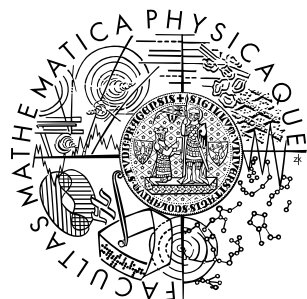


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Václav Římal

Sledování teplotně indukovaného rozpadu dvojšroubovice DNA pomocí jaderné magnetické rezonance vysokého rozlišení

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Helena Štěpánková, CSc.
Studijní program: Obecná fyzika

2007

Děkuji své vedoucí doc. RNDr. Heleně Štěpánkové, CSc., za její zájem a ochotu v průběhu provádění měření i při sepisování bakalářské práce. Děkuji prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc., za zajištění a přípravu potřebných vzorků a obětavou spolupráci při zpracování naměřených dat. Děkuji Mgr. Zdeňku Tošnerovi, Ph.D., za cenné rady ohledně jaderné magnetické rezonance a obsluhy spektrometru.

Děkuji svým rodičům a blízkým za podporu a ohleduplnost během sepisování této práce.

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

V Praze dne 30. května 2007

Václav Římal

Obsah

| | |
|--|-----------|
| Abstrakt | 4 |
| 1 Úvod | 5 |
| 2 Nukleové kyseliny | 6 |
| 2.1 Stavba nukleových kyselin | 6 |
| 2.2 Komplementarita bází | 7 |
| 2.3 Sekundární struktura nukleových kyselin | 8 |
| 3 Jaderná magnetická rezonance | 10 |
| 3.1 Gyromagnetický poměr a rezonanční frekvence | 10 |
| 3.2 Larmorova precese | 12 |
| 3.3 Pulsní metody NMR spektroskopie | 12 |
| 3.4 Dipól-dipólová interakce | 13 |
| 3.5 Chemická výměna | 13 |
| 3.6 Potlačení signálu rozpouštědla | 14 |
| 4 Experimenty | 16 |
| 4.1 Kalibrace teploty a stanovení teplotního režimu pro další měření . . . | 16 |
| 4.2 NMR nukleových kyselin | 22 |
| 5 Vyhodnocení změřených spekter a diskuse výsledků | 25 |
| 5.1 Přiřazení čar v aromatické oblasti | 26 |
| 5.2 Srovnání spekter Duplexu se součtem spekter vzorků Match a Kompl | 28 |
| 5.3 Teplotní závislost posunů čar v aromatické oblasti spektra | 30 |
| 5.4 Protony vázané na atomy dusíku | 32 |
| 5.5 Teplotní závislost polohy těžiště spektra | 36 |
| 5.6 Korelace mezi spektry při sousedních teplotách | 37 |
| 5.7 Porovnání výsledků a srovnání s mikrokalorimetrickými měřeními . . | 37 |
| 5.8 Nečistoty ve vzorcích | 40 |
| 6 Závěr | 43 |
| Literatura | 45 |
| Přílohy | 46 |

Název práce: Sledování teplotně indukovaného rozpadu dvojšroubovice DNA pomocí jaderné magnetické rezonance vysokého rozlišení

Autor: Václav Římal

Katedra (ústav): Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Helena Štěpánková, CSc.

e-mail vedoucího: stepanko@mbox.troja.mff.cuni.cz

Abstrakt: V předložené práci studujeme chování teplotní závislosti ^1H spekter jaderné magnetické rezonance syntetických deoxyoligonukleotidů. Vytvořením směsi dvou komplementárních řetězců DNA se umožní vznik duplexů. Relativní zastoupení spárovaných vláken závisí na teplotě podle van't Hoffovy rovnice, při nízkých teplotách jsou duplexy více preferovány. Tato práce prověřuje, jaké spektrální charakteristiky nejlépe odráží děje probíhající při změnách teploty a nastiňuje tak možnosti, kterými směry se lze ve výzkumu tvorby komplexů nukleových kyselin pomocí NMR vysokého rozlišení dále ubírat.

Klíčová slova: jaderná magnetická rezonance, oligonukleotid, DNA, tání dvojšroubovice

Title: Monitoring of DNA duplex melting by nuclear magnetic resonance

Author: Václav Římal

Department: Department of Low-Temperature Physics

Supervisor: doc. RNDr. Helena Štěpánková, CSc.

Supervisor's e-mail address: stepanko@mbox.troja.mff.cuni.cz

Abstract: The work is devoted to investigation into the temperature dependence of synthetic deoxyoligonucleotide ^1H NMR spectra. In the mixture of two complementary DNA strands, duplex complexes can spontaneously be formed. The percentage of the bound in the complex strands depends on temperature according to the van't Hoff equation, the duplexes being preferred at low temperatures. The work examines which spectral characteristics reflect better the processes induced by temperature changes. This enables to outline perspective directions for further NMR studies of nucleic acid complexes and their formation.

Keywords: nuclear magnetic resonance, oligonucleotide, DNA, double helix melting

Kapitola 1

Úvod

K výzkumu vlastností nukleových kyselin se často využívají oligonukleotidy, které jsou tvořeny jen krátkým úsekem DNA či RNA ve srovnání s přirozenými molekulami vyskytujícími se v živých organismech. Oligonukleotidy mají v mnoha ohledech velmi podobné vlastnosti a chování jako nukleové kyseliny přirozených délek, přitom je lze snadno sledovat běžnými fyzikálními postupy, mezi které se řadí široká škála metod: infračervená a Ramanova spektroskopie, fluorescenční mikroskopie, mikrokalorimetrie, jaderná magnetická rezonance a další.

Očekává se, že znalosti chování oligonukleotidů povedou jak k zevrubnějšímu pochopení pochodů probíhajících v buňkách, tak k výrobě nových léků založených na samotných oligonukleotidech. Ukazuje se totiž, že i některé krátké sekvence s deseti až dvaceti nukleotidy se v celé DNA buněk vyskytují pouze jednou. Toho se současný vývoj léků snaží využít například v boji proti retrovirálním onemocněním, zejména nemoci AIDS způsobené virem HIV. Retroviry totiž umisťují svou genetickou informaci do jaderné DNA hostitelské buňky, čímž ji přimějí k tvorbě virových bílkovin vlastními postupy a umožní se tak další množení viru. Cesta k přerušení rozmnožovacího cyklu viru by mohla vést přes oligonukleotidy s přesným pořadím bází, které by se navázaly právě na úsek virové nukleové kyseliny a znemožnily by tak další děje vedoucí k tvorbě proteinu.

Důležitou schopností nukleových kyselin je utváření duplexů. Cílem této práce je získat poznatky o tom, jaké nové údaje o tvorbě a rozpadu duplexů může přinést jaderná magnetická rezonance vysokého rozlišení, spíše než stanovit jednotlivé termodynamické parametry popisující tvorbu dvojšroubovice. V buněčném prostředí jsou dvojšroubovice nukleových kyselin velmi stabilní a jejich vznik či zánik řídí enzymy. Přechod mezi duplexem a samostatnými vlákny však lze uskutečnit i v laboratorních podmínkách na oligonukleotidovém modelu, a sice změnou teploty: při jejím zvyšování roste počet samostatných řetězců v roztoku na úkor duplexů. Hlavní součástí této práce je proto změření sady jednoduchých spekter NMR komplementárních oligonukleotidů a jejich směsi v závislosti na teplotě v oblasti tání duplexu a rozbor získaných experimentálních výsledků s ohledem na testování možností této metodiky v uvedené oblasti.

Kapitola 2

Nukleové kyseliny

Pro veškerý život na Zemi hrají podstatnou roli tři základní druhy organických sloučenin: cukry, tuky a bílkoviny. Zatímco cukry spolu s tuky zastávají především stavební a zásobní funkce, význam bílkovin spočívá v řízení téměř všech chemických dějů probíhajících uvnitř buněk. Jejich molekuly jsou zpravidla velmi složité a tvoří je aminokyseliny spojené peptidovými vazbami do dlouhých řetězců. Za správnou činnost každé bílkoviny prvotně zodpovídá právě tato posloupnost aminokyselin – nazýváme ji *primární strukturou*. Buňka pro svůj život musí dokázat opakovaně vytvářet své bílkoviny ve správném a přesně určeném složení, k čemuž nutně potřebuje údaje o jejich primární struktuře. Uložení a přenos těchto údajů zprostředkovávají *nukleové kyseliny*.

Informace o primární struktuře všech bílkovin, které buňka užívá, je zapsána v *deoxyribonukleové kyselině*, DNA¹. K vytvoření bílkoviny podle tohoto klíče musí proběhnout následující kroky: *přepis* neboli *transkripce* určité části DNA do molekuly *ribonukleové kyseliny* (RNA²) a poté její *překlad* – *translace* – probíhající na ribozómech, kde se konečně vytvoří polypeptidové vlákno.

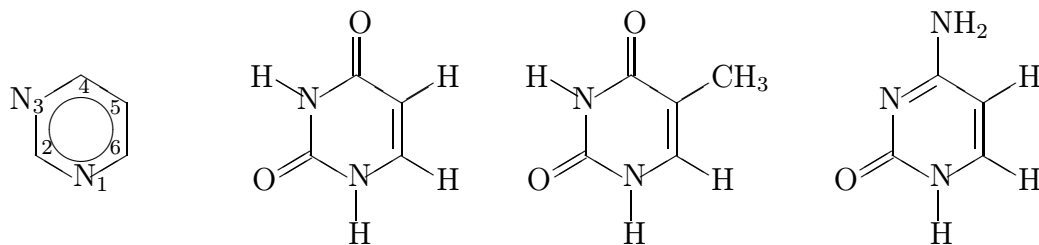
2.1 Stavba nukleových kyselin

Základními stavebními kameny nukleových kyselin jsou *nukleotidy*, které se za sebe řadí chemickou vazbou. Jsou tvořené pětiuhlíkatým sacharidem a na něm navázanou dusíkatou bází a fosfátem. Jednotlivé nukleotidy odlišuje pět různých bází³: pyrimidinové cytosin, thymin a uracil a purinové adenin a guanin, jejichž chemické vzorce jsou na obrázcích 2.1 a 2.2. Obvykle se označují zkratkami C, T, U, A a G. Báze se na cukr, kterým je buď ribóza, nebo 2-deoxyribóza (vždy v β -D-furanózové formě – obrázek 2.3), váží N-glykosidickou vazbou: za vzniku molekuly vody se ze sacharidu odštěpí hydroxyl od uhlíku C_{1'} a z báze atom vodíku (v případě pyrimidinové báze

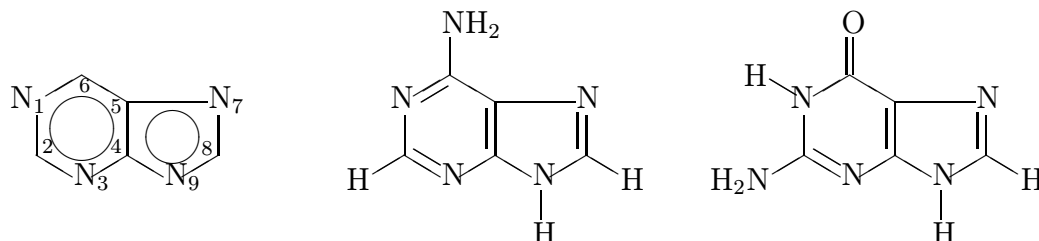
¹zkratka anglického názvu *deoxyribonucleic acid*

²původ zkratky je již zřejmý; RNA používaná pro přenos genetického kódu se nazývá mediátorová RNA či messenger RNA a označuje se jako mRNA. Tím nejsou úlohy RNA v buňkách vyčerpány: známé jsou například ribozomální RNA sloužící jako základní stavební jednotka ribozómů (rRNA) či transferová RNA přenášející jednotlivé aminokyseliny k ribozómům (tRNA) a další.

³kromě těchto bází nazývaných majoritní se v nukleových kyselinách mohou vyskytovat i jiné, avšak v mnohem menším zastoupení



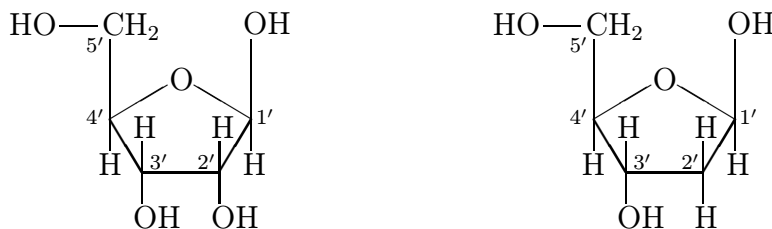
Obrázek 2.1: Pyrimidinové báze: po znázornění způsobu číslování jednotlivých atomů na pyrimidinovém kruhu následují vzorce uracilu, thyminu a cytosinu



Obrázek 2.2: Purinové báze: po znázornění způsobu číslování jednotlivých atomů na purinovém jádře následují vzorce adeninu a guaninu

od dusíku N_1 , z purinové od dusíku N_9) a dojde k jednoduché kovalentní vazbě mezi uhlíkem a dusíkem. Fosfátová skupina se váže esterovou vazbou na uhlík $C_{5'}$; jednotlivé nukleotidy se na sebe váží esterovou vazbou mezi fosfátem a uhlíkem $C_{3'}$. Z toho plyne směrovost řetězce nukleových kyselin: rozlišujeme jejich 3'-konec a 5'-konec.

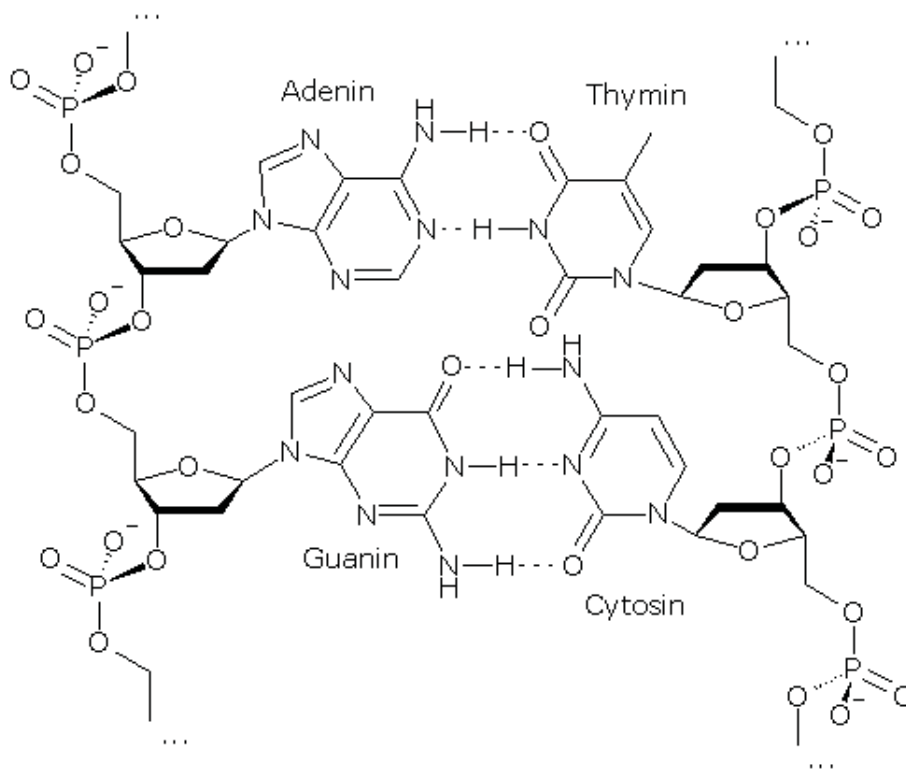
Molekuly RNA a DNA se od sebe odlišují nejen různým sacharidem, nýbrž také použitím dusíkatých bází: uracil se vyskytuje pouze v řetězcích RNA, thymin (až na řídké výjimky) jen v DNA; jejich funkce jsou však rovnocenné v obou případech.



Obrázek 2.3: β -D-ribofuranóza (vlevo) a β -D-2-deoxyribofuranóza: číslování atomů uhlíku se čárkuje, aby se odlišilo od číslování bází

2.2 Komplementarita bází

Volné elektronové páry na některých dusících a kyslících bází a polární vazba mezi vodíky a dusíky umožňují tvorbu *vodíkových můstků* mezi bázemi navzájem. Pro život zásadním jevem je *Watsonovo-Crickovo párování bází* (obrázek 2.4): vodíkovou vazbou se vždy pojí pyrimidinová a purinová báze, a to adenin s uracilem či thyminem dvěma můstky a cytosin s guaninem třemi. Dvě báze, mezi nimiž dochází k párování, nazýváme *komplementární*. Dvojice řetězců nukleových kyselin se takto



Obrázek 2.4: Watsonovo-Crickovo párování bází. Čárkovaně jsou znázorněny vodíkové můstky (zdroj: wikipedia.org)

mohou vázat dohromady a za vhodných podmínek (které přirozené buněčné prostředí obvykle splňuje) tím stabilizovat své uspořádání. Buněčná DNA, která je zpravidla tvořena vysokým počtem nukleotidů, vytváří *duplexy* navzájem komplementárních vláken; tím se rozumí takových, jejichž báze jsou navzájem komplementární, avšak *v opačném pořadí* (vzhledem k 3'- a 5'-koncům). Ke tvorbě duplexů dochází také například při transkripci mezi DNA a RNA, párování bází mezi mRNA a tRNA se významně podílí na translaci bílkovin.

Nukleové kyseliny účastníci se biologických dějů bývají tvořeny velmi dlouhými řetězci; pro studium některých jejich vlastností je však často vhodné použít látku čítající jen několik nukleotidů – takové molekuly se nazývají *oligonukleotidy*.

2.3 Sekundární struktura nukleových kyselin

Nukleové kyseliny v přirozených podmínkách vykazují helikální strukturu, nejběžnější konformace duplexů DNA se nazývá B-forma a tvoří ji pravotočivá dvojšroubovice. Tu kromě vodíkových můstků udržuje *stohování bází* (*base stacking*) způsobené přitažlivými van der Waalsovými silami mezi aromatickými jádry dusíkatých bází a – pokud je rozpouštědlem voda – hydrofobní jev, který utváří uvnitř dvojšroubovice prostor, kde se upřednostňují vodíkové můstky mezi bázemi navzájem před vazbami s molekulami vody. Zároveň se zeslabuje vzájemné odpuzování obou záporně nabitých řetězců, neboť jejich sacharido-fosfátové páteře leží vně šroubovice. Stohování

bází napomáhá k vytvoření šroubovitého tvaru i u jednoduchých řetězců. V tomto případě ale takové uspořádání narušují vodíkové můstky mezi bázemi a molekulami vody, čímž je forma šroubovice znevýhodněna. [4]

Vznik uspořádané struktury je spojen s poklesem entropie ($\Delta S < 0$), současně ho však doprovází snížení enthalpie ($\Delta H < 0$) [5]. Pro tvorbu stabilní šroubovice musí být změna enthalpie dostatečná k tomu, aby zapříčinila pokles Gibbsovy volné energie

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S. \quad (2.1)$$

Tvorba duplexu tedy patří mezi enthalpií řízené děje a při zvýšení teploty postupně přestává být energeticky výhodná.

Stabilita sekundární struktury významně závisí na mnoha okolnostech: mezi ně patří teplota, bázevé složení a délka řetězce či iontové prostředí. Například větší zastoupení G-C párů vede ke zvýšení soudržnosti duplexu v důsledku vyššího počtu vodíkových můstků mezi bázemi. Koncentrace duplexů a jednotlivých vláken v roztoku jsou v termodynamické rovnováze. S rostoucí teplotou dochází k postupnému snižování počtu duplexů, nad určitou teplotou se už v roztoku vyskytují výhradně samostatná vlákna. Tento jev má vlastnosti fázového přechodu, mluvíme proto o *tání dvojšroubovice DNA*. Teplotu, při níž je spárována právě polovina všech řetězců, nazýváme *teplotou tání* T_m .

Velmi často se používá *dvoustavový model*, který předpokládá, že se v roztoku vždy nacházejí jen úplně oddělená vlákna a dokonalé duplexy. Model zanedbává možnost, že molekuly mohou být jen částečně spárované pomocí několika bázevých dvojic. Rovnovážná konstanta K mezi duplexem a samostatnými vlákny A a B při shodné koncentraci obou složek je potom dána vztahem

$$K = \frac{C_D}{C_A C_B} = \frac{C_D}{(C - C_D)^2}, \quad (2.2)$$

kde C_A , C_B a C_D jsou koncentrace vláken A a B a duplexů a C celková koncentrace jednoho typu vláken. Teplotní závislost K udává *van't Hoffova rovnice*

$$\ln K(T) = -\frac{\Delta G}{RT} = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R}, \quad (2.3)$$

kde $R = 8,314 \text{ Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$ značí univerzální plynovou konstantu. Fitem naměřené závislosti K na teplotě lze určit termodynamické parametry ΔH a ΔS a z nich vyjádřit teplotu tání podle vztahu

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R \ln C/2}{\Delta H} + \frac{\Delta S}{\Delta H} \quad (2.4)$$

plynoucím z vyrovnaných koncentrací duplexu a samostatných vláken v bodě tání:

$$C_D = \frac{1}{2}C. \quad (2.5)$$

Kapitola 3

Jaderná magnetická rezonance

Zájmem jaderné magnetické rezonance – NMR¹ – jsou magnetické momenty jader atomů, které souvisí s jejich celkovým momentem hybnosti nazývaným *jaderný spin*. Zatímco spinová kvantová čísla jednotlivých protonů a neutronů jsou právě rovna jedné polovině, jádra mohou být složena z několika takových částic: skládání spinů všech nukleonů a jejich orbitálních momentů se projeví jako celkový spin jádra s kvantovým číslem l , které nabývá nezáporných celočíselných násobků jedné poloviny. NMR se obvykle zabývá jádry v základních stavech. Některá jádra mají nulový celkový spin (jádra sudo-sudá) – taková nemůžeme měřit magnetickou rezonancí. V organických látkách se nejčastěji měří takové izotopy, jež mají jednopolovinový spin: sem patří zejména vodík ^1H , uhlík ^{13}C , dusík ^{15}N či fosfor ^{31}P . Jádra s vyšším spinem mají kromě magnetického dipólového také elektrický kvadrupólový moment, což vede k interakcím s elektrickým polem, které se v případě $\frac{1}{2}$ -spinových jader neprojevují.

Průmět vektoru spinu \mathbf{I} do zvolené osy nemůže nabývat libovolných hodnot: pro částici s celkovým spinovým kvantovým číslem l – čili $I^2 = \hbar^2 l(l+1)$ – je povoleno pouze $2l+1$ různých projekcí, potažmo magnetických kvantových čísel

$$m = -l, -l+1, \dots, l-1, l. \quad (3.1)$$

Všechny tyto směry vektoru spinu jsou za nepřítomnosti elektromagnetického pole rovnocenné a leží na stejné energetické hladině. Vložíme-li však takovou částici do magnetického pole, odstraníme degeneraci stavů příslušících různým číslům m a jejich energie se rozštěpí na $2l+1$ úrovní. NMR se zabývá přechody mezi těmito stavy atomových jader, které doprovází absorpce či vyzáření fotonu v radiofrekvenčním pásmu.

3.1 Gyromagnetický poměr a rezonanční frekvence

Magnetický moment jádra $\boldsymbol{\mu}$ závisí přímo úměrně na jeho spinu \mathbf{I} :

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I}. \quad (3.2)$$

Součinitel této úměrnosti se nazývá *gyromagnetický poměr* a liší se pro různá jádra; jeho velikosti pro některé izotopy používané v NMR uvádím v tabulce 3.1.

