

3064

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BIOCHEMIE



# Vliv pH a iontové síly na strukturu a stabilitu cytochromu *c*

Diplomová práce

Effect of pH and Ionic Strength  
on the Structure and Stability of Cytochrome *c*

**Hana Kratochvílová**

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2009

Přírodovědecká fakulta UK  
KNIHOVNA CHEMIE



3233145668

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 30. srpna 2009

  
Hana Kratochvílová

Chtěla bych poděkovat svému školiteli doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracování této práce. Dále bych chtěla celému kolektivu laboratoře za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě chci poděkovat celé své rodině a blízkým za všestrannou pomoc a podporu během studia.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ.....</b>	<b>6</b>
<b>1. PŘEHLED LITERATURY .....</b>	<b>8</b>
1.1. Spektrofotometrie .....	8
1.1.1. Absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti.....	8
1.1.2. Absorpční spektrofotometrie proteinů v UV/VIS oblasti.....	10
1.1.3. Diferenční spektrofotometrie.....	14
1.1.3.1. Perturbace spektra vlivem teploty.....	15
1.1.3.2. Perturbace spektra vlivem přidavku další látky do roztoku.....	15
1.1.3.3. Další způsoby perturbace spektra .....	16
1.1.4. Derivační spektrofotometrie.....	17
1.2. Prostorová struktura, stabilita a denaturace proteinů .....	20
1.3. Sbalování proteinů.....	23
1.4. Cytochrom <i>c</i> .....	25
1.4.1. Základní vlastnosti, funkce a výskyt cytochromu <i>c</i> .....	25
1.4.2. Struktura a evoluce cytochromu <i>c</i> .....	26
1.4.3. Absorpční spektrofotometrie cytochromu <i>c</i> v UV/VIS oblasti.....	28
1.4.4. Cytochrom <i>c</i> a konformační stav „molten globule“.....	29
<b>2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIÁL A METODY .....</b>	<b>34</b>
3.1. Použitý materiál a chemikálie .....	34
3.2. Použité laboratorní přístroje .....	34
3.3. Metody.....	35
3.3.1. Příprava pufrů a roztoků.....	35
3.3.2. Měření absorpčních spekter cytochromu <i>c</i> .....	36
3.3.3. Zpracování experimentálních dat.....	36
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>38</b>
4.1. Absorpční a derivační spektra nativního cytochromu <i>c</i> .....	38
4.2. Studium vlivu pH a iontové síly na stabilitu a strukturu cytochromu <i>c</i> .....	45
<b>5. DISKUSE.....</b>	<b>59</b>
<b>6. SOUHRN .....</b>	<b>62</b>

**7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY ..... 64**

## SEZNAM ZKRATEK A POUŽITÝCH SYMBOLŮ

<b><i>A</i></b>	Absorbance
<b><i>c</i></b>	Koncentrace
<b>CD</b>	Cirkulární dichroismus
<b>Cyt <i>c</i></b>	Cytochrom <i>c</i>
<b><i>E</i></b>	Energie záření
<b><i>E</i><sub>0</sub></b>	Energie základní
<b><i>E</i><sub>e</sub></b>	Energie elektronová
<b><i>E</i><sub>r</sub></b>	Energie rotační
<b><i>E</i><sub>v</sub></b>	Energie vibrační
<b><i>G</i><sub>celk</sub></b>	Celková Gibbsova energie
<b><i>h</i></b>	Planckova konstanta
<b><i>H</i><sub>mol</sub></b>	Enthalpie molekulární
<b><i>H</i><sub>rozp</sub></b>	Enthalpie rozpouštědla
<b>CT</b>	„ <i>Charge transfer</i> “ pás
<b><i>I</i></b>	Iontová síla
<b>IUPAC</b>	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii „ <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> “
<b>IUB</b>	Mezinárodní unie pro biochemii „ <i>International Union of Biochemistry</i> “
<b><i>l</i></b>	Optická délka
<b>MG</b>	Konformační stav „ <i>molten globule</i> “
<b>NAD(P)H</b>	Nikotinamiddinukleotidfosfát

<b>NIR</b>	Blízká infračervená oblast <i>„Near infrared“</i>
<b>SEM</b>	Směrodatná odchylka průměru
<b>SPDS</b>	Diferenční spektrofotometrie změnou složení roztoku <i>„Solvent perturbation difference spectroscopy“</i>
$S_{mol}$	Entropie molekulární
$S_{rozp}$	Entropie rozpouštědla
$T$	Teplota
$T_m$	<i>„Temperature of melting“</i> Teplota tání
<b>TPDS</b>	Teplotně perturbační diferenční spektrofotometrie <i>„Thermal perturbation difference spectroscopy“</i>
<b>UV</b>	Ultrafialová oblast <i>„Ultraviolet“</i>
<b>VIS</b>	Viditelná oblast <i>„Visible“</i>
$\lambda$	Vlnová délka
$\varepsilon$	Absorpční koeficient
$\nu$	Frekvence
$\tilde{\nu}$	Vlnčet

Dále byly použity standardní třípísmenné zkratky aminokyselin (cit.<sup>[1]</sup>):

Asp, Asn, Arg, Cys, Glu, Gly, His, Lys, Met, Phe, Ser, Thr, Trp, Tyr

# 1. PŘEHLED LITERATURY

## 1.1. Spektrofotometrie

Při spektrofotometrických měřeních studujeme absorpci, popř. emisi elektromagnetického záření látkou. V této práci se budu zabývat pouze absorpcí záření molekulami, zejména absorpcí ve viditelné a ultrafialové oblasti elektromagnetického spektra. Vzhledem ke kvantové povaze záření platí, že absorbováno je pouze to záření, jehož fotony mají energii  $E$ , přesně odpovídající rozdílu energetických hladin absorbujících molekul (atomů). energii elektromagnetického záření lze vyjádřit vztahem (1), kde  $E$  je energie (J),  $h$  je Planckova konstanta ( $6,62 \cdot 10^{-34}$  Js) a  $\nu$  je frekvence (Hz)<sup>[2-4]</sup>:

$$E = h \nu \quad (1)$$

Ve spektrofotometrii z praktických důvodů častěji vyjadřujeme energii záření pomocí vlnové délky ( $\lambda$ ), resp. vlnočtu ( $\tilde{\nu}$ )<sup>[5]</sup>.

### 1.1.1. Absorpční spektrofotometrie v UV/VIS oblasti

Oblastí UV/VIS („ultraviolet/visible“) elektromagnetického spektra rozumíme rozmezí vlnových délek přibližně od 200 nm do 400 nm (blízká ultrafialová oblast) a od 400 až 800 nm (viditelná oblast). Některé moderní spektrofotometry dokáží měřit i v oblasti pod 200 nm (tzv. vakuová oblast spektra) a naopak i v oblasti do vlnových délek 1100 nm (NIR „near infrared“, blízká infračervená oblast)<sup>[2-4]</sup>.

Energie záření v této oblasti odpovídá přechodům mezi jednotlivými elektronovými hladinami molekul. Každá z elektronových hladin je dále rozštěpena na vibrační energetické podhladiny, ty jsou díky rotačnímu pohybu celé molekuly štěpeny na rotační energetické podhladiny<sup>[2-5]</sup>.



Celkovou energii molekuly tedy můžeme symbolicky vyjádřit vztahem (2):

$$E_0 = E_e + E_v + E_r \quad (2)$$

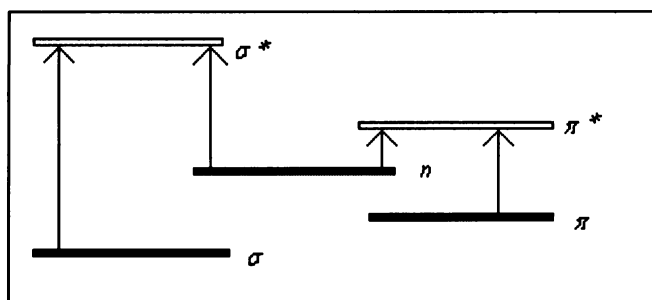
Velikosti jednotlivých energetických příspěvků jsou následující (3):

$$E_e > E_v > E_r \quad (3)$$

Jak již bylo řečeno, podstatou vzniku absorpčních spekter v UV/VIS oblasti jsou elektronové přechody, každý takový přechod však může být doprovázen změnou rotačního nebo vibračního stavu molekuly. Namísto jedné energie přechodu (čára ve spektru s odpovídající hodnotou  $\lambda$ ) tak každému elektronovému přechodu přísluší skupina čar. Intenzita jednotlivých čar je dána tím, nakolik jsou pro odpovídající přechody splněna příslušná výběrová pravidla. Takovou skupinu bychom ovšem mohli pozorovat pouze ideálním spektrometrem, měřením na reálných přístrojích (s konečnou hodnotou spektrálního rozlišení) je signál „rozmazán“ a místo čar pozorujeme absorpční pásy.

Popisovaná situace plně platí pouze pro izolované molekuly ve vakuu. Při přechodu do kondenzovaného stavu či roztoku jsou jednotlivé molekuly ovlivněny vzájemnými srážkami a dalšími interakcemi (solvatace). Tyto interakce ovlivňují (perturbují) jednotlivé energetické hladiny; každá molekula je přitom ovlivněna v poněkud odlišné míře. Vzhledem k obrovskému počtu molekul ve vzorku vytvářejí tato oproti sobě posunutá individuální spektra de facto kontinuální pásové spektrum, které je obálkou příspěvků jednotlivých molekul. Jeho tvar i intenzita jsou výrazně ovlivněny prostředím, v němž se molekuly vyskytují.

Absorpční přechody elektronů se uskutečňují z hladiny s nižší energií do hladiny s vyšší energií (obr.1, str. 10). V UV/VIS oblasti jsou nejčastější přechody  $\pi$  elektronů mezi vazebnými a antivazebnými orbitály ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Energetické přechody mezi vazebnými a antivazebnými  $\sigma$  orbitály ( $\sigma \rightarrow \sigma^*$ ) jsou spojeny s absorpcí záření ve vzdálené ultrafialové oblasti. Uplatňují se i přechody elektronů z nevazebných do antivazebných orbitalů ( $n \rightarrow \pi^*$ ,  $n \rightarrow \sigma^*$ ), které mohou nastat u molekul obsahující heteroatom (kyslík, síra, dusík, atd.)<sup>[4]</sup>. V koordinačních sloučeninách jsou obvykle dominantní přechody mezi d orbitály.



Obr.1: Schéma přechodů elektronů mezi energetickými hladinami

(plně označené orbitaly-obsazené, prázdné-neobsazené) (převzato cit.<sup>[4]</sup>)

Přísně vzato se všechny přechody (elektronové, vibrační, rotační) týkají vždy molekuly jako celku. Velmi často je však možné s dobrým přiblížením „lokalizovat“ tyto děje na určité skupiny atomů v rámci molekuly, označované jako chromofory<sup>[2, 5-7]</sup>.

Charakteristické absorpční pásy v UV/VIS oblasti elektromagnetického spektra nalezneme u mnoha biochemicky významných struktur. Peptidová vazba absorbuje v oblasti vlnových délek 200-225 nm. Báze nukleových kyselin absorbují přibližně při vlnové délce 260 nm. Charakteristické absorpční pásy aromatických aminokyselin nalezneme v oblasti okolo 280 nm. Při 340 nm absorbuje NAD(P)H a v oblasti mezi 405-420 nm můžeme pozorovat tzv. Soretův pás v absorpčních spektrech hemových bílkovin<sup>[2, 8]</sup>.

### 1.1.2. Absorpční spektrofotometrie proteinů v UV/VIS oblasti

Z hlediska UV/VIS absorpčních spekter jsou pro studium bílkovin nejvýznamnější přechody  $\pi$  elektronů ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Charakteristickými chromoforními skupinami bílkovin jsou zejména systémy obsahující aromatické skupiny a násobné vazby (aromatické aminokyseliny, peptidová vazba). Tabulka 1 (str. 12) uvádí nejčastěji se vyskytující proteinové chromofory společně s typem přechodu, polohou absorpčního maxima a hodnotou logaritmu absorpčního koeficientu.

Chromoformní skupiny, kde se uplatňuje přechod elektronů  $\sigma \rightarrow \sigma^*$  (jednoduché vazby), absorbují záření s  $\lambda < 180$  nm. Oblast pod 180 nm (tzv. vakuová ultrafialová oblast) je pro většinu spektrofotometrů nedosažitelná, protože v této oblasti absorbují křemenné součásti přístrojů a aparatur, jednoduché anorganické ionty i například molekuly  $O_2$  atd.<sup>[2, 3]</sup>.

Peptidová vazba absorbuje ve vzdálené UV oblasti spektra okolo 188 nm a dále v oblasti vlnových délek 200-225 nm. Absorpční pásy aromatických chromoforů nalezneme v oblasti přibližně okolo 280 nm. Ve spektru fenylalaninu se vyskytuje absorpční pás při 188 nm, a několik maxim při 206 a 261 nm. Absorpční spektrum tryptofanu obsahuje několik maxim při vlnových délkách 195 a 220 nm. Větší význam mají pásy při vlnových délkách 280 nm a 286 nm. Struktura tyrosinu je závislá na pH roztoku (disociace hydroxylové skupiny na aromatickém kruhu). Absorpční maxima ve spektru nedisociované aminokyseliny nalezneme při vlnových délkách 193 nm, 222 nm a 275 nm. Při disociaci hydroxylové skupiny dojde ke zvýšení intenzity a k posunu maxim k vyšším vlnovým délkám 200 nm, 240 nm a 293 nm.

