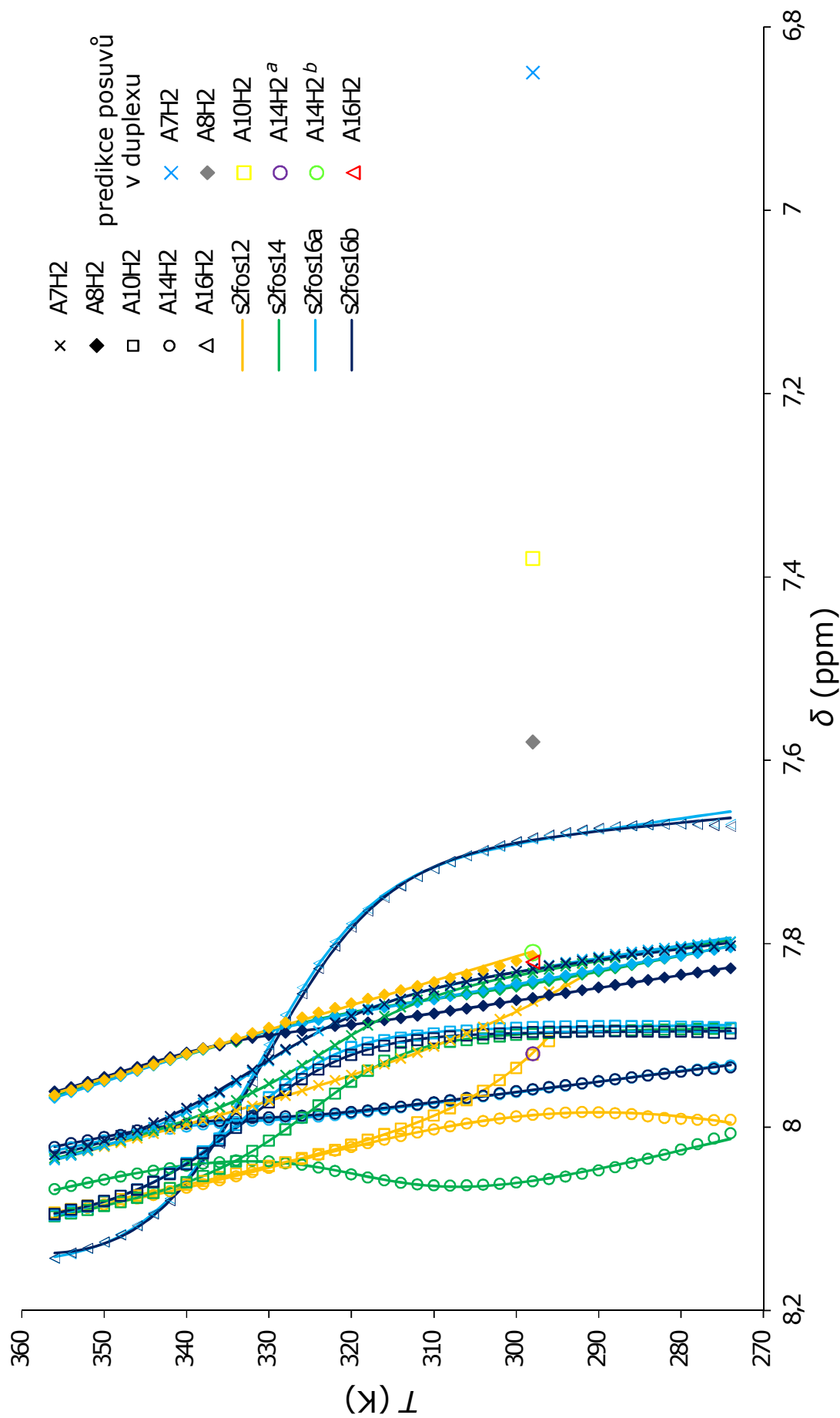
^aPredikce pro vzorek s2fos14, ^bPredikce pro vzorek s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.11: Nafitované posuvy CytH6 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



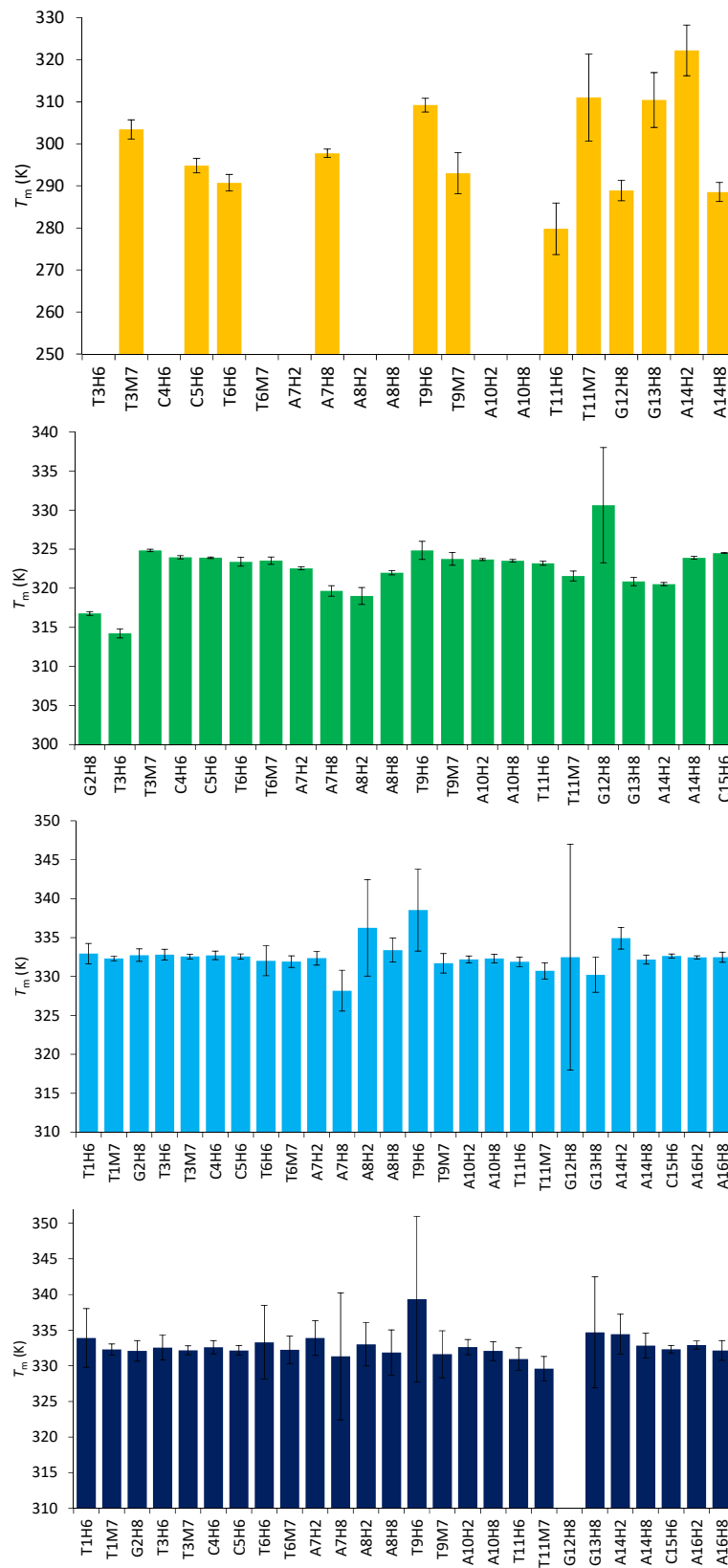
^aPredikce pro vzorek s2fos12, ^bPredikce pro vzorky s2fos14, s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.12: Naftované posuvy ThyM7 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



^aPredikce pro vzorek s2fos12, ^bPredikce pro vzorky s2fos14, s2fos16a a s2fos16b

Obrázek 4.13: Naftované posuvy AdeH2 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27]. Plné čáry jsou fity dle rovnice (2.27), samostatným symbolem jsou označeny predikce, tvary symbolů značí vodíky z různých nukleotidů a barvy symbolů a čar označují jednotlivé vzorky.



Obrázek 4.14: Teplota tání pro jednotlivé nukleotidy, shora pro vzorek s2fos12, s2fos14, s2fos16a a s2fos16b.