¹zkratka anglického spojení *nuclear magnetic resonance*

| Jádro | Spin I | $\gamma/2\pi$ [$10^7 \text{T}^{-1}\text{s}^{-1}$] | ν [MHz] | Přirozený výskyt izotopu [%] |
|-----------------|----------|---|-------------|------------------------------|
| ^1H | 1/2 | 26,75 | 500,0 | 99,985 |
| ^2H | 1 | 4,11 | 76,8 | 0,015 |
| ^{13}C | 1/2 | 6,73 | 125,8 | 1,108 |
| ^{14}N | 1 | 1,93 | 36,1 | 99,63 |
| ^{15}N | 1/2 | -2,71 | 50,6 | 0,37 |
| ^{31}P | 1/2 | 10,84 | 202,6 | 100,0 |

Tabulka 3.1: Spiny a gyromagnetické poměry vybraných izotopů a příslušné rezonanční frekvence v magnetickém poli 11,7 T [2]

Zavedením magnetického pole o indukci \mathbf{B}_0 vytvoříme v místě jádra význačný směr, položme tedy osu z rovnoběžně se směrem tohoto pole. Průmět spinu jádra do této osy je pro magnetické kvantové číslo m roven

$$I_z = \hbar m. \quad (3.3)$$

Energie magnetického dipólu $\boldsymbol{\mu}$ v magnetickém poli \mathbf{B} je dána skalárním součinem

$$E = -\boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{B} = -\mu_z B, \quad (3.4)$$

kde μ_z je z -ovou složkou magnetického momentu $\boldsymbol{\mu}$ a B je velikost magnetické indukce v místě jádra. Po dosazení ze vztahů (3.2) a (3.3) dostaneme výraz pro energii magnetického dipólu v magnetickém poli:

$$E = -\hbar\gamma m B. \quad (3.5)$$

Rozdíl mezi těmito energiemi pro dvě sousední čísla m (která se liší o 1) tedy činí

$$\Delta E = \hbar\gamma B. \quad (3.6)$$

Frekvence fotonu, který může vyvolat přechod mezi sousedními energetickými hladinami jádra, neboli *rezonanční frekvence* je proto

$$\nu = \frac{\gamma B}{2\pi}. \quad (3.7)$$

Spektroskopie NMR využívá skutečnosti, že rezonanční frekvence je citlivá na velikost magnetického pole *v místě jádra*. Ta je totiž ovlivněna jeho blízkým okolím, elektrony v molekulách přispívají k hodnotě magnetické indukce na jádře, mohou tedy zvyšovat či snižovat její velikost oproti vnějšímu magnetickému poli B_0 . I jádra stejných izotopů na různých pozicích v molekule tak často rezonují na odlišných frekvencích. Tento jev se nazývá *chemický posun*. Frekvence ve spektrech se uvádí relativně jako veličina

$$\delta \equiv \frac{\nu - \nu_0}{\nu_0}, \quad (3.8)$$

která se udává v jednotkách ppm². Frekvence ν_0 přísluší rezonanci standardu, kterým pro vodíková a uhlíková jádra obvykle bývá TMS – tetramethylsilan, tedy $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$.

²z anglického *parts per million*, tedy 10^{-6}

Chemické posuny ve spektrech ^1H (mluvíme také o protonových spektrech) v kapalinách leží přibližně v rozmezí 0 – 15 ppm. K docílení vysokého rozlišení spekter je třeba dbát na to, aby pole \mathbf{B}_0 v prostoru vzorku dosahovalo co nejlepší homogenity a časové stability; současné spektrometry umožňují relativní přesnosti řádu až 10^{-10} . Frekvenční osa se z historických důvodů zpravidla zobrazuje tak, že posun δ roste zprava doleva.

3.2 Larmorova precese

Jaderné stavy s různými kvantovými čísly m nejsou za přítomnosti magnetického pole obsazeny rovnoměrně: přednost dostanou projekce spinu s menší energií (tedy ty s větším m pro $\gamma > 0$) a v tepelné rovnováze se četnosti budou řídit *Boltzmannovým rozdělením*. Z makroskopického hlediska se projeví souhrnný magnetický moment všech jader (v jednotkovém objemu vzorku) \mathbf{M} , který bude v rovnováze směřovat ve směru pole \mathbf{B}_0 .

Dojde-li k vychýlení jaderné magnetizace z rovnovážného směru, působením okolního magnetického pole začne vektor \mathbf{M} konat precesi kolem osy z . Říká se jí *Larmorova precese* a její kruhová rychlost, *Larmorova frekvence*, je dána vztahem

$$\omega = \gamma B. \quad (3.9)$$

Stojí za povšimnutí, že rychlost Larmorovy precese odpovídá rezonanční frekvenci ze vztahu (3.7).

3.3 Pulsní metody NMR spektroskopie

V dnešní době se k proměření spekter NMR zpravidla nepracuje tak, jak tomu bývalo v období počátků této metody, kdy se postupně měnila frekvence vysílaného záření a sledovala se absorpce tohoto záření ve vzorku. Obvyklý postup dnes je takový, že se na vzorek působí jenom velice krátkým pulsem nebo sledem několika pulsů elektromagnetického pole, které stočí magnetizaci \mathbf{M} mimo osu z , a následně se měří časový průběh napětí na detekční cínce indukované Larmorovou precesí jaderné magnetizace. Z průběhu napětí lze poté *Fourierovou transformací* získat spektrum.

Stále předpokládáme, že vzorek je umístěn do homogenního magnetického pole \mathbf{B}_0 ve směru osy z . Zavedením přídavného magnetického pole s indukcí \mathbf{B}_1 rotující v rovině kolmé na osu z s kruhovou rychlostí ω_0 se způsobí pohyb vektoru jaderné magnetizace vzorku: ten bude konat jednak precesi kolem směru \mathbf{B}_1 , tak precesi kolem osy z způsobenou odklonem magnetizace od rovnovážného směru. Úhel sklopení magnetizace \mathbf{M} od osy z závisí na délce trvání pulsu τ a na jeho amplitudě B_1 :

$$\alpha = \gamma B_1 \tau. \quad (3.10)$$

Může se tak docílit sklopení magnetizace o libovolný úhel. Pro měření jsou důležité zejména pulsy, které ji stočí do roviny kolmé na osu z ($\pi/2$ -pulsy) či změni její orientaci (π -pulsy).

Základní měřicí technikou pulsní spektroskopie NMR je sledování *signálu volné precese*³. Tehdy se $\pi/2$ -puls magnetizace sklopí do roviny xy a následně ponechá precedovat kolem osy z , zatímco se měří napětí indukované na detekční soustavě. Intenzita signálu s časem klesá v důsledku relaxačních mechanismů, které navyšují magnetizaci ve směru osy z a současně snižují její příčnou složku; po uplynutí určité doby se znovu ustanoví tepelná rovnováha, kdy je jaderná magnetizace rovnoběžná s osou z .

3.4 Dipól-dipólová interakce

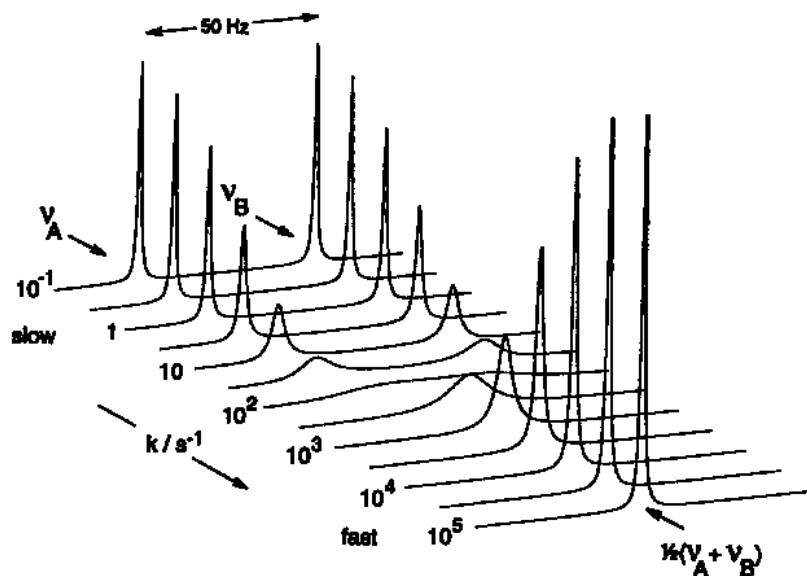
Na spiny jader nepůsobí jen vnější magnetické pole B_0 a pole indukované elektrony v obalech (způsobující chemický posun), nýbrž také magnetické pole vytvořené jinými jádry v okolí. Rozlišuje se *přímá a nepřímá dipól-dipólová interakce*. Přímá interakce je způsobena vzájemným působením jaderných dipólových momentů přes prostor; molekuly v roztoku se však velmi rychle pohybují a rotují, čímž se tato interakce střeďuje na nulu, nicméně stále významně ovlivňuje relaxace. Nepřímá interakce je zprostředkována vazebnými elektrony, lze ji tedy pozorovat pouze mezi jádry spojenými chemickými vazbami – s rostoucím počtem vazeb mezi jádry se tato interakce nazývaná také *J-vazbou* zeslabuje. Pohybem molekul se však nestřeďuje k nule jako přímá interakce, ale způsobuje štěpení spektrálních čar: každé jádro se spinem $1/2$ v dosahu J-vazby zapříčiní rozdělení na dvě čáry (dublet). Výjimkou je J-interakce mezi magneticky ekvivalentními jádry, která se ve spektrech neprojevuje. V případě dvou protonů se velikost rozštěpení přes tři vazby (tedy mezi vodíky ve skupině H–C–C–H) pohybuje v rozmezí 2 – 20 Hz.

Štěpení spektrálních čar J-vazbou však je v některých případech nežádoucí, zejména pokud mezidvěma různými izotopy dochází k silné vazbě, která činí spektra nepřehledná vlivem překrývání různých čar. To nastává například při měření uhlíkových spekter: J-vazba mezi uhlíkovým jádrem a sousedícím protonem dosahuje řádově 100 Hz, což v 11,7T poli představuje posun o několik ppm, a to už bývá neúnosné. Vliv J-vazby na spektrum se však dá potlačit, a to takzvaným *decouplingem*: při něm se radiofrekvenčním polem působí na jádra způsobující nežádoucí štěpení (často se říká, že se tato jádra *ozařují*) a tím se vyvolají rychlé přechody mezi jejich spinovými stavy. K přechodům dochází tak často, že měřená jádra zaznamenají jen časovou střední hodnotu J-interakce – a tou je nula.

3.5 Chemická výměna

Pomocí jaderné magnetické rezonance lze sledovat dynamické procesy na úrovni molekul. Děje spojené se změnou konformace nebo zánikem a vznikem chemických vazeb nazýváme *chemickou výměnou*; tehdy se mění okolí měřeného jádra a tím i jeho rezonanční frekvence. Uvažujme, že dané jádro může přecházet mezi dvěma polohami, jimž přísluší různé chemické posuny δ_A a δ_B (tedy rezonanční frekvence ν_A a ν_B). V závislosti na rychlosti výměny se kvalitativně mění spektrum: je-li výměna dostatečně pomalá, ve spektru lze pozorovat dvě ostré čáry. S rostoucí rychlostí

³free induction decay, bývá označován zkratkou FID



Obrázek 3.1: Symetrická chemická výměna mezi dvěma polohami. Pro různé hodnoty k jsou zobrazena simulovaná NMR spektra (zdroj: [2])

konstantou k přechodu ze stavu A do B a zpět se však obě čáry rozšiřují, až se slíjí do jedné a ta se při dalším navýšení rychlosti výměny zužuje. Její poloha je dána aritmetickým průměrem posunů δ_A a δ_B , pokud jsou oba stavy molekuly rovnocenné. Takovou situaci nazýváme *symetrickou chemickou výměnou*; průběh NMR spekter v závislosti na rychlostní konstantě ukazuje obrázek 3.1. V opačném případě, když mají čáry odpovídající stavům A a B rozdílné intenzity, leží jediná čára pozorovaná při vysoké rychlostní konstantě v místě těžiště původních čar.

Rozlišujeme tedy *rychlou* a *pomalou výměnu*. Situace, ve které právě dojde ke splynutí obou původních čar (*koalescenci*), odpovídá rychlostní konstantě

$$k = \frac{\pi}{\sqrt{2}} |\nu_A - \nu_B|. \quad (3.11)$$

Zda jde o pomalou či rychlou výměnu, je proto dáno rozdílem rezonančních frekvencí.

3.6 Potlačení signálu rozpouštědla

Pro lepší rozlišení spektra zkoumané látky je často třeba odstranit signál rozpouštědla, který je vzhledem k nízkým koncentracím vzorku obvykle převažující a způsobuje tak nečitelnost zbytku spektra. Jako rozpouštědlo biomolekul je pro sledování přirozených dějů nejvhodnější použít vodu, která však dává silný signál v protonovém spektru na 4,7 ppm.

Nejjednodušším postupem, jak docílit zeslabení signálu rozpouštědla, je *presaturace*: před měřicí sekvencí pulsů se selektivně ozařují jádra rozpouštědla, čímž se vyrovnají populace stavů s různými čísly m a zamezí se tak přechodům mezi těmito stavy. Toho lze dosáhnout dlouhým nízkovýkonným pulsem na Larmorově frekvenci jader rozpouštědla.

Mezi pokročilejší techniky se řadí potlačení signálu rozpouštědla pomocí selektivních π -pulsů a pulsních gradientů ve směru magnetického pole. Po sklopení magnetizace do příčné roviny se dočasným zapnutím gradientu magnetického pole Larmorova frekvence stane závislou na poloze ve vzorku, čímž dojde k rozfázování jednotlivých příspěvků k výslednému signálu. Následnou aplikací π -pulsu a dalším gradientem (symetrickým k prvnímu) se fáze znovu dostanou do shody a lze poté měřit běžný FID. Kouzlo metody spočívá v tom, že se dá vytvořit sled několika pulsů chovající se jako jeden π -puls, jenž způsobí refokusaci signálu pro všechny Larmorovy kmitočty kromě kmitočtu příslušejícího rozpouštědlu. To znamená, že se magnetizace rozpouštědla nerefokusuje zpět a při měření se signály rozpouštědla ve spektru neprojeví.

Kapitola 4

Experimenty

Všechna spektra byla změřena na spektrometru Avance 500 firmy Bruker a jejich bezprostřední zpracování se provádělo v programovém balíku Topspin dodávaném společně s přístrojem. Spektra se snímala pomocí tříkanálové sondy TBO. Uvnitř supravodivého magnetu se nachází pole o indukci $B_0 = 11,7\text{ T}$, což odpovídá kmitočtu 500, 132 MHz pro vodíková jádra a 202, 456 MHz pro jádra fosforu ^{31}P .

Součástí sondy je také topná spirála a teplotní čidlo. Počítačový program vedle uživatelského nastavení teploty a sledování okamžité teploty v okolí vzorku zprostředkovává průběžné změny topného výkonu spirály tak, aby se optimálním způsobem dosáhlo požadované teploty. Výměnu tepla s okolím zajišťuje proud plynného dusíku obtékající vzorek, pro měření při teplotách nižších než pokojová teplota je předřazena chladnička snižující teplotu proudícího plynu. Parametry používané shodně při veškerých měřeních, která budou popsána, shrnuje tabulka 4.1.

| | |
|-----------------------|---------|
| Průtok dusíku | 800 l/h |
| Maximální topný výkon | 20 % |
| Proportional band | 12,40 |
| Integrační doba | 14,00 |
| Derivační doba | 0,00 |

Tabulka 4.1: Parametry pro zacházení se změnami a udržováním teplot vzorku uvnitř sondy

4.1 Kalibrace teploty a stanovení teplotního režimu pro další měření

Jak již bylo řečeno, součástí sondy spektrometru je i teplotní čidlo umístěné uvnitř magnetu poblíž vzorku, nicméně nelze předpokládat, že se teplota čidla přesně shoduje se skutečnou teplotou měřeného vzorku. Pro její přesnější určení bylo třeba zkalibrovat čidlo pomocí látek s dobře popsanou teplotní závislostí protonových spekter.

Spektra methanolu CH_3OH a ethylenglykolu $\text{HOCH}=\text{CHOH}$ obsahují dvě čáry. Rozdíl jejich posunů δ v jednotkách ppm lze využít pro výpočet teploty pomocí rovnice platné pro methanol v rozsahu teplot 175 K–330 K:

$$T/\text{K} = 403,0 - 29,46 \delta - 23,832 \delta^2 \quad (4.1)$$

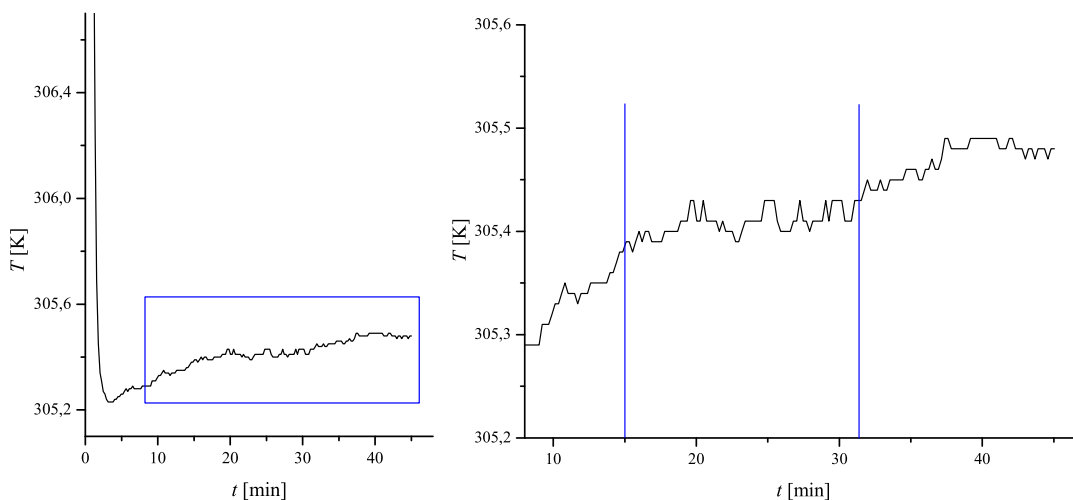
a rovnice pro ethylenglykol v rozsahu teplot 283 K–343 K:

$$T/\text{K} = 466,0 - 101,64 \delta. \quad (4.2)$$

Tyto vztahy umožňují výpočet teploty s přesností lepší než 0,5 K. [1]

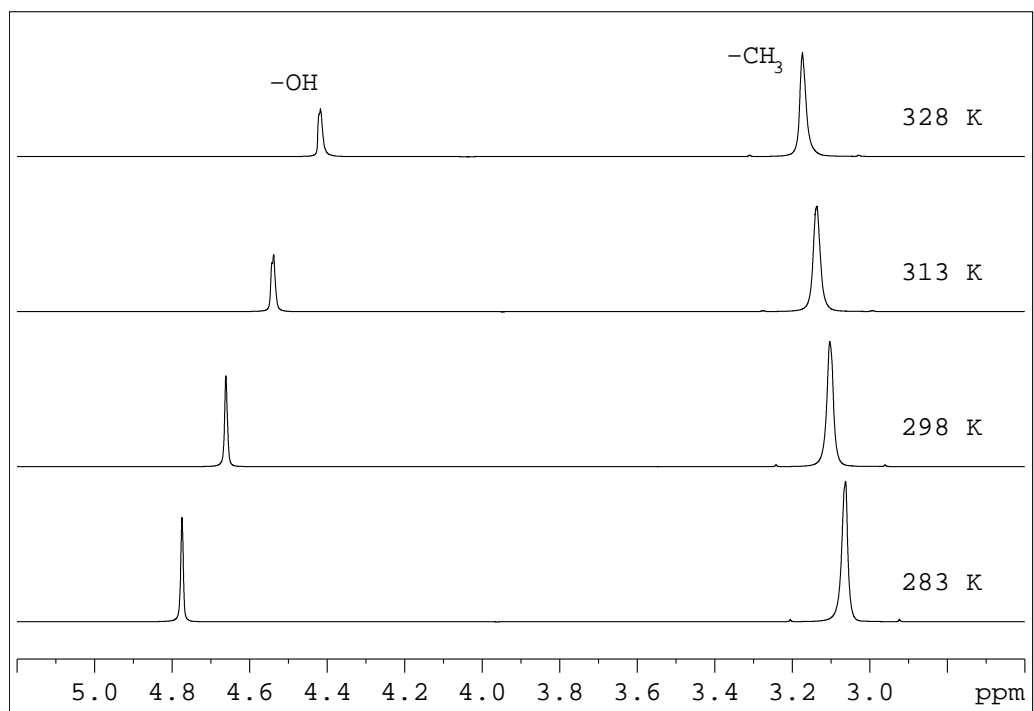
Pro určení okamžiku, kdy se teplota vzorku ustálí, jsem proměřil průběh spektra methanolu při poklesu teploty ze 310 K na 305 K po dobu 45 minut. Ačkoli totiž může být teplota čidla stálá, neznamená to, že i vzorek dosáhl požadované teploty. Závislost skutečné teploty na čase ukazuje obrázek 4.1. Z něj je patrné, že i po uplynutí 40 minut teplota vzorku stále poněkud kolísá. Při ochlazování vzorku totiž jeho skutečná teplota nejdříve poklesne pod cílovou hladinu, ke které se potom limitně blíží zespoda. Sledování teploty methanolu v čase při jejím navýšení ukázalo, že se v průběhu ohřevu chová přesně opačně – cílové teploty se v tomto případě dosahuje shora –, což umožňuje následující úvahy použít i zde.

Měření teplotní závislosti spekter, při kterém by se vždy čekalo téměř hodinu na ustálení teploty, by zabralo příliš mnoho času. Všimněme si proto v grafu vyznačené oblasti, kde je teplota takřka stálá. Pokud se tedy spektra zkoumané látky budou měřit vždy v rozmezí 15 – 30 minut od okamžiku změny cílové teploty T_0 , s největší pravděpodobností se teplota vzorku během měření rezonancí příliš nezmění. (Přitom je důležité mít neustále na paměti, že tyto výsledky vypovídají o chování průběhu teploty pouze při změně teploty o 5 K!)

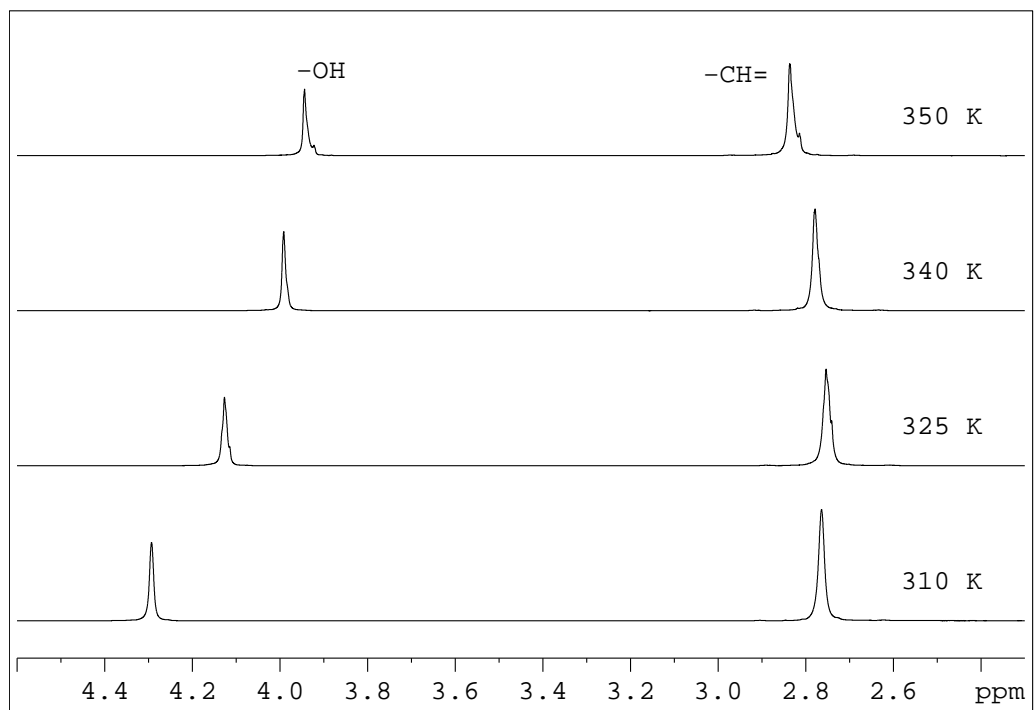


Obrázek 4.1: Časový vývoj teploty vzorku methanolu při změně nastavení cílové teploty ze 310 K na 305 K. Vyznačenou oblast z levého grafu zobrazuje podrobněji druhý graf, na němž je vymezen časový úsek, kde se teplota vzorku T výrazně nemění

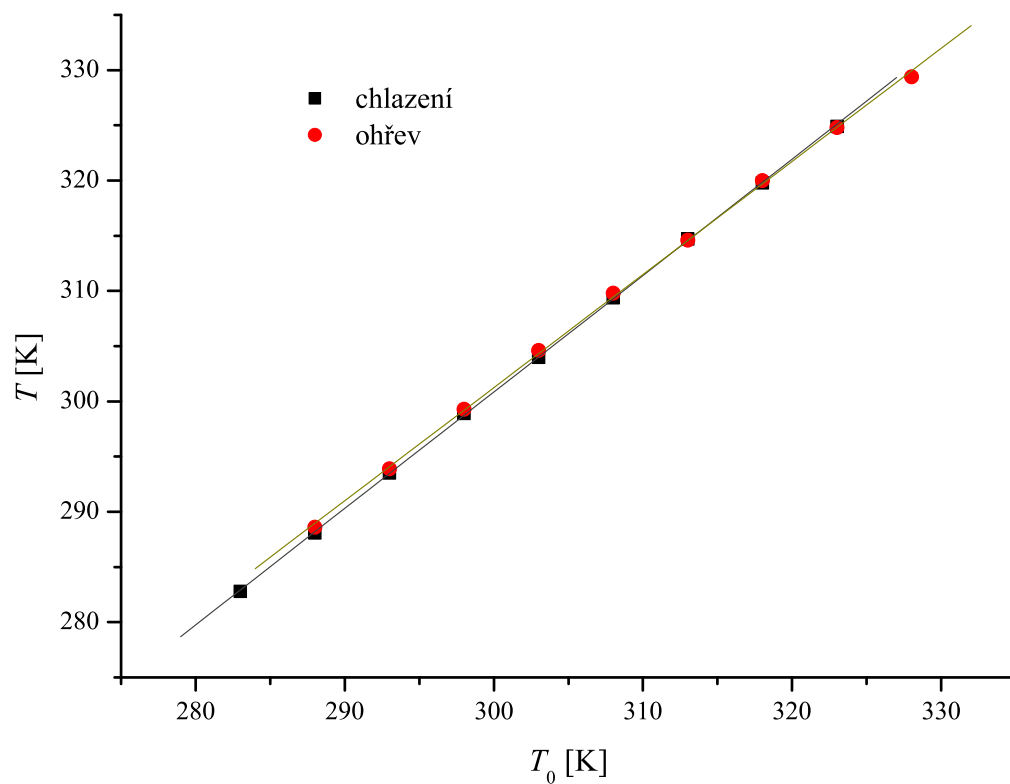
Měřil jsem protonová spektra methanolu v rozsahu teplot 288 K–328 K při ohřívání vzorku a při teplotách od 323 K do 283 K při jeho ochlazování. Použil jsem nejjednodušší pulsní sekvenci pro měření signálu volné precese, tedy jediný $\pi/2$ -puls. Krok mezi sousedními teplotami jsem volil 5 K, měření jednotlivých spekter jsem spustil vždy po patnácti minutách od nastavení teploty. Nastavenou (nominální) teplotu T_0 , posun methylové a hydroxylové skupiny, jejich rozdíl δ a skutečnou teplotu methanolu T spočtenou podle vztahu (4.1) ukazují tabulky 4.2 a 4.3. Ukázka spekter methanolu při několika různých teplotách je na obrázku 4.2. Závislost skutečné teploty na teplotě ukazované čidlem ukazuje obrázek 4.4.