Minoritní příspěvky v absorpčních spektrech bílkovin náleží histidinu a aminokyselinám obsahující atom síry. Ostatní UV chromofory bílkovin jsou zastíněny intenzivnějšími absorpčními pásy tryptofanu, tyrosinu, fenylalaninu nebo peptidové vazby nebo absorbují záření s  $\lambda < 180$  nm (tzv. vakuová oblast spektra). Kromě aminokyselinových zbytků a peptidové vazby mohou v UV/VIS spektrech proteinů absorbovat i jiné součásti proteinové struktury (kofaktory a koenzymy)<sup>[2, 8]</sup>. Typická a výrazná je tato absorpce pro hemové proteiny. O jejich spektrech bude (na příkladu cytochromu *c*) pojednáno důkladněji v dalším textu (odst. 1.4.3.).

Tabulka 1: Chromofory v bílkovinách (převzato cit.<sup>[2]</sup>)

Chromofor (absorbující struktura)	Zbytek aminokyseliny	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\log \epsilon_{\max}$	Typ přechodu
C-H	Všechny	125	-	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
C-C	Všechny	135	-	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
O-H	Ser, Thr	150	3,2	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
		183	2,2	$n \rightarrow \sigma^*$
N-H	Lys, Arg, N-konec	173	3,4	$\sigma \rightarrow \sigma^*$
		213	2,8	$n \rightarrow \sigma^*$
S-H	Cys	195	3,3	$n \rightarrow \sigma^*$
S <sup>-</sup>	Cys <sup>-</sup>	235	3,5	$n \rightarrow \sigma^*$
C-S-C	Met	205	3,3	$n \rightarrow \sigma^*$
-S-S-	Cystin	250	2,5	$n \rightarrow \sigma^*$
COOH	Asp, Glu, C-konec	205	1,6	$n \rightarrow \pi^*$
CO-NH	Asn, Gln Peptidová vazba	188	3,9	$\pi \rightarrow \pi^*$
		225	2,6	$n \rightarrow \pi^*$
Fenyl	Phe	188	4,8	$\pi \rightarrow \pi^*$
		206	3,9	
		261	2,4	
Fenol	Tyr	193	4,7	$\pi \rightarrow \pi^*$
		222	3,9	
		275	3,1	
Fenolát	Tyr <sup>-</sup>	200	5,0	$\pi \rightarrow \pi^*$
		240	4,0	
		293	3,4	
Indol	Trp	195	4,3	$\pi \rightarrow \pi^*$
		220	4,5	
		280	3,7	
		286	3,3	
Imidazol	His	211	3,8	$\pi \rightarrow \pi^*$

Výsledné UV/VIS absorpční spektrum bílkoviny nelze nahradit sumou příspěvků samostatných chromoforních skupin, protože tyto skupiny jsou ovlivněny pozicí v molekule, složením rozpouštědla a dalšími interakcemi. Z těchto důvodů odrážejí reálná spektra nejen aminokyselinové složení bílkoviny, ale i její konformační stav.

Jelikož poloha absorpčních pásů pro dané chromoforní skupiny závisí na polaritě prostředí, je studium změn poloh a intenzit absorpčních maxim z experimentálního hlediska velmi zajímavé. Ke změně průběhu nebo intenzity absorpční křivky dochází v důsledku změny polaritě prostředí. Při snížení polaritě v okolí chromoforu je obvyklý posun absorpčních pásů k vyšším vlnovým délkám (červený posun). Pokud se absorpční maxima posouvají k nižším vlnovým délkám (modrý posun) indikuje to často rozbalování nativní konformace proteinu<sup>[2, 8, 9]</sup>.

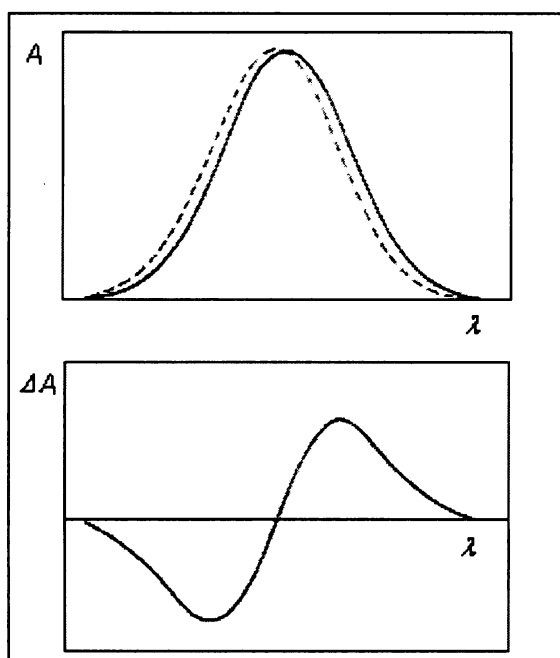
Změny poloh absorpčních maxim nebo intenzit jednotlivých pásů mohou být jen velmi nepatrné a obtížně vyhodnotitelné přímým měřením spektra. Techniky diferenční a derivační spektrofotometrie jsou vhodnými metodami ke sledování těchto malých změn v absorpčních spektrech proteinů<sup>[4]</sup>.

### 1.1.3. Diferenční spektrofotometrie

Působením vnějších faktorů (tzv. perturbací) může v absorpčním spektru bílkoviny docházet ke změnám v polohách či intenzitách absorpčních maxim ve srovnání s původním spektrem bílkoviny. Mezi chemické nebo fyzikální faktory ovlivňující polohy a intenzity absorpčních pásů patří například změna teploty, přidavek další látky k roztoku bílkoviny (rozpouštědla, nízkomolekulární látky, ionty, substráty, ligandy, denaturační činidla atd.), změna koncentrace proteinu nebo změna pH roztoku. Pro sledování malých změn v poloze pásů je vhodné použití diferenční spektrofotometrie<sup>[2, 5]</sup>.

Diferenční spektrum získáme odečtením dvou srovnávaných spekter. Experimentálně na dvoupraprskovém spektrofotometru se provádí odečítání optické, kdy jako referentní vzorek slouží původní roztok bílkoviny. U jednopaprskových přístrojů použijeme metod matematického odečítání v paměti přístroje nebo na připojeném počítači.

Tvar diferenčního spektra při posunu o  $\Delta\lambda$  zhruba sleduje průběh první derivace (obr. 2):



Obr. 2: Schématické znázornění vzniku diferenčního spektra při posunu absorpčního pásu o  $\Delta\lambda$  (převzato cit.<sup>[4]</sup>)

Při vzniku diferenčního spektra nedochází pouze k posunu absorpčních pásů. V reálných spektrech se maxima mohou posouvat, měnit svoji intenzitu a nebo dokonce navzájem překrývat, výsledná diferenční spektra mají poté složitější tvar<sup>[4, 5]</sup>.

#### 1.1.3.1. Perturbace spektra vlivem teploty

Perturbace spektra vlivem teploty (TPDS „*Thermal perturbation difference spectroscopy*“) je technika, při které se sledují změny absorpčního spektra při změnách teploty. Změny ve spektrech bílkovin můžeme pozorovat již v závislosti na malé změně teploty. Takové změny jsou především charakteristické pro perturbaci tyrosinových a tryptofanových zbytků ve vodných roztocích bílkovin. Metoda je založena na předpokladu, že nepřístupné „pohřbené“ chromofory (bez kontaktu s rozpouštědlem) nepřispívají ke vzniku diferenčního spektra. Spektrum je pak pouze tvořeno příspěvky chromoforních skupin, které jsou částečně nebo zcela přístupné molekulám rozpouštědla. Srovnáním amplitudy diferenčního spektra a modelové látky lze získat přehled o přístupnosti chromoforů na povrchu proteinu<sup>[4, 9]</sup>. Metoda TPDS byla využita ke studiu stability mnoha proteinů například pepsinu, aldolasy, imunoglobulinů nebo ribonukleasy atd.<sup>[10-15]</sup>.

#### 1.1.3.2. Perturbace spektra vlivem přidavku další látky do roztoku

Perturbace spektra vlivem přidavku další látky do roztoku (SPDS „*Solvent perturbation difference spectroscopy*“) je metoda, při které se sledují změny spektra v závislosti na přidavku další látky (perturbantu) k roztoku bílkoviny. K nejpoužívanějším perturbantům patří organická rozpouštědla, která ovlivňují hydratační obal bílkoviny a zpřičiňují tak změnu její konformace<sup>[16]</sup>.

Užití techniky SPDS je podobné jako TPDS. V diferenčním spektru bílkoviny se projeví jen příspěvky chromoforních skupin na povrchu bílkoviny. „Pohřbené“ aminokyselinové zbytky uvnitř bílkoviny nejsou změnou složení rozpouštědla nijak dotčeny. Interpretace SPDS spekter je analogická TPDS, kdy se kvantitativně srovnává spektrum modelové látky se spektrem látky perturbované. Technika SPDS je hojně využívanou metodou pro studium proteinů a jejich perturbací<sup>[17-21]</sup>.

Porovnáním TPDS a SPDS zjistíme, že výsledky technik nejsou stejné. Změna složení rozpouštědla často vede ke značným konformačním změnám struktury bílkovin. TPDS používá jen malých teplotních rozdílů, které většinou závažně konformaci nenaruší<sup>[4]</sup>.

### *1.1.3.3. Další způsoby perturbace spektra*

Diferenční spektrofotometrie může být například déle využita ke sledování změn provázející interakci iontů a malých molekul s molekulou proteinu. Interakce nejsou příčinou vzniku diferenčních spekter přímou perturbací, ale vedou ke specifickým změnám konformace celé molekuly nebo okolí chromoforu. Tyto interakce substrátů a ligandů s bílkovinou mají velký význam při řadě biologických dějů. Sledováním vazby vápníku na fosfolipas A se například ve své práci zabýval Slotboom a spol.<sup>[22]</sup>.

Spektrum může být ovlivněno i změnou koncentrace bílkoviny jako perturbujícího činitele. Metoda je založena na měření odchylek od Lambertova-Beerova zákona, které jsou způsobené asociací makromolekul v roztoku.

Perturbace vlivem změny pH (spektrofotometrická titrace) především mění spektrofotometrické vlastnosti tyrosinových zbytků. Využívá se zde skutečnosti, že disociovaná hydroxylová skupina tyrosinu má jiné absorpční vlastnosti než nedisociovaný tyrosin. Zvyšujícím se pH roztoku se nejdříve disociují zbytky zcela na povrchu bílkoviny, poté ty částečně exponované a nakonec zcela pohřbené zbytky, které se do kontaktu s rozpouštědlem dostávají až po úplné denaturaci proteinu<sup>[2, 4]</sup>.



### 1.1.4. Derivační spektrofotometrie

Technika derivační spektrofotometrie podobně jako diferenční spektrofotometrie umožňuje zvýraznění malých změn v absorpčním spektru bílkovin a to především změn ve tvaru absorpčních pásů. Základem techniky je schopnost odlišit od sebe překrývající se absorpční pásy. Této skutečnosti využili ve své práci například Jones a spol.<sup>[23]</sup> při stanovení porfyrinů v moči. Derivační spektrofotometrie pomáhá k lepšímu kvantitativnímu i kvalitativnímu vyhodnocení absorpčního spektra proteinu.

Metoda derivační spektrofotometrie se začala rozvíjet především díky pokroku v přístrojovém vybavení koncem šedesátých let. Dnešní moderní spektrofotometry často umožňují pozorovat derivaci spektra přímo<sup>[2, 4]</sup>.

Derivace Lambertova-Berrova zákona (4) ( $c$  koncentrace absorbující látky,  $l$  optická délka,  $\varepsilon$  absorpční koeficient) podle  $\lambda$ :

$$A = cl\varepsilon \quad (4)$$

$$\frac{dA}{d\lambda} = c \cdot l \cdot \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad \text{první derivace} \quad (5)$$

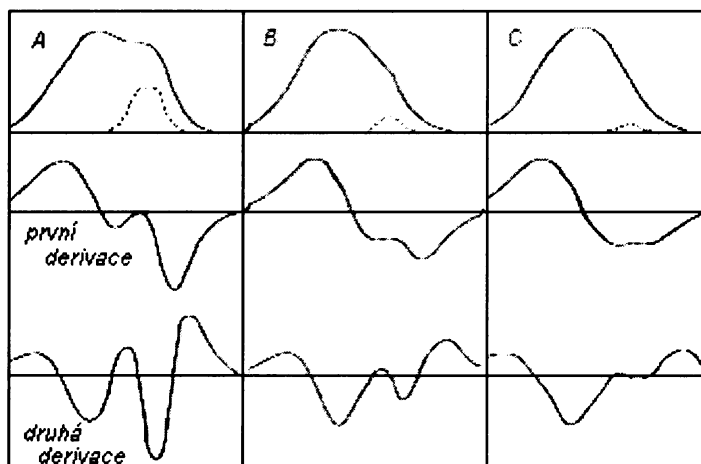
$$\frac{d^2 A}{d\lambda^2} = c \cdot l \cdot \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \quad \text{druhá derivace} \quad (6)$$

...

$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = c \cdot l \cdot \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n} \quad n\text{-tá derivace} \quad (7)$$

Pokud se absorbance při každé vlnové délce chová dle Lambertova-Beerova zákona (4), je amplituda derivačního spektra přímo úměrná koncentraci dané složky v roztoku<sup>[4]</sup>.

Derivační zpracování spekter je ilustrováno na obrázku 3. V každém sloupci je znázorněna nultá, první a druhá derivace součtu dvou překrývajících se absorpčních pásů. Nižší pás (znázorněný čárkovaně) je překryt intenzivnějším a širším pásem. Pomocí první a druhé derivace lze tento pás snadno odkrýt, zvyšováním řádu derivace se pásy „zužují“ a zvyšuje i rozlišení mezi nimi<sup>[5]</sup>.