Tabulka 4.2: Termodynamické parametry tvorby vlásenky získané jakožto vážené průměry výsledků fitů závislostí chemických posuvů jednotlivých vodíků v daném vzorku na teplotě a srovnání s výsledky z UV spektroskopie [32].

vzorek	c (μM)	T_m (K)	ΔG_{310}^b (kJmol^{-1})	ΔS ($\text{JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$)	ΔH (kJmol^{-1})
s2fos12	797	297 ± 9	$4,8 \pm 3,8$	-273 ± 92	-79 ± 27
s2fos14	933	323 ± 2	$-5,0 \pm 1,4$	-395 ± 56	-127 ± 19
s2fos16a	866	332 ± 1	$-9,3 \pm 0,9$	-413 ± 41	-137 ± 14
s2fos16b	161	332 ± 1	$-8,7 \pm 0,9$	-386 ± 42	-128 ± 14
s2fos16 ^b	2,60	327	-7,9	-440	-145

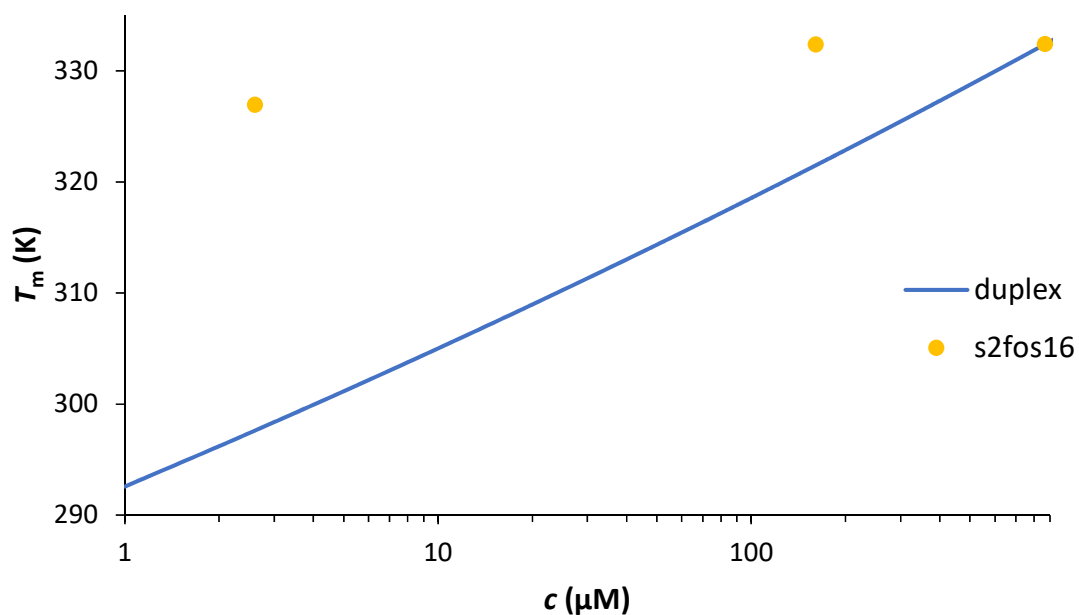
^a ΔG při teplotě 310 K

^bvýsledky z UV spektroskopie [32]

Z malých odchylek teploty tání mezi jednotlivými vodíky v rámci jednoho vzorku vyplývá, že při tání vzorků dochází ke koordinovanému rozpadu celé struktury. Proto lze určit termodynamické parametry celé sekvence jakožto vážený průměr hodnot získaných pro jednotlivé vodíky. V tabulce 4.2 je srovnání naměřených termodynamických parametrů pro jednotlivé vzorky, v posledním řádku jsou výsledky měření vzorku s2fos16 pomocí UV spektroskopie [32]. Při prodloužení vzorku z 12 na 14 nukleotidů došlo k výraznému poklesu ΔG_{310} a tedy ke vzrůstu stability struktury a také ke vzrůstu T_m o více než 20 K. Při prodloužení vzorku ze 14 na 16 nukleotidů došlo také k poklesu ΔG_{310} a k vzrůstu T_m , tato změna je přibližně poloviční oproti změně při prodloužení z 12 na 14 nukleotidů. Výsledky pro vzorky s2fos16a a s2fos16b se shodují, což odpovídá očekáváním pro vlásenku.

4.6.2 Vliv změny koncentrace na teplotu tání

Uvažujme duplex ze dvou stejných vláken s ΔH , T_m a c shodnými se vzorkem s2fos16a. Dle vzorce (1.16) by pro tento duplex byla $\Delta S = -355 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$. Teplota tání tohoto duplexu je závislá na koncentraci (graf 4.15), v tabulce 4.3 je srovnání teplot tání naměřených pro vzorek s2fos16 a teplot tání uvažovaného duplexu při různých koncentracích. Pro změnu koncentrace z $866 \mu\text{M}$ na $161 \mu\text{M}$ bychom u duplexu očekávali pokles teploty tání o 10 K, naměřená teplota tání je ale pro obě koncentrace shodná. Při změně koncentrace ze $161 \mu\text{M}$ na $2,60 \mu\text{M}$ bychom u duplexu očekávali pokles teploty tání o více než 20 K, naměřený pokles je ale jen 5 K. Rozdíly mezi teplotami tání vzorku s2fos16 pro různé koncentrace jsou tedy výrazně menší, než bychom očekávali, pokud by ve vzorku docházelo k tvorbě duplexu. Nezávislost teploty tání na koncentraci odpovídá očekáváním pro vlásenku a vylučuje možnost tvorby duplexu či jiné vícemolekulární struktury ve zkoumaných vzorcích.



Obrázek 4.15: Srovnání naměřené teploty tání vzorku s2fos16 pro různé koncentrace a teoretické závislosti teploty tání duplexu na koncentraci.

Tabulka 4.3: Srovnání teplot tání vzorku s2fos16 pro různé koncentrace a teoretické teploty tání duplexu.

vzorek	c (μM)	naměřená T_m (K)	T_m (K) pro duplex ^a
s2fos16a	866	332 ± 1	332 ± 1
s2fos16b	161	332 ± 1	322 ± 1
s2fos16 ^b	2,60	327	298 ± 3

^apro $\Delta S = -355 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$ a $\Delta H = -137 \text{ kJmol}^{-1}$

^bUV spektroskopie [32]

Závěr

V rámci této práce byly studovány krátké sekvence DNA CArG boxu v *serum response elementu* pomocí jaderné magnetické rezonance. Cílem této práce bylo zhodnotit, zda lze prokázat tvorbu vlásenek. Během této práce byla změřena tato spektra:

- jednorozměrná ^{31}P spektra,
- teplotní závislosti jednorozměrných ^1H spekter,
- dvourozměrná spektra ^1H - ^1H NOESY,
- dvourozměrná spektra ^1H - ^{13}C HMBC.

Analýzou naměřených spekter byly získány tyto informace:

- koncentrace studovaných vzorků,
- přiřazení vodíkových rezonancí v naměřených spektrech jednotlivým vodíkům ve studovaných sekvencích,
- informace o prostorové blízkosti některých vodíků ve studovaných sekvencích vyplývající ze spekter NOESY,
- teplotní závislosti chemických posuvů některých vodíků ve studovaných sekvencích,
- termodynamické parametry popisující tvorbu sekundárních struktur v jednotlivých vzorcích.

Tvorbě vlásenek ve studovaných sekvencích DNA nasvědčují tato fakta:

- Naměřená spektra ^1H - ^1H NOESY obsahují mnoho signálů očekávaných pro vlásenku a neočekávaných pro duplex.
- Řada signálů ve spektrech NOESY očekávaných pro duplex v naměřených spektrech chybí nebo je méně intenzivní, než lze pro duplex očekávat.
- V naměřených teplotních závislostech a spektrech NOESY pozorujeme signály (např. signály iminovodíků) nasvědčující tvorbě básových párů ve stonku vlásenky, pro nukleotidy ve středu sekvence nikoli.
- Chemické posuvy některých vodíků v neselfkomplementární části sekvence se značně liší od predikcí pro duplex.
- Teplota tání nejdelšího vzorku nezávisí na koncentraci.

Lze tedy pokládat za prokázané, že ve studovaných vzorcích dochází k tvorbě vlásenek. Tvorba vlásenek ve vzorcích komplementárních k vzorkům studovaným v této práci již byla potvrzena v předchozí práci [33]. To jsou nutné předpoklady pro teorii, že v CArG boxu dochází k lokální změně konformace, konkrétně k tvorbě vlásenky, resp. kruciformy. Dalším krokem při zkoumání této teorie by bylo studium směsí komplementárních sekvencí a jejich sekundárních struktur.

Seznam použité literatury

- [1] James D. Watson and Francis H. C. Crick. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*, 171:737–738, 1953.
- [2] Paul Singer and Wu Cheng-Wen. Promotor search by *Escherichia coli* RNA polymerase on a circular DNA template. *Journal of Biological Chemistry*, 262(29):14178–14189, 1987.
- [3] Larry J. Friedman, Jeffrey P. Mumm, and Jeff Gelles. RNA polymerase approaches its promoter without long-range sliding along DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24):9740–9745, 2013.
- [4] Alexis Huet, Ara Parlakian, Marie-Claire Arnaud, Jean-Marie Glandieres, Pierre Valat, Serge Fermandjian, Denise Paulin, Bernard Alpert, and Christian Zentz. Mechanism of binding of serum response factor to serum response element. *FEBS Journal*, pages 3105–3119, 2005.
- [5] IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature. Abbreviations and symbols for nucleic acids, polynucleotides, and their constituents. *Biochemistry*, 9(20):4022–4027, 1970.
- [6] Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter. *Molecular biology of the cell*. Garland Publishing, New York, fourth edition, 1983.
- [7] John L. Markley, Ad Bax, Yoji Arata, C. W. Hilbers, Robert Kaptein, Brian D. Sykes, Peter E. Wright, and Kurt Wüthrich. Recommendations for the presentation of NMR structures of proteins and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 280:933–952, 1998.
- [8] Cornelis W. Hilberts and Sybren S. Wijmenga. Nucleic acids: Spectra, structures, and dynamics. In D. M. Grant and R. K. Harris, editors, *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*. John Wiley, 2002.
- [9] David L. Nelson and Michael M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W. H. Freeman and Company, New York, fourth edition, 2005.
- [10] Václav Brázda, Rob C. Laister, Eva B. Jagelská, and Cheryl Arrowsmith. Cruciform structures are a common DNA feature important for regulating biological processes. *BMC Molecular Biology*, 12(1):33, 2011.
- [11] Donald Voet and G. Voet, Judith. *Biochemistry*. John Wiley & sons, inc., third edition, 2004.
- [12] Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Angelika Amon, and Mathew P. Scott. *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York, seventh edition, 2013.
- [13] Richard Owczarzy. Melting temperatures of nucleic acids: Discrepancies in analysis. *Biophysical Chemistry*, 117(3):207–215, 2005.