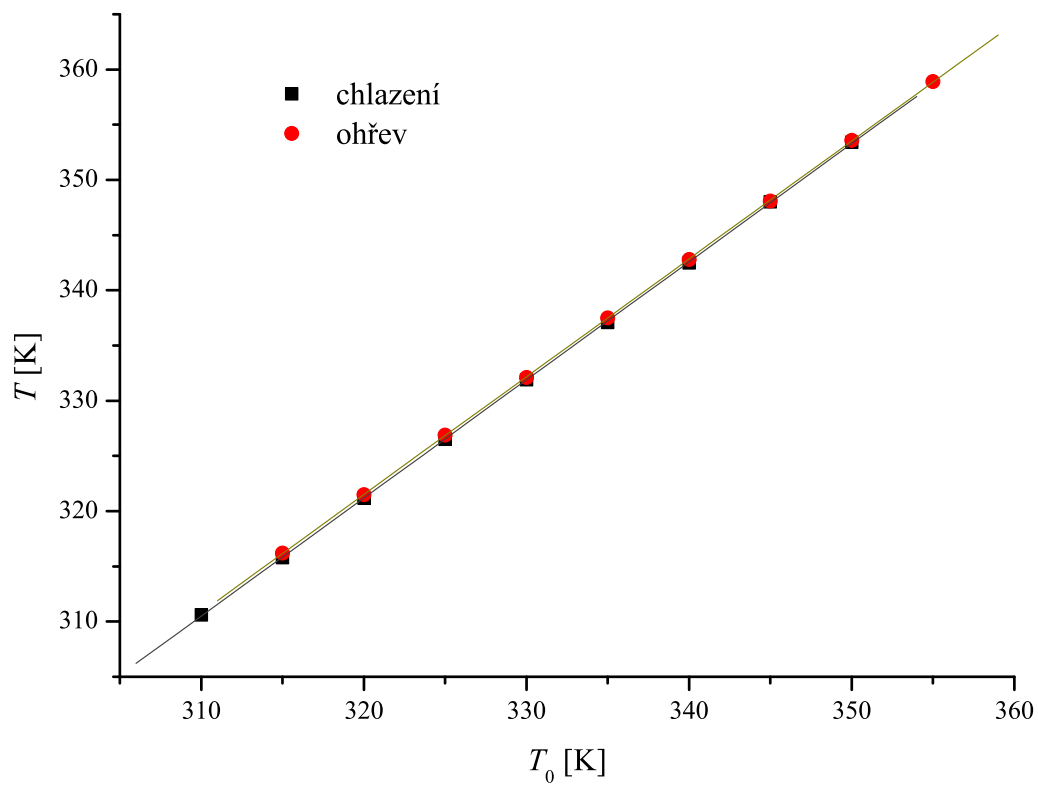
Obrázek 4.2: Spektra methanolu při několika různých teplotách



Obrázek 4.3: Spektra ethylenglykolu při několika různých teplotách



Obrázek 4.4: Kalibrační závislosti methanolu, naměřenými body jsou proloženy přímkou



Obrázek 4.5: Kalibrační závislosti ethylenglykolu, naměřenými body jsou proloženy přímkou

| T_0 [K] | δ_{CH_3} [ppm] | δ_{OH} [ppm] | δ [ppm] | T [K] |
|-----------|-----------------------|---------------------|----------------|---------|
| 288,0 | 3,087 | 4,745 | 1,658 | 288,6 |
| 293,0 | 3,084 | 4,693 | 1,609 | 293,9 |
| 298,0 | 3,103 | 4,661 | 1,558 | 299,3 |
| 303,0 | 3,117 | 4,623 | 1,506 | 304,6 |
| 308,0 | 3,125 | 4,579 | 1,454 | 309,8 |
| 313,0 | 3,137 | 4,542 | 1,405 | 314,6 |
| 318,0 | 3,141 | 4,489 | 1,348 | 320,0 |
| 323,0 | 3,159 | 4,455 | 1,296 | 324,8 |
| 328,0 | 3,173 | 4,418 | 1,245 | 329,4 |

Tabulka 4.2: Teplotní závislost spektra methanolu při ohřevu

| T_0 [K] | δ_{CH_3} [ppm] | δ_{OH} [ppm] | δ [ppm] | T [K] |
|-----------|-----------------------|---------------------|----------------|---------|
| 283,0 | 3,063 | 4,774 | 1,711 | 282,8 |
| 288,0 | 3,069 | 4,732 | 1,663 | 288,1 |
| 293,0 | 3,077 | 4,690 | 1,613 | 293,5 |
| 298,0 | 3,084 | 4,645 | 1,561 | 298,9 |
| 303,0 | 3,117 | 4,629 | 1,512 | 304,0 |
| 308,0 | 3,109 | 4,567 | 1,458 | 309,4 |
| 313,0 | 3,137 | 4,541 | 1,404 | 314,7 |
| 318,0 | 3,153 | 4,503 | 1,350 | 319,8 |
| 323,0 | 3,159 | 4,454 | 1,295 | 324,9 |

Tabulka 4.3: Teplotní závislost spektra methanolu při chlazení

| T_0 [K] | δ_{CH} [ppm] | δ_{OH} [ppm] | δ [ppm] | T [K] |
|-----------|---------------------|---------------------|----------------|---------|
| 315,0 | 2,802 | 4,276 | 1,474 | 316,2 |
| 320,0 | 2,742 | 4,164 | 1,422 | 321,5 |
| 325,0 | 2,805 | 4,174 | 1,369 | 326,9 |
| 330,0 | 2,801 | 4,118 | 1,317 | 332,1 |
| 335,0 | 2,810 | 4,074 | 1,264 | 337,5 |
| 340,0 | 2,779 | 3,991 | 1,212 | 342,8 |
| 345,0 | 2,810 | 3,970 | 1,160 | 348,1 |
| 350,0 | 2,823 | 3,929 | 1,106 | 353,6 |
| 355,0 | 2,859 | 3,913 | 1,054 | 358,9 |

Tabulka 4.4: Teplotní závislost spektra ethylenglykolu při ohřevu

| T_0 [K] | δ_{CH} [ppm] | δ_{OH} [ppm] | δ [ppm] | T [K] |
|-----------|---------------------|---------------------|----------------|---------|
| 310,0 | 2,764 | 4,293 | 1,529 | 310,6 |
| 315,0 | 2,816 | 4,294 | 1,478 | 315,8 |
| 320,0 | 2,782 | 4,207 | 1,425 | 321,2 |
| 325,0 | 2,754 | 4,126 | 1,372 | 326,5 |
| 330,0 | 2,797 | 4,116 | 1,319 | 331,9 |
| 335,0 | 2,864 | 4,132 | 1,268 | 337,1 |
| 340,0 | 2,818 | 4,033 | 1,215 | 342,5 |
| 345,0 | 2,802 | 3,963 | 1,161 | 348,0 |
| 350,0 | 2,836 | 3,944 | 1,108 | 353,4 |

Tabulka 4.5: Teplotní závislost spektra ethylenglykolu při chlazení

Stejným postupem jsem proměřil teplotní závislost spektra ethylenglykolu, a sice v rozsahu teplot 315 K–355 K při ohřívání a při teplotách od 350 K do 310 K při ochlazování vzorku. Několik spekter naměřených při různých teplotách ukazuje obrázek 4.3. Výsledky ukazují tabulky 4.4 a 4.5, přičemž skutečnou teplotu T jsem určil z rozdílu chemických posunů methinové a hydroxylové skupiny podle rovnice (4.2). Závislosti skutečné teploty na teplotě čidla ukazuje obrázek 4.5.

Všechny proměřené kalibrační závislosti jsem proložil přímkami. Tyto výsledky lze použít pro výpočet skutečné teploty vzorku T pro nastavenou nominální teplotu T_0 v patřičném rozsahu. Pro omezení chyb fitů jsem nominální teplotu vztáhnul ke středu proměřeného teplotního úseku: pro methanol 303 K a pro ethylenglykol 320 K. Teplota T se tedy vypočte podle vztahů

$$T = a + b(T_0 - 303 \text{ K}) \quad \text{pro methanol,} \quad (4.3)$$

$$T = a + b(T_0 - 320 \text{ K}) \quad \text{pro ethylenglykol.} \quad (4.4)$$

Výsledky těchto fitů uvádím v tabulce 4.6.

Je přitom stále třeba dbát na to, že rozdíl teplot mezi jednotlivými měřeními by měl být 5 K a že měření by mělo probíhat přibližně mezi 15. a 30. minutou od okamžiku nastavení teploty. Z popsanych měření kalibrace teploty plyne, že při dodržení uvedeného postupu se dosáhne dobré stability teploty a reprodukovatelnosti nastavení za současné úspory času potřebného k ustálení teploty.

| Látka | Methanol | | Ethylenglykol | |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | Ohřev | Chlazení | Ohřev | Chlazení |
| Platnost | 288 K–328 K | 283 K–323 K | 315 K–355 K | 310 K–350 K |
| a [K] | $304,3 \pm 0,1$ | $304,01 \pm 0,04$ | $321,51 \pm 0,03$ | $321,19 \pm 0,04$ |
| b | $1,024 \pm 0,008$ | $1,055 \pm 0,003$ | $1,066 \pm 0,002$ | $1,070 \pm 0,002$ |
| χ^2/n | 0,108 | 0,018 | 0,0042 | 0,0084 |

Tabulka 4.6: Výsledky teplotní kalibrace: parametr a označuje absolutní člen prokládané přímkou, veličina b její směrnici

4.2 NMR nukleových kyselin

Všechny vzorky nukleových kyselin byly rozpuštěny ve vodě s 10 % D₂O a 25mM koncentrací pufru Tris, který zajišťoval stabilní pH v roztoku, a sice 7,4. Voda se jako rozpouštědlo biologických vzorků používá z důvodu vytvoření přirozeného prostředí, a to i za cenu nutnosti potlačit její signál ve spektru použitím speciální pulsní série. V jiném rozpouštědle, byť třeba polárním, by získané výsledky nemohly sloužit jako vhodný model k popisu dějů probíhajících uvnitř živých buněk. V případě sledování tvorby duplexů DNA voda výrazně přispívá k jejich stabilitě. Rozpouštědlo je navíc pro účely NMR spektroskopie částečně deuterované, což je vyžadováno pro nastavení homogenity magnetického pole a udržení jeho časové stability (takzvaný *lock*).

Do žádných z připravených vzorků nebyl přidáván standard. Škála chemických posunů v protonových spektrech byla vztažena k chemickému posunu vodíkových jader v HDO, kterému byla přiřazena hodnota 4,7 ppm.

Všechna měření byla provedena při teplotách v rozmezí 280 K až 350 K s krokem po 5 K s ohledem na teplotní kalibraci, a to jak při ohřevu, tak při ochlazení vzorku. Zároveň jsem dodržoval shodné nastavení parametrů topného zařízení a regulační zpětné vazby jako v tabulce 4.1. Pro všechna následující měření jsem užil stejných pulsních programů, jejichž průběh ukazuje obrázek 4.6 a parametry shrnuje tabulka 4.7.

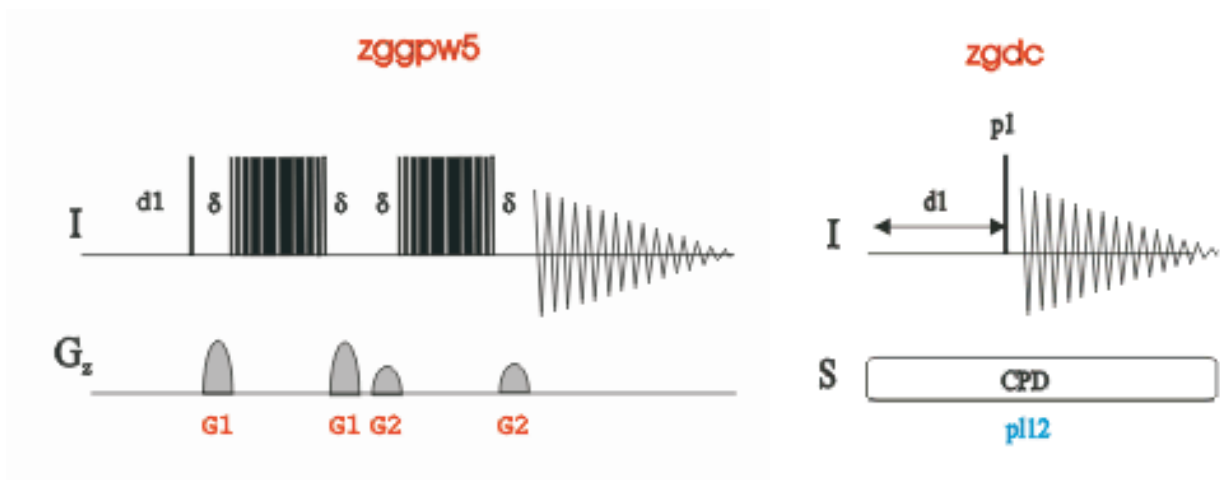
Do válcové kyvety o průměru 5 mm vkládané do spektrometru jsem vždy umístil přibližně 600 μ l vzorku.

| Jádro | ¹ H | ³¹ P |
|--------------------------------------|------------------|------------------|
| Pracovní kmitočet [MHz] | 500, 132 | 202, 456 |
| Lock | D ₂ O | D ₂ O |
| Pulsní program | zggpw5 | zgdc |
| Počet scanů (NS) | 16 | 64 |
| Počet nezaznamenávaných scanů (DS) | 4 | 4 |
| Šířka spektra (SW) [ppm] | 20,0 | 50,2 |
| Střed spektra (O1P) [ppm] | 4,699 | 0,00 |
| Délka $\pi/2$ -pulsu (P1) [μ s] | 13,00 | 7,70 |
| Útlum $\pi/2$ -pulsu (PL1) [dB] | 5,00 | 3,00 |
| Prodleva pro relaxaci (D1) [s] | 5,0 | 5,0 |

Tabulka 4.7: Parametry pulsních sekvencí užitých pro měření protonových a fosforových NMR spekter

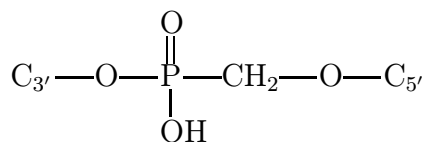
Dinukleotidy

První měření spekter jaderné magnetické rezonance nukleových kyselin jsem provedl na jednoduchých sloučeninách, a sice dinukleotidech, tedy molekulách tvořených jen dvěma ribonukleotidy spojenými fosfodiesterickou vazbou. Účelem těchto měření bylo získání zevrubného přehledu o protonových a fosforových spektrech nukleových kyselin a jejich chování při změnách teploty a ověření režimu měření teplotních závislostí s cílem minimalizovat celkovou dobu, po kterou budou vzorky vystaveny vnějším vlivům spojeným s experimenty NMR.



Obrázek 4.6: Použité pulsní sekvence: pro měření protonových spekter jsem použil pulsní program **zggpw5** potlačující signál vody, v řádku označeném I je vyobrazen sled pulsů aplikovaných na frekvenci vodíkových jader a následné měření signálu volné precese, v řádku G_z jsou schematicky zachyceny gradientní pulsy ve směru magnetického pole. Operace využívající rozfázování jednotlivých izochromních příspěvků k signálu rozpouštědla pomocí gradientních pulsů, popsaná v oddíle 3.6, se v pulsní sekvenci opakuje dvakrát s různými výkony gradientních pulsů, aby se zamezilo náhodnému složení fází magnetizace rozpouštědla. Program **zgdc** jsem použil pro měření fosforových spekter, kanál I tedy přísluší jádru ^{31}P a kanál S vodíkům ^1H , na která je aplikován decoupling (zdroj: dokumentace Topspinu)

Proměřila se spektra dvou různých dinukleotidů, a sice ApU a Gp_cC, přičemž druhý z nich obsahoval modifikovanou fosfátovou spojku (obrázek 4.7). Velká písmena v označení dinukleotidů odpovídají zkratkám dusíkatých bazí, a to ve směru od 5'-konce k 3'-konci. Koncentrace dinukleotidů v roztoku v obou případech činila 10,0 mM. I když jsou oba dinukleotidy selfkomplementární a mohou tedy pomocí Watsonova-Crickova párování utvářet duplexy, jsou to řetězce natolik krátké, že jejich párování není energeticky výhodné. Neočekávají se proto výrazné kvalitativní odchylky mezi spektry měřenými při různých teplotách. Ukázky protonových spekter dinukleotidů jsou na obrázcích P-1 a P-2, fosforová spektra ukazuje obrázek P-6 v přílohách.



Obrázek 4.7: Modifikovaná fosfátová spojka uvnitř Gp_cC

Devítinukleotidy

Hlavní část této práce tvoří měření teplotní závislosti protonových a fosforových spekter oligonukleotidů sestavených z devíti deoxynukleotidů v přesně daném pořadí. Použité vzorky jsou navzájem komplementární a jejich sekvence jsou násle-

dující: 5'-GCA TAT CAC-3' (tato molekula bude nadále označována jako Match) a 5'-GTG ATA TGC-3' (komplement, zkráceně Kompl). Obě látky byly syntetizované a vyčištěné na zakázku vídeňskou firmou VBC-Biotech Services GmbH. Molekuly oligonukleotidů byly v obou roztocích použitých pro NMR experimenty zastoupeny v koncentraci 1,83 mM, tedy značně méně než dinukleotidy, což plyne z jejich vyšší ceny a tím nesnadnější dostupnosti.

Nejprve jsem proměřil protonová a fosforová spektra při teplotách od 280 K do 350 K každého řetězce zvlášť, a to jak při zvyšování teploty, tak při jejím snižování. Spektra ^1H NMR samostatných řetězců ukazují obrázky P-3 a P-4, jejich fosforová spektra zachycuje obrázek P-7 v přílohách.

Po této sadě měření přišlo na řadu vytvoření směsi obou komplementárních vláken, a to slitím obou roztoků dohromady. Tím došlo ke snížení koncentrace každého z vláken na polovinu původní hodnoty, čili 0,91 mM. Smíchání obou roztoků proběhlo za pokojové teploty. Takto vzniklou směs budu nadále označovat jako Duplex. Následně jsem tento vzorek uvnitř sondy spektrometru pozvolna ohřál na 355 K. Při této teplotě by se v roztoku neměly vyskytovat žádné spárované řetězce. Poté jsem stejným postupem jako v případě samostatných řetězců proměřil spektra ^1H i ^{31}P . Teploty jsem měnil opět po 5 K, a to nejprve od 355 K do 280 K a potom zpět. Takto získané řady spekter ukazují obrázky P-5 (^1H) a P-8 (^{31}P) v přílohách.

Kapitola 5

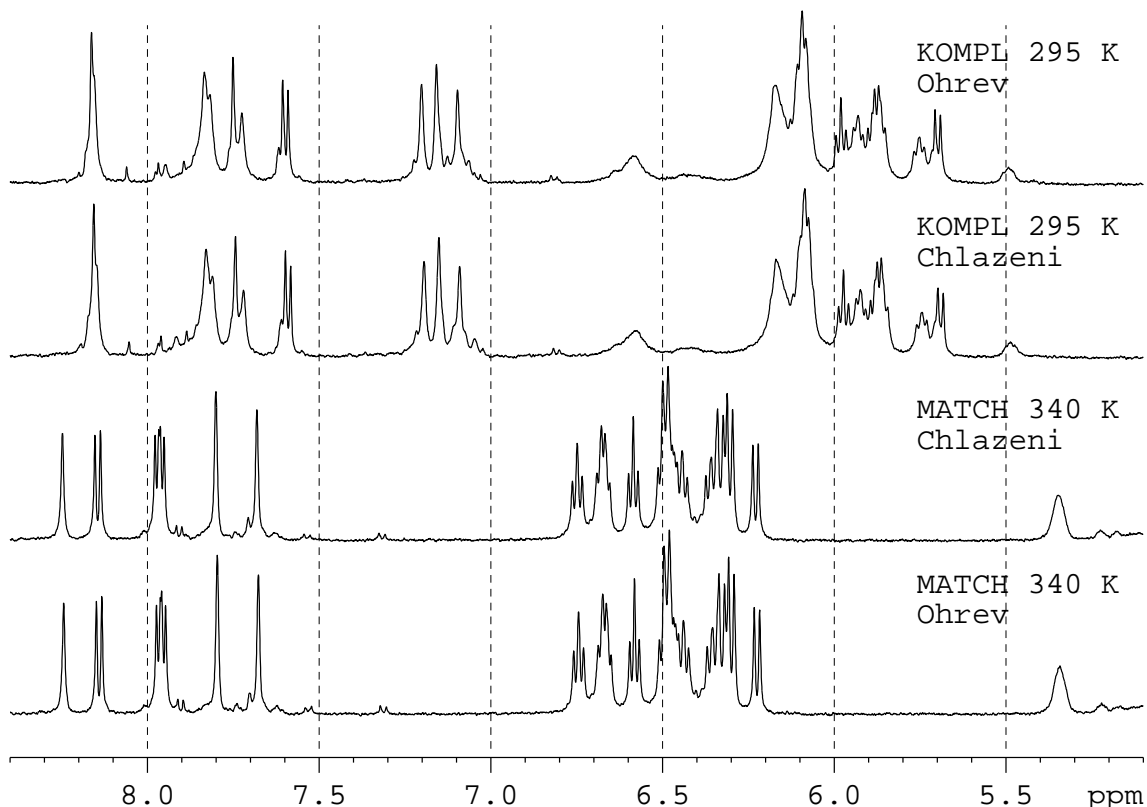
Vyhodnocení změřených spekter a diskuse výsledků

Při pohledu na protonová spektra di- a oligonukleotidů je dobře patrné, že se dají rozdělit na tři hlavní oblasti, a to na část *aromatickou*, kam patří signály od bázevých protonů, část *smíšenou*, kde se vyskytují signály jak z dusíkatých bází, tak z cukerné složky, a část *sacharidovou*, kde se objevují čáry příslušící vodíkům vázaným na furanózový kruh (ale také signál od pufru a thymínových methylů, jak se záhy ukáže). Hranice mezi těmito úseky se posouvají v závislosti na teplotě; hranice mezi aromatickou a smíšenou částí se pohybuje v rozmezí 6,5 ppm až 7,5 ppm, přechod mezi smíšenou a sacharidovou částí spadá do okolí signálu vody, tedy 4,7 ppm. Použité potlačení rezonance vody zkresluje i jiné čáry v jejím blízkém okolí. V okolí 6,5 ppm při nízkých teplotách nalézáme další čáry, které jsou širší než ostatní: tyto signály, narozdíl od výše popsaných skupin, přísluší vodíkům vázaným na atomy dusíku v aminoskupinách bází. Ve spektrech směsi obou komplementárních řetězců si ještě při nízkých teplotách všimneme čar, které jsme doposud jinde nepozorovali: mezi 12 ppm a 13,5 ppm se objevují signály iminoprotonů bází, které patrně svědčí o přítomnosti vláken spárovaných do duplexů.