Obr. 3: Schématické znázornění první a druhé derivace dvou překrývajících se absorpčních pásů (- - - překrytý pás) (převzato cit.<sup>[5]</sup>)

Křivka první derivace nabývá nulových hodnot v místech, kde mělo původní absorpční spektrum maximum. Minimum druhé derivace odpovídá poloze maxima původního absorpčního spektra. Vyšší liché stupně derivace se chovají obdobně jako první, stejně tak jako vyšší stupně sudé derivace mají podobný průběh jako druhá derivace<sup>[2, 4, 5]</sup>.

Derivační spektrum je dobrým nástrojem k zvýraznění přítomných bočních pásů (ramének), které se v původním absorpčním spektru mohou snadno zaměnit za šum přístroje.

Metody získání derivačního spektra můžeme rozdělit do dvou skupin. První skupinu tvoří metody založené na modifikaci optické části spektrofotometru. Metody druhé skupiny využívají dodatečné zpracování záznamu připojením přídatného systému k běžným přístrojům nebo matematickým zpracováním pomocí počítačového programu.

Přínosem derivační spektrofotometrie je malá citlivost této metody k interferujícímu pozadí (pozadí víceméně monotónní nebo jsou jeho změny jen velmi pomalé). Toho lze využít například k eliminaci rozptylu světla u zakalených vzorků,

například z důvodů agregace proteinů<sup>[24]</sup>. Nevýhodou derivační spektrofotometrie je snižování odstupu signálu od šumu přístroje při zvyšování řádu derivace,<sup>[4, 25]</sup> to fakticky omezuje použitelnost vyšších řádů derivací.

Derivační spektrofotometrie se uplatňuje při vícesložkové analýze, která spočívá v určení jednoho či více analytů ve složité matrici. Tato technika slouží ke kvantifikaci jednoho nebo několika analytů bez nutné počáteční separace nebo purifikace. Technika derivační spektrofotometrie mnoho uplatnění ve farmaceutickém průmyslu ke stanovení složek léčiva. V klinické a biochemické analýze lze díky této metodě stanovit určité látky v lidském séru, moči nebo plazmě již ve velmi nízkých koncentracích<sup>[26]</sup>. Obecně lze říct, že derivační technika je dobrým nástrojem ke studiu bílkovin, zvláště je to pak využití druhé a čtvrté derivace<sup>[27-30]</sup>.

## 1.2. Prostorová struktura, stabilita a denaturace proteinů

Proteiny v buňce zastávají mnoho různých funkcí (regulační, zásobní, signální, katalytické, strukturní, transportní, pohybové atd.). Každá bílkovina zaujímá svoji specifickou prostorovou strukturu, která určuje její biologickou funkci<sup>[31, 32]</sup>.

Podle doporučení mezinárodní komise pro názvosloví IUPAC-IUB se člení struktura proteinů následovně<sup>[33, 34]</sup>:

1. *Primární struktura* proteinu je dána pořadím (sekvencí) aminokyselinových zbytků v polypeptidovém řetězci, bez ohledu na jejich prostorové uspořádání.
2. *Sekundární struktura* molekuly (segmentu) je prostorové uspořádání hlavního řetězce bez ohledu na uspořádání postranních řetězců a na vztah k ostatním molekulám (segmentům).
3. *Terciární struktura* bílkoviny (podjednotky) je prostorové uspořádání všech jejích atomů v prostoru bez ohledu na vztah k ostatním molekulám (podjednotkám).
4. *Kvartérní struktura* proteinu je prostorové uspořádání podjednotek bez ohledu na jejich vnitřní strukturu.

Energetickou bilanci tvorby nativní konformace bílkoviny je možné vyjádřit následujícím výrazem (8):

$$\Delta G_{celk} = \Delta H_{mol} + \Delta H_{rozp} - T \Delta S_{mol} - T \Delta S_{rozp} \quad (8)$$

Změna celkové Gibbsovy energie ( $\Delta G_{celk}$ ) rozhoduje o stabilitě nativní struktury proteinu. Pravá strana výrazu reprezentuje příspěvek vazebné energie intramolekulárních interakcí ( $\Delta H_{mol}$ ), enthalpický zisk interakce s rozpouštědlem ( $\Delta H_{rozp}$ ), entropickou ztrátu, která je dána vrůstem uspořádanosti v nativní struktuře bílkoviny ( $\Delta S_{mol}$ ) a entropickou bilanci interakce molekuly proteinu s rozpouštědlem ( $\Delta S_{rozp}$ )<sup>[33]</sup>.

Nativní struktura bílkoviny je stabilizována velkým množstvím intramolekulárních interakcí různého typu: disperzní síly, van der Waalsovy interakce, elektrostatické interakce (iontový pár, vodíková vazba). Strukturu dále mohou stabilizovat kovalentní vazby (disulfidické můstky) a koordinačně-kovalentní vazby (vazby ligandů v metaloproteinech). Významné jsou také interakce proteinu s molekulami rozpouštědla (hydrofóbní efekt). Obecně intramolekulární interakce spolu s kontakty s okolním prostředím udržují složitou strukturu bílkoviny<sup>[33, 35]</sup>.

Vlivem vnějších faktorů, například zvýšením teploty, změnou iontové síly, změnou pH roztoku nebo vlivem denaturačních činidel může bílkovina ztratit svoji nativní konformaci a dochází k denaturaci. Možná definice zní<sup>[31]</sup>: „*Denaturací nazýváme každou podstatnou změnu prostorového uspořádání biopolymeru, která vede ke ztrátě jeho biologické aktivity.*“

Faktorů, které způsobují denaturaci, je mnoho<sup>[31, 35]</sup>.

- Změna teploty způsobuje změnu vlastností závislých na konformaci bílkoviny (optická rotace, viskozita, absorpce UV záření). Stoupá-li teplota pomalu a postupně, struktura proteinu zůstává dlouho stálá a uvedené vlastnosti se mění jen málo. Při dosažení určitého tepelného rozmezí však dochází k náhlé, skokové změně vlastností proteinu a tedy také jeho struktury. Teplota, kdy protein ztrácí svou nativní konformaci, se nazývá teplota tání  $T_m$  („*temperature of melting*“). Náhlost přechodu naznačuje, že struktura je rozvíňována kooperativně, tento děj je často popisován pomocí dvoustavového modelu.
- Změny pH roztoku mění ionizaci postranních řetězců aminokyselin. V důsledku těchto přechodů dochází ke změně celkového náboje proteinu a jeho rozložení, a k odpuzování souhlasně nabitých skupin a „roztrhání“ nativní struktury.
- Také detergenty významně narušují strukturu bílkovin. Interagují s nepolárními postranními řetězci proteinu i s hlavním řetězcem. Narušují tak působení hydrofóbního efektu, které se významně podílí na udržení nativní konformace proteinu.
- Organické látky rozpustné ve vodě (např. alifatické alkoholy) a jejich vysoké koncentrace také ovlivňují hydrofóbní jev, který stabilizuje strukturu bílkoviny. Některé mohou strukturu proteinů stabilizovat (glycerol), jiné jsou silnými denaturačními činidly (aceton).

- Mechanická denaturace proteinu je nejčastěji spojena se vznikem mezifázového rozhraní (roztok proteinu-nepolární povrch, roztok proteinu-plyn, atd.). Na tomto rozhraní se nemůže plně uplatnit hydrofobní efekt. Při intenzivním míchání, pění atd. se podíl molekul bílkoviny, denaturovaných na rozhraní, výrazně zvyšuje. Méně často je mechanická denaturace přímo spojena s působením mechanické síly (stříh), nebo se zvýšením hydrostatického tlaku.
- Vliv solí na strukturu bílkoviny je různý. Některé soli jako například  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  nebo  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  strukturu nativního proteinu stabilizují. Naproti tomu jiné soli (např.  $\text{KSCN}$ ) strukturu proteinu destabilizují. Stupeň účinnosti iontů na stabilitu proteinu se shoduje s jeho schopností vysolit protein z roztoku, jak ji udává tzv. Hoffmeisterova řada:

Anionty:  $\text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^{2-} > \text{CH}_3\text{COO}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$

Kationty:  $\text{NH}_4^+, \text{Cs}^+, \text{K}^+, \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{Mg}^+ > \text{Ca}^+ > \text{Ba}^+$

Ionty ke konci této řady, které mají sklon k destabilizování proteinu, se nazývají chaotropní ( $\text{I}^-$ ,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SCN}^-$ ,  $\text{Ca}^+$ ,  $\text{Ba}^+$ ). K chaotropním činidlům řadíme také guanidiový ion a neiontovou močovinu. Chaotropní činidla zvyšují rozpustnost nepolárních látek ve vodě. Jejich účinnost, jako denaturačních činidel, je důsledek schopnosti narušit strukturu vody a tak oslabit hydrofobní efekt. Látky, které stabilizují strukturu vody, naopak tento efekt zvyšují, a tím protein stabilizují (tzv. kosmotropní činidla). Příkladem kosmotropních iontů jsou  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{K}^+$  nebo  $\text{Li}^+$ , jako kosmotropy působí také některé alkoholy nebo sacharosa. Vliv iontů na stabilitu proteinu je kumulativní<sup>[31, 32]</sup>.

### 1.3. Sbalování proteinů

Proces, kdy protein získává svou trojrozměrnou strukturu se nazývá sbalování („*fold*ing“). Opačným dějem je rozbalození proteinu („*un*fold*ing*“), tento pojem se překrývá s pojmem denaturace. Prostorové uspořádání molekuly bílkoviny je zakódováno v jejím aminokyselinovém složení<sup>[36,37]</sup>.

Struktura proteinu je určena snahou dosáhnout konformace s co nejmenším obsahem volné energie<sup>[38]</sup>. Rozpor v rychlosti sbalování a množství konformací s nízkou hodnotou volné energie se nazývá Levinthálov paradox<sup>[39]</sup>. Dosažení nativní konformace předchází tvorba meziproductů, která je řízena kineticky. Proces sbalování proteinů je tedy řízen termodynamicky i kineticky.

Samotný děj probíhá přes tvorbu několika nukleačních center (segmentů s uspořádanou strukturou) v různých částech bílkoviny. Vznik těchto center v počátečním procesu omezuje množství možných konformací s nízkou hodnotou volné energie<sup>[40]</sup>. V této fázi se především ve formování struktury uplatňují vodíkové vazby. V další fázi se vytvořené segmenty pod vlivem hydrofóbního efektu formují do nativní konformace. Celý proces sbalování proteinu je vysoce kooperativní děj<sup>[33]</sup>.

Pro „*fold*ing“ nativní konformace proteinu bylo navrženo několik modelů popisujících tento proces. Jedním z příkladů je tzv. model „sbalovací nálevky“ („*free-energy funnel*“), kdy je průběh sbalování určen specifickým energetickým profilem. Z modelu vyplývá, že sbalování proteinů je tím rychlejší, čím strmější jsou stěny nálevky. V této pomyslné energetické hyperploše však existují energetické „záhyby“ (energetické minima), která odpovídají stabilním meziproductům vytvořených při procesu sbalování proteinů<sup>[41]</sup>.

Meziproducty vzniklé během procesu sbalování mají obecně velmi krátkou dobu života. Ohgushi a Wada<sup>[42]</sup> pozorovali při sbalování proteinů vznik meziproductu, které nazvali „*molten globule*“ (MG).

„*Molten globule*“ je poměrně kompaktní útvar s vysokým podílem nativní sekundární struktury (zachování pravidelných struktur), s fluktuující terciární strukturou a velkým počtem obnažených hydrofóbních úseků. Meziproducty typu MG byly pozorovány při sbalování celé řady proteinů<sup>[43-46]</sup>.

U některých proteinů byla jako intermediát sbalování, předcházející vytvoření MG, navržena ještě struktura tzv. „*pre-molten globule*“, v níž dochází k narušení části segmentů s pravidelnou sekundární strukturou. Stejně jako MG vykazuje přítomnost hydrofóbních oblastí<sup>[47, 48]</sup>.

Studium stabilních nebo částečně stabilních meziproductů vznikajících při denaturaci a následné renaturaci je dobrým modelem k přiblížení vzniku a stability přechodných konformačních stavů. Jedním ze zkoumaných intermediátů je i MG. Některé globulární proteiny (cytochrom *c*,  $\alpha$ -laktalbumin atd.) přecházejí do struktury MG pod vlivem mírných denaturačních podmínek (zvýšení teploty, změnou pH, přidávkem močoviny nebo alkoholů atd.)<sup>[49]</sup>.

Metody sledování vzniku a vlastností konformačního stavu MG jsou různé. K nejvíce používaným patří zejména spektroskopické metody. Absorpční spektrofotometrií v UV/VIS oblasti použili ve své práci pro sledování stability MG například Pineda a spol.<sup>[50]</sup>. Diferenční a derivační techniku spektrofotometrie využili ve svých pokusech Pauer a spol.<sup>[45]</sup>. Metodu cirkulárního dichroismu ve svých experimentech aplikovali například autoři práce<sup>[46]</sup> ke zkoumání vzniku stavu MG  $\beta$ -laktamasy nebo Kamiyama<sup>[51]</sup> ve své práci, zabývající se stabilitou konformace MG cytochromu *c*. Fluorescenční resp. Ramanova spektroskopie se stala nástrojem pro experimenty na molekule cytochromu *c* v pracích<sup>[52]</sup> resp.<sup>[53]</sup>.

Při vytváření nativní struktury proteinů *in vivo* je v některých případech podmínkou přítomnost dalších struktur bílkovinné povahy, chaperonů. Chaperony chrání nově syntetizované proteinové řetězce před asociací s nesprávnými partnery. Chaperony nezvyšují rychlost reakce, a proto je neoznačujeme jako enzymy. Protein určený ke sbalení se neváže na chaperon ve své zcela rozbalené podobě, ale až ve formě částečně sbaleného meziproductu, blížíci se stavu MG<sup>[32, 35, 36]</sup>.