- [14] Robert A. Alberty. *Thermodynamics of biochemical reactions*. John Wiley & sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2003.
- [15] Václav Římal. NMR study of oligonucleotide structures. Dizertační práce, Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, 2018.
- [16] Harald Günther. *NMR spectroscopy*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester, second edition, 1983.
- [17] Horst Friebolin. *Basic One- and Two-Dimensional NMR Spectroscopy*. Wiley–VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, fifth edition, 2011.
- [18] Richard R. Ernst, Geoffrey Bodenhausen, and Alexander Wokaun. *Principles of Nuclear Magnetic Resonance in One and Two Dimensions*. The international series of monographs on chemistry. Oxford University Press: Clarendon Press, 1987.
- [19] Malcolm H. Levitt. *Spin Dynamics*. The international series of monographs on chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, second edition, 2009.
- [20] Jaroslav Zamastil and Jakub Benda. *Kvantová mechanika a elektrodynamika*. Karolinum, Praha, 2016.
- [21] Tsang-Lin Hwang and A. J. Shaka. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary waveforms and pulsed field gradients. *Journal of Magnetic Resonance*, 112:275–279, 1995.
- [22] Maria J. P. van Dongen, Sybren S. Wiljmenga, Ramón Eritja, Fernando Azorin, and W. Hilberts, Cornelis. Through–bond correlation of adenine H2 and H8 protons in unlabeled DNA fragments by HMBC spectroscopy. *Journal of Biomolecular NMR*, 8:207–212, 1996.
- [23] Martial Piotto, Vladimír Saudek, and Vladimír Sklenář. Gradient–tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions. *Journal of Biomolecular NMR*, 2:661–665, 1992.
- [24] Sik Lok Lam and Lai Man Chi. Use of chemical shifts for structural studies of nucleic acids. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 56:289–310, 2010.
- [25] Cornelis Altona, Dirk H. Faber, and Aldert J. A. Westra Hoekzema. Double-helical DNA ^1H chemical shifts: an accurate and balanced predictive empirical scheme. *Magnetical Resonance in Chemistry*, 38:95–107, 2000.
- [26] Sik Lok Lam. DSHIFT – a webserver for predicting DNA chemical shifts. <http://slamweb.chem.cuhk.edu.hk/DSHIFT/>, březem 2019.
- [27] Sik Lok Lam. DSHIFT: a web server for predicting DNA chemical shifts. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2):W713–W717, 2007.
- [28] Juli Feigon, Vladimír Sklenář, Edmond Wang, Dara E. Gilbert, Román F. Macaya, and Peter Schultze. ^1H NMR spectroscopy of DNA. *Methods in Enzymology*, 211:235–253, 1992.

- [29] Kurt Wüthrich. *NMR of proteins and nucleic acids*, chapter Nucleic Acid Conformation, ^1H - ^1H Overhauser Effects, and Sequence-Specific Resonance Assignments, pages 233–255. Wiley-Interscience, New York, 1986.
- [30] Mark Winter. WebElements. <https://www.webelements.com>, duben 2019.
- [31] Václav Římal, Helena Štěpánková, and Josef Štěpánek. Analysis of NMR spectra in case of temperature-dependent chemical exchange between two unequally populated sites. *Concepts Magn. Reson. Part A*, 38A(3):117–127, 2011.
- [32] Barbora Řezáčová. Strukturní flexibilita regulačního segmentu DNA. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, 2009.
- [33] Ondřej Socha. Charakterizace strukturních vlastností astability DNA vlásenek pomocí NMR spektroskopie. Diplomová práce, Univerzita Karlova, Matematicko-fyzikální fakulta, 2016.

Seznam obrázků

1.1	Standardní číslování atomů vodíku v 2'deoxyribóze a v bázích DNA dle [8].	6
1.2	Watsonovy-Crickovy páry bází DNA.	7
1.3	Možné sekundární struktury sekvence DNA promotoru lidského genu <i>c-fos</i>	8
2.1	Absorpční a disperzní složka signálu, převzato z [19].	15
2.2	Pulzní sekvence pro měření spinového echa.	16
2.3	Nasimulovaná spektra pro dvoustavovou chemickou výměnu, převzato z [19].	18
2.4	Pulzní sekvence <i>zg</i>	19
2.5	Pulzní sekvence <i>zgesgp</i> pro měření jednorozměrných spekter s potlačením signálu rozpouštědla.	19
2.6	Pulzní sekvence <i>noesyegpph</i> pro měření ^1H - ^1H NOESY spekter.	20
2.7	Pulzní sekvence <i>shmbcgpl2ndwg</i> pro měření ^1H - ^{13}C HMBC spekter.	21
2.8	^1H spektrum vzorku s2fos16a při 300 K s vyznačenými typickými chemickými posuny jednotlivých vodíků v DNA (dle [24])	22
2.9	^1H - ^1H NOESY spektrum vzorku s2fos16b při teplotě 300 K.	24
3.1	^{31}P spektrum vzorku s2fos16 pro určení koncentrace.	28
4.1	Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos12 při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.	33
4.2	Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos14 při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.	33
4.3	Výřez z ^1H - ^1H NOESY spektra vzorku s2fos16a při teplotě 300 K s vytrasovanou sekvencí.	34
4.4	Spektrum ^1H - ^{13}C HMBC vzorku s2fos12 při teplotě 308 K s vyznačeným mechanismem přiřazování AdeH2.	34
4.5	Výřez z ^1H spektra vzorku s2fos16a při 300 K obsahující signály H6/H8 a AdeH2 s jejich vyznačeným přiřazením.	36
4.6	Vyznačení naměřených krosplíků v sekvenci nesousedících nukleotidů vzhledem k možným sekundárním strukturám studovaných vzorků.	37
4.7	Rozdíly naměřených chemických posuvů vodíků H6/H8, ThyM7 a AdeH2 při teplotě 298 K a predikcí pro duplex [25, 26, 27].	39
4.8	Nafitované posuvy AdeH8 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	41
4.9	Nafitované posuvy ThyH6 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	42
4.10	Nafitované posuvy GuaH8 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	43
4.11	Nafitované posuvy CytH6 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	44
4.12	Nafitované posuvy ThyM7 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	45

4.13	Nafitované posuvy AdeH2 a predikce chemických posuvů v duplexu [25, 26, 27].	46
4.14	Teplota tání pro jednotlivé nukleotidy.	47
4.15	Srovnání naměřené teploty tání vzorku s2fos16 pro různé koncentrace a teoretické závislosti teploty tání duplexu na koncentraci.	49
4.16	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály H6/H8.	51
A.1	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos12 obsahující signály H6/H8.	62
A.2	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály H6/H8.	63
A.3	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály H6/H8.	64
A.4	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály H6/H8.	65
A.5	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos12 obsahující signály thyminových methyľů.	66
A.6	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály thyminových methyľů.	66
A.7	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály thyminových methyľů.	67
A.8	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály thyminových methyľů.	67
A.9	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály iminovodíků.	68
A.10	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály iminovodíků.	68
A.11	Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály iminovodíků.	69

Seznam tabulek

3.1	Sekvence a koncentrace studovaných vzorků.	26
3.2	Složení pufru.	26
3.3	Parametry izotopů, jejichž spektra byla v rámci této práce měřena [30].	27
3.4	Parametry při měření 1D spekter.	28
3.5	Parametry při měření spekter společné pro všechna spektra ^1H - ^1H NOESY.	29
3.6	Parametry při měření spekter ^1H - ^1H NOESY lišící se pro jednotlivá spektra.	29
3.7	Parametry při měření spekter ^1H - ^{13}C HMBC společné pro všechny vzorky.	30
3.8	Parametry při měření spekter ^1H - ^{13}C HMBC lišící se pro jednotlivé vzorky.	31
4.1	Určení koncentrace jednotlivých vzorků.	32
4.2	Termodynamické parametry tvorby vlásenky získané jakožto vážené průměry výsledků fitů závislostí chemických posuvů jednotlivých vodíků v daném vzorku na teplotě a srovnání s výsledky z UV spektroskopie [32].	48
4.3	Srovnání teplot tání vzorku s2fos16 pro různé koncentrace a teoretické teploty tání duplexu.	49
A.1	Seznam krosníků ve spektrech NOESY vzorku vzorku s2fos12, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.	59
A.2	Seznam krosníků ve spektrech NOESY vzorku s2fos14, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.	60
A.3	Seznam krosníků ve spektru NOESY vzorku s2fos16a, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.	61
A.4	Hodnoty T_m jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.	70
A.5	Hodnoty ΔG při teplotě 310 K jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.	71
A.6	Hodnoty ΔS jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.	72
A.7	Hodnoty ΔH jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.	73

Seznam použitých zkratek

Ade – adenin
Cyt – cytosin
DNA – deoxyribonukleová kyselina
DSS – 4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina
FID – *Free induction decay*, česky signál volné precese
Gua – guanin
HMBC – NMR spektrum *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HPLC – *High-Performance Liquid Chromatography*, česky vysokotlaká
plynová chromatografie
mRNA – *messenger RNA*
NMR – *Nuclear Magnetic Resonance*, česky jaderná magnetická rezonance
NOE – *Nuclear Overhauser Effect*, česky jaderný Overhauserův jev
NOESY – NMR spektrum *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*
ppm – *parts per million*
RNA – ribonukleová kyselina
SRE – *Serum Response Element*
SRF – *Serum Response Factor*
TBP – *TATA binding protein*
TF – Transkripční faktor
Thy – thymin

A. Přílohy

Tabulka A.1: Seznam krosníků ve spektrech NOESY vzorku s2fos12, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.