Zajímavá je především aromatická část, kde lze nejnázorněji odlišit jednotlivé čáry. Jsou to totiž právě vodíky na aromatických heterocyklech, které se účastní vodíkových vazeb při párování vláken DNA. Budu se proto snažit nejen sledovat závislost posunů čar aromatické části v závislosti na teplotě, nýbrž také blíže popsat kvalitativní změny ve spektru, ke kterým dochází zejména ve vzorku směsi komplementárních řetězců.

Kromě vodíkových spekter jsem také změřil NMR spektra fosforových jader ^{31}P . Ani při použití decouplingu na protony nejsou čáry ve spektrech oligonukleotidů rozlišitelné, jejich šířky jsou totiž větší než rozdíl mezi jednotlivými posuny.

Spektra byla měřena v teplotním rozsahu 280 K až 350 K, a to jak při zvyšování teploty, tak při jejím snižování. Srovnání dvou spekter získaných při stejné nominální teplotě T_0 po ohřevu a po chlazení nicméně potvrzuje předpoklady uvedené v oddíle 4.1, a sice to, že nedochází ke kvalitativním odchylkám mezi takovými dvěma spektry (ukázka takových dvojic spekter je na obrázku 5.1). Obě spektra jsou jen vzájemně posunuta o zhruba 0,01 ppm, což odpovídá rozdílným teplotám: po chlazení je teplota vždy nepatrně nižší než po ohřátí vzorku. Směr tohoto posunu je v souladu s chováním posunů spekter viditelném v celém teplotním rozmezí. Vzhledem k těmto



Obrázek 5.1: Srovnání spekter oligonukleotidů získaných po ohřevu a po ochlazení vzorku

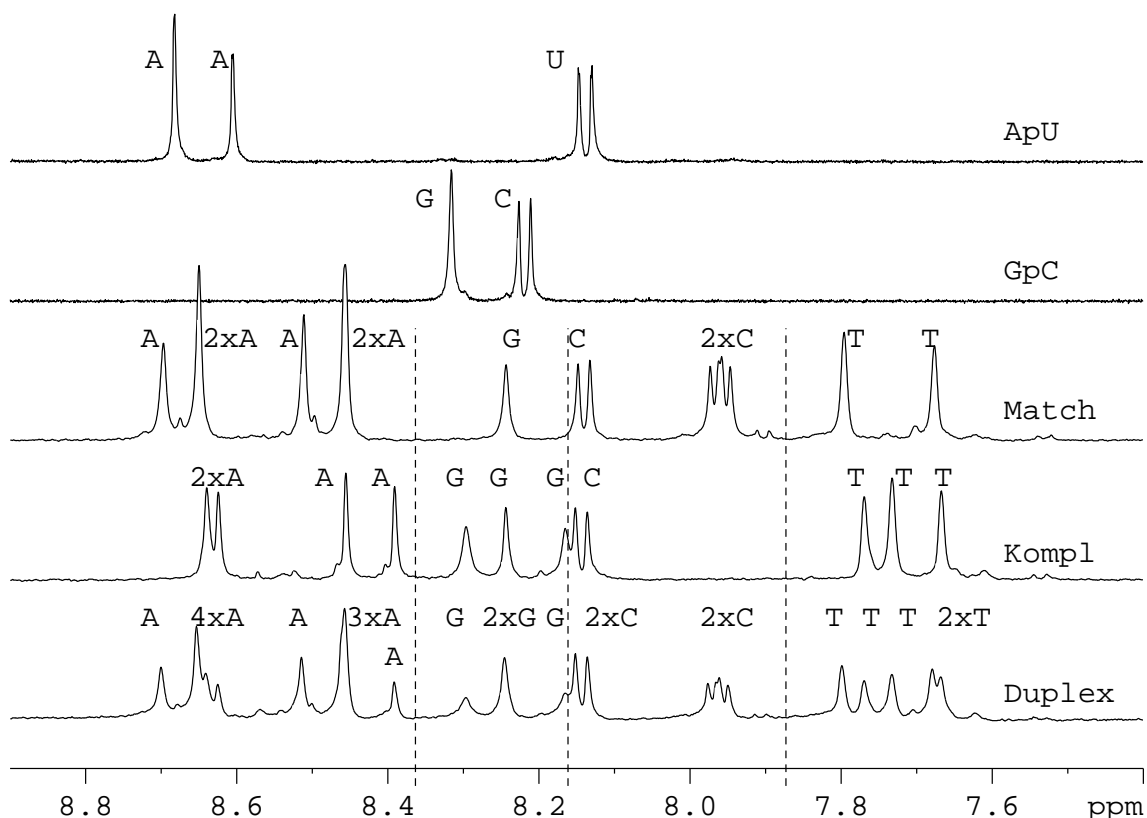
okolnostem budu dále vyhodnocovat vždy spektra změřená po chlazení.

Na všech obrázcích spekter jsou uvedeny nominální teploty T_0 a stupnice chemických posunů je vztažena k signálu protonů v HDO, jak bylo uvedeno v oddíle 4.2. Naopak na grafech změřených závislostí spektrálních charakteristik jsou teplotní stupnice přepočteny dle výsledků kalibrace shrnutých v tabulce 4.6.

5.1 Přiřazení čar v aromatické oblasti

Je dobře známé, že atomy vodíku vázané na uhlíky v aromatických kruzích vykazují v NMR spektrech posuny mezi 8,5 – 6,5 ppm. Chemický posun ovlivňuje také přítomnost sousedních atomů s volnými elektronovými páry (zejména kyslík a dusík), jež signál posouvají směrem k vyšším hodnotám ppm. [1, 2]

Značné zjednodušení pro přiřazení signálů v aromatické části jednotlivým bázím v oligonukleotidech přináší změřená spektra dinukleotidů ApU a Gp_cC. Na nich je totiž dobře patrná odlišnost posunů signálů od vodíků z různých bází. Lze snadno rozpoznat, zda jednotlivé čáry patří adeninu, cytosinu, guaninu či uracilu: signály cytosinu a uracilu tvoří ve spektrech vždy dublety v důsledku vzájemné blízkosti obou protonů v těchto bázích (přes tři vazby). Při teplotě $T_0 = 340$ K, kterou jsem takto zvolil kvůli možnému srovnání se spektry Duplexu, tedy dublet na pozici 8,1 ppm ve spektru ApU odpovídá uracilu, ve spektru Gp_cC v poloze 8,2 ppm nalézáme cytosin. Tyto dublety jsou J-interakcí svázané s dublety ve smíšené části spekter. Další čáry v aromatické části proto nutně přísluší adeninu, případně guaninu – adenin obsahuje



Obrázek 5.2: Přiřazení aromatické části spekter při nominální teplotě 340 K. Zkratkami jsou označené čáry příslušící odpovídajícím bázím. Přerušované čáry naznačují hranice mezi oblastmi ve spektrech oligonukleotidů, kde se nacházejí signály od shodných bází

dva atomy vodíku vázané přímo na uhlíky, guanin jediný. Protony vázané na dusíky nejsou při této teplotě ve spektrech měřitelné.

Na těchto závěrech jsem založil přiřazení signálů v oligonukleotidech Match a Kompl. Ukázalo se dokonce, že nedochází k překryvům mezi čarami od vodíkových jader z různých bází navzájem. Narozdíl od dinukleotidů jsou tyto vzorky tvořeny deoxynukleotidy a nevyskytují se v nich uracily, nýbrž thyminy. Jejich signály (od vodíků H_6) lze snadno rozpoznat na spodním okraji aromatické části spektra, kde se v případě dinukleotidů nic nevyskytovalo. Podle chemických posunů v protonových spektrech můžeme proto uspořádat dusíkaté báze tak, jak ukazuje tabulka 5.1. Srovnáním integrálních intenzit jednotlivých čar lze určit rozložení počtu signálů v této oblasti spektra.

Přiřazení spektrálních čar jednotlivým bázím v di- a nonanukleotidech znázorňuje obrázek 5.2. Z provedených měření nelze posoudit, kolikáté bázi v řetězci které signály přísluší, k tomu by bylo zapotřebí dalších pokročilejších měřících postupů; úplné přiřazení spekter však není cílem této práce.

Thymin obsahuje kromě vodíku H_6 ještě jednu měřitelnou skupinu protonů, a sice methyl vázaný na uhlík C_5 pyrimidinového kruhu. Jeho silný signál můžeme při teplotě 340 K pozorovat v okolí 2,1 ppm.

Jednoznačně lze ještě přiřadit jeden signál, a to ten nejsilnější v celém spektru: při teplotě 340 K se vyskytuje ve všech vzorcích na pozici 4,1 ppm a přísluší protonům z pufru. Jeho intenzita je mnohonásobná ve srovnání s ostatními signály z důvodu

| Báze | Adenin | Guanin | Cytosin | Thymin (H ₆) |
|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Posun [ppm] | 8,70 – 8,38 | 8,30 – 8,17 | 8,15 – 7,93 | 7,80 – 7,66 |

Tabulka 5.1: Rozsah chemických posunů protonů od různých bází v NMR spektrech oligonukleotidů při nominální teplotě $T_0 = 340$ K; vztaženo k rezonanci protonů v HDO – popsáno v oddíle 4.2

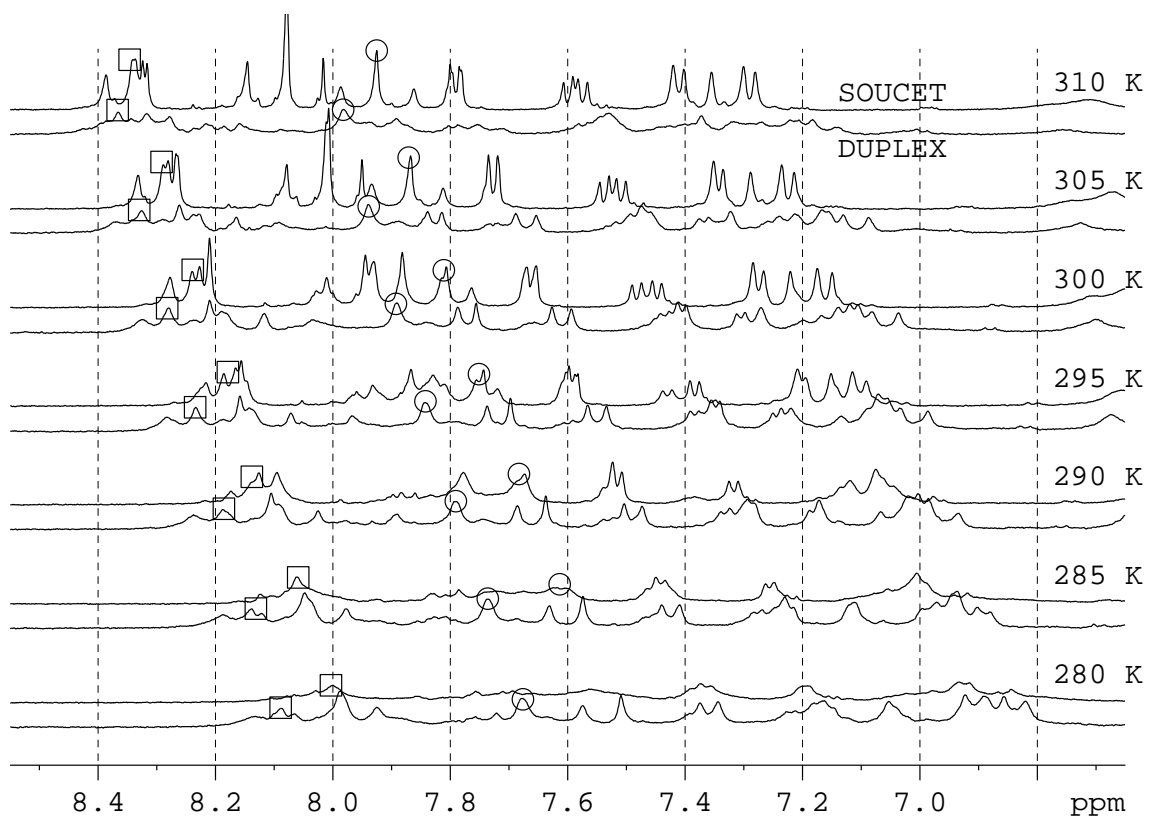
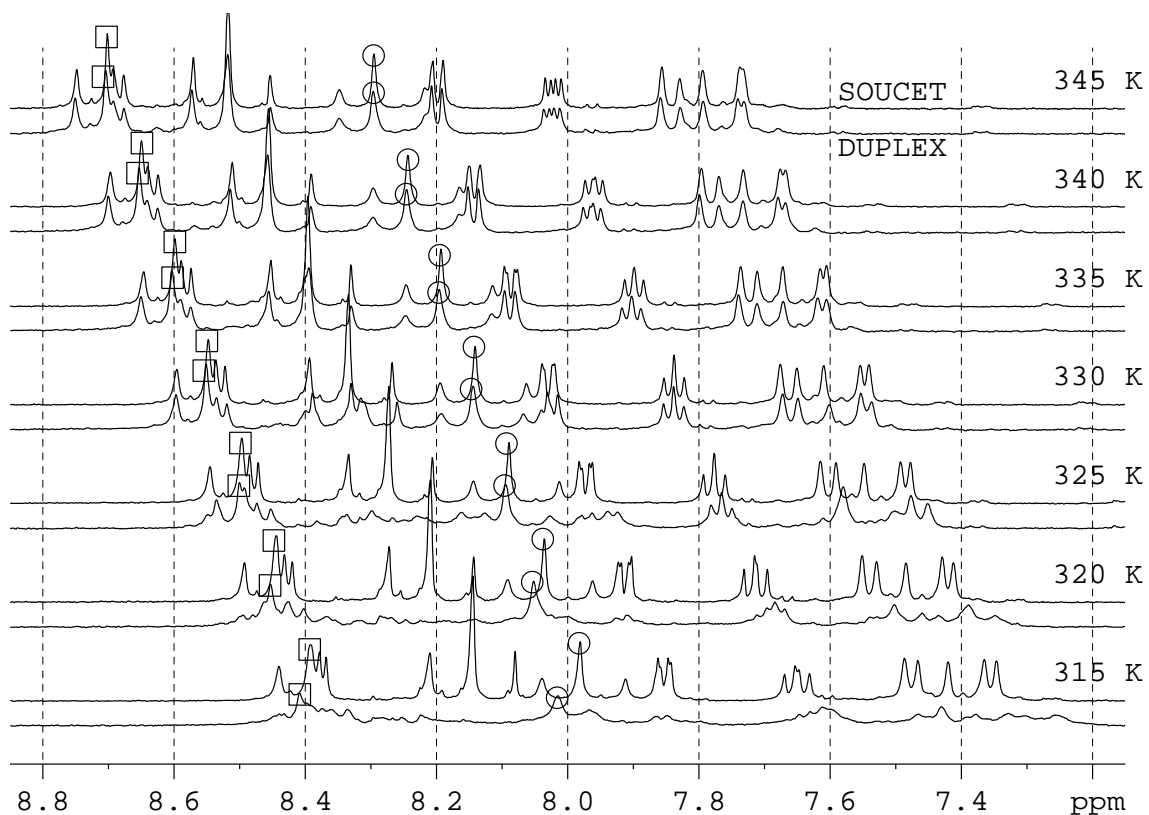
řádově vyšší koncentrace v použitém roztoku. Na obě strany od této čáry jsou zřetelné drobné satelity, které jsou způsobeny štěpením J-vazbou (asi 140 Hz) s uhlíkem ^{13}C , tedy izotopem, jehož přirozené zastoupení je jen asi 1% (tabulka 3.1). Proto jsou satelity asi stokrát slabší než hlavní čára. U žádných dalších čar ve spektru není takový jev viditelný, satelity leží pod úrovní šumu.

V protonových spektrech oligonukleotidů jsou ještě zřetelné dva triplety, jejichž posuny při teplotě 340 K jsou 3,7 ppm a 3,3 ppm. Tyto signály nepřísluší žádným protonům z molekul nukleových kyselin, ale poukazují na přítomnost nečistot ve vzorcích. Oběma tripletu se ještě budu podrobněji zabývat.

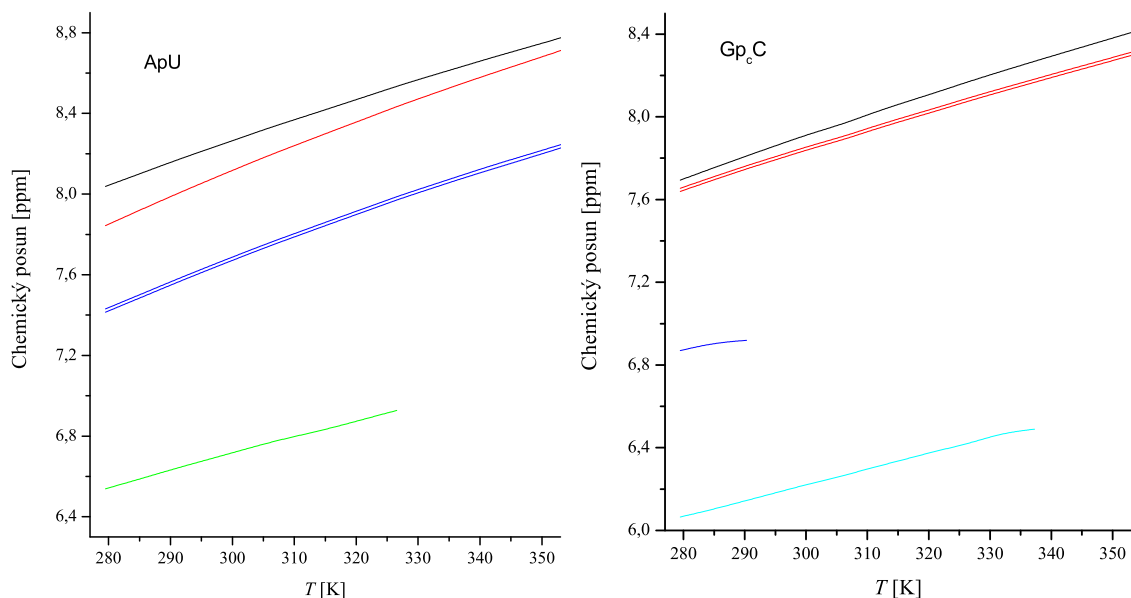
5.2 Srovnání spekter Duplexu se součtem spekter vzorků Match a Kompl

Předpokládáme-li, že při dostatečně vysokých teplotách se v roztoku směsi obou komplementárních vláken již nevyskytují duplexy, nýbrž jen samostatné řetězce – lze zanedbat zastoupení spárovaných vláken – a že vlákna mezi sebou navzájem nijak neinteragují, nutně z toho plyne, že NMR spektrum Duplexu lze získat jako součet spekter příslušných jednotlivým řetězcům při téže teplotě. A skutečně: srovnáme-li protonová spektra Duplexu se součtem spekter od Match a Kompl (obrázek 5.3 zachycuje podrobněji aromatickou část spekter, veškerá získaná spektra se nacházejí na obrázcích P-9 až P-12 v přílohách), je patrné, že se při teplotách nad 330 K výborně shodují. Při nižších teplotách se čáry ve spektrech Duplexu rozšiřují vlivem středně rychlé chemické výměny. Znamená to, že opakovaně probíhá tvorba a rozpad duplexů, přičemž chemické posuny v obou stavech se navzájem liší. I spektrální čáry jednotlivých řetězců se s klesající teplotou rozšiřují; tento děj se však výrazněji projevuje až při podstatně nižších teplotách, totiž v okolí pokojové teploty. To je patrné spojeno s pomalejšími přechody mezi různými konformacemi, i jednotlivá vlákna se mohou na krátkou dobu uspořádat do šroubovice (či částečné šroubovice).

Z porovnání teplotních průběhů součtu spekter samostatných vláken a spekter jejich směsi tedy vychází najevo, že čáry ve spektrech Duplexu se rozšiřují skutečně vlivem tvorby dvojšroubovic. Při dalším poklesu teploty se šířka čar ve spektru Duplexu opět počíná zmenšovat – k tomu dochází kolem 305 K. To zřejmě způsobuje větší stabilita duplexů, začíná se více preferovat uspořádaná struktura a zpomaluje se chemická výměna. Ve spodní části teplotního rozsahu jsou již čáry ve spektrech Duplexu srovnatelně široké s čarami v součtovém spektru. Zároveň se ale podstatně liší polohy jednotlivých signálů. To vše svědčí o výrazném podílu duplexů v roztoku směsi komplementárních vláken.



Obrázek 5.3: Srovnání aromatických částí součtu spekter jednotlivých řetězců a spekter Duplexu pro nominální teploty od 280 K do 345 K. Na obrázku je pro každou teplotu spektrum Duplexu výše než součtové spektrum. Ve spektrech, kde to bylo možné, jsou vyznačeny vrcholy čar, jejichž posuny byly hlouběji zpracovány. Spektra Duplexu jsou vynásobena dvěma z důvodu poloviční koncentrace



Obrázek 5.4: Závislost chemických posunů čar v aromatické oblasti spekter dinukleotidů na skutečné teplotě vypočtené podle kalibrace. Signály, jež nejsou vysledovány pro celý teplotní rozsah, přísluší protonům v aminoskupinách

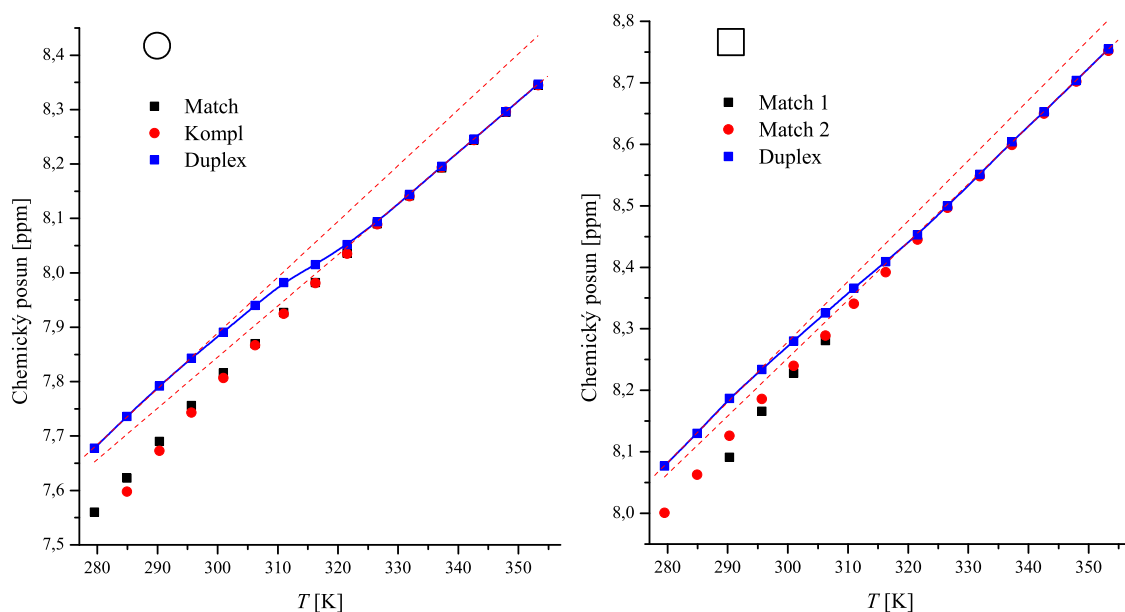
5.3 Teplotní závislost posunů čar v aromatické oblasti spektra

Již z prvního pohledu na sérii spekter libovolného vzorku nukleových kyselin je patrné, že celé spektrum se s rostoucí teplotou posouvá směrem k vyšším chemickým posunům. To je zřejmě způsobeno teplotní závislostí Larmorovy frekvence vody, k níž jsou naše spektra vztažena. Nicméně se dá pozorovat, že se celé spektrum neposouvá rovnoměrně, ale vzájemné vzdálenosti mezi jednotlivými čarami se mohou průběžně měnit. Pro ukázkou tohoto jevu jsem vyhodnotil posuny čar v aromatických částech spekter dinukleotidů spolu s polohami signálů od aminoprotonů, což zobrazuje obrázek 5.4. Na něm lze pozorovat drobné odchylky ve strmostech růstu jednotlivých čar. Vysledované závislosti jsou téměř lineární; zejména je důležité, že na nich není viditelná žádná výrazná změna tendence.