## 1.4. Cytochrom *c*

### 1.4.1. Základní vlastnosti, funkce a výskyt cytochromu *c*

Cytochrom *c* (cyt *c*) (obr. 4) je redoxně aktivní protein, které ve své molekule obsahuje hemovou skupinu. Jde o periferní membránový protein, který se volně váže k vnějšímu povrchu vnitřní mitochondriální membrány. Zprostředkovává transport elektronů mezi integrálními membránovými komplexy v dýchacím řetězci buňky. Přenáší elektrony z proteinového komplexu ubichinol-cytochrom *c* oxidoreduktasy (komplex III) na cytochrom *c* oxidasu (komplex IV).

Cytochrom *c* je všudypřítomný protein vyskytující se ve všech organismech kromě několika málo obligatorních anareobů. Jedná se o malý (přibližně 12,5 kDa), relativně stabilní, dobře rozpustný protein s izoelektrickým bodem v zásadité oblasti ( $pI=10,6$ )<sup>[31, 54]</sup>.



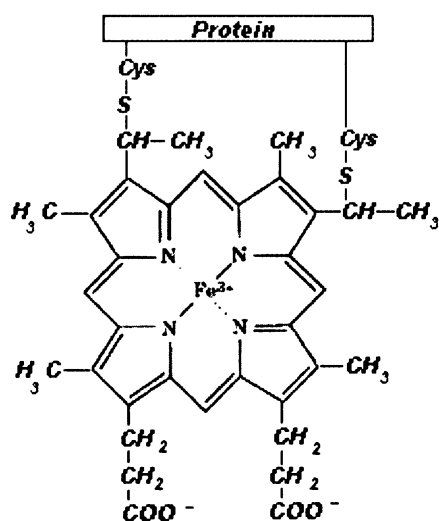
Obr. 4: Cytochrom *c* (převzato cit.<sup>[54]</sup>)

### 1.4.2. Struktura a evoluce cytochromu *c*

Cytochrom *c* je jednodoménová globulární bílkovina. Molekula je tvořena prosthetickou hemovou skupinou a polypeptidickým řetězcem, obsahujícím 100-120 aminokyselinových zbytků. Přesný počet aminokyselinových zbytků se liší podle příslušného druhu organismu<sup>[54]</sup>.

Pro hem typu *c* je charakteristické, že je kromě koordinačních vazeb atomu železa k apoproteinu vázán pomocí dvou kovalentních thioetherových vazeb. V případě cytochromu *c* je porfyrinový skelet spojen s aminokyselinovými zbytky Cys-14 a Cys-17 (obr. 5). Atom železa hemové skupiny je oktaedrálně koordinován s atomy dusíku v porfyrinovém skeletu, atomem dusíku His-18 a atomem síry Met-80. Hemová skupina je k apoproteinu připojena po biosyntéze v endoplazmatickém retikulu. V syntetizovaném proteinu je pro hem již vytvořena hydrofóbní kapsa<sup>[55]</sup>.

Hem obsahuje ion železa vyskytujícího se ve dvou možných oxidačních stavech Fe (II) a Fe (III)<sup>[31, 54]</sup>.



Obr. 5: Vazba hemové skupiny k proteinu, thioetherové vazby (převzato cit.<sup>[31]</sup>)

Cytochrom *c* je téměř univerzální eukaryotní protein, který je evolučně velmi dobře konzervován. Nachází se ve všech organismech obsahující elektronový transportní řetězec. Předpokládá se, že elektronový transportní řetězec vznikl asi před 1,5-2 miliardami let a od té doby změnil se jen nepatrně. Jeho funkce a struktura byla vysoce konzervována během celého vývoje. Důkazem je, že cyt *c* jakéhokoliv eukaryotického organismu reaguje *in vitro* s cytochrom *c* oxidasou jiného druhu<sup>[56]</sup>.

V molekule cytochromu *c* nalezneme takové aminokyselinové sekvence, které jsou naprosto konzervovány, ale i úseky více či méně variabilní. Srovnání Margoliashe<sup>[57]</sup> ukazuje, že primární struktury šesti cytochromů *c* různých druhů jsou z 53% totožná. Pokud je srovnání provedeno pouze u obratlovců, je totožnost až 73%. Velikost rozdílů mezi cytochromy různých druhů odpovídá očekávání podle údajů klasické taxonomie. Fylogeneticky vzdálené druhy mají více odlišností v primární struktuře cytochromu *c* než druhy si navzájem příbuzné<sup>[31]</sup>.

Struktura cytochromu *c* je vysoce konzervována. Aminokyseliny, které zastávají významné funkční nebo strukturní role, jsou zcela invariabilní nebo podléhají substituci jen málokdy. Naproti tomu aminokyseliny povrchové vykazují vyšší variabilitu. Substitute invariabilního aminokyselinového zbytku, který zastává v molekule významnou biochemickou úlohu, inaktivuje celý protein<sup>[31, 35]</sup>.

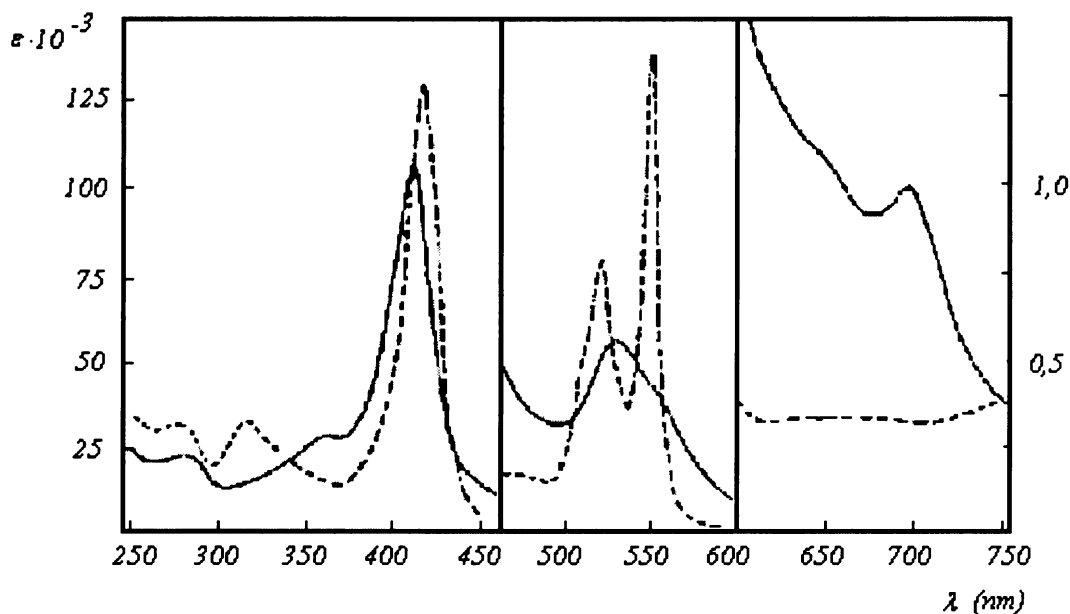
- Cys-14, Cys-17, His-18, Met-80 jsou aminokyseliny tvořící vazbu s hemovou skupinou.
- Devět invariabilních glycinových zbytků obsazuje v molekule cytochromu *c* taková místa, kde by větší aminokyseliny výrazně měnily trojrozměrnou strukturu proteinu.
- Lysinové zbytky v polohách 8, 13, 25, 27, 72, 73, 86 a 87 jsou umístěny v kruhu okolo exponovaného okraje jinak zanořené hemové skupiny. Kladně nabitě lysinové zbytky jsou komplementární k povrchovým oblastem fyziologických reakčních partnerů s převládajícím negativním nábojem.
- Tyr-48, Tyr-67, Tyr-74 a Tyr-97 jsou kritickými aminokyselinami pro udržení nativní konformace cytochromu v blízkosti hemu<sup>[58]</sup>.
- Dalším konzervovaným zbytkem molekuly cytochromu *c* je Phe-82. Aromatický kruh je téměř rovnoběžný s hemem a tvoří zřejmě základní složku proteinového vodiče elektronů v reakcích dýchacího řetězce.

Molekula proteinu zaujímá téměř sférický tvar. Cytochrom *c* obsahuje pět samostatných helixů. První helix od N-konce obsahuje přibližně aminokyselinové zbytky v polohách 1-15. V tomto úseku molekuly cytochromu *c* nalezneme His-18 koordinující ion železa. Dále pokračuje oblast zbytků 16-22 netvořící žádnou uspořádanou sekundární strukturu. Aminokyseliny 23-27 tvoří tzv.  $\beta$ -otáčku a za ní následuje znovu řada aminokyselin bez větší známky strukturního uspořádání. V oblasti aminokyselinových zbytků 50-56 nalezneme v molekule cytochromu *c* druhý helix, po kterém následuje krátká smyčka a v pořadí třetí helix zahrnující zbytky v polohách 61-69. Po čtvrtém helixu (71-74) následuje smyčka, obsahující další významnou aminokyselinu Met-80 koordinující ion železa v prosthetické skupině proteinu. Konečně pátý helix pokračuje od aminokyseliny s pořadovým číslem 90 až ke karboxylovému konci peptidového řetězce<sup>[54]</sup>.

### ***1.4.3. Absorpční spektrofotometrie cytochromu c v UV/VIS oblasti***

Cytochrom *c* je protein s charakteristickým absorpčním spektrem. Obrázek 6 (str. 29) představuje absorpční spektra cyt *c* v oxidovaném a redukovaném stavu. Ve spektrech dominuje silný absorpční pás v oblasti 380-420 nm tzv. Soretův pás ( $\gamma$ -pás). Menší intenzitu mají dva pásy mezi 500-600 nm ( $\alpha$ -pás a  $\beta$ -pás). V absorpčním spektru je samozřejmě přítomný pás v oblasti 200-220 nm (na obrázku není naznačen) charakteristický pro absorpci peptidové vazby a několik maxim v oblasti mezi 250-290 nm příslušející absorpci zbytků aromatických aminokyselin.

Redukovanou formu proteinu charakterizuje přítomnost  $\alpha$ -pásu při 550 nm a  $\beta$ -pásu při 521 nm. V oxidovaném stavu dochází v absorpčním spektru cytochromu *c* k několika změnám. Soretův pás se posouvá od 410 nm k 408 nm,  $\alpha$ -pás a  $\beta$ -pás kolabují a spojují se v jeden pás při 530 nm s raménkem u 565 nm. Tzv. „*charge transfer*“ pás při 695 nm je spojen s přechodem elektronu z orbitalu hemu do orbitalů ligandu (tedy formálně s přenosem náboje mezi Fe a ligandy<sup>[59, 60]</sup>). Je velmi citlivým indikátorem nativní konformace oxidovaného cytochromu *c*.



Obr.6: Absorpční spektrum cytochromu *c*,  
 — oxidovaný stav, - - - redukováný stav (převzato cit.<sup>[59]</sup>)

#### 1.4.4. Cytochrom *c* a konformační stav „molten globule“

Cytochrom *c* je velmi často studovaným proteinem. Slouží jako modelová bílkovina ke studiu konformačních stavů, změn a přechodů proteinů. Dostatek informací o struktuře částečně sbalených proteinů je základním předpokladem pro porozumění procesu sbalování.

*In vitro* může být cytochrom *c* transformován do struktury MG pomocí nízkého pH, mírné koncentrace denaturačních činidel, zvýšené koncentrace alkoholů vysoké teploty atd., obecně v podmínkách odlišných od normálního fyziologického prostředí<sup>[49]</sup>.

„*Molten globule*“ není nativní konformací cytochromu *c*, existuje však pravděpodobně i v živých buňkách a je patrně součástí fyziologických procesů. Bychkova a spol. vyslovili ve své práci<sup>[61]</sup> hypotézu, že by protein při své interakci s membránou mohl zaujímat konformační stav podobný „*molten globule*“.

Jako modelovou bílkovinu cytochrom *c* ve své práci použili i Goto a spol.<sup>[62]</sup> Přídavkem HCl k roztoku proteinu za nízké hodnoty iontové síly přijal cytochrom *c* v podstatě rozbalenou strukturu (pH vyšší než 2,5). Po přidavku dalšího objemu kyseliny do roztoku při pH 2,2 získal protein opět kompaktní strukturu s vlastnostmi konformačního stavu MG, kteří autoři nazvali A-stav.

Hlavními faktory zodpovědnými za částečné znovusbalení je navázání aniontů, které minimalizují intramolekulové nábojové odpuzování. Právě tyto odpudivé síly byly na počátku přidání kyseliny do roztoku zodpovědné za rozbalování nativní struktury.

Ve své práci autoři dále poukazují na kooperativnost vzniku A-stavu při lineárním snižování pH. Díky naměřeným CD spektrům odhadli, že kooperativnost děje je silnější v přítomnosti KCl (0,5M).

Goto a spol.<sup>[63]</sup> dále svou práci rozšířili o výsledky efektů různě silných kyselin na strukturu a stabilitu MG cytochromu *c*. Spektroskopií CD a měřením absorpčních spekter v oblasti Soretova pásu zjistili, že kyselina sírová, dusičná a trichloroctová mají na strukturu cytochromu *c* stejný vliv jako kyselina chlorovodíková. Konformační A-stav s vlastnostmi MG zaujímá cytochrom *c* v oblasti pH 2,2.