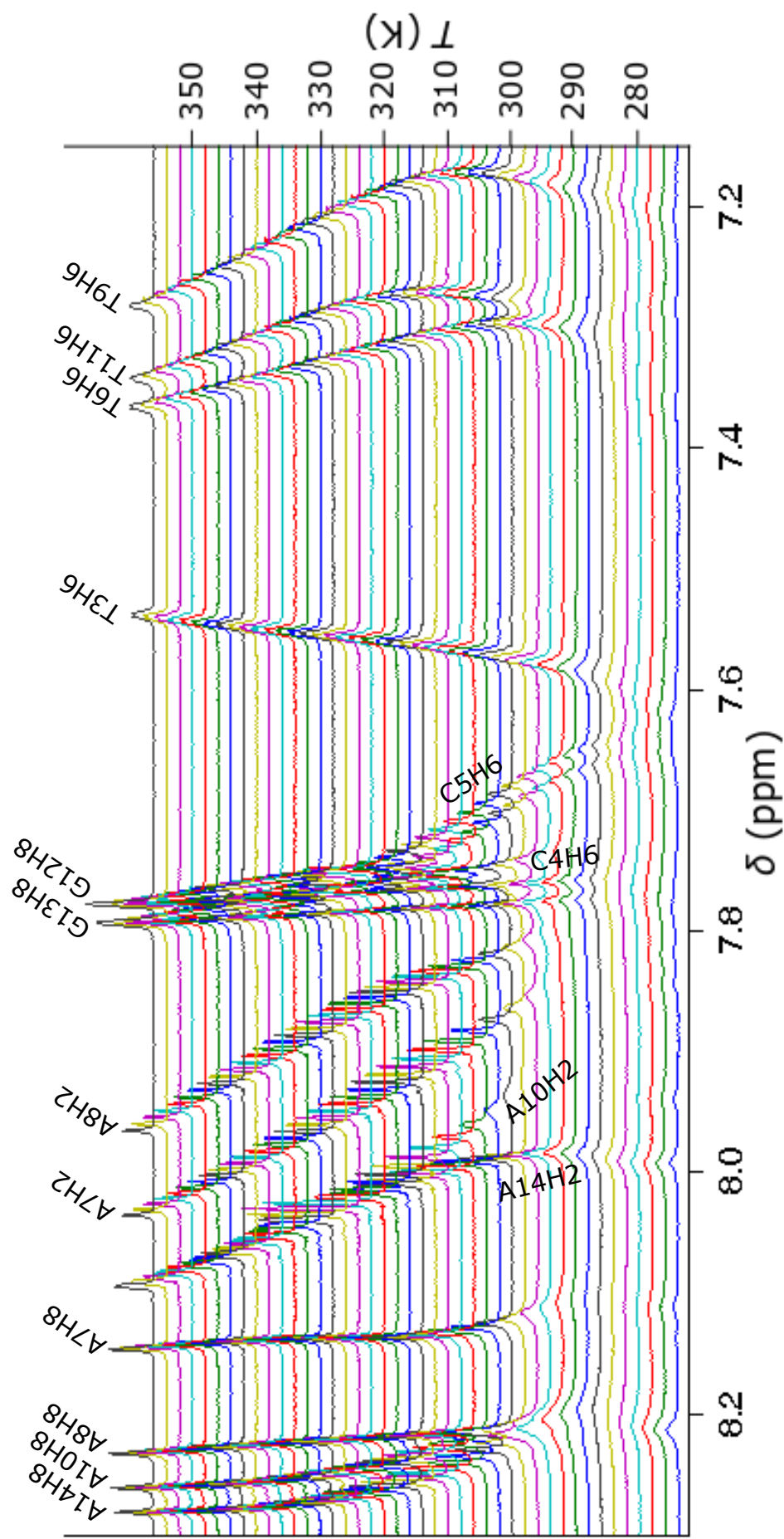
dvojice nukleotidů	t_m (ms)	
	500	300
T3, A14	T3H1'×A14H2	
C5, A7	C5H1'×A7H8	
A7, T9	A7H1'×T9M7	
T9, T11	T9H1'×T11M7	

Tabulka A.2: Seznam krosníků ve spektrech NOESY vzorku s2fos14, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.

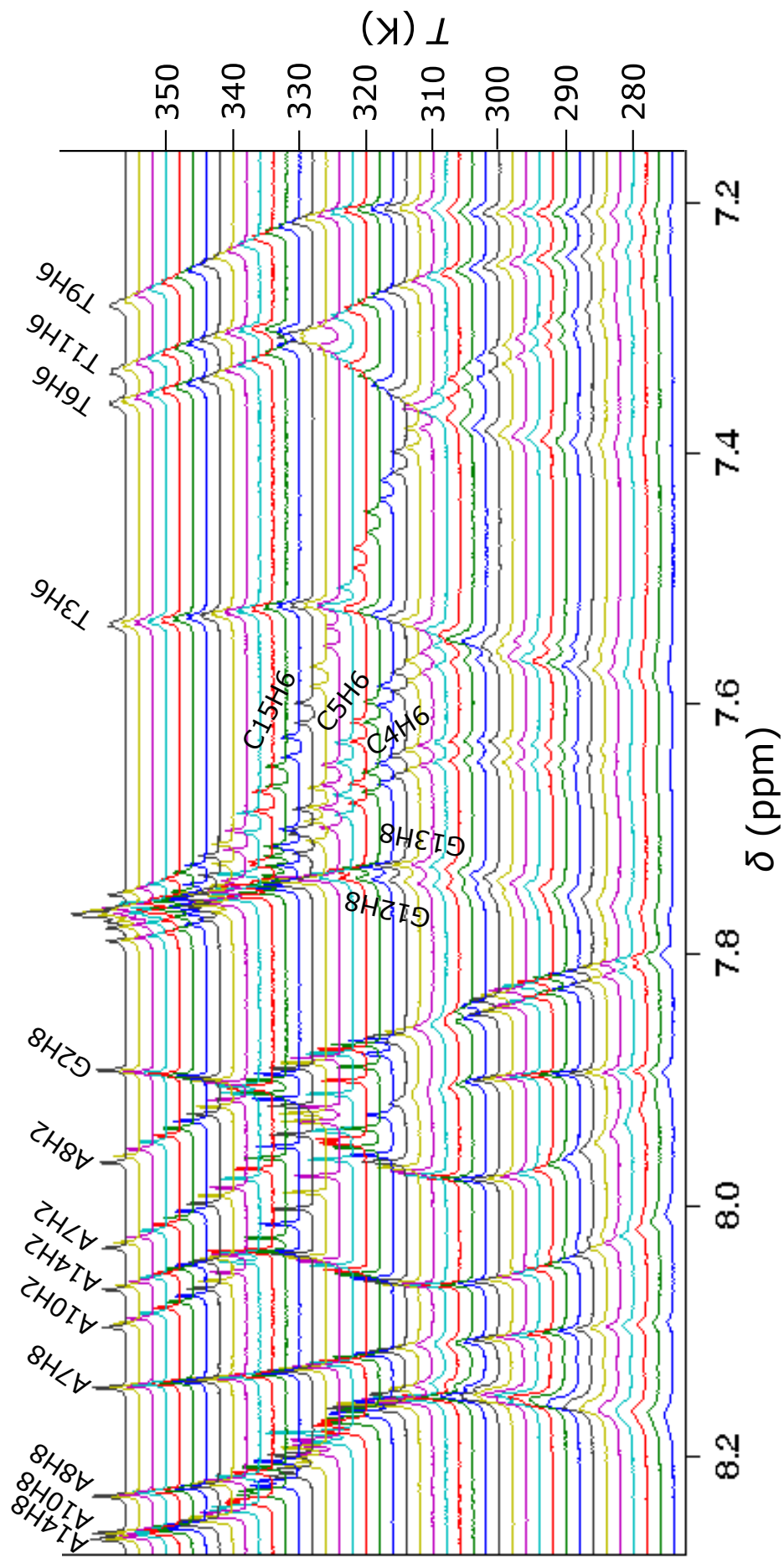
dvojice nukleotidů	$T(K)$	
	300	284
G2, C15	G2H8×C15H5 G2H8×C15H41	G2H8×C15H5
T3, A14	T3M7×A14H2 T3H1×A14H2	
C4, G13	C4H42×G13H3 C4H41×G13H3 C4H5×G13H3 C4H6×G13H3 C4H1'×G13H3	
C5, T9	C5H42×T9M7	C5H5×T9H6
C5, T11	C5H1'×T11M7 C5H41×T11M7 C5H42×T11M7	C5H5×T11M7
C5, G12	C5H41×G12H3 C5H42×G12H3 C5H5×G12H3	
C5, A14	C5H42×A14H8	
A7, T9	A7H8×T9M7	
A7, A10	A7H1'×A10H2	
A7, T11	A7H8×T11M7	
A8, T11	A8H2×T11M7	A8H2×T11M7
T9, T11		T9M7×T11H6
A10, G12	A10H1'×G12H8 A10H8×G12H1' A10H2×G12H1'	A10H8×G12H1' A10H1'×G12H8 A10H2×G12H1'