Podobně se podařilo vysledovat dvě čáry v aromatické části spekter Duplexu (ostatní čáry se v oblasti tání rozšiřovaly natolik, že není možné jednoznačně určit, která čára přechází v kterou). V tomto případě by již měla být patrná odchylka od posunů příslušných čar ve spektrech jednotlivých řetězců. V důsledku tvorby duplexů totiž dochází ke změně chemického okolí protonů v bázích a tím i změně jejich Larmorových frekvencí. Teplotní závislost posunů vybraných čar ukazuje tabulka 5.2 a graficky znázorňuje obrázek 5.5. Vybrané čáry jsou vyznačené ve spektrech na obrázku 5.3. První z nich, čára označená čtverečkem, přísluší signálu od protonů ze dvou různých adeninů v molekule Match, druhá z nich (kroužek) je společná pro guaniny ze sloučenin Match a Kompl. Dvojnásobná intenzita těchto čar, které vždy přísluší současně dvěma protonům, zvyhodňuje sledování jejich posunů i v okolí teploty tání, kde šířka čar dosahuje nejvyšších hodnot. Za to se platí drobnou daní v podobě rozštěpení jejich posunů na dvě větve při nízkých teplotách.

| Označení | | ○ | | | □ | | |
|-----------|---------|-------|-------|--------|---------|---------|--------|
| T_0 [K] | T [K] | Match | Kompl | Duplex | Match 1 | Match 2 | Duplex |
| 350,0 | 353,3 | 8,345 | 8,345 | 8,347 | — | 8,752 | 8,755 |
| 345,0 | 347,9 | 8,295 | 8,296 | 8,296 | — | 8,702 | 8,704 |
| 340,0 | 342,6 | 8,244 | 8,244 | 8,246 | — | 8,650 | 8,653 |
| 335,0 | 337,2 | 8,193 | 8,194 | 8,196 | — | 8,599 | 8,604 |
| 330,0 | 331,9 | 8,142 | 8,141 | 8,144 | — | 8,548 | 8,551 |
| 325,0 | 326,5 | 8,090 | 8,089 | 8,094 | — | 8,497 | 8,500 |
| 320,0 | 321,5 | 8,036 | 8,035 | 8,052 | — | 8,445 | 8,453 |
| 315,0 | 316,3 | 7,982 | 7,981 | 8,015 | — | 8,392 | 8,409 |
| 310,0 | 311,0 | 7,927 | 7,925 | 7,982 | — | 8,341 | 8,366 |
| 305,0 | 306,2 | 7,870 | 7,867 | 7,940 | 8,281 | 8,289 | 8,326 |
| 300,0 | 301,0 | 7,816 | 7,807 | 7,891 | 8,228 | 8,240 | 8,280 |
| 295,0 | 295,6 | 7,756 | 7,743 | 7,843 | 8,166 | 8,186 | 8,234 |
| 290,0 | 290,3 | 7,690 | 7,673 | 7,792 | 8,091 | 8,126 | 8,187 |
| 285,0 | 284,9 | 7,623 | 7,598 | 7,736 | — | 8,063 | 8,139 |
| 280,0 | 279,5 | 7,560 | — | 7,678 | — | 8,001 | 8,088 |

Tabulka 5.2: Teplotní závislosti chemických posunů dvou vybraných čar ve spektrech oligonukleotidů. Posuny Match 1 a Match 2 jsou rozlišitelné až při nižších teplotách



Obrázek 5.5: Závislosti chemických posunů dvou čar ve spektrech Duplexu a jednotlivých vláken na skutečné teplotě vypočtené podle kalibrace. Naměřenými hodnotami je proložena závislost (5.1). Čárkované přímky představují lineární fit počátečními a koncovými čtyřmi body

| Čára | ΔH [kcal/mol] | ΔS [cal/mol/K] | ΔG_{310} [kcal/mol] | T_m [°C] | ζ |
|------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------|---------|
| ○ | -74,2 | -221 | -5,74 | 41,1 | 0,16 |
| □ | -68,0 | -201 | -5,60 | 40,8 | 0,18 |

Tabulka 5.3: Výsledky získané z teplotních závislostí posunů čar ve spektrech Duplexu

Teplotní závislosti posunů těchto čar skutečně zachycují nárůst počtu vytvořených duplexů při klesání teploty. Zatímco ve spektrech samostatných vláken se posuny chovají obdobně jako v případě dinukleotidů, spektra Duplexu vykazují zřetelnou odchylku od takové závislosti. Je však zjevné, že při teplotách v blízkosti obou okrajů měřeného rozsahu i tato závislost plynule přechází v přímky, což vyhovuje představě, že tehdy se již s teplotou výrazně nemění množství spárovaných řetězců. Křivku této závislosti nazýváme *sigmoidou* a lze ji popsat vztahem

$$\Psi = (A_0 + A_1T)\frac{C_D}{C} + (B_0 + B_1T)\frac{C - C_D}{C}, \quad (5.1)$$

kde Ψ značí změřenou veličinu (v nynějším případě se jedná o chemický posun δ), A_0, A_1, B_0 a B_1 jsou parametry limitních přímek a C_D a C označují koncentrace duplexů a celkovou koncentraci všech molekul jedné nukleové kyseliny v roztoku.

Uvedená funkce byla fitována na změřené posuny obou vyhodnocených čar ve spektrech duplexu. Využitím vztahů (2.2) a (2.3) lze z parametrů získaných fitem určit termodynamické veličiny tvorby duplexu, a to ΔG , ΔH , ΔS a teplotu tání T_m . Výsledky od obou spektrálních čar shrnuje tabulka 5.3. Pro určení míry toho, jak dvoustavový model odpovídá vyhodnocovaným veličinám, byl vypočten součet čtverců odchylek mezi změřenými hodnotami a fitem vztažený k součtu čtverců odchylek mezi daty a jejich aritmetickým průměrem:

$$\zeta = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_i^{\text{fit}})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}}. \quad (5.2)$$

V případě chemických posunů však tato veličina nedokáže objektivně posoudit správnost fitu, neboť posuny vztažené k rezonanci HDO mají základní tendenci měnit se lineárně s teplotou. Je proto třeba najít nejlepší aproximaci změřené závislosti přímkou $y = a + bT$ a parametr ζ spočítat dle upraveného vztahu

$$\zeta = \sqrt{\frac{\sum (y_i - y_i^{\text{fit}})^2}{\sum (y_i - a - bT_i)^2}}. \quad (5.3)$$

5.4 Protóny vázané na atomy dusíku

Atomy dusíku se v nukleových kyselinách vyskytují pouze v bázích. Podle počtu vazeb směřujících od dusíku k atomům jiných prvků než vodíku rozlišujeme dva druhy seskupení vodíků a dusíků: *aminoskupiny* jsou tvořeny dusíkem s jednou takovou vazbou (tedy $-\text{NH}_2$), atomy dusíku v *iminoskupinách* tvoří takové vazby dvě ($=\text{NH}$). V obou případech dochází k *protonaci* atomů dusíku, při které se na něj koordinačně kovalentní vazbou naváže kladný iont vodíku. V roztocích se rychle střídají oba možné stavy, protóny se váží a znovu uvolňují. Rovnováha daná poměrem středního počtu protonovaných a neprotonovaných dusíků závisí na pH roztoku: při jeho vyšší hodnotě klesá počet protonovaných atomů.

Dochází tedy k chemické výměně protonů mezi bázemi a rozpouštědlem, v našem případě vodou. V ^1H NMR spektrech se to projeví rozšířením čar, které se ještě zvýrazní při zvyšování teploty. Nepříjemným důsledkem potlačení signálu vody je

| T_0 [K] | Čára A | Čára B | Čára C | Čára D |
|-----------|--------|--------|--------|--------|
| 280 | 0,30 | 0,48 | 0,24 | 0,20 |
| 285 | 0,29 | 0,43 | 0,21 | 0,18 |
| 290 | 0,23 | 0,40 | 0,18 | 0,20 |
| 295 | 0,20 | 0,37 | 0,15 | 0,22 |
| 300 | 0,17 | 0,32 | 0,09 | 0,18 |
| 305 | 0,09 | 0,22 | — | 0,13 |
| 310 | — | 0,09 | — | 0,05 |
| 315 | — | — | — | — |

Tabulka 5.4: Relativní integrální intenzity čar iminoproteinů ve spektrech Duplexu. Intenzita 1 odpovídá jednomu atomu vodíku

však postupná ztráta rezonance z dusíkatých skupin.¹ Proto při rychlejší výměně nelze pozorovat signál na střední frekvenci obou možných výskytů jádra vodíku jako v ideálním případě (obrázek 3.1). Tento jev můžeme sledovat jak u dinukleotidů, tak i u devítičetných řetězců ve spektrech v okolí 6,5 ppm (na rozhraní aromatické a smíšené části): rezonance aminoproteinů je viditelná do teploty asi 320 K, při vyšších teplotách ji ve spektrech nenajdeme. Signály příslušné vodíkovým jádrům z iminoskupin nejsou ve spektrech patrné vůbec. Zřejmě je to způsobeno ještě vyšší rychlostí výměny protonů, takže i při nejnižších měřených teplotách je magnetizace těchto protonů použitou pulsní sekvencí potlačena.

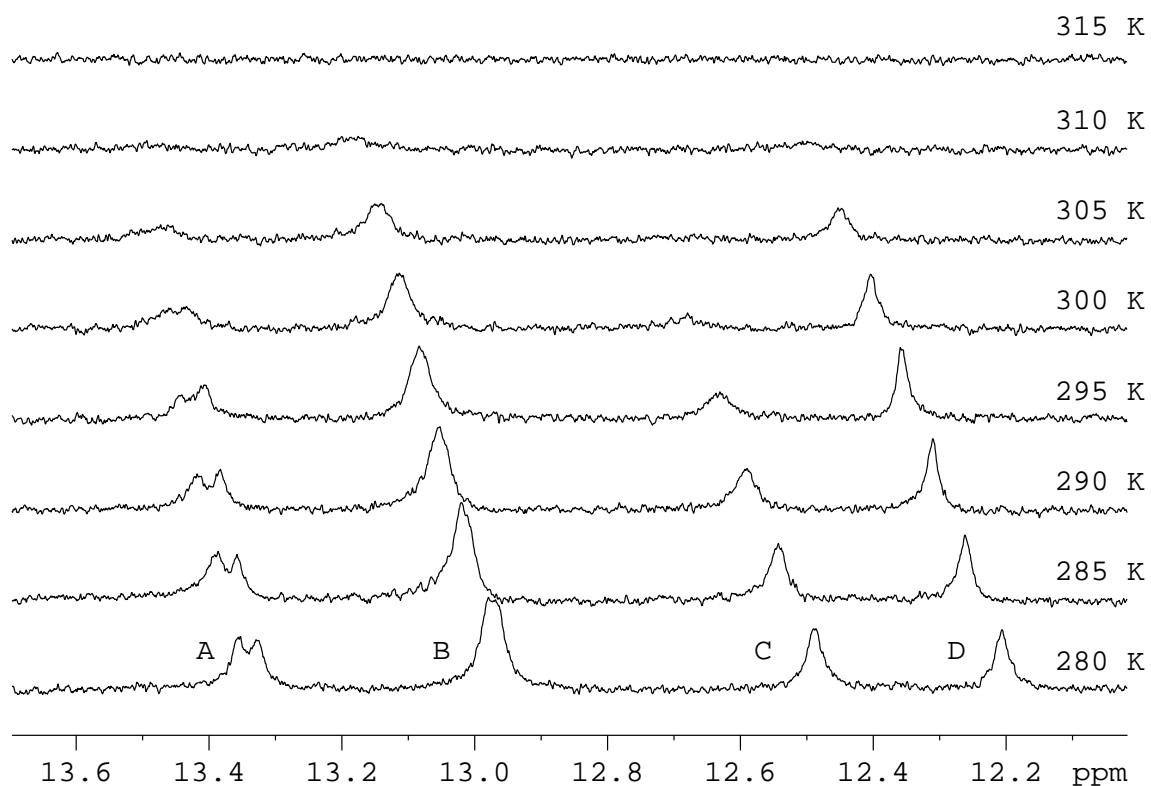
Významným zjištěním je existence signálů od iminoproteinů ve spektrech Duplexu při teplotách do 310 K (obrázek 5.6). Svědčí to o značném zpomalení procesu výměny protonů mezi bázemi a vodou. Tudíž lze tyto rezonance považovat za důkaz přítomnosti dvojšroubovic, všechny iminoskupiny v bázích se totiž účastní Watsonova-Crickova párování. Do prostoru uvnitř duplexu se nemohou dostat molekuly vody a nedochází proto k výměně protonů. Ve skutečnosti ale není situace takto dokonalá: rozbor integrálních intenzit v této oblasti spektra – hodnoty v tabulce 5.4, graf na obrázku 5.7 – ukazuje, že změřené signály odpovídají jen malé části ze skutečného počtu iminoproteinů v roztoku. Z celkových devíti takových protonů odpovídá signál při nejnižší teplotě jen 1,20 atomům. Lze to vysvětlit tím, že k výměně s molekulami vody dochází i při těchto teplotách, byť v omezené míře ve srovnání s volnými řetězci.

Změřené závislosti intenzit byly proloženy funkcí

$$\Phi = qC_D, \quad (5.4)$$

která předpokládá přímou úměrnost mezi intenzitou čáry a koncentrací duplexů v roztoku. Výsledkem fitu jsou pro každou z čar termodynamické parametry tvorby dvojšroubovice uvedené v tabulce 5.5. Pro výpočet parametru ζ byl použit vztah (5.2).

¹k zeslabení signálu také přispívá přítomnost 10 % těžké vody, jádra deuteria neměříme v protonových spektrech vůbec z důvodu odlišné rezonanční frekvence

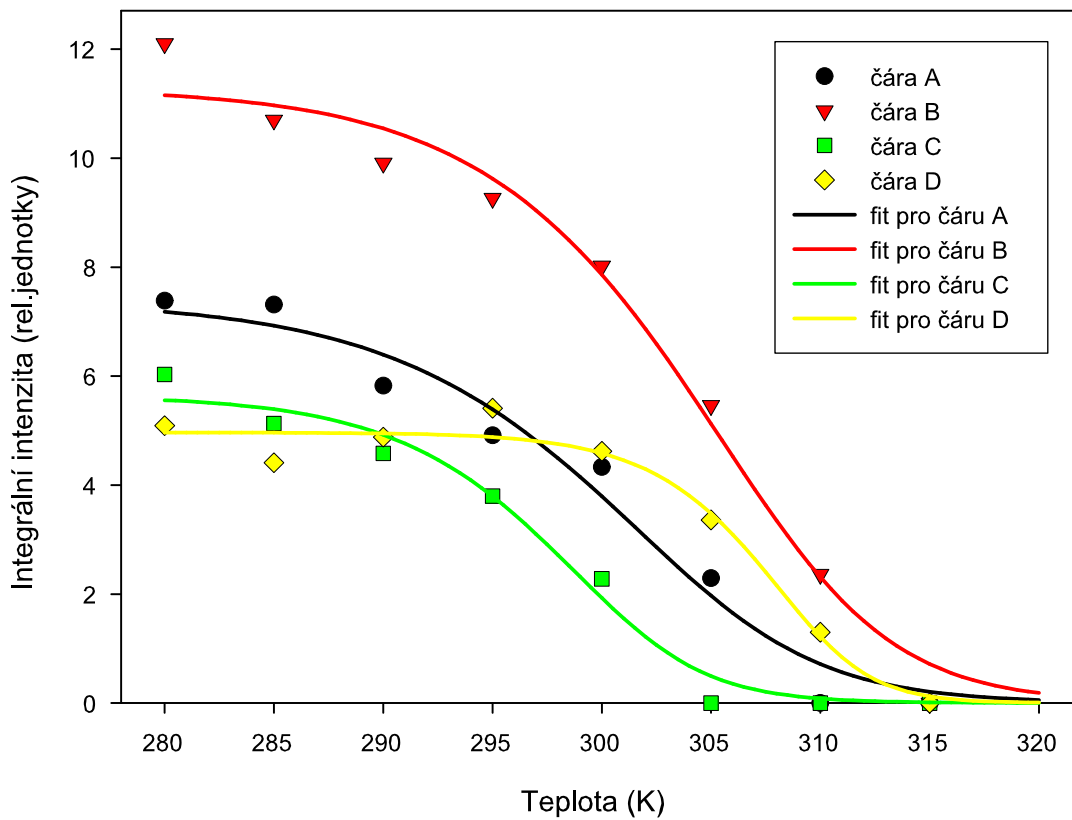


Obrázek 5.6: Spektra iminoprotonů v Duplexu. Písmeny A až D jsou označeny jednotlivé čáry

| Čára | ΔH [kcal/mol] | ΔS [cal/mol/K] | ΔG_{310} [kcal/mol] | T_m [°C] | ζ |
|------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------|---------|
| A | -52,9 | -160 | -3,22 | 28,2 | 0,17 |
| B | -57,8 | -174 | -3,85 | 32,1 | 0,14 |
| C | -69,5 | -218 | -2,08 | 25,4 | 0,14 |
| D | -112,6 | -350 | -4,17 | 35,3 | 0,15 |

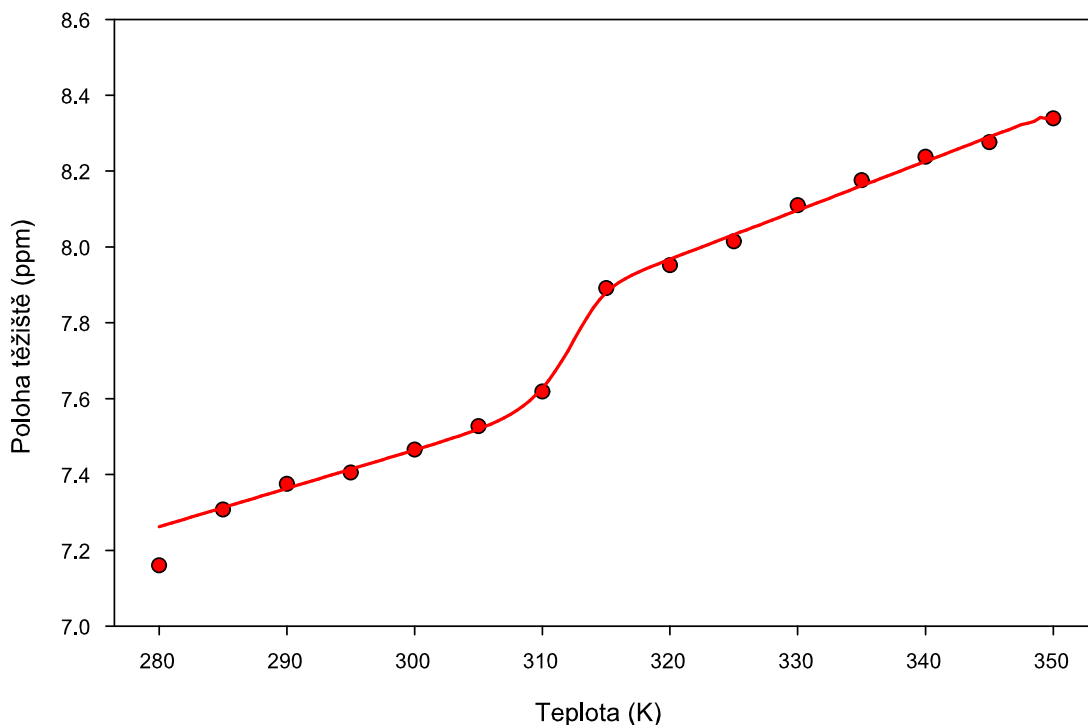
Tabulka 5.5: Výsledky fitu závislosti integrálních intenzit čar iminoprotonů funkcí tvaru (5.4)

Integrální intenzity ^1H NMR čar imino protonů



Obrázek 5.7: Teplotní závislost integrálních intenzit signálů od iminoprotonů ve spektrech Duplexu spolu s křivkami získanými fitováním naměřených hodnot funkcí (5.4)

Poloha těžiště



Obrázek 5.8: Teplotní závislost posunu těžiště aromatické části spektra Duplexu

5.5 Teplotní závislost polohy těžiště spektra

Lze očekávat, že teplotní závislost polohy těžiště spektra bude vykazovat obdobné chování jako v případě posunů jednotlivých čar a že tedy bude zřetelná změna v oblasti tání. Výhodou by měla být skutečnost, že chemická výměna mezi signály ležícími uvnitř sledovaného intervalu nemění polohu těžiště.

Poloha těžiště je dána jako vážený průměr všech posunů δ ze zpracovávané oblasti spektra (a, b) vztahem

$$\delta_T \equiv \frac{\int_a^b \delta A(\delta) d\delta}{\int_a^b A(\delta) d\delta}, \quad (5.5)$$

kde $A(\delta)$ je intenzita signálu v bodě spektra. Pomocí tohoto vzorce byla vypočtena poloha těžiště aromatické části protonových spekter Duplexu v celém teplotním rozsahu. Teplotní závislost polohy těžiště spolu s nafitovanou křivkou tvaru (5.1) ukazuje obrázek 5.8. Výsledky fitu shrnuje tabulka 5.6. Pro výpočet parametru ζ byl použit vztah (5.3). Do souboru dat pro fit nebyla zahrnuta hodnota při nejnižší teplotě, která je příliš nízká.

| ΔH [kcal/mol] | ΔS [cal/mol/K] | ΔG_{310} [kcal/mol] | T_m [°C] | ζ |
|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------|---------|
| -182,4 | -568 | -6,44 | 39,8 | 0,19 |

Tabulka 5.6: Výsledky fitu teplotní závislosti posunu těžiště aromatické části spektra Duplexu funkcí (5.1)

5.6 Korelace mezi spektry při sousedních teplotách

Korelační koeficient ρ mezi dvěma posloupnostmi a_i a b_i , kde $i \in \{1, \dots, N\}$, je definován vztahem

$$\rho \equiv \frac{\sum_{i=1}^N (\bar{a} - a_i) (\bar{b} - b_i)}{\sqrt{\sum_{i=1}^N (\bar{a} - a_i)^2 \sum_{i=1}^N (\bar{b} - b_i)^2}}, \quad (5.6)$$

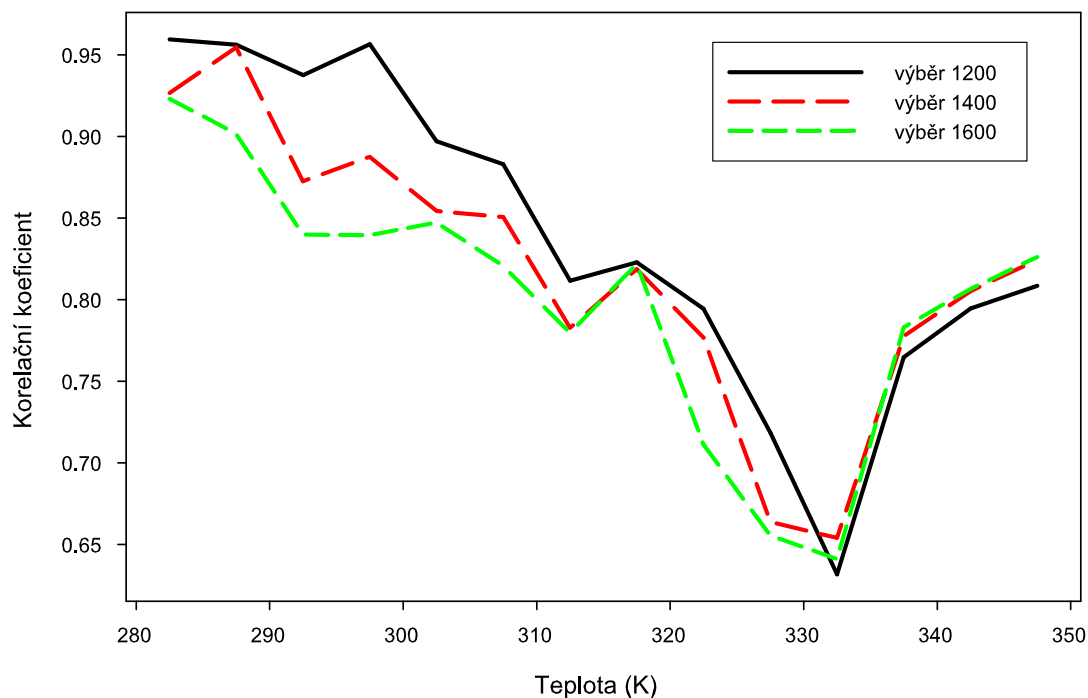
přičemž \bar{a} a \bar{b} značí aritmetické průměry obou posloupností. Korelační koeficient může nabývat hodnot mezi 0 a 1 – čím vyšší korelační koeficient, tím podobnější jsou si obě posloupnosti.