Struktura MG cytochromu *c* má podobné rysy jako u dalších proteinů, u kterých byl tento konformační stav pozorován. Vyznačuje se nativním obsahem uspořádaných sekundárních struktur ( $\alpha$ -helixy), avšak rozvolněnou terciární strukturou. Autoři Goto a Calciano<sup>[62]</sup> ve své práci uvádějí, že konformační stav MG zaujímá prostorovou strukturu o 10-20% méně kompaktní než nativní cytochrom *c*. K tomuto závěru dospěli na základě výsledků získaných z chromatografických měření konformačního stavu s vlastnostmi MG, tzv. A-stavu, který získali po přidavku HCl (pH 2,2) k roztoku cytochromu *c* s nízkou iontovou silou.

Shrneme-li výsledky prací různých autorů, je cytochrom *c* dobře charakterizován koordinačním stavem železa v hemové skupině. V nativním stavu se vyskytuje v nízkospinovém stavu s aminokyselinami His-18 a Met-80 koordinovanými na ion železa. Při snížení pH dochází k protonaci a odtržení histidinu. Stav „*molten globule*“ je charakterizován vysokospinovým stavem hemové skupiny a zrušenou koordinací His-18 i Met-80.<sup>[62, 64]</sup>

Studiem vlivu systému methanol-voda za mírně kyselého pH na molekulu cytochromu *c* se ve svém článku zabývá například Bychkova a spol.<sup>[65]</sup> Tento systém navozuje podmínky podobné podmínkám v blízkosti membrány, kde dochází k lokálnímu snížení pH vlivem záporně nabitého povrchu. CD a fluorescenční spektra odhalila, že nativní protein přejde účinkem alkoholu do konformace s nízkým obsahem terciárních struktury, naproti tomu nativní sekundární strukturou a relativně kompaktním uspořádáním s vlastnostmi MG. Po přidání dalšího methanolu je tato struktura MG převedena na strukturu se zvýšeným obsahem helikálních struktur typickou pro proteiny v roztoku s vysokou koncentrací alkoholu.

Sedlák a Antalík<sup>[66]</sup> se ve své práci zaměřili na studium vlivu polyaniontů na vznik konformace MG cytochromu *c*. Polyanionty (polyvinylsulfáty) v tomto případě zastupovaly v systému negativně nabitý povrch membrány. Především pozorováním absorpčních vlastností v oblasti Soretova pásu a oblastí Q-pásů bylo zjištěno, že konformační stav s vlastnostmi MG se ustanovuje v přítomnosti polyvinylsulfátů již při pH 5 a níže.

V práci Bongiovanniho a spol.<sup>[67]</sup> byla kysele denaturovaná molekula cytochromu *c* stabilizována vysokou koncentrací glycerolu (98%). Cytochrom *c* přijal konformaci s vlastnostmi MG, kdy byla zachována nativní sekundární struktura, ale terciární struktura byla méně kompaktní s porovnání s nativním stavem proteinu. Spektrofotometrické studie (absorpční spektra, CD) potvrdily podobné vlastnosti konformačního stavu s vlastnostmi MG indukovaného pomocí vysoké koncentrace glycerolu jako pro indukci jinými faktory.

Vlivem kyseliny a methanolu na strukturu cytochromu *c* se zabývali kromě jiných i Drew a spol.<sup>[64]</sup> Konformační stav MG zaujme molekula proteinu při nízké hodnotě iontové síly při pH 2 a nižším. Tento fakt se dobře shoduje s výsledky prací jiných autorů. Efekt kyseliny se projeví v absorpčním spektru molekuly posunem poloh a intenzit absorpčních pásů. Změny nastávají především ve viditelné oblasti spektra.

Pokud je cytochrom *c* přítomný ve své nativní podobě, Soretův pás nalezneme při 408 nm, Q-pás při 530 nm. Oxidovanou formu molekuly indukuje přítomnost CT pásu při 695 nm. Na hemovou skupinu jsou navázány obě koordinující aminokyseliny, His-18 a Met-80. Pokud je cytochrom *c* přítomen v roztoku s pH 2 a nízkou iontovou silou dochází k posunu Soretova pásu k nižším vlnovým délkám (396 nm) a zániku pásu při 530 nm a naopak vzniku dvou zcela nových pásů při 496 nm a 620 nm. Tento posun

pásu a vznik dvou nových je zapříčiněn přechodem nativního nízkospinového stavu proteinu do stavu vysokospinový stavu. Dochází dále k odpoutání Met-80 od železa v hemové skupině a zrušení oktaedrální koordinace. Změny v absorpčním spektru cytochromu *c* nastávají i v roztoku s pH 2 a za přítomnosti 1M NaCl. Dochází opět k posunu Soretova pásu, ovšem pouze k 401 nm. Q-pás při 530 nm se pouze posune k 527 nm a vzniká nový pás při 622 nm<sup>[64]</sup>.



## **2. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo pomocí absorpční, derivační a diferenční spektrofotometrie studovat vliv pH v kyselé oblasti na strukturu a stabilitu cytochromu *c* se zaměřením na vznik konformace „*molten globule*“.

Dalším cílem práce bylo studium vlivu iontové síly na stabilitu konformačního stavu „*molten globule*“ a nativní struktury cytochromu *c* s využitím absorpční a derivační spektrofotometrie.

Diplomová práce z části navazuje na mou bakalářskou práci, jejímž hlavním cílem bylo optimalizovat měření absorpčních spekter na spektrofotometru HP 8453. V bakalářské práci bylo dále zkoumáno chování cytochromu *c* v UV oblasti spektra při několika vybraných hodnotách pH. V diplomové práci byly experimenty rozšířeny i na viditelnou oblast spektra a detailní studium chování cytochromu *c* v kyselé oblasti.

## **3. MATERIÁL A METODY**

### **3.1. Použitý materiál a chemikálie**

**Loba Feinchemie** (Rakousko) cytochrom *c* (z mitochondrií srdečního svalu koně).  
Ostatní chemikálie ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , KCl, HCl,  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) byly čistoty p.a. a pocházely od firmy **Lachema** (Česká republika).

### **3.2. Použité laboratorní přístroje**

**Spektrofotometr** HP 8453, Agilent Technologies (USA)

**Automatické mikropipety:** BioHit (Finsko), Nichiryo (Japonsko)

**Váhy:**

analytické váhy PESA 40SM-200A (Švýcarsko)

předvážky KERN EW600-2M (Německo)

**pH metr** perpHecT logR 370 , ATI Orion (USA) s kombinovanou elektrodou,  
kalibrovanou standardními pufrů od výrobce.

**magnetická míchačka:** Variomag Monotherm, (Německo)

### 3.3. Metody

#### 3.3.1. Příprava pufrů a roztoků

Pro přípravu roztoků použitých k měření absorpčních spekter cytochromu *c* a jejich následnou derivaci byl použit 0,005 M fosfát (1,79 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  rozpuštěno v 1000 ml destilované  $\text{H}_2\text{O}$ ). V tomto roztoku byla rozpuštěna navážka cytochromu *c* o přibližné koncentraci ( $c \approx 0,5$  mg/ml,  $c \approx 0,05$  mg/ml) (obvykle pro celkový objem roztoku 10 ml).

Roztoky byly dotitrovány (1 M HCl) na požadovanou hodnotu pH 7,0; 3,0-1,0 (3,0, 2,7; 2,5; 2,3; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3 a 1,0).

Pro studium vlivu iontové síly bylo použito návrhu tlumivých roztoků podle McIlvaina (tabulka 2)<sup>[68]</sup>. Jinak bylo postupováno obdobně jako výše.

Tabulka 2: Tlumivý roztok kyselina citrónová- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (McIlvaine), upraveno na konstantní iontovou sílu<sup>[68]</sup>

pH	Množství látky na 1 dm <sup>3</sup> roztoku (g)		I (mol/ dm <sup>3</sup> )	Množství KCl na 1 dm <sup>3</sup> roztoku pro I=konst.	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$		I=1,0	I=0,5
2,2	1,43	20,6	0,0108	74,5	37,2
7,0	58,9	3,70	0,427	42,7	5,44

### 3.3.2. Měření absorpčních spekter cytochromu *c*

Absorpční spektra cytochromu *c* byla měřena na spektrofotometru HP 8453. Přístroj byl připojen na počítač a ovládán programem ChemStation (Agilent). Parametry měření spekter byly nastaveny jednotně:

- *Rozsah vlnových délek 190-1100 nm* představuje celý rozsah vlnových délek přístroje. Přístroj vzhledem ke své konstrukci prakticky neumožňuje použití jiného rozsahu. Omezení rozsahu vlnových délek, který nabízí ovládací program, se týká pouze výstupního formátu dat a nijak neurychluje ani neovlivňuje vlastní měření, proto nebylo použito.
- *Integrační čas 5 s*, byl zvolen na základě předchozí optimalizace v mé bakalářské práci<sup>[69]</sup>. Jedná se o kompromisní nastavení, které výrazně potlačuje vliv šumu přístroje a přitom nadměrně neprodlužuje čas měření.
- Byla použita *maskovaná křemenná semimikrokyveta* s optickou délkou 1 cm.
- Každý vzorek byl měřen třikrát, aby se vyloučil vliv náhodných chyb. Data uváděna ve výsledcích jsou aritmetickým průměrem těchto měření. Velikosti směrodatných odchylek průměru se pohybovala mezi  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $5 \cdot 10^{-6}$ , což odpovídá relativní chybě menší než 1%.

### 3.3.3. Zpracování experimentálních dat

Experimentální data byla pomocí programu Chemstation ukládána ve formě textových souborů „csv“. Výsledky byly dále zpracovány a graficky vyhodnoceny v programu Origin (ver. 7.5)

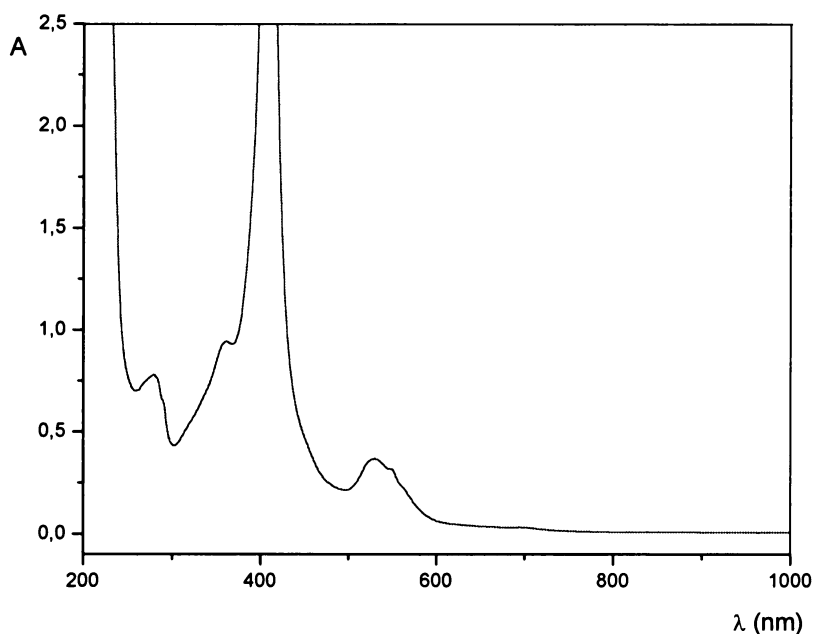
V programu Origin (ver. 7.5) byla pomocí funkce Add Plot to Layer vynesena absorpční spektra cytochromu *c* a upraven rozsah vlnových délek. Pro výpočet derivačního spektra byl vybrán příslušný sloupec hodnot a vyneseno absorpční spektrum pomocí funkce Add Plot to Layer. V nabídce „Analysis“ byl zvolen příkaz „Calculus“ „Diff/Smoothing“ → „Smoothing: Polynomial Order Second, Points to the Left 2, Points to the Right 2“. Program používá k výpočtu derivací metodu

Savitzky-Golay<sup>[70]</sup>, zvolený postup vybírá proložení polynomem druhého stupně s minimálním vyhlazováním (pětice bodů). Dále byla zvolena první nebo druhá derivace příslušného spektra → „Order of Derivative: First/Second“. Pro diferenční spektra bylo provedeno: „Analysis“ → „Subtract“ → „Reference data“ → „Vybrání sloupců a jejich odečtení“.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Absorpční a derivační spektra nativního cytochromu *c*

Typický průběh absorpčního spektra nativního cytochromu *c* (oxidovaný stav; pH 7,0; nízká iontová síla) v oblasti vlnových délek 200-1000 nm je znázorněn na obrázku 7 (spektrum je uvedeno v podobě, kterou poskytuje přístroj; pouze byl upraven rozsah vlnových délek). Ve spektru je patrné několik charakteristických absorpčních pásů.