Tabulka A.3: Seznam krosníků ve spektru NOESY vzorku s2fos16a, které nejsou v rámci jednoho nukleotidu ani mezi nukleotidy sousedícími v sekvenci.

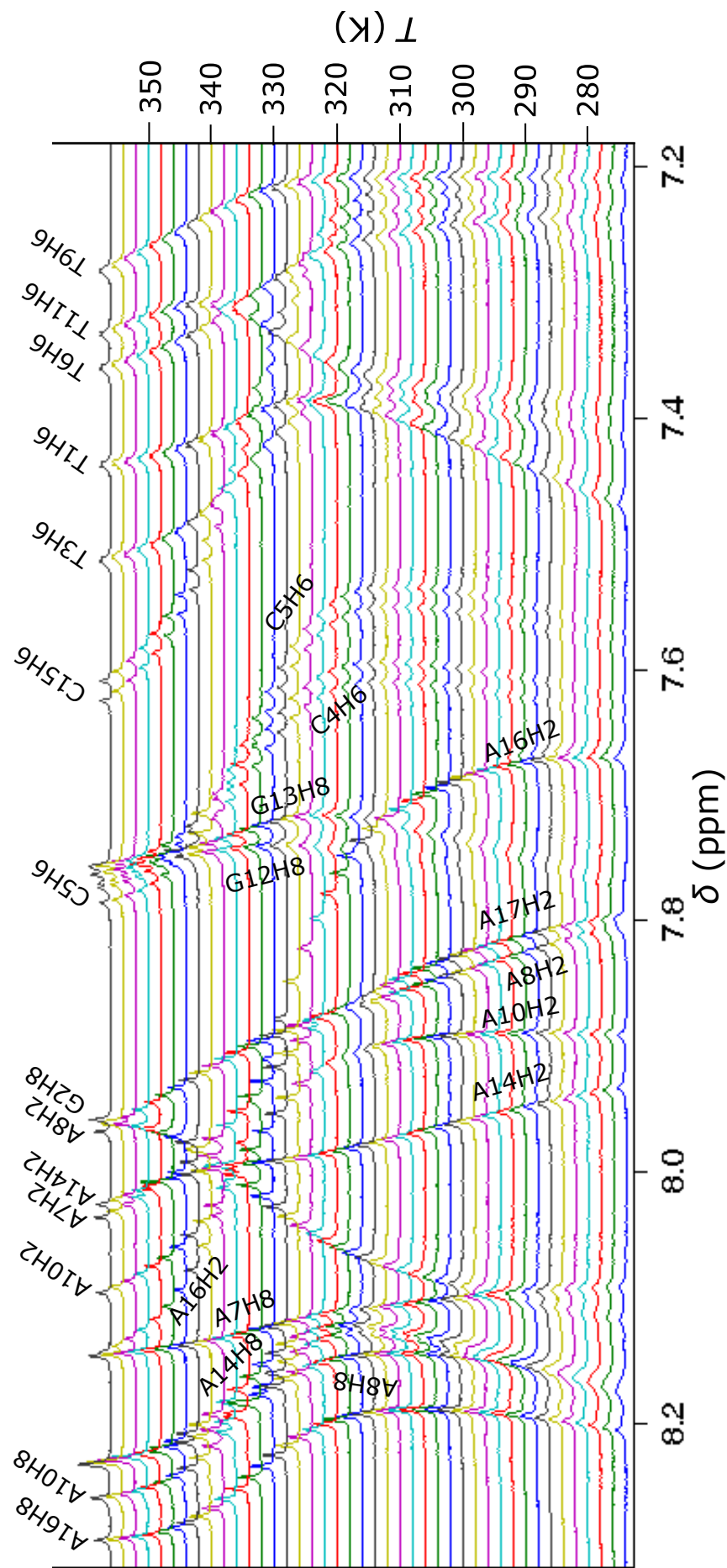
dvojice nukleotidů	krosníky
T1, A14	T1M7×A14H2
T1, C15	T1M7×C15H41
T1, A16	T1H1'×A16H2 T1H2''×A16H2 T1H2'×A16H2 T1H5''×A16H2 T1M7'×A16H8
G2, A16	G2H1'×A16H2 G2H2''×A16H2
T3, A14	T3H1×A14H2
T3, C15	T3H1×C15H42
C4, G13	C4H41×G13H3 C4H41×G13H3
C4, A14	C4H1'×A14H2 C4H2''×A14H2
C4, C15	C4H5×C15H1'
C5, A7	C5H2'×A7H2
C5, A14	C5H2''×A14H2
A7, T9	A7H2×T9H2' A7H2×T9H5' A7H8×T9H6
A7, G12	A7H8×G12H1'
A8, A10	A8H2'×A10H2
A8, T11	A8H2×T11M7
A10, G12	A10H2×G12H1' A10H2'×G12H4'



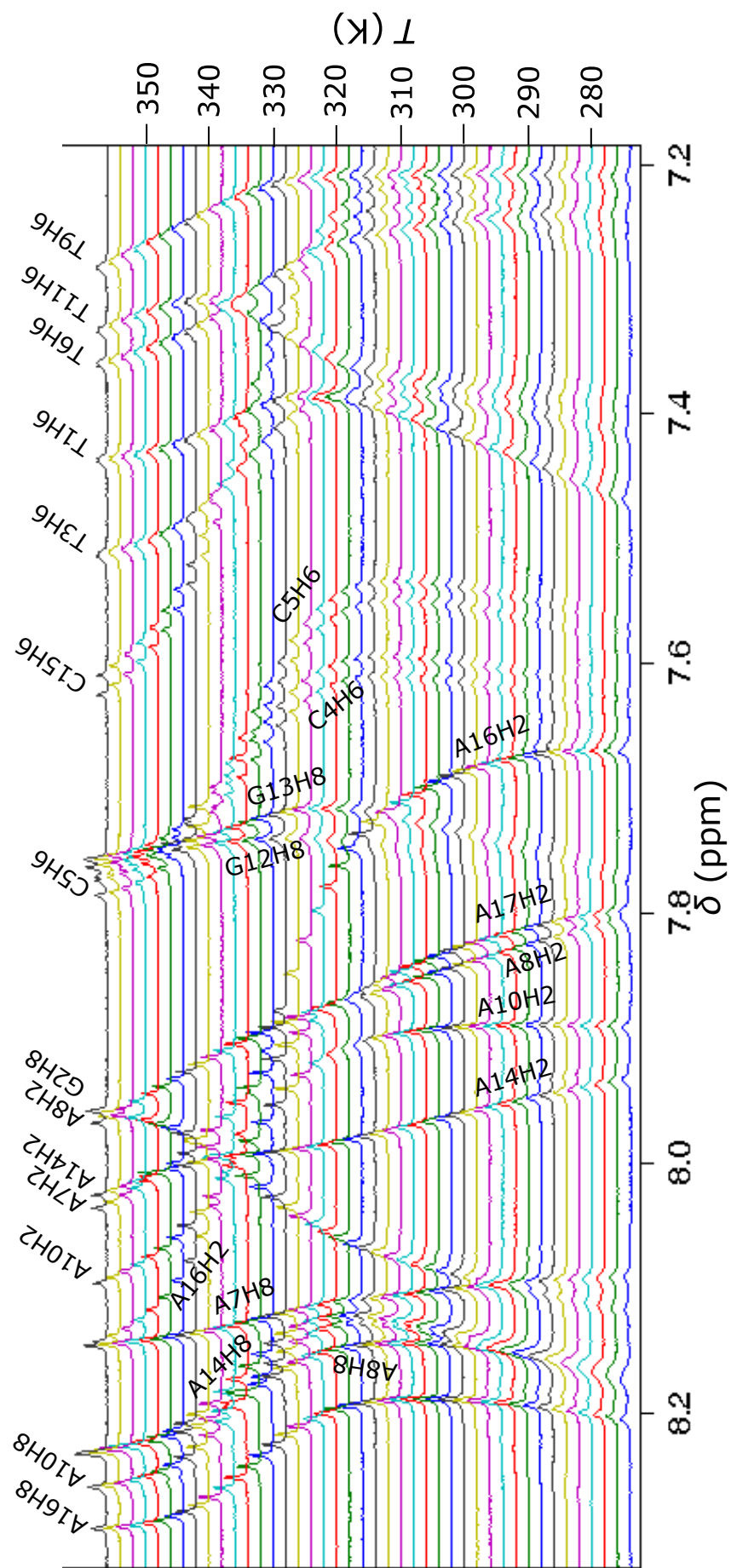
Obrázek A.1: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos12 obsahující signály H6/H8 s vyznačeným přiřazením GuaH8, AdeH8, ThyH6, CytH6 a AdeH2.