V aromatické části spekter Duplexu byly fitováním hledány takové vzájemné posuny spekter změřených při sousedních teplotách, aby korelační koeficienty byly maximální. Ukázalo se však, že při použití celé aromatické části spektra tento postup nevede k uspokojivým výsledkům: korelace jsou malé a posuny dosti oscilují. Lepších výsledků se dosáhne použitím přibližně poloviny aromatické části spektra, a to od nejvyšších ppm. Na obrázku 5.11 jsou vyznačeny tři různé oblasti spektra Duplexu při teplotě 310 K. Nejvyšší dosažené korelační koeficienty mezi sousedními spektry ukazuje obrázek 5.9. Ze vzájemných posunů spekter při nejvyšších korelacích se určily celkové posuny všech spekter vztažené k poloze při nejnižší teplotě (280 K). Tuto teplotní závislost zachycuje obrázek 5.10. Fitováním celkových posunů sigmoidou (5.1) byly získány termodynamické parametry. Vyhodnocovaly se tři různě dlouhé úseky spektra, což umožňuje odhad chyby nafitovaných parametrů jako dvojnásobek standardní odchylky od průměru hodnot. Parametr ζ byl vypočten dle vztahu (5.3). Výsledky shrnuje tabulka 5.7.

5.7 Porovnání výsledků a srovnání s mikrokalo- metrickými měřeními

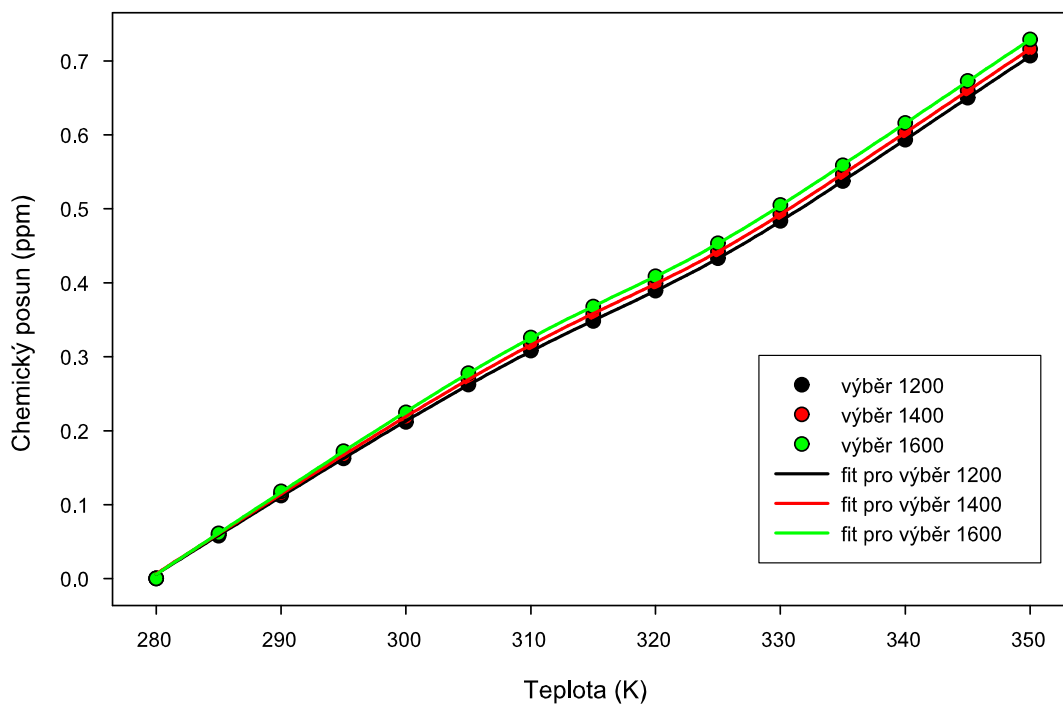
Po ukončení experimentů jaderné magnetické rezonance na směsi komplementárních devítinukleotidů byl tento vzorek podroben mikrokalo-
metrickému měření na Fyzikálním ústavu UK [3]. Při jeho ředění bylo použito totožné rozpouštědlo jako pro účely NMR. Tato měření byla prováděna na diferenciálním scanovacím kalorimetru (DSC) model 6100 Nano-DSC II firmy Calorimetric Sciences Corporation. Naměřené závislosti rozdílu v tepelném příkonu mezi vzorkovou a referenční květou pro dosažení stejné teplotní změny byly fitovány pomocí van't Hoffovy rovnice (2.3). Výsledné

Nejvyšší korelační koeficienty optimálně posunutých spekter



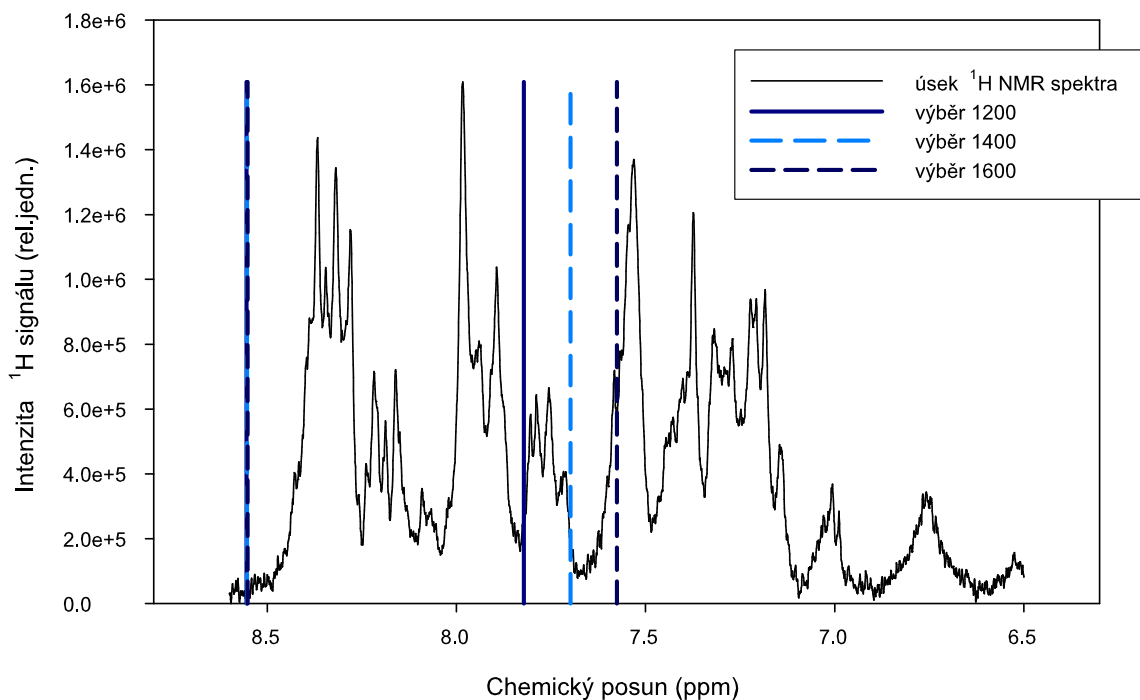
Obrázek 5.9: Nejvyšší dosažené korelační koeficienty mezi spektry Duplexu změřenými při sousedních teplotách

Celkové relativní posuny pro optimální korelaci



Obrázek 5.10: Celkový posun spekter Duplexu, kterým odpovídají nejvyšší korelační koeficienty. Závislost je proložena křivkou tvaru (5.1)

Spektrální oblasti vybrané pro výpočty korelací



Obrázek 5.11: Výběr různých částí spektra Duplexu při teplotě 310 K pro výpočet korelačních koeficientů. Počátek všech výběrů je společný, oblasti se liší v počtu bodů spektra – ty jsou postupně 1200, 1400 a 1600

| | ΔH [kcal/mol] | ΔS [cal/mol/K] | ΔG_{310} [kcal/mol] | T_m [°C] | ζ |
|--------|-----------------------|------------------------|-----------------------------|------------|---------|
| Průměr | -56,5 | -162 | -6,17 | 44,9 | 0,18 |
| Chyba | 7,8 | 25 | 0,07 | 0,8 | 0,02 |

Tabulka 5.7: Výsledky fitu teplotní závislosti celkového posunu spektra Duplexu při nejvyšších korelacích mezi sousedními spektry

| Koncentrace [mM] | ΔH [kcal/mol] | ΔS [cal/mol/K] | T_m [°C] |
|------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| 0,57 | $-66,5 \pm 1,0$ | -184 ± 3 | $46,0 \pm 0,9$ |
| 0,16 | $-64,4 \pm 1,1$ | -179 ± 3 | $39,6 \pm 1,3$ |
| 0,0445 | $-63,1 \pm 3,3$ | -176 ± 10 | $33,7 \pm 1,8$ |

Tabulka 5.8: Termodynamické parametry tvorby dvojšroubovic získané z mikrokolorimetrických měření [3]

| | Posuny čáry ○ | Posuny čáry □ | Těžiště | Korelace | Kalorimetrie |
|------------|---------------|---------------|---------|----------|--------------|
| T_m [°C] | 41,1 | 40,8 | 39,8 | 44,9 | 48,2 |
| T_m [K] | 314,2 | 313,9 | 312,9 | 318,0 | 321,3 |

Tabulka 5.9: Srovnání teplot tání určených různými postupy

hodnoty termodynamických parametrů a teplot tání jsou uvedené v tabulce 5.8. Extrapolací závislosti teploty tání na logaritmu koncentrace dostaneme pro koncentraci 0,91 mM teplotu tání ($48,2 \pm 1,1$) °C.

Znamená to tedy, že teplota tání získaná z mikrokolorimetrie je vyšší při všech srovnání s parametry T_m získanými z fitů změřených závislostí spektrálních charakteristik z NMR (tabulka 5.9). Nejblíže k hodnotě obdržené z mikrokolorimetrie je výsledek rozboru korelací mezi spektry Duplexu, kde vychází teplota tání ($44,9 \pm 0,8$) °C. Hodnoty T_m získané z teplotních závislostí posunů těžiště spektra a dvou vysledovaných čar jsou s ní ještě srovnatelné. Rozdíly určených parametrů T_m jednotlivými popsány postupy jsou zřejmě způsobeny tím, že složité procesy tvorby a rozpadu dvojšroubovice jsou postiženy z poněkud odlišných stránek. V případě teplotní závislosti intenzit čar iminoproteinů je situace navíc komplikovaná výměnou s molekulami vody, která značně snižuje intenzitu těchto čar a ovlivňuje její teplotní závislost, proto nelze intenzity těchto čar popsaným způsobem použít k určení T_m .

5.8 Nečistoty ve vzorcích

V oddíle 5.1 jsem se zmínil o přítomnosti dvou neočekávaných tripletů v protonových spektrech oligonukleotidů. Triplety vznikají v důsledku štěpení spektrální čáry J-interakcí s dvojicí ekvivalentních protonů. Stejná velikost rozštěpení v obou tripletech (7 Hz) spolu se slabým, leč viditelným *stříškovým efektem* – dvě vnitřní čáry z celkových šesti jsou silnější než dvě vnější – prokazují, že k J-vazbě dochází navzájem mezi jádry vodíku, jimž ve spektru přísluší tyto triplety. Znamená to proto, že každý z tripletů tvoří signál od dvou magneticky ekvivalentních protonů. Ve vzorku se proto musí nacházet molekuly, jejichž části odpovídají schématu X–CH₂–CH₂–Y, přitom na prvních atomech ve skupinách X ani Y nejsou navázány žádné vodíky. Takové skupiny se v nukleových kyselinách ani použitém pufru nevyskytují – prokazatelně se jedná o nečistoty ve vzorcích.

Integrální intezita každého tripletu je přibližně čtyřikrát vyšší než intezita libovolné čáry příslušné jednomu jádru vodíku v molekule oligonukleotidu. Můžeme proto odhadnout koncentraci nečistot: ta je dvojnásobná oproti koncentraci oligonukleotidů, neboť každý z tripletů přísluší dvěma vodíkům v jedné molekule.

Pološířka tripletů se nemění v závislosti na teplotě v žádném ze tří proměřených

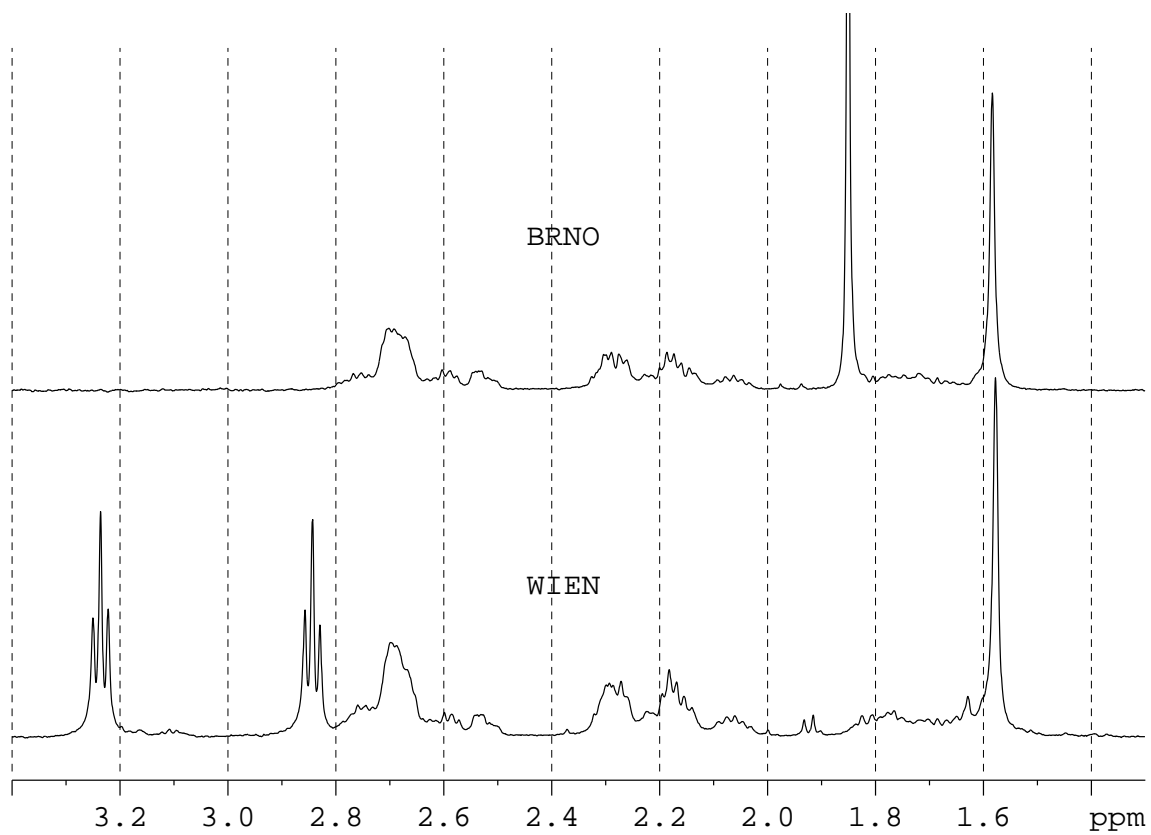
vzorků. Molekuly nečistot tedy neinteragují z nukleovými kyselinami a pravděpodobně nijak neovlivňují tvorbu dvojšroubovic.

Chemické posuny obou tripletů závisí na teplotě přibližně lineárně. Graf této závislosti, ve kterém jsou současně posuny signálu od pufru, ukazuje obrázek P-13 v přílohách.

Na e-mailový dotaz firma VBC-Biotech, která vzorky vyrobila, uvedla, že nežádoucí příměsi mohou pocházet ze dvou kroků při začišťování vzorků: buď z polyakrylamidové gelové elektroforézy (PAGE), nebo z NAP-5 kolon, které byly použity pro odstranění zbytků z PAGE. Pravděpodobná se jeví první možnost, při elektroforéze se do vzorku mohly uvolnit různé deriváty akrylamidu. NMR spektrum některých takových sloučenin by mohlo odpovídat výše popsaným vlastnostem. Z dostupných údajů se ale nic určitějšího o druhu nečistot říci nedá.

Pro srovnání jsem změřil ^1H NMR spektra totožného oligonukleotidu Match od druhého výrobce, který byl pořízen za účelem jiných měření na Fyzikálním ústavu UK. Tento vzorek pocházel z Laboratoře funkční genomiky a proteomiky na Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Byly použity stejné rozpouštědlo a stejný postup měření jako ve všech dříve popsaných a provedených NMR experimentech na nukleových kyselinách. Na obrázku 5.12 je ukázka spekter vzorků Match z obou laboratoří při teplotě $T_0 = 300\text{ K}$. Na první pohled je zřejmé, že triplety pozorované u vídeňských vzorků se ve spektru brněnského oligonukleotidu nevyskytují, zato se v něm nalézá nová čára s posunem 1,85 ppm, kterou jistě způsobuje jiný typ nečistot. Shodující se čára na 1,58 ppm patří thyminovým methylům. Část spektra, kterou obrázek neukazuje, se v obou případech shodovala.

Z uvedených pozorování plyne, že ani jeden z použitých vzorků nedosahuje dokonalé čistoty a že příměsi ve vzorcích z obou laboratoří se navzájem liší. Nečistoty ve vzorcích použitých pro měření teplotních závislostí NMR spekter však nijak neovlivnily dosažené výsledky.



Obrázek 5.12: Srovnání protonových NMR spekter vzorků Match připravených ve Vídni a v Brně; $T_0 = 300\text{ K}$

Kapitola 6

Závěr

V rámci této bakalářské práce jsem provedl tato měření a jejich vyhodnocení:

- Pro přesnější určení teplot při měření spekter jaderné magnetické rezonance nukleových kyselin jsem zkalibroval teplotní čidlo a stanovil optimální postup měření.
- Takto navrženým postupem jsem proměřil ^1H a ^{31}P spektra NMR vysokého rozlišení dinukleotidů ApU a Gp_cC v teplotním rozsahu 280 K až 350 K. Ověřil se tak stanovený teplotní režim experimentu.
- Stejným postupem jsem proměřil ^1H a ^{31}P spektra deoxyoligonukleotidů v teplotním rozsahu 280 K až 350 K. Experimenty jsem provedl nejprve na dvou oddělených vzorcích navzájem komplementárních vlákních devítinukleotidů, poté následovalo měření na směsi obou těchto řetězců.
- Protonová spektra lze rozdělit na několik oblastí, v nichž se nalézají signály vodíkových jader z určitých skupin atomů: směrem od nejvyšších posunů jsou to postupně vodíky v iminoskupinách, dále vodíky vázané na aromatické uhlíky, aminoprotony, v další části spektra čáry odpovídají jak některým aromatickým vodíkům, tak protonům v sacharidových skupinách, pozice 4,7 ppm přísluší potlačenému signálu vody, poté následuje oblast sacharidových protonů, pufru a také nečistot a nakonec signál od methylové skupiny thyminu.
- Přiřadil jsem signály v aromatických částech protonových spekter. Podařilo se jednoznačně určit, které spektrální čáry odpovídají jednotlivým druhům bází v dinukleotidech i v oligonukleotidech. Protonům ze sacharidů nelze jednoznačně přiřadit jednotlivé spektrální čáry z důvodu malých vzájemných posunů, velkého počtu štěpení čar J-interakcí i značného množství takových protonů v molekulách.
- Čáry v protonových spektrech směsi dvou komplementárních vláken se s klesající teplotou značně rozšiřují a znesnadňují tak jejich vyhodnocování. Rychlost tvorby a rozpadu duplexů není dostatečná k tomu, aby se dala pozorovat rychlá chemická výměna, která by vedla k zúžení čar.
- Srovnání součtu spekter jednotlivých vláken se spektry směsi komplementárních řetězců jednoznačně prokázalo, že ve vodném roztoku se při dostatečně

vysokých teplotách nacházejí pouze nespárované řetězce (tehdy se součet dílčích spekter shoduje se spektry směsi), kdežto s klesající teplotou je zřetelný nárůst relativního zastoupení duplexů.

- Sledování posunů vybraných spektrálních čar v aromatické oblasti přineslo výsledky v podobě sigmoidální závislosti prokazující probíhající fázový přechod, jejímž fitem byly získány termodynamické parametry popisující vznik duplexu.
- Teplotní závislosti změřených spekter se vyhodnocovaly několika různými způsoby, mezi něž se řadí rozbor polohy těžiště části spektra v závislosti na teplotě a výpočet korelačních koeficientů mezi spektry změřenými při sousedních teplotách.
- Signály od iminoprotonů z bází, které se vyskytovaly pouze ve spektrech směsi komplementárních řetězců při nízkých teplotách, jasně dokazují přítomnost duplexů. Závislost jejich intenzit na teplotě však nepřináší spolehlivé výsledky z důvodu zkreslení této části spekter vlivem probíhající chemické výměny.
- Protonová NMR spektra oligonukleotidů odhalila přítomnost nečistot ve vzorku pocházejících patrně z čištění gelovou elektroforézou. Ukázalo se však, že tyto látky pravděpodobně nijak neovlivňují vznik a rozpad duplexů DNA. Ze srovnání se spektry od jiného výrobce vyplývá, že ani v jednom případě nebyly vzorky bez znatelných příměsí, ty se však navzájem lišily.
- Fosforová NMR spektra oligonukleotidů se neukázala vhodná ke stanovení určitých závěrů o tvorbě a rozpadu duplexů. Je to způsobeno především příliš širokými spektrálními čarami, které nelze navzájem odlišit.

Všechna změřená protonová spektra byla vztažena k posunu protonů v HDO. Pro přesné hodnoty chemických posunů vzhledem ke standardu (TMS), by bylo třeba buď přidat tento standard přímo ke vzorku, nebo změřit teplotní závislost chemického posunu HDO vůči TMS.

Z popsaných výsledků je zřejmé, že i jednoduchá jednorozměrná spektra NMR vysokého rozlišení skýtají mnoho možností, jak získat smysluplné údaje o dynamice tvorby a rozpadu duplexů oligonukleotidů. Nelze z nich však jednoduše určit například koncentrace množství spárovaných řetězců při dané teplotě. Některé navržené a provedené postupy zpracování změřených spekter, jako jsou sledování posunů jednotlivých čar a těžiště spektra či výpočet korelačních koeficientů mezi spektry změřenými při sousedních teplotách, vedou k výsledkům, které se dají srovnávat s údaji získanými jinými experimentálními metodami než NMR.