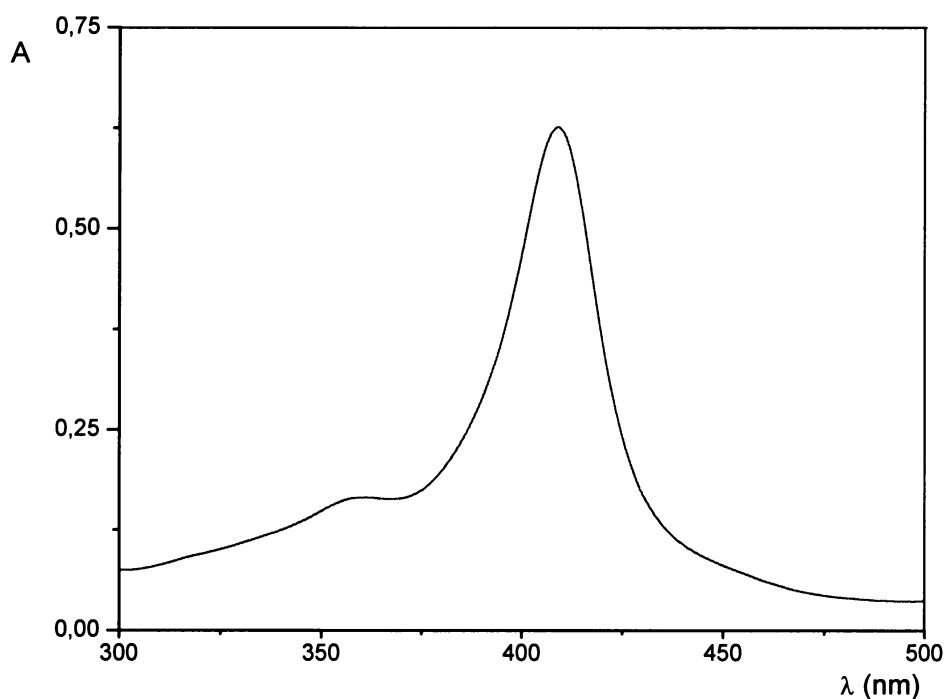
Obr. 7: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 200-1000 nm

( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 7,0)

V oblasti  $\lambda < 225 \text{ nm}$  se projevuje především absorpce chromoforu peptidové vazby, mohou zde však absorbovat i nízkomolekulární příměsi. V UV oblasti spektra je dále jasně patrný absorpční pás s vrcholem kolem 280 nm, který odpovídá absorpci chromoforních skupin aromatických aminokyselin a hemové skupiny. Nevýrazný pás při cca 360 nm („raménko“) je způsoben absorpcí hemové skupiny, stejně jako

dominantní pás při cca 400 nm a další pásy v dlouhovlnné části spektra. Podrobnější pohled na jednotlivé oblasti spektra poskytují obrázky 8-11 (str. 39-42).

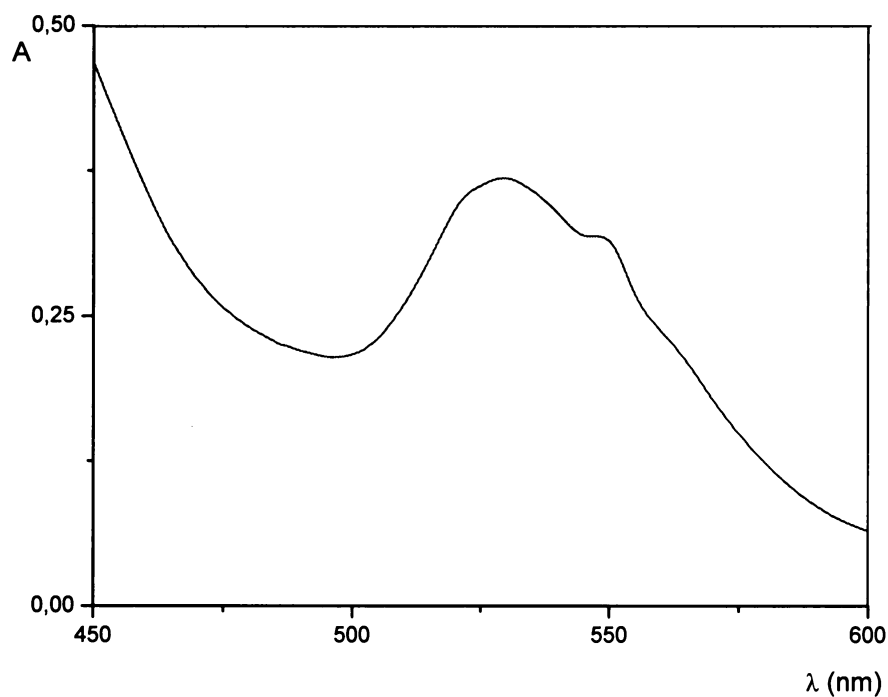
Na rozhraní UV/VIS oblasti dominuje absorpčnímu spektru cytochromu *c* velmi intenzivní tzv. Soretův pás ( $\gamma$ -pás) přibližně mezi vlnovými délkami 380-470 nm. Rozsah absorbance uvedený na obrázku 7 nedovoluje přesně odečíst polohu maxima Soretova pásu kvůli jeho vysoké intenzitě. Proto bylo použito desetkrát nižší koncentrace cytochromu *c*, příslušné spektrum v rozmezí vlnových délek 300-500 nm (viz obr. 8) umožňuje zjistit polohu maxima Soretova pásu (408 nm), intenzitu v maximu (0,624) a přibližnou pološířku pásu ( $\lambda_{1/2} = 26$  nm).



Obr.8: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm

( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,05$  mg/ml, 0,005 M fosfát, pH 7,0)

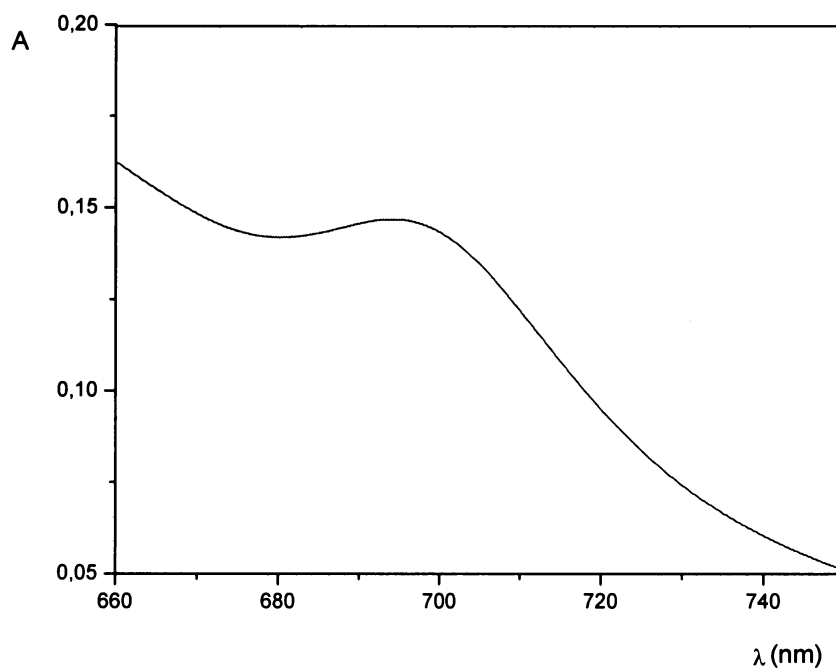
V intervalu vlnových délek 450-600 nm (obr. 9, str. 40) je patrný ve spektru další charakteristický pás, tzv. Q-pás. Jeho maximum leží při 530 nm a poloha pobočného maxima je přibližně při 550 nm, nevýrazné pobočné raménko můžeme najít při 565 nm. Přesnou polohu těchto maxim nelze dobře určit vzhledem ke klesajícímu nenulovému pozadí spektra v tomto intervalu vlnových délek.



Obr.9: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 450-600 nm  
( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ , 0,005 M fosfát, pH 7,0)

Interval vlnových délek 660-750 nm představuje obrázek 10 (str. 41). V této oblasti je možné pozorovat jedno nevýrazné absorpční maximum (695 nm) s velmi nízkou intenzitou. Pás je označován jako tzv. „charge transfer“ .

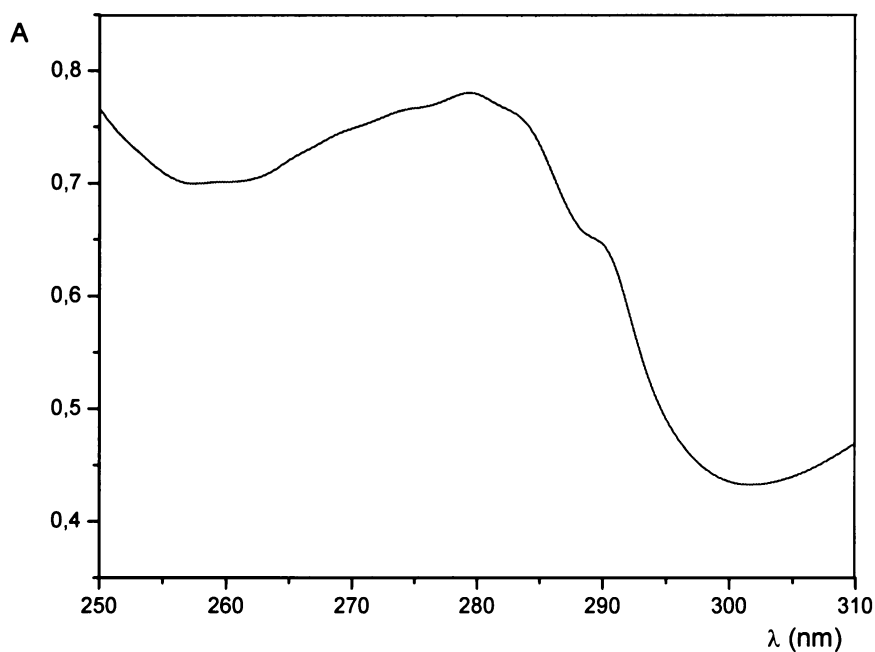




Obr.10: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 660-750 nm

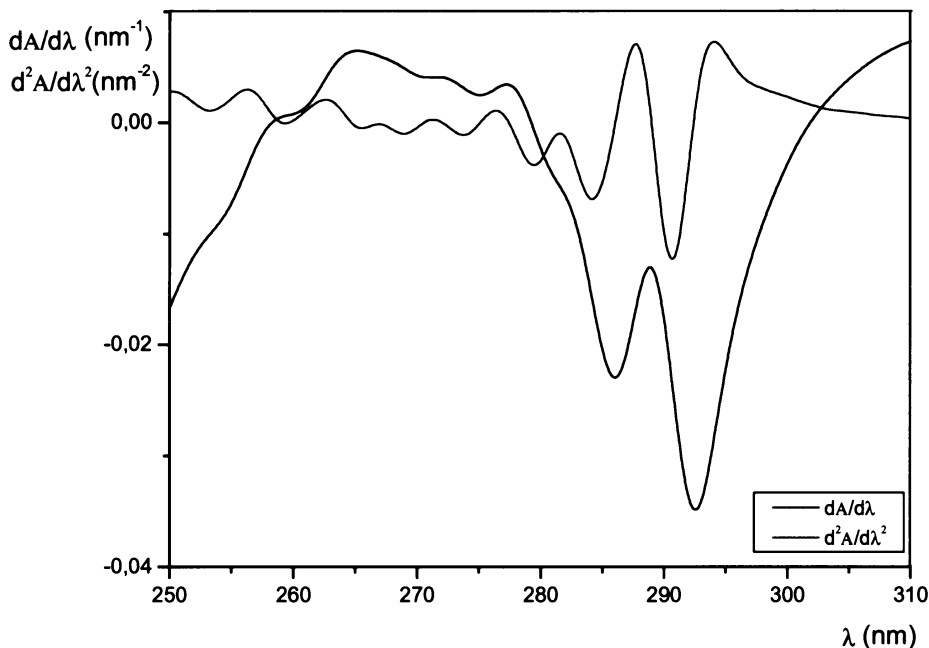
( $c_{\text{cyt c}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 7,0$ )

Tato práce je zaměřena zejména na studium strukturních změn peptidového řetězce, které se mohou projevit zejména v oblasti vlnových délek 250-310 nm, která je charakteristická pro absorpci aromatických aminokyselin. Tuto oblast detailněji znázorňuje spektrum na obrázku 11 (str. 42). Ve sledované oblasti spektra nelze od sebe přesně odlišit jednotlivé příspěvky chromoforních skupin aromatických aminokyselin a hemové skupiny. Proto byla spočtena a vynesena spektra první a druhé derivace absorpčního spektra v oblasti vlnových délek 250-310 nm (obr. 12, str. 43).



Obr.11: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 250-310 nm  
( $c_{\text{cyt c}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát,  $\text{pH } 7,0$ )

Spektra na obrázku 12 znázorňují první a druhou derivaci v rozsahu vlnových délek 250-310 nm. Maximům ve spektrální křivce odpovídají na křivce první derivace (černá křivka) průsečíky s nulovou hodnotou, druhá derivace (červená křivka) má na jejich místě mimima.



Obr.12: První a druhá derivace absorpčního spektra cyt *c*  
v oblasti vlnových délek 250-310 nm  
( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 7,0$ )

Křivka první derivace (na obrázku vyznačena černě) vykazuje výrazná minima při vlnových délkách 292 a 286 nm a maximum při vlnové délce 289 nm. Druhá derivace (červená křivka) absorpčního spektra cytochromu *c* obsahuje v oblasti 270-295 nm pásy náležící absorpci postranních řetězců aromatických aminokyselin tyrosinu a tryptofanu (čtyři resp. jeden zbytek)<sup>[71]</sup>. Dále jsou ve spektru druhé derivace cytochromu *c* patrné příspěvky absorpce fenylalaninu v oblasti 250-270 nm. Cytochrom *c* má ve své molekule tuto aminokyselinu obsaženou celkem v počtu čtyři zbytky<sup>[71]</sup>. V této oblasti může přispívat k tvorbě absorpčního spektra i hemové skupina. Přesné pozice pásů ve spektru druhé derivace jsou uvedeny v tabulce 3 (str. 44).

Z uvedeného obrázku vyplývá, že druhé derivace poskytuje lepší rozlišení mezi jednotlivými příspěvky chromoforních skupin v této oblasti a dále proto bylo používáno jenom této derivace.