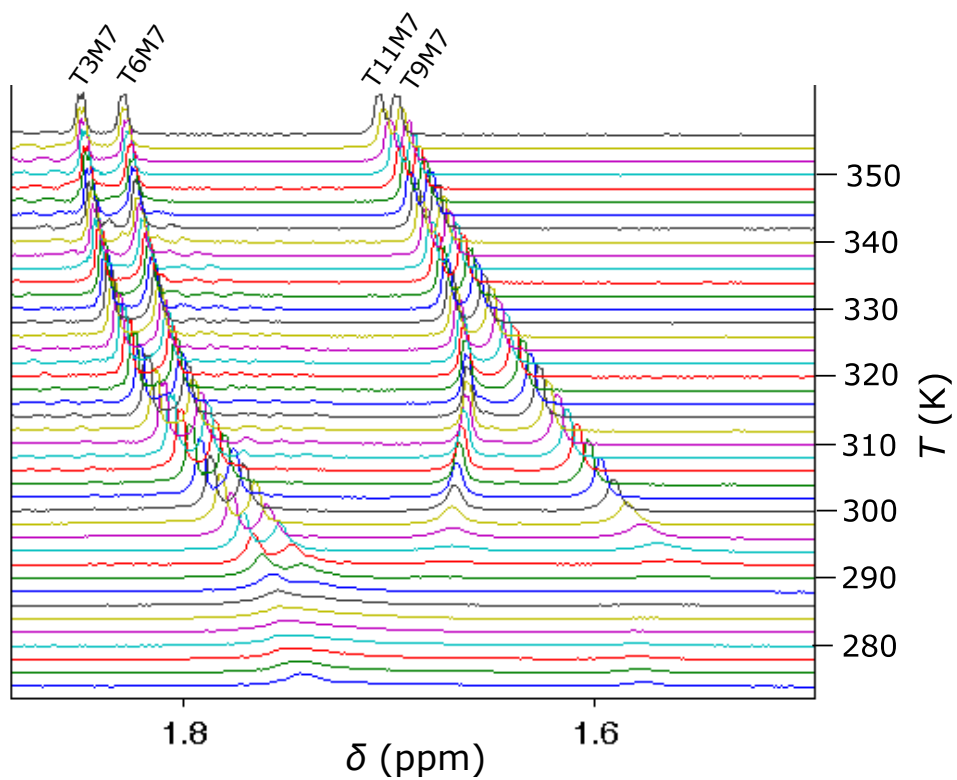
Obrázek A.2: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály H6/H8 s vyznačeným přiřazením GuaH8, AdeH8, ThyH6, CytH6 a AdeH2.



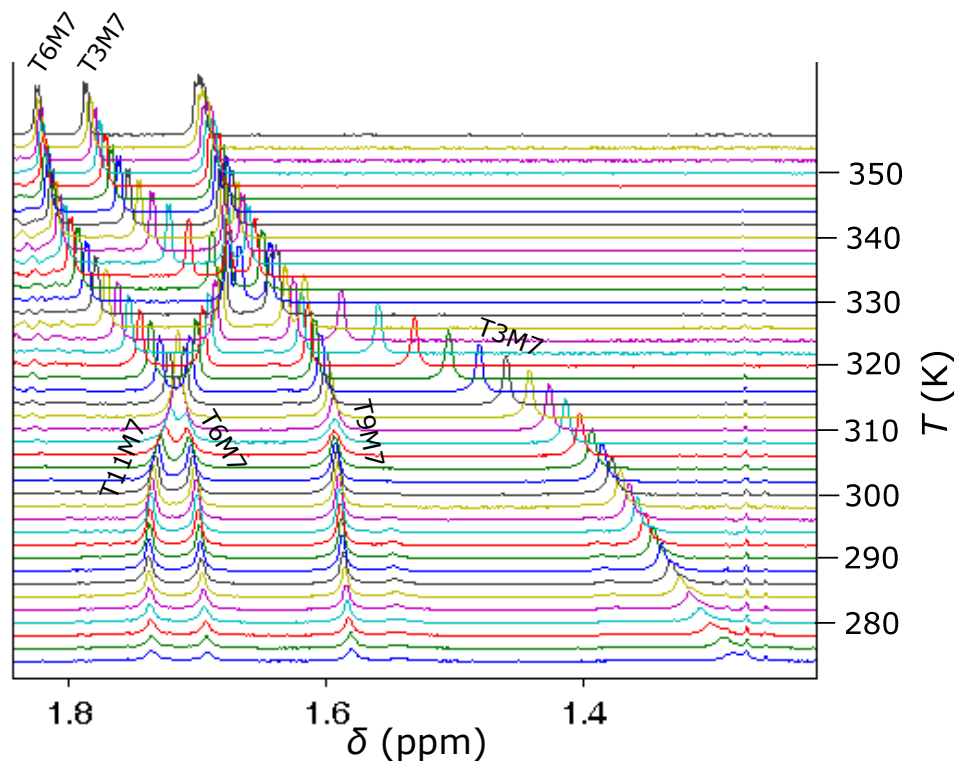
Obrázek A.3: Výřez z teplotní závislosti ¹H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály H6/H8 s vyznačeným přiřazením GuaH8, AdeH8, ThyH6, CytH6 a AdeH2.



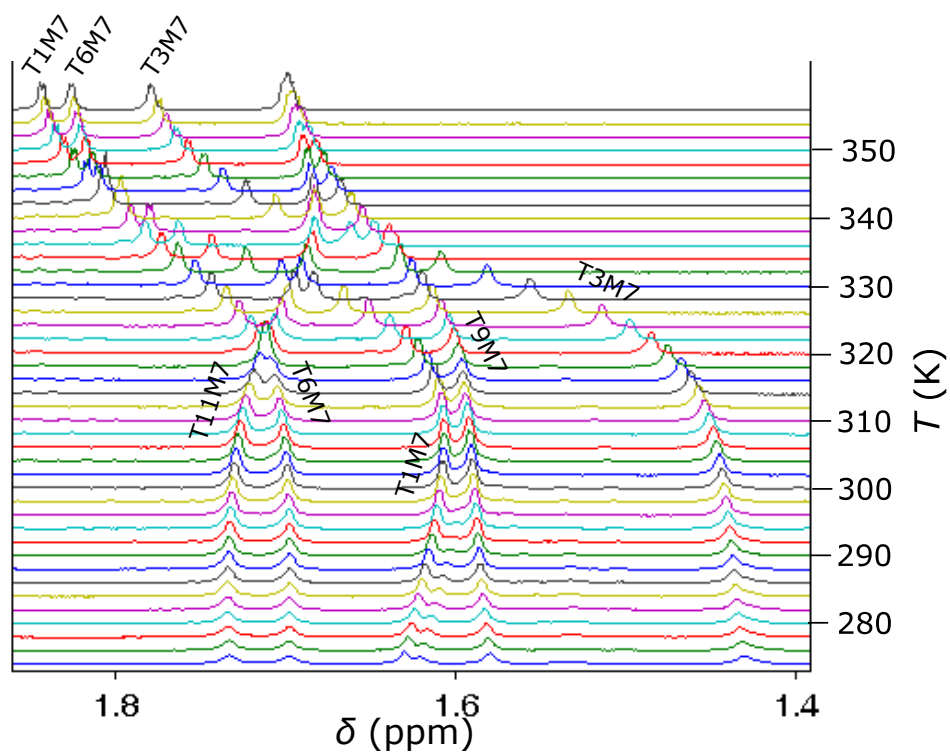
Obrázek A.4: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály H6/H8 s vyznačeným přiřazením GuaH8, AdeH8, ThyH6, CytH6 a AdeH2.