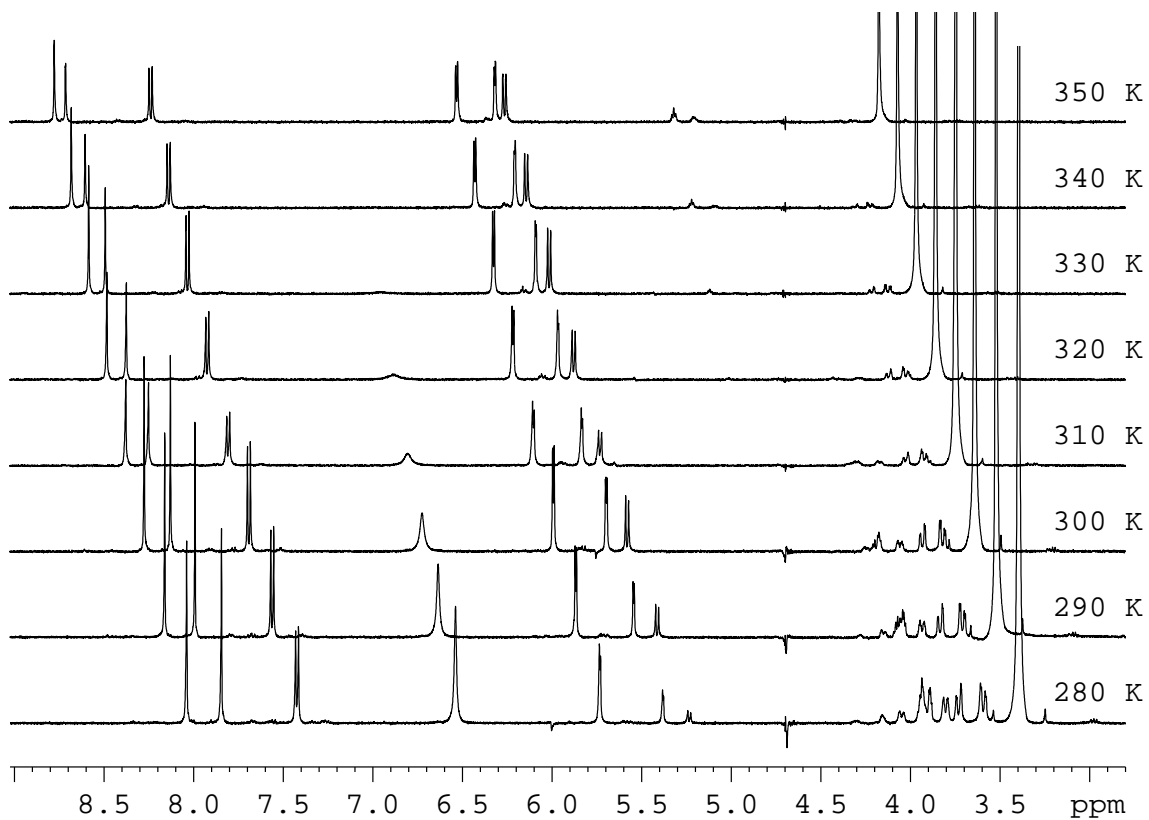
Zároveň se ukazuje, že zvolená délka oligonukleotidů se blíží hranici, kdy již nebude možné protonová spektra spolehlivě interpretovat. Kratší řetězce by sice značně zjednodušily získaná spektra (nejen nižším počtem čar, ale také patrně zrychlením chemické výměny v důsledku vyšší pohyblivosti molekul), ale současně je známo, že duplexy krátkých úseků DNA jsou méně stabilní. Je proto třeba hledat kompromis mezi usnadněním práce se spektry a použitelností získaných výsledků.

Další údaje o tvorbě dvojšroubovic by přinesla měření NMR spekter uhlíku ^{13}C , případně také dusíku ^{15}N a vícerozměrných korelačních spekter. V souvislosti s nízkým přirozeným zastoupením těchto izotopů vyvstává pro taková měření potřeba izotopicky značených vzorků, jejichž výroba je však obtížnější a nákladnější.

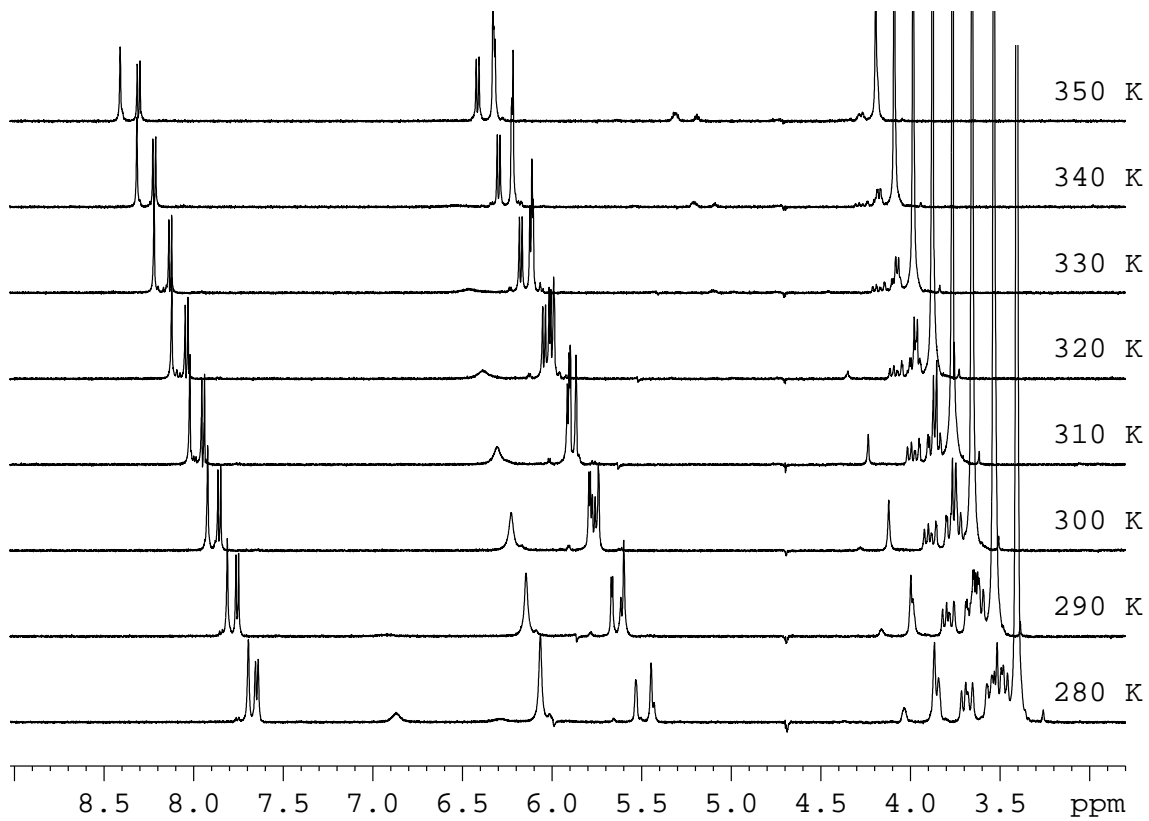
Literatura

- [1] H. Günther, *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry*, s. 23–28, 65–67, 336–341, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 1995.
- [2] P.J. Hore, *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, Oxford, 1995.
- [3] P. Ottová, *Mikrokalorimetrické stanovení změn energie při tvorbě duplexu DNA*, bakalářská práce, MFF UK, Praha, 2007.
- [4] J. Palacký, *Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů – potenciálních chemoterapeutik*, diplomová práce, MFF UK, Praha, 2005.
- [5] W. Saenger, *Principles of Nucleic Acid Structure*, s. 141–149, Springer-Verlag, New York, 1984.

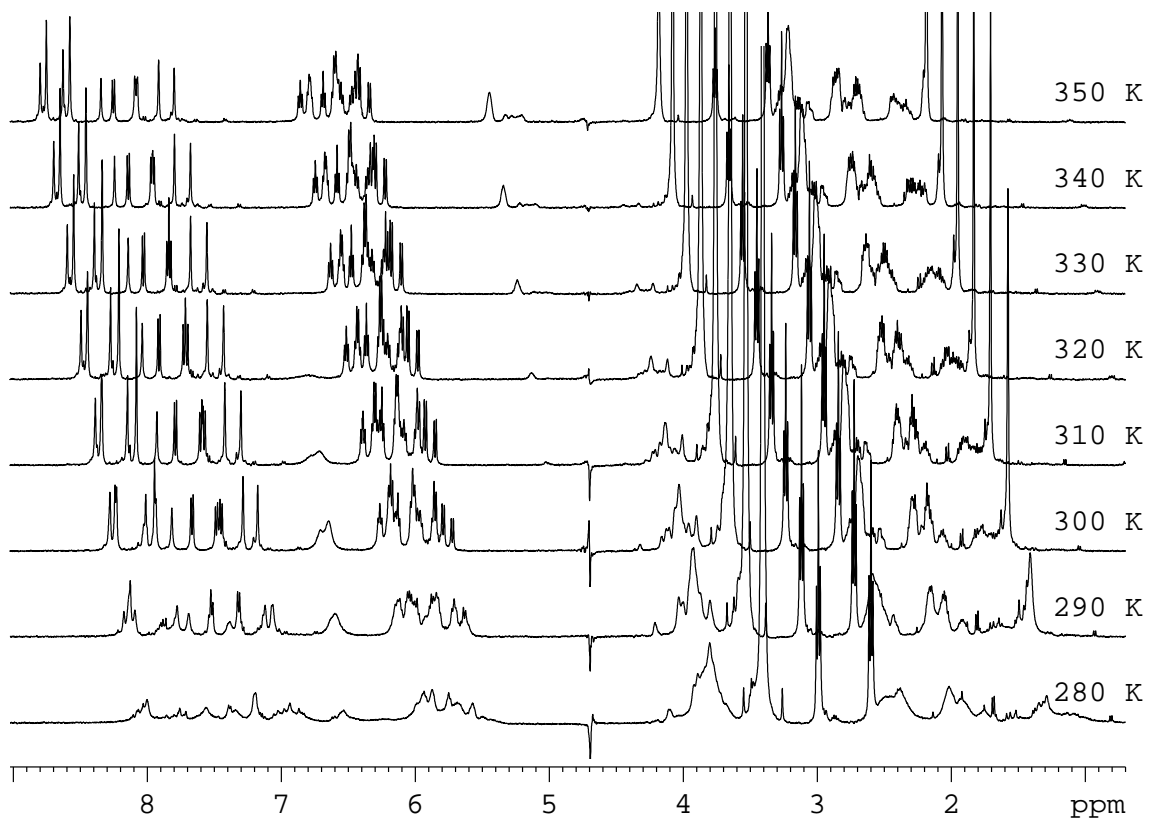
Přílohy



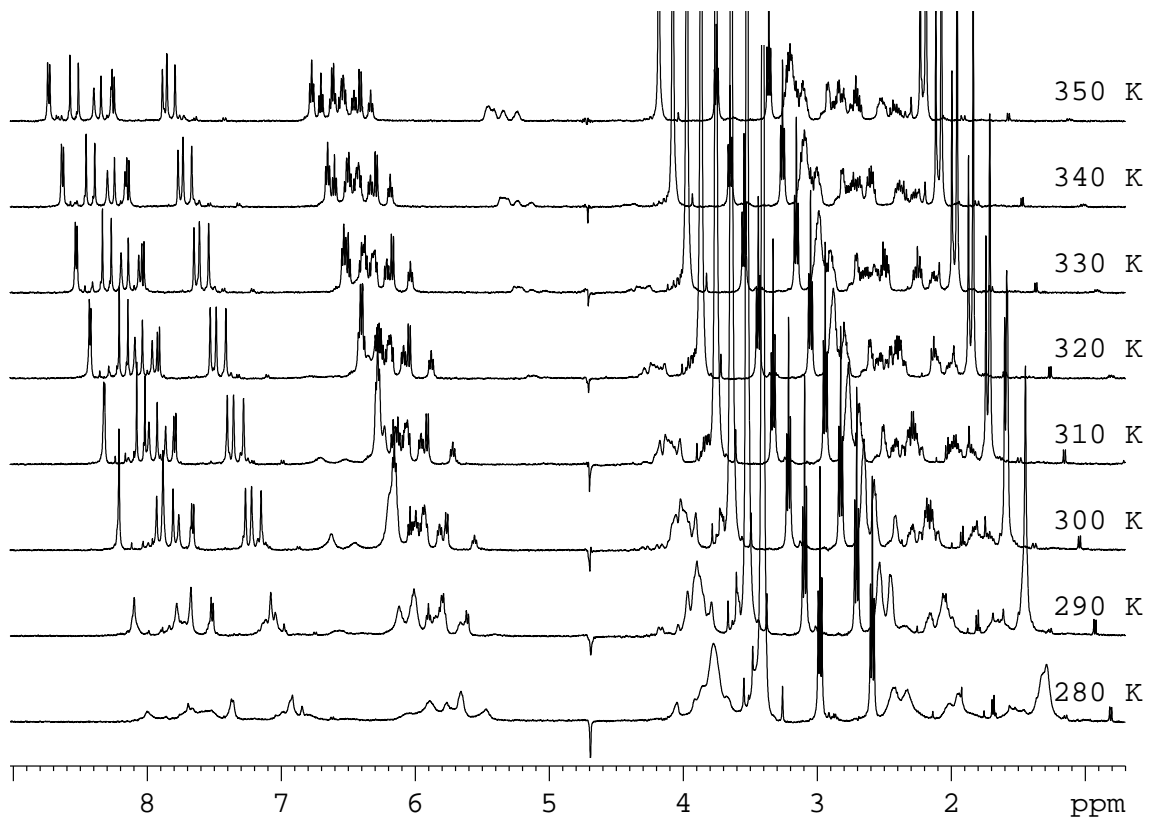
Obrázek P-1: Protonová NMR spektra ApU



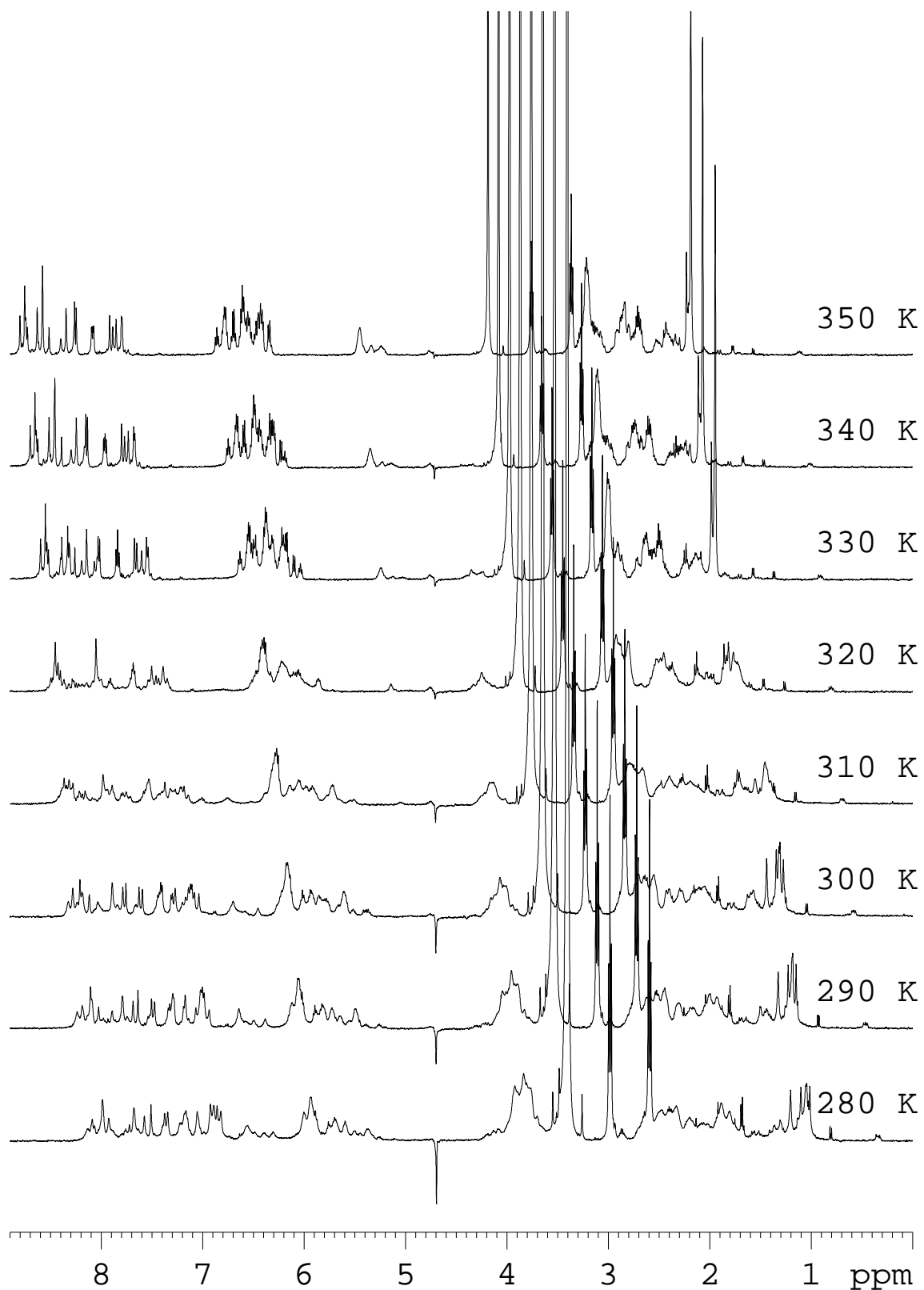
Obrázek P-2: Protonová NMR spektra Gp_cC



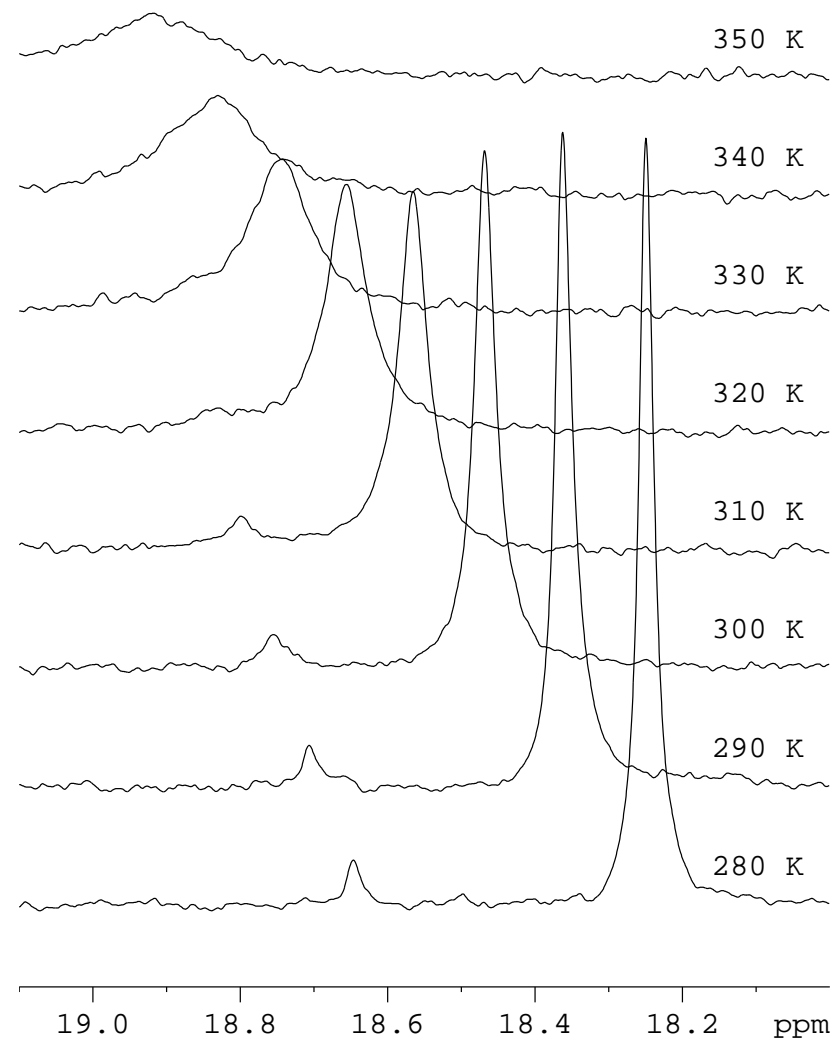
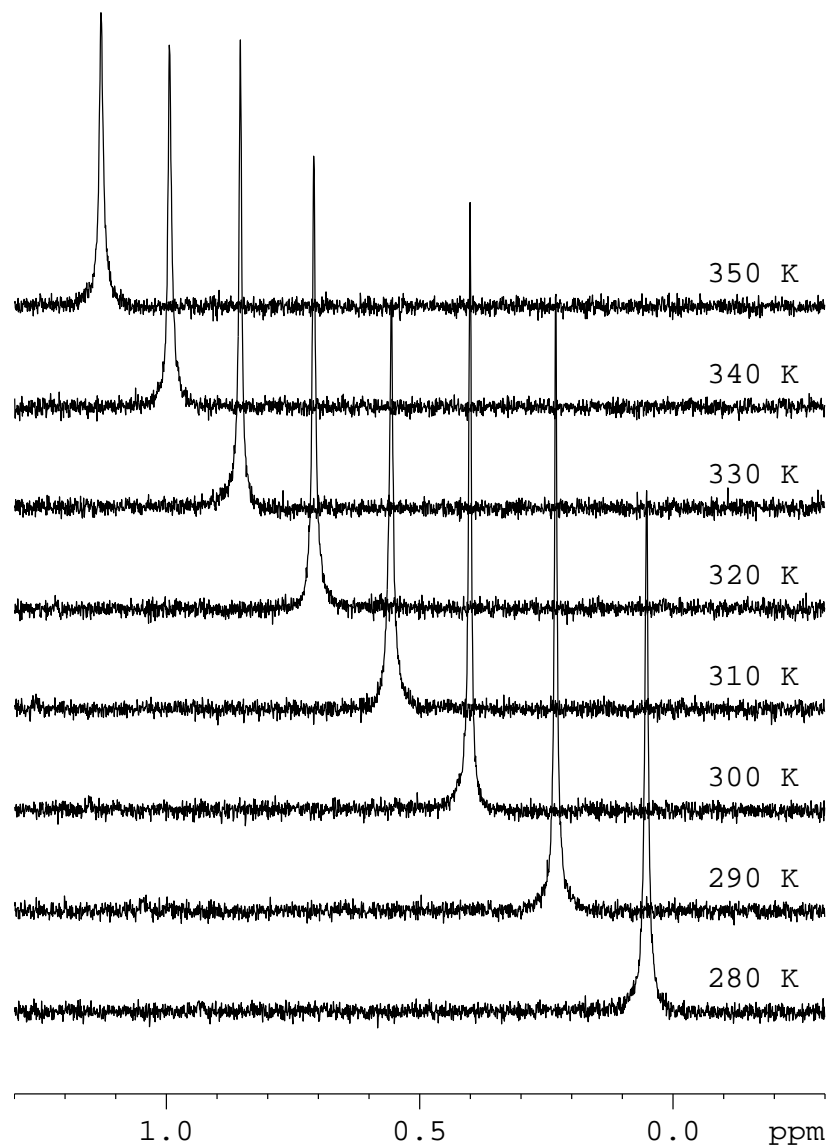
Obrázek P-3: Protonová NMR spektra vzorku Match



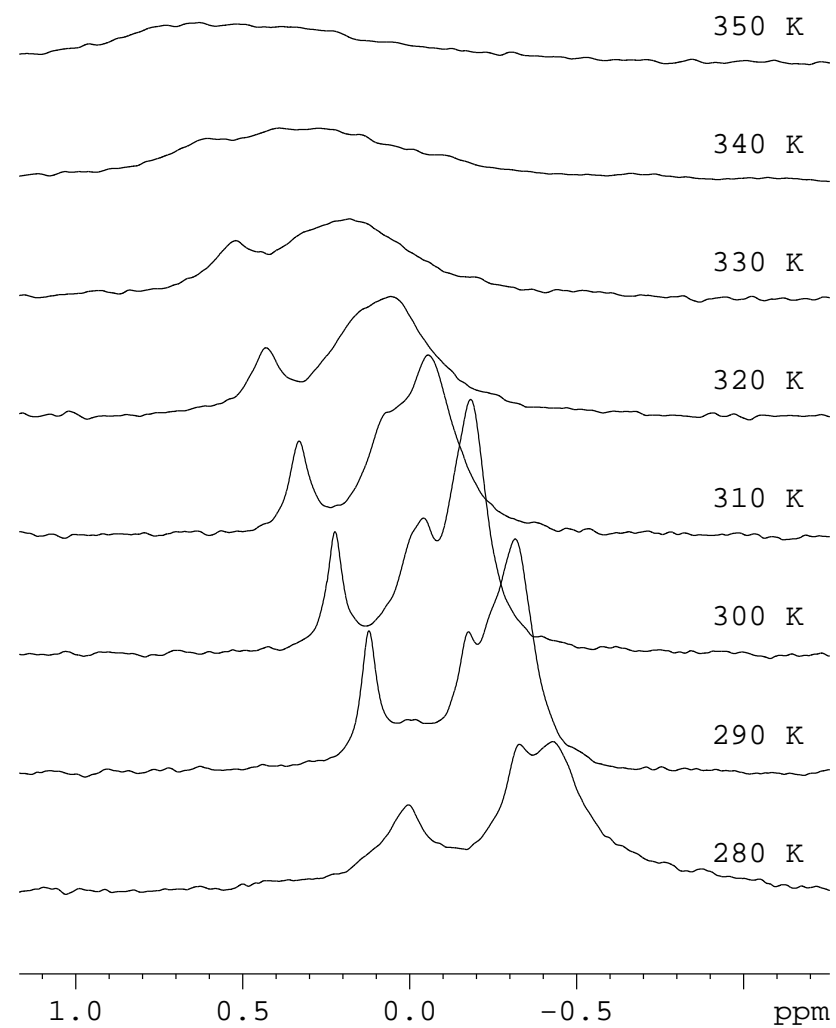
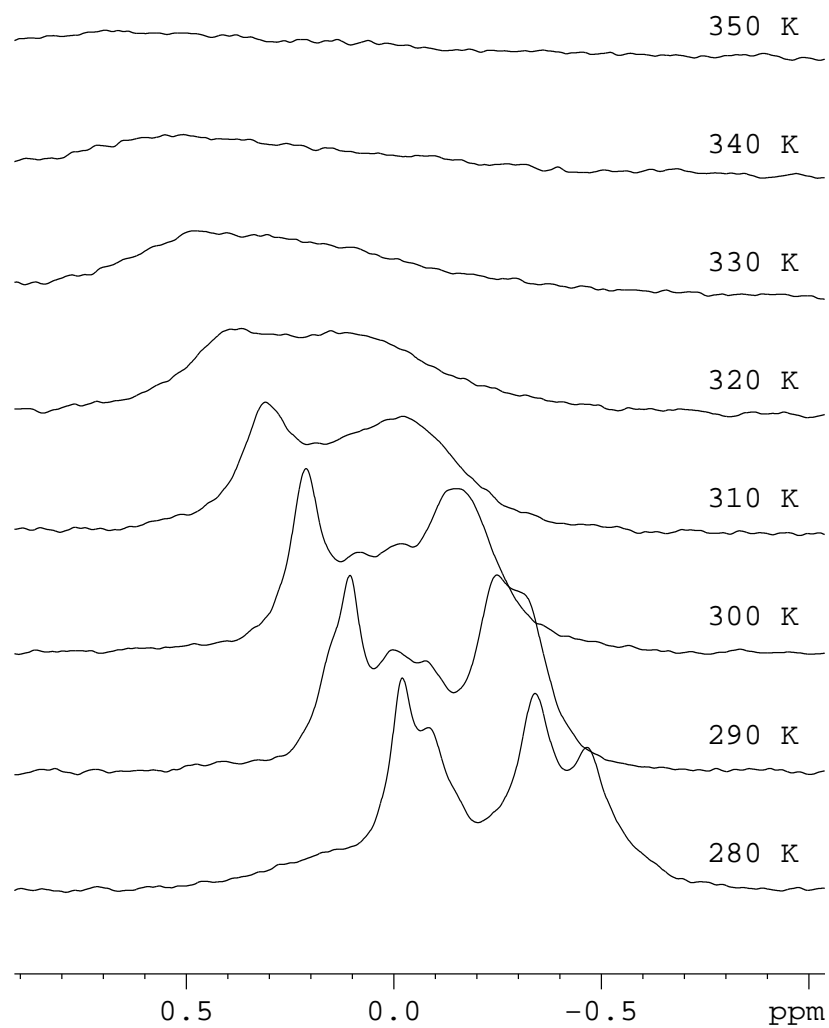
Obrázek P-4: Protonová NMR spektra vzorku Kompl