Tabulka 3: Přehled nejvýraznějších maxim a minim

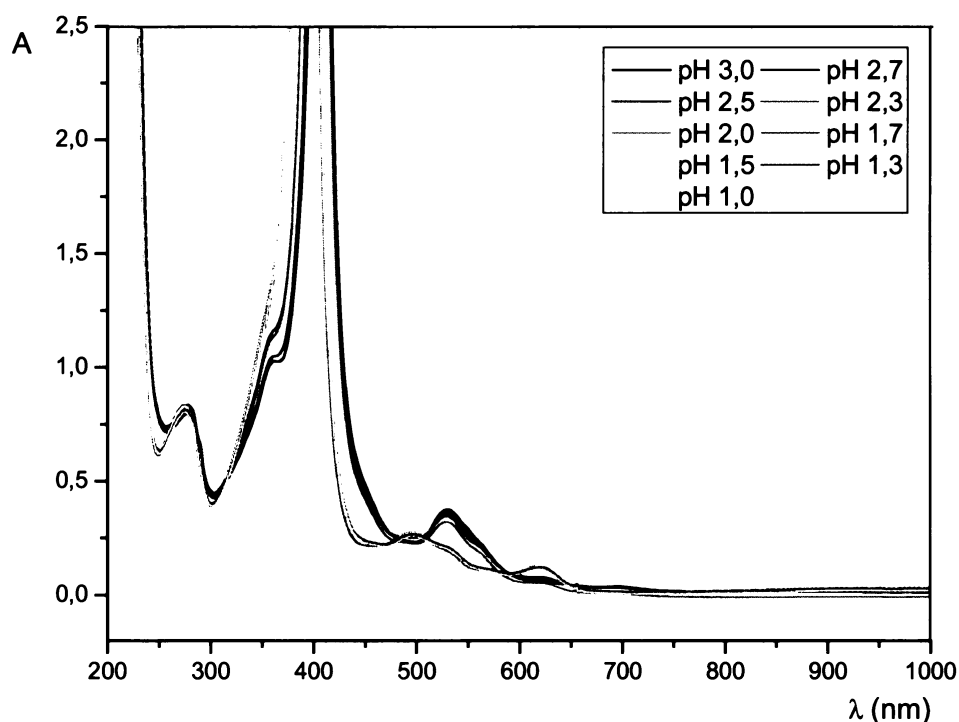
ve spektru druhé derivace cyt c v oblasti vlnových délek 250-310 nm

	Vlnová délka (nm)							
<b>max</b>	256,3	263,2	267,0	271,3	276,2	281,6	287,7	294,1
<b>min</b>	253,3	259,5	265,4	269,0	273,7	279,3	284,1	290,7

## 4.2. Studium vlivu pH a iontové síly na stabilitu a strukturu cytochromu *c*

### Vliv pH:

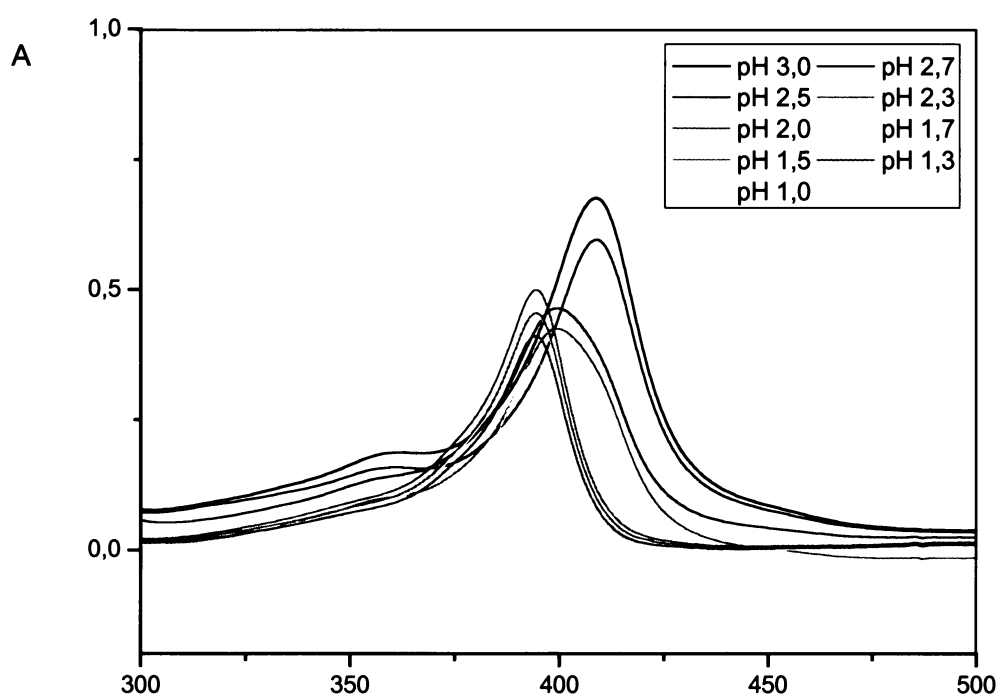
Vlivu pH na strukturu cytochromu *c* je možné posoudit na základě spekter pro pH z intervalu 3 až 1 (obrázek 13). Již z přímého srovnání absorpčních křivek vyplývá, že k výrazným změnám v průběhu absorpčního spektra dochází při pH 2,0-1,0. Podrobnější srovnání pro oblast jednotlivých absorpčních pásů je možné na základě detailů na obrázcích 14-16 (str. 46-48).



Obr.13: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 200-1000 nm

( $c_{\text{cyt } c} = 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

Rozmezí vlnových délek 300-500 nm (Soretův pás) představuje obr. 14. Je možné vysledovat, že poloha a intenzita Soretova pásu se s klesajícím pH mění.

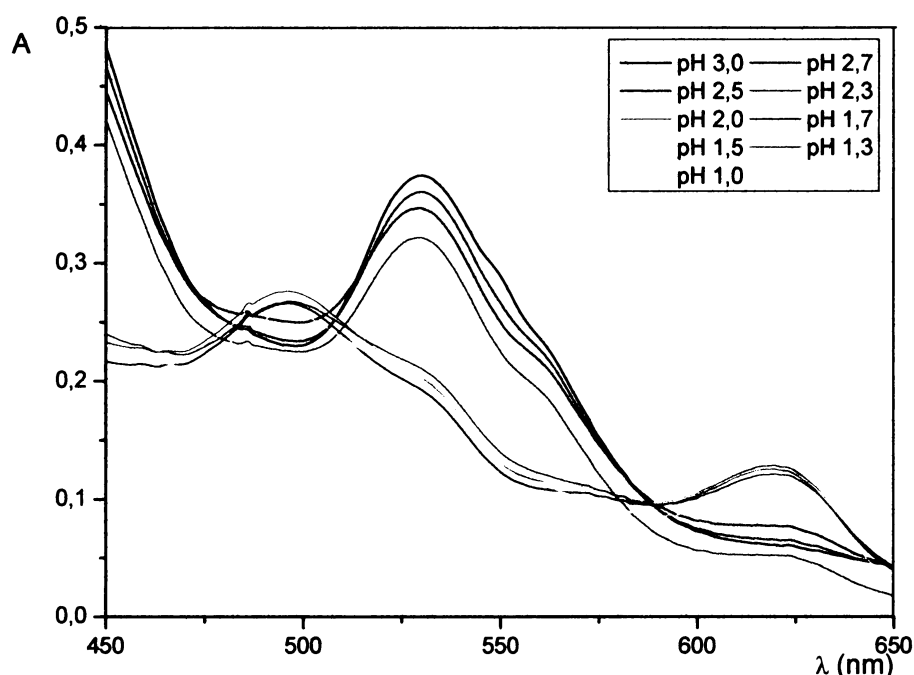


Obr.14: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm

( $c_{\text{cyt } c} = 0,05 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

Absorpční křivky pro hodnoty pH 3,0 a 2,7 mají maximum při 408 nm. S klesajícím pH se snižuje intenzita v tomto maximu. Při pH 2,5 a pH 2,3 dochází k posunu maxima Soretova pásu k nižší vlnové délce (400 nm) a dalšímu poklesu intenzity. S dalším poklesem pH (pod pH 2,0) se maximum Soretova pásu opět posouvá až k hodnotě 395 nm. V této poloze maximum již zůstává i pro další studovaná pH, ale intenzita se nadále s klesající hodnotou pH snižuje.

Ve viditelné oblasti spektra v rozmezí vlnových délek 450-650 nm dochází k výrazným změnám spektra mezi pH 2,3 a pH 2 (obr.15).

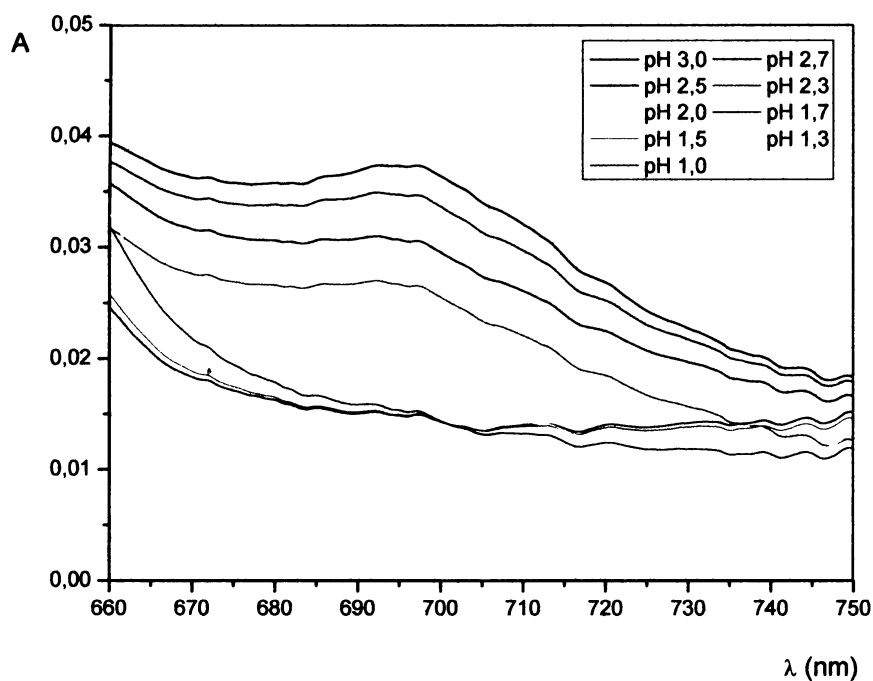


Obr.15: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 450-650 nm

( $c_{\text{cyt c}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

Průběh absorpčních křivek v oblasti Q-pásu při pH 3,0-2,5 je v podstatě shodný. Dochází pouze k mírnému postupnému snižování intenzity absorpčního pásu při 530 nm. K výrazným změnám však dochází při pH 2,3-1,0. Při pH 2,3 dochází k výraznému snížení pásu při 530 nm a postupnému vzniku nového pásu při 620 nm. Trend zániku pásu při 530 nm a vzniku pásů při 620 a 500 nm je patrný od pH 2,0. Ve spektrech roztoků s pH nižším než 2,0 je už zcela patrný dokončený vznik pásu při 500 a 620 nm, jejich intenzita se příliš nemění.

Obrázek 16 (str. 48) absorpčního spektra cytochromu c v oblasti vlnových délek 660-750 nm ukazuje zánik CT pásu (695 nm) pro pH nižší než 2,3. V oblasti pH 3,0 až 2,3 se intezita pásu snižuje, po dalším okyselení CT pás zcela mizí.

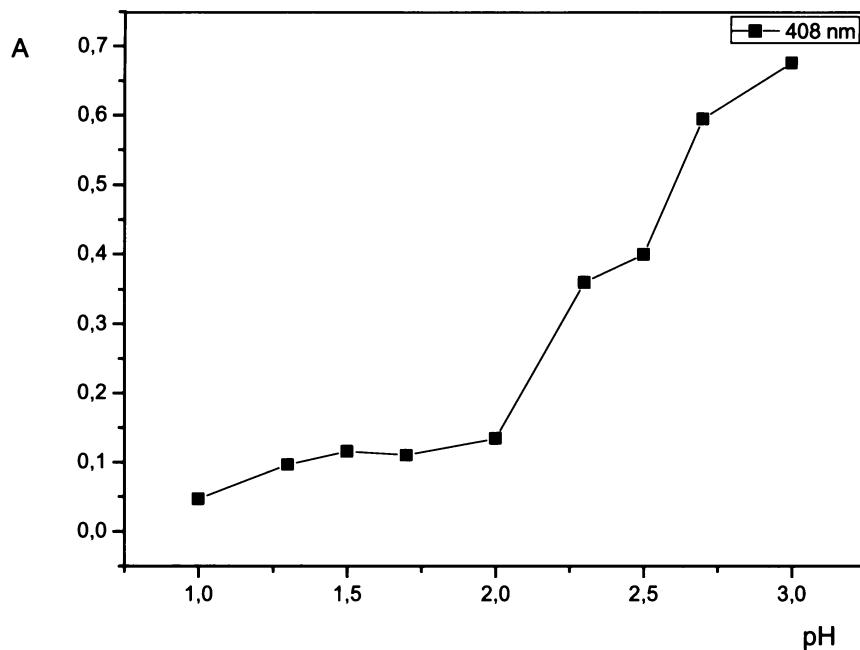


Obr. 16: Absorpční spektrum cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 6000-750 nm

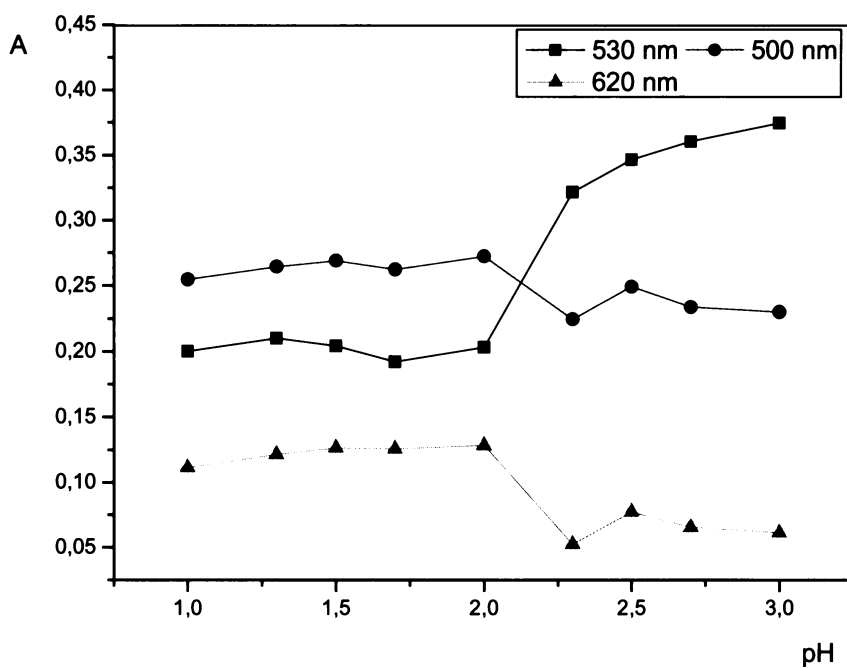
( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

Pro srovnání jsou na obrázcích 17-19 (str. 49, 50) vyznačeny změny intenzit významných absorpčních pásů ve spektru cytochromu *c* v závislosti na hodnotě pH (3,0-1,0).