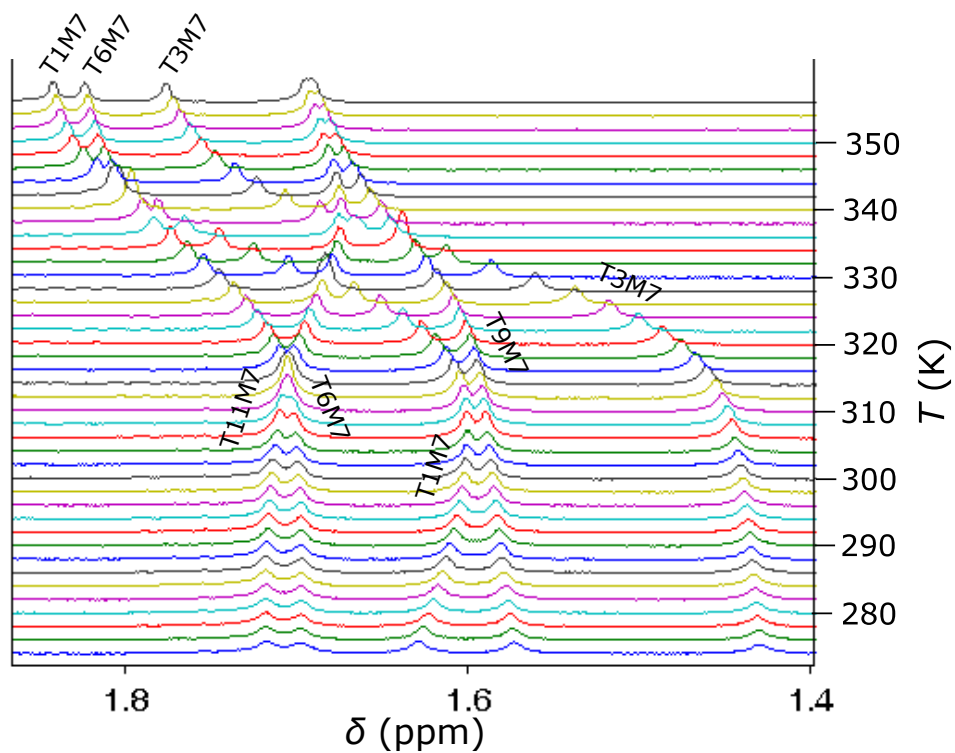
Obrázek A.5: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos12 obsahující signály thyminových methylů s vyznačeným přiřazením ThyM7.



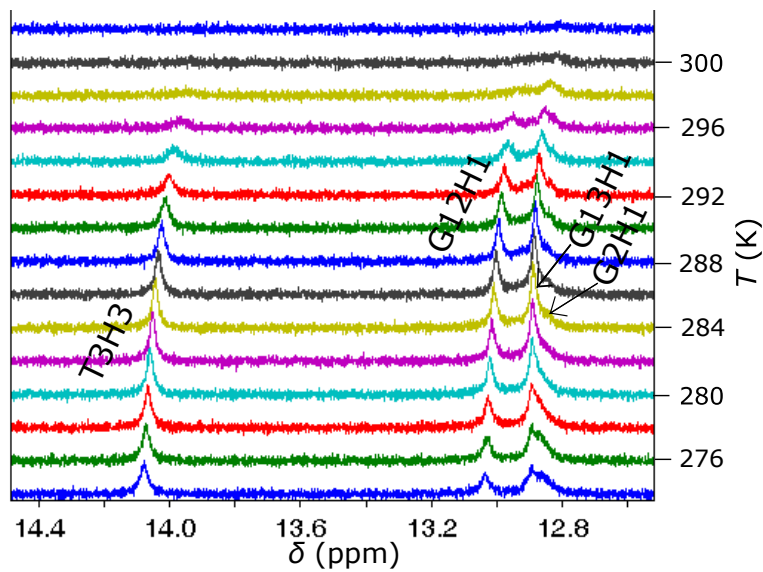
Obrázek A.6: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály thyminových methylů s vyznačeným přiřazením ThyM7.



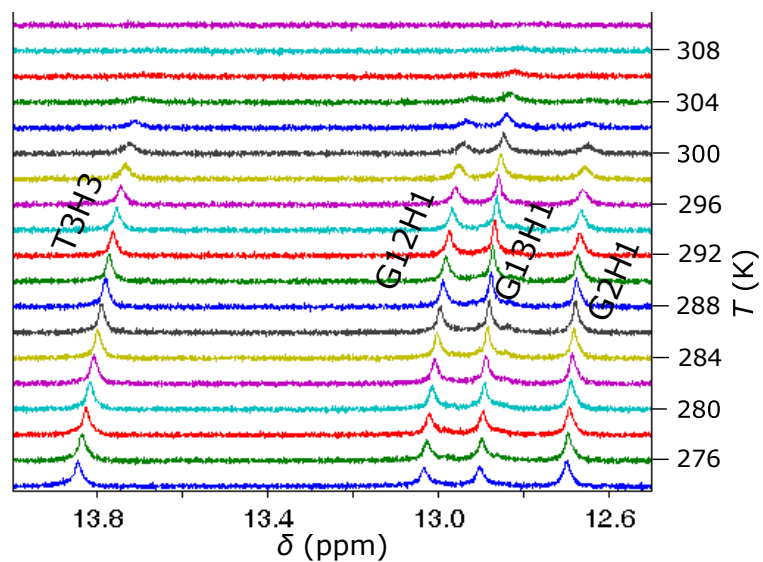
Obrázek A.7: Výřez z teplotní závislosti ¹H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály thyminových methylů s vyznačeným přiřazením ThyM7.



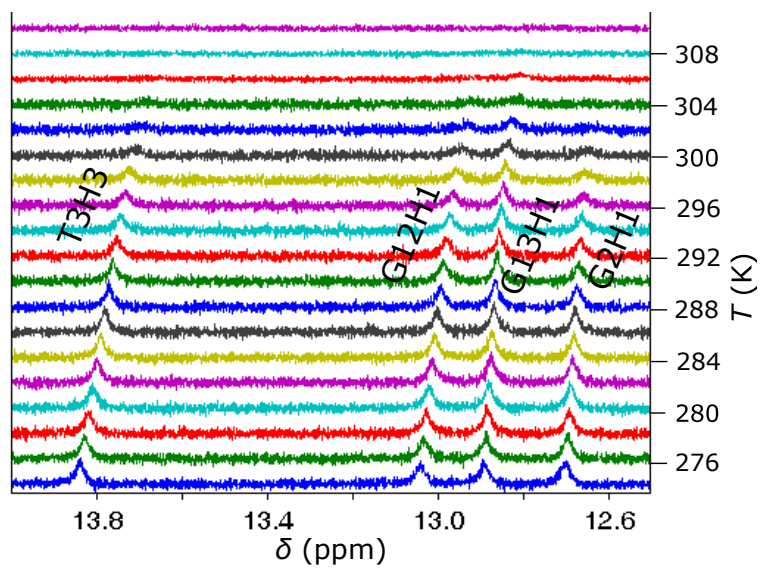
Obrázek A.8: Výřez z teplotní závislosti ¹H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály thyminových methylů s vyznačeným přiřazením ThyM7.



Obrázek A.9: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos14 obsahující signály iminodíků s vyznačeným přiřazením ThyH3 a GuaH1.



Obrázek A.10: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16a obsahující signály iminodíků s vyznačeným přiřazením ThyH3 a GuaH1.



Obrázek A.11: Výřez z teplotní závislosti ^1H spekter vzorku s2fos16b obsahující signály iminodíků s vyznačeným přiřazením ThyH3 a GuaH1.

Tabulka A.4: Hodnoty T_m jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.

	T_m (K)			
	s2fos12	s2fos14	s2fos16a	s2fos16b
T1H6	–	–	$332,9 \pm 1,3$	$333,9 \pm 4,1$
T1M7	–	–	$332,3 \pm 0,3$	$332,3 \pm 0,8$
G2H8	–	$316,8 \pm 0,2$	$332,7 \pm 0,8$	$332,1 \pm 0,7$
T3H6	^a	$314,2 \pm 0,6$	$332,8 \pm 0,7$	$332,5 \pm 1,7$
T3M7	303 ± 2	$324,8 \pm 0,2$	$332,6 \pm 0,3$	$332,2 \pm 0,6$
C4H6	^a	$324,0 \pm 0,2$	$332,7 \pm 0,5$	$332,6 \pm 0,9$
C5H6	295 ± 2	$323,9 \pm 0,1$	$332,6 \pm 0,3$	$332,2 \pm 0,7$
T6H6	291 ± 2	$323,4 \pm 0,6$	$332,0 \pm 1,9$	$333,3 \pm 5,2$
T6M7	^a	$323,5 \pm 0,5$	$331,9 \pm 0,8$	$332,2 \pm 1,9$
A7H2	^b	$322,5 \pm 0,2$	$332,3 \pm 0,9$	$333,9 \pm 2,5$
A7H8	298 ± 1	$319,7 \pm 0,7$	$328,2 \pm 2,6$	$331,3 \pm 8,9$
A8H2	^a	$319,0 \pm 1,1$	$336,2 \pm 6,2$	$333,0 \pm 3,0$
A8H8	^a	$322,0 \pm 0,3$	$333,4 \pm 1,5$	$331,9 \pm 3,2$
T9H6	309 ± 2	$324,8 \pm 1,2$	$338,5 \pm 5,3$	$339,3 \pm 11,6$
T9M7	293 ± 5	$323,8 \pm 0,8$	$331,7 \pm 1,2$	$331,6 \pm 3,3$
A10H2	^a	$323,7 \pm 0,1$	$332,2 \pm 0,4$	$332,6 \pm 1,1$
A10H8	^a	$323,5 \pm 0,2$	$332,3 \pm 0,6$	$332,1 \pm 1,3$
T11H6	280 ± 6	$323,2 \pm 0,2$	$331,9 \pm 0,6$	$330,9 \pm 1,6$
T11M7	311 ± 10	$321,6 \pm 0,6$	$330,7 \pm 1,0$	$329,6 \pm 1,7$
G12H8	289 ± 2	$330,6 \pm 7,4$	$332,5 \pm 14,5$	^a
G13H8	310 ± 7	$320,9 \pm 0,5$	$330,2 \pm 2,2$	$334,7 \pm 7,8$
A14H2	322 ± 6	$320,5 \pm 0,2$	$334,9 \pm 1,4$	$334,4 \pm 2,8$
A14H8	289 ± 2	$323,9 \pm 0,2$	$332,2 \pm 0,6$	$332,8 \pm 1,7$
C15H6	–	$324,5 \pm 0,1$	$332,6 \pm 0,3$	$332,3 \pm 0,5$
A16H2	–	–	$332,5 \pm 0,2$	$332,9 \pm 0,6$
A16H8	–	–	$332,5 \pm 0,7$	$332,2 \pm 1,4$