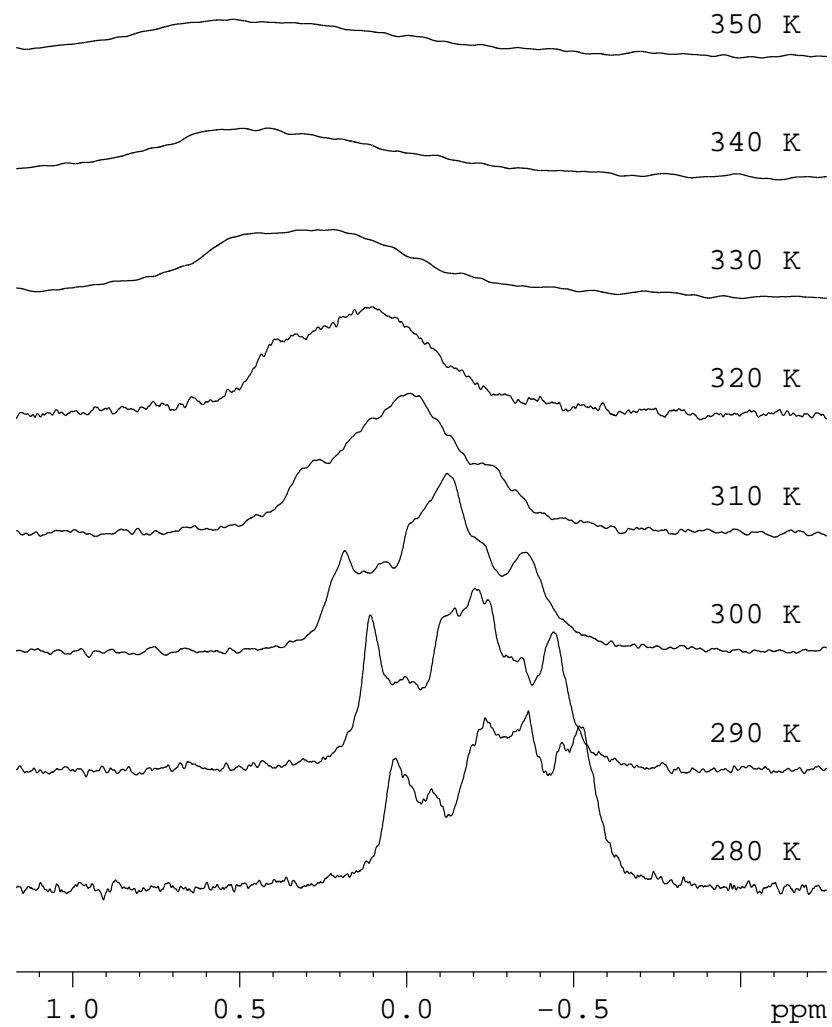
Obrázek P-5: Protonová NMR spektra vzorku Duplex



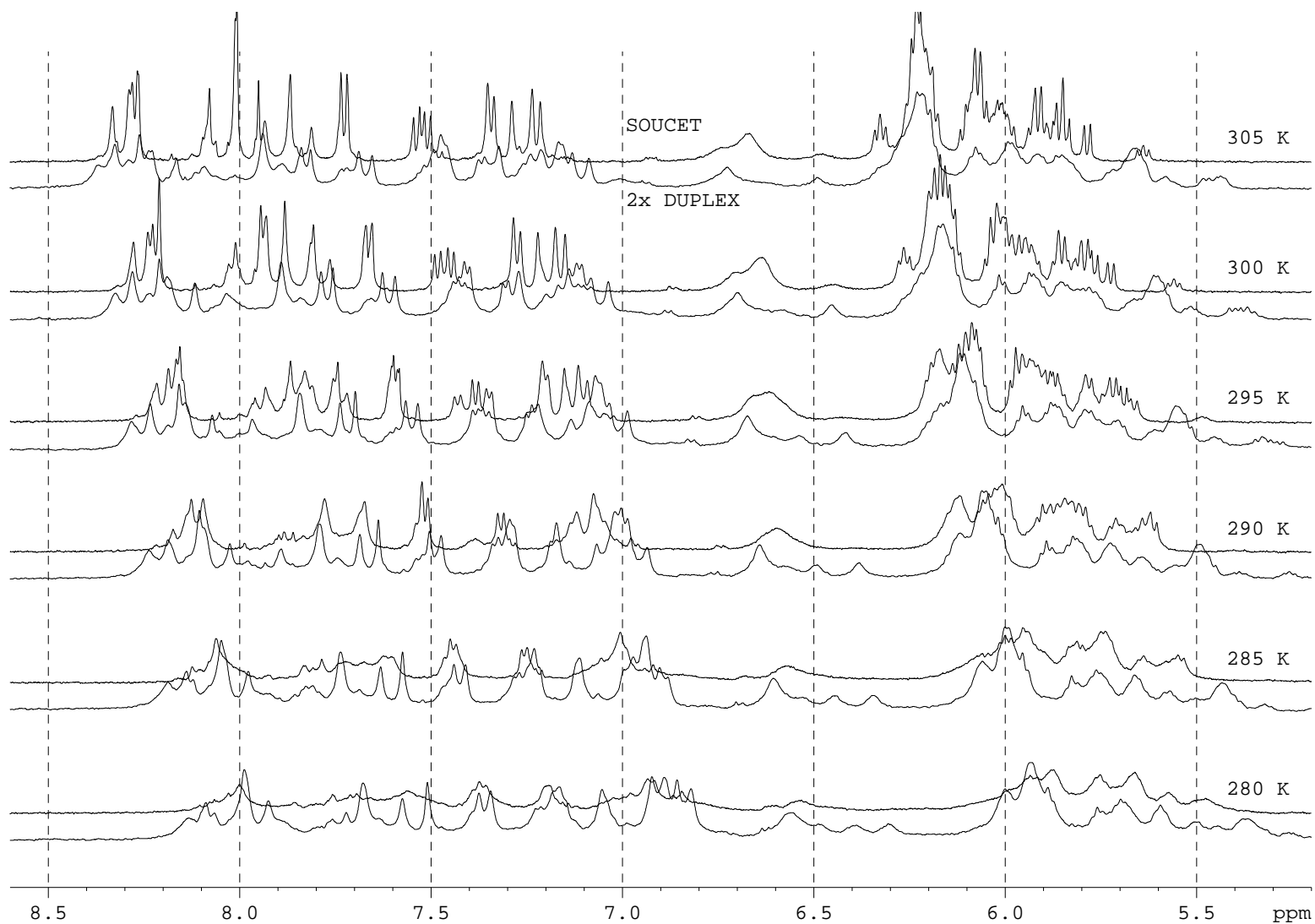
Obrázek P-6: Fosforová NMR spektra dinukleotidů: nalevo spektra ApU, napravo Gp_cC



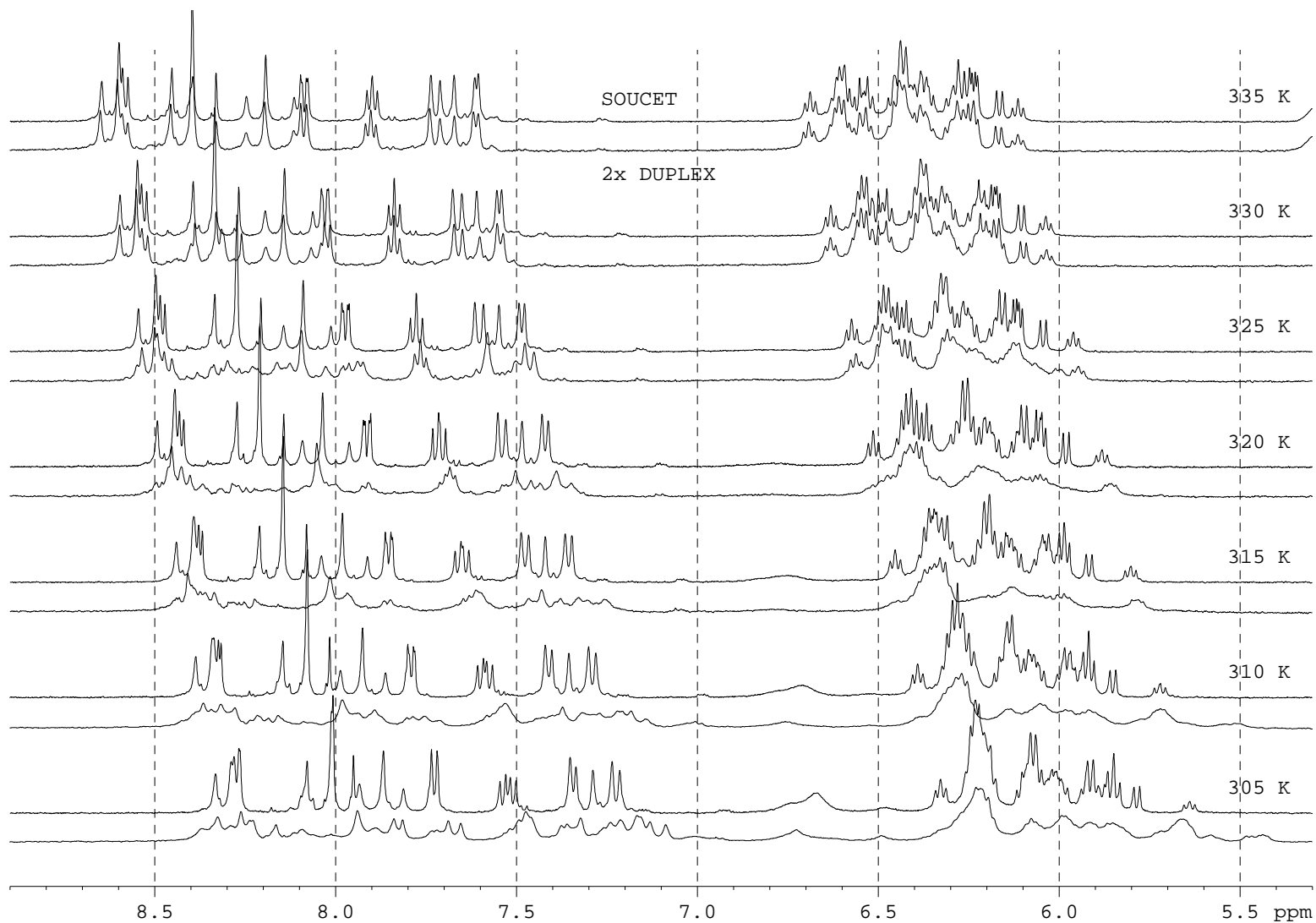
Obrázek P-7: Fosforová NMR spektra oligonukleotidů: nalevo spektra vzorku Match, napravo Kompl



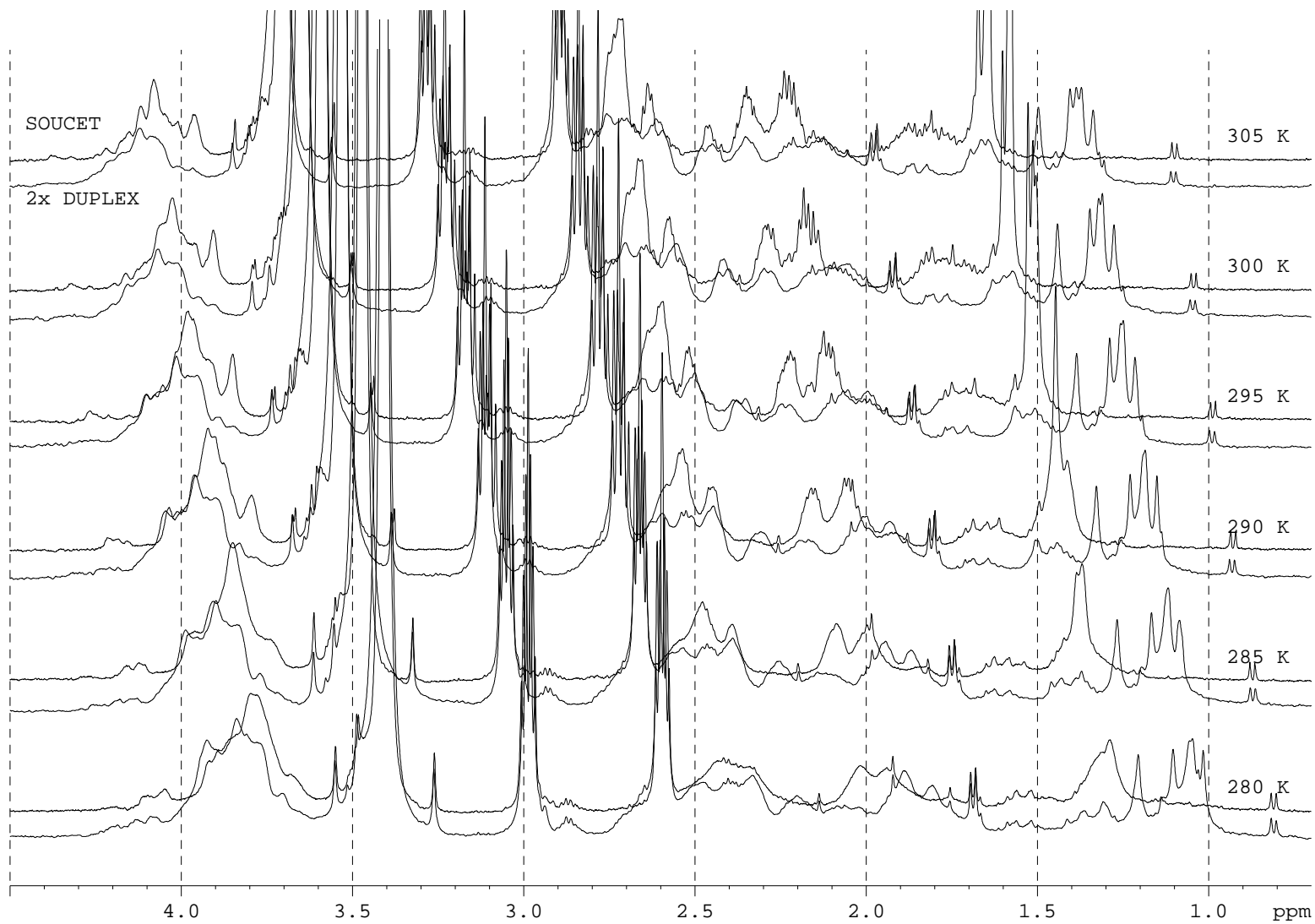
Obrázek P-8: Fosforová NMR spektra vzorku Duplex



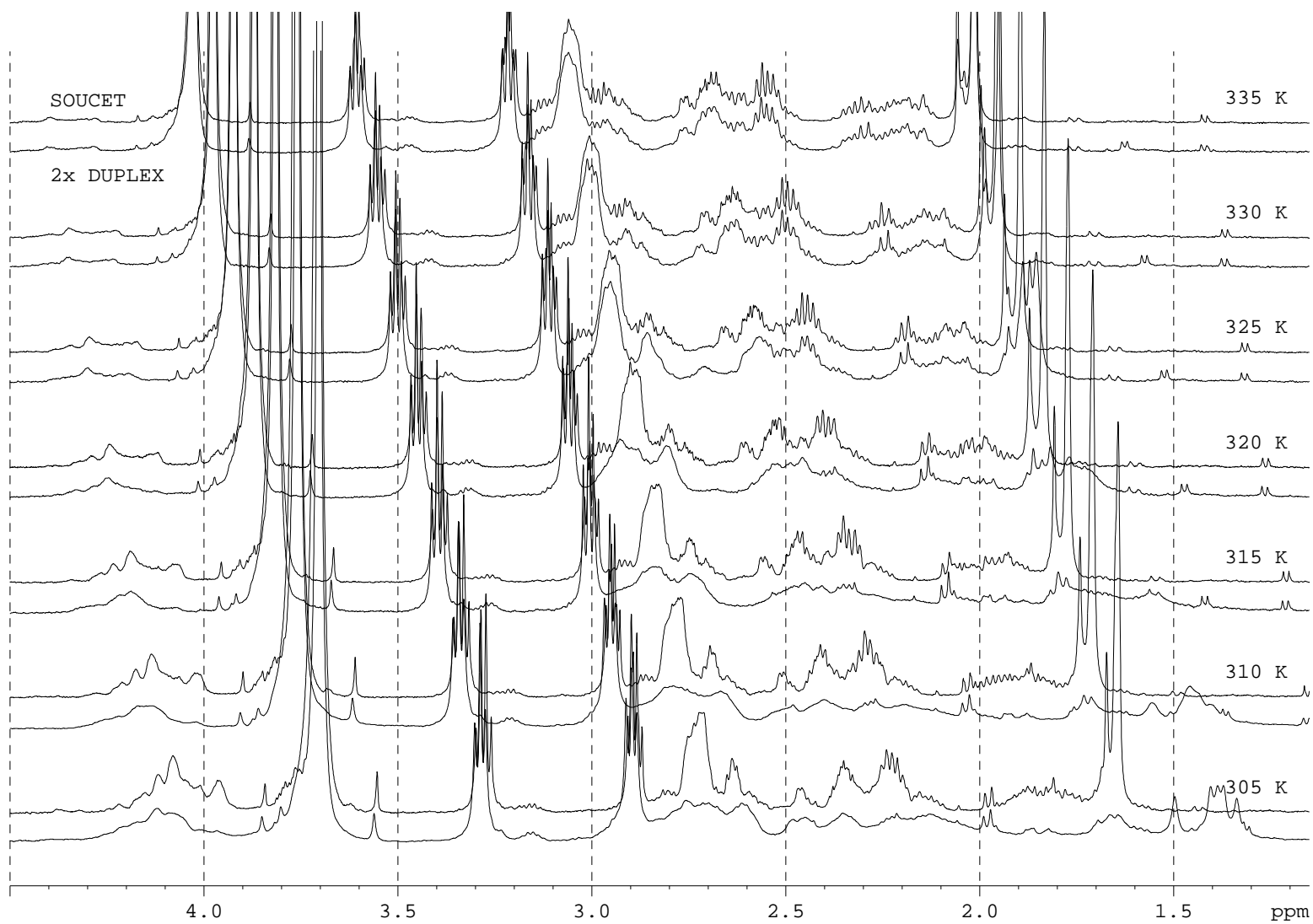
Obrázek P-9: Srovnání součtu protonových spekter samostatných vláken oligonukleotidů Match a Kompl s protonovými spektry vzorku Duplex: aromatická a smíšená oblast spektra při teplotách od 280 K do 305 K



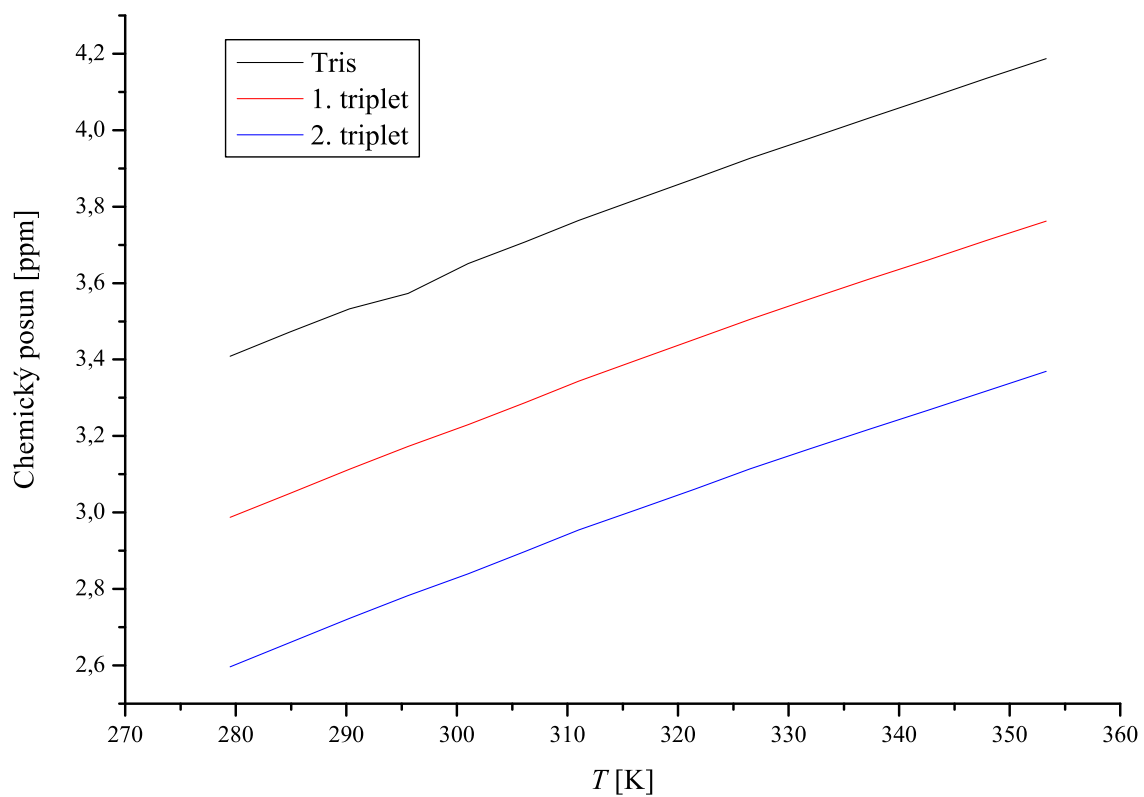
Obrázek P-10: Srovnání součtu protonových spekter samostatných vláken oligonukleotidů Match a Kompl s protonovými spektry vzorku Duplex: aromatická a smíšená oblast spektra při teplotách od 305 K do 335 K



Obrázek P-11: Srovnání součtu protonových spekter samostatných vláken oligonukleotidů Match a Kompl s protonovými spektry vzorku Duplex: sacharidová oblast spektra při teplotách od 280 K do 305 K



Obrázek P-12: Srovnání součtu protonových spekter samostatných vláken oligonukleotidů Match a Kompl s protonovými spektry vzorku Duplex: sacharidová oblast spektra při teplotách od 305 K do 335 K



Obrázek P-13: Teplotní závislost posunů signálu pufru a dvou tripletů, které přísluší nečistotám