^ahodnoty s chybou větší, než 20 K

^bsignál tohoto vodíku nebylo možné spolehlivě naitovat kvůli chybějícímu vytrasování do nejnižších teplot

Tabulka A.5: Hodnoty ΔG při teplotě 310 K jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.

vodík	ΔG_{310} (kJmol ⁻¹)			
	s2fos12	s2fos14	s2fos16a	s2fos16b
T1H6	–	–	–9,0 ± 0,4	–8,2 ± 0,8
T1M7	–	–	–9,3 ± 0,1	–8,6 ± 0,2
G2H8	–	–1,9 ± 0,1	–10,1 ± 0,7	–10,1 ± 1,1
T3H6	^a	–1,7 ± 0,3	–10,0 ± 0,4	–9,4 ± 0,6
T3M7	2,2 ± 0,6	–6,5 ± 0,1	–10,4 ± 0,2	–9,8 ± 0,3
C4H6	^a	–5,7 ± 0,1	–10,1 ± 0,3	–9,5 ± 0,4
C5H6	3,4 ± 0,3	–5,8 ± 0,1	–9,9 ± 0,2	–9,3 ± 0,3
T6H6	11,8 ± 0,8	–4,7 ± 0,2	–7,9 ± 0,6	–7,5 ± 0,9
T6M7	^a	–5,9 ± 0,3	–9,5 ± 0,4	–8,9 ± 0,6
A7H2	^b	–5,2 ± 0,1	–8,1 ± 0,2	–7,4 ± 0,4
A7H8	13,5 ± 1,6	–7,5 ± 1,3	–8,9 ± 2,3	–6,4 ± 1,6
A8H2	^a	–3,0 ± 0,5	–9,7 ± 3,2	–12,0 ± 4,9
A8H8	^a	–4,5 ± 0,1	–7,3 ± 0,3	–7,1 ± 0,6
T9H6	0,2 ± 0,4	–5,9 ± 0,6	–9,7 ± 1,7	^a
T9M7	5,8 ± 1,0	–6,3 ± 0,6	–10,6 ± 0,7	–10,2 ± 1,5
A10H2	^a	–6,0 ± 0,1	–9,6 ± 0,2	–8,9 ± 0,3
A10H8	^a	–5,7 ± 0,1	–9,6 ± 0,3	–8,9 ± 0,4
T11H6	8,3 ± 1,9	–5,3 ± 0,2	–9,8 ± 0,7	–9,9 ± 1,8
T11M7	–0,4 ± 3,8	–4,3 ± 0,4	–7,5 ± 0,6	–7,6 ± 1,3
G12H8	7,3 ± 0,7	–4,7 ± 1,3	–6,8 ± 3,9	^a
G13H8	–0,2 ± 2,4	–4,5 ± 0,3	–7,7 ± 0,7	–7,7 ± 1,5
A14H2	^a	–3,5 ± 0,1	–14,5 ± 2,3	–14,1 ± 4,4
A14H8	5,8 ± 0,4	–5,5 ± 0,1	–9,7 ± 0,3	–8,9 ± 0,5
C15H6	–	–6,1 ± 0,1	–9,9 ± 0,1	–9,3 ± 0,2
A16H2	–	–	–8,8 ± 0,1	–8,2 ± 0,2
A16H8	–	–	–8,7 ± 0,2	–8,0 ± 0,4

^ahodnoty s chybou větší než 5 kJmol⁻¹

^bsignál tohoto vodíku nebylo možné spolehlivě nafitovat kvůli chybějícímu vytrasování do nejnižších teplot

Tabulka A.6: Hodnoty ΔS jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.

vodík	ΔS (JK ⁻¹ mol ⁻¹)			
	s2fos12	s2fos14	s2fos16a	s2fos16b
T1H6	–	–	–390 ± 25	–341 ± 46
T1M7	–	–	–419 ± 9	–384 ± 17
G2H8	–	–285 ± 7	–444 ± 37	–459 ± 67
T3H6	^a	–407 ± 22	–440 ± 23	–415 ± 43
T3M7	–330 ± 32	–439 ± 9	–460 ± 11	–442 ± 20
C4H6	^a	–405 ± 10	–445 ± 19	–418 ± 27
C5H6	–225 ± 9	–418 ± 6	–438 ± 12	–420 ± 21
T6H6	–616 ± 64	–348 ± 19	–360 ± 41	–323 ± 67
T6M7	^a	–434 ± 25	–433 ± 24	–401 ± 64
A7H2	^a	–411 ± 9	–363 ± 17	–311 ± 28
A7H8	–1102 ± 184	–781 ± 111	–489 ± 154	–300 ± 129
A8H2	–180 ± 1	–332 ± 26	–370 ± 68	–522 ± 225
A8H8	^a	–372 ± 11	–312 ± 22	–324 ± 42
T9H6	–253 ± 20	–398 ± 21	–341 ± 31	–403 ± 103
T9M7	–341 ± 57	–461 ± 45	–488 ± 48	–470 ± 102
A10H2	^a	–437 ± 6	–433 ± 13	–395 ± 23
A10H8	–265 ± 29	–424 ± 9	–431 ± 17	–402 ± 31
T11H6	–274 ± 10	–400 ± 10	–450 ± 35	–475 ± 93
T11M7	–372 ± 100	–373 ± 24	–360 ± 35	–387 ± 72
G12H8	–347 ± 16	–227 ± 30	–301 ± 84	–280 ± 125
G13H8	–357 ± 201	–416 ± 26	–380 ± 48	–311 ± 66
A14H2	–111 ± 22	–334 ± 7	–581 ± 107	–577 ± 212
A14H8	–270 ± 11	–399 ± 8	–437 ± 18	–388 ± 33
C15H6	–	–423 ± 4	–436 ± 9	–418 ± 14
A16H2	–	–	–391 ± 5	–357 ± 9
A16H8	–	–	–386 ± 16	–361 ± 28

^ahodnoty s chybou větší než 1 kJK⁻¹mol⁻¹

Tabulka A.7: Hodnoty ΔH jednotlivých vodíků pro všechny měřené vzorky.

vodík	ΔH (kJmol ⁻¹)			
	s2fos12	s2fos14	s2fos16a	s2fos16b
T1H6	–	–	–130 ± 8	–114 ± 14
T1M7	–	–	–139 ± 3	–128 ± 6
G2H8	–	–90 ± 2	–148 ± 12	–152 ± 22
T3H6	^a	–128 ± 7	–146 ± 7	–138 ± 14
T3M7	–100 ± 10	–143 ± 3	–153 ± 4	–147 ± 6
C4H6	^a	–131 ± 3	–148 ± 6	–139 ± 9
C5H6	–66 ± 3	–135 ± 2	–146 ± 4	–140 ± 7
T6H6	–179 ± 19	–113 ± 6	–120 ± 13	–108 ± 13
T6M7	^a	–140 ± 8	–144 ± 8	–133 ± 15
A7H2	^a	–133 ± 3	–121 ± 5	–104 ± 9
A7H8	^a	–250 ± 36	–161 ± 50	–99 ± 41
A8H2	–37 ± 1	–106 ± 8	–125 ± 23	–174 ± 74
A8H8	^a	–120 ± 4	–104 ± 7	–108 ± 13
T9H6	–78 ± 6	–129 ± 7	–115 ± 10	–137 ± 35
T9M7	–100 ± 18	–149 ± 14	–162 ± 16	–156 ± 33
A10H2	^a	–141 ± 2	–144 ± 4	–132 ± 7
A10H8	–73 ± 6	–137 ± 3	–143 ± 5	–133 ± 10
T11H6	–77 ± 2	–129 ± 3	–149 ± 12	–157 ± 31
T11M7	–116 ± 30	–120 ± 8	–119 ± 12	–128 ± 23
G12H8	–100 ± 5	–75 ± 9	–100 ± 26	–100 ± 32
G13H8	^a	–133 ± 8	–126 ± 15	–104 ± 20
A14H2	–36 ± 6	–107 ± 2	–194 ± 57	–193 ± 70
A14H8	–78 ± 4	–129 ± 3	–145 ± 6	–129 ± 10
C15H6	–	–137 ± 1	–145 ± 3	–139 ± 5
A16H2	–	–	–130 ± 2	–119 ± 3
A16H8	–	–	–128 ± 5	–120 ± 9

^ahodnoty s relativní chybou větší než 50 %