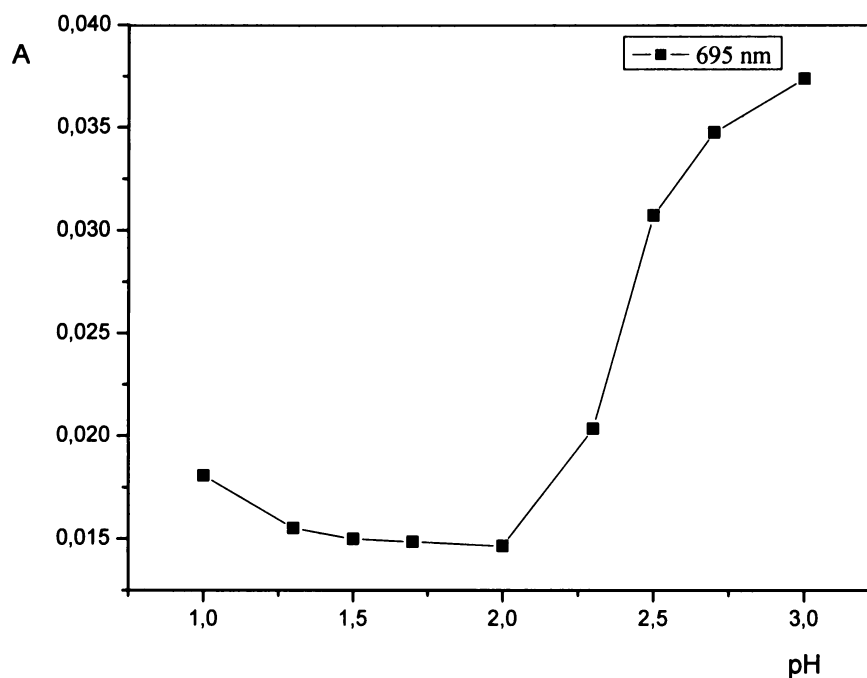




Obr. 17: Změna intenzity při 408 nm v závislosti na hodnotě pH



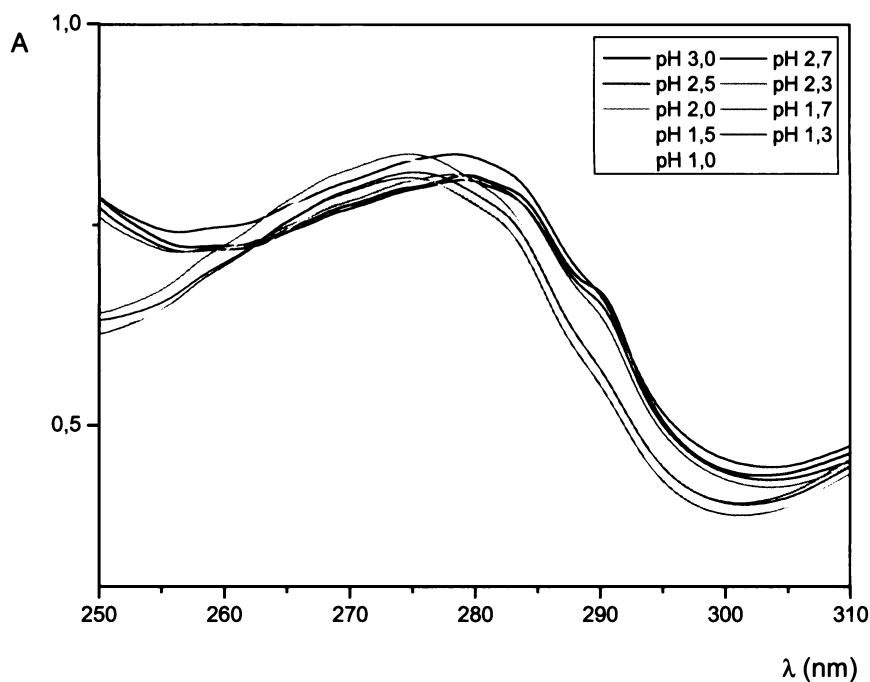
Obr. 18: Změny intenzit při 500, 530 a 620 nm v závislosti na hodnotě pH



Obr. 19: Změna intenzity při 695 nm v závislosti na hodnotě pH

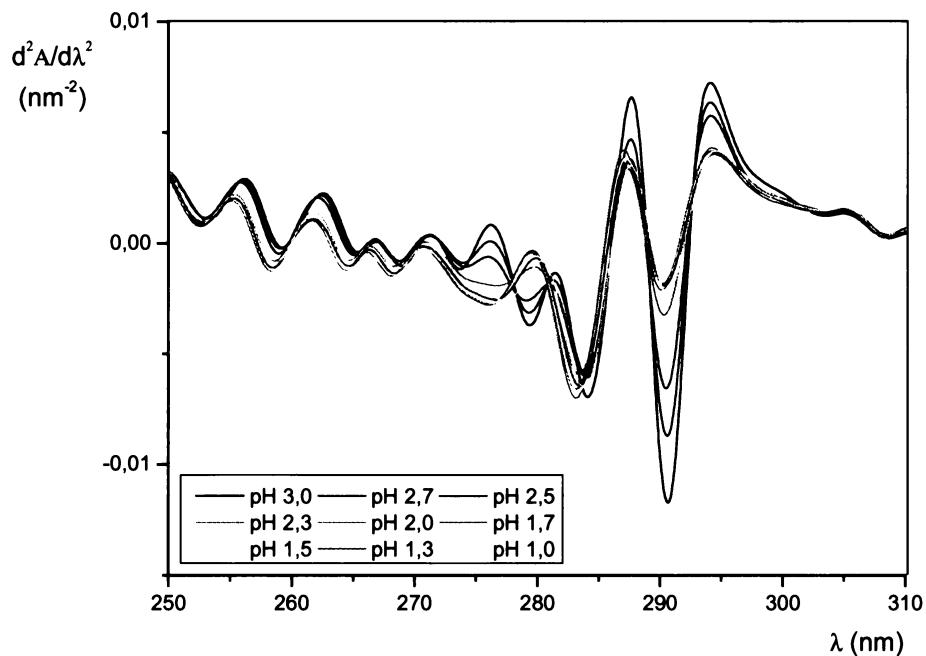
Pro všechny studované vlnové délky je průběh závislosti intenzity na pH roztoku v zásadě obdobný, k výrazným změnám dochází zejména v oblasti pH 2,5-2,0.

Změny spektra v oblasti absorpce aromatických chromoforů (250-310 nm) shrnuje obr. 20 (str. 51). Ačkoliv jisté změny jsou patrné i zde, k podrobnějšímu zkoumání je vhodnější grafické vynesení druhé derivace na obr. 21 (str. 51).



Obr.20: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 250-310 nm

( $c_{\text{cyt c}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

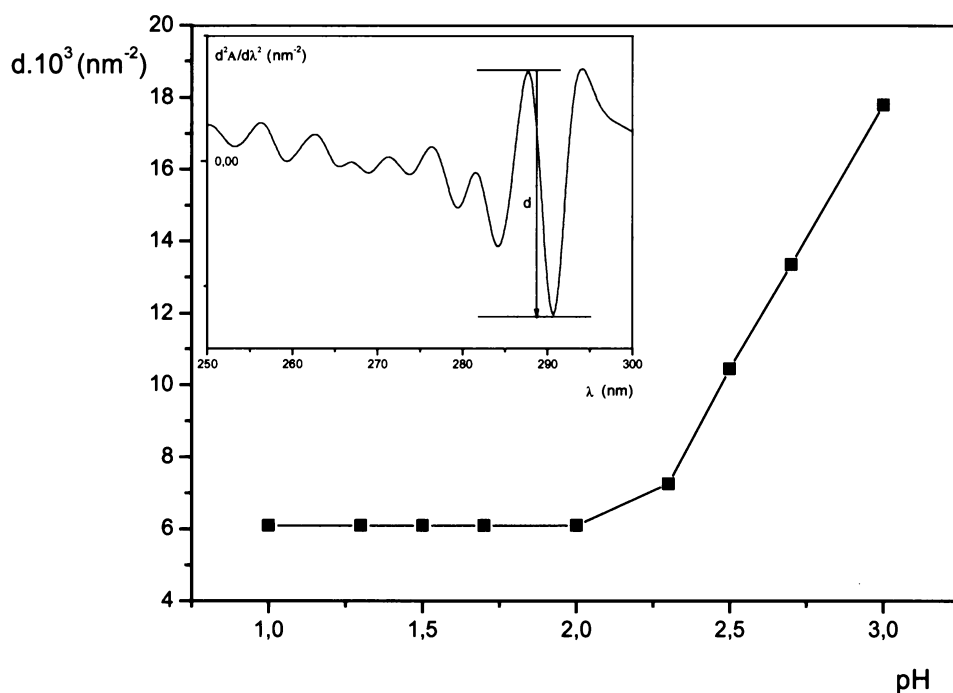


Obr.21: Druhá derivace absorpčního spektra cyt c v oblasti vlnových délek 250-310 nm

( $c_{\text{cyt c}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát, pH 3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,1; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

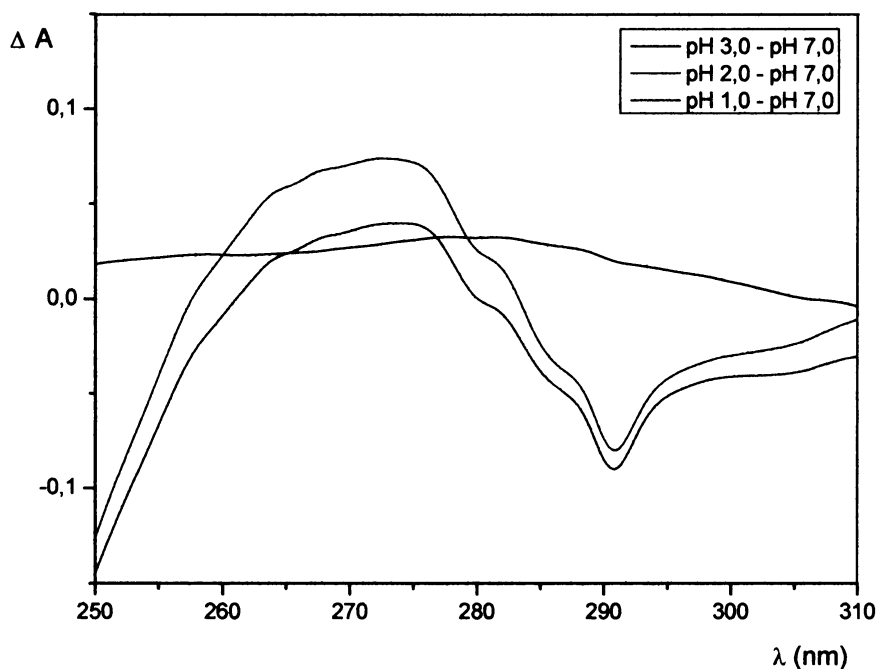
Ze spektra druhých derivací pozorujeme, že průběh absorpčních křivek v oblasti absorpce fenylalaninu 250-270 nm je téměř totožný, dochází pouze k celkovému posunu spektra k nižším vlnovým délkám. K výrazným změnám v průbězích derivačních křivek však dochází v oblasti mezi 275 a 285 nm. Absorpční křivky pro pH 3,0-2,5 obsahují v této oblasti ve spektru druhých derivací dvě jasná maxima a dvě minima. Naproti tomu křivky pro pH 2,3-1,0 obsahují v této oblasti pouze jediné maximum a dvě minima. Další průběh absorpčních křivek pro pH 3,0-1,0 v oblasti 285-310 nm je téměř totožný, až na rozdíly v intenzitě maxim a minim, která s klesajícím pH postupně klesá.

Jako kvantitativní míra změn v derivačních spektrech cytochromu *c* byl použit „rozkmit“ vrcholů spektra druhé derivace<sup>[72]</sup>. Byl zaveden parametr *d*, jehož definici vystihuje vnitřní část obrázku 22. Změny hodnoty parametru *d* pro různá pH jsou patrné z obr. 22. Při poklesu pH až k hodnotě pH 2,3 parametr *d* prudce klesá, od hodnoty pH 2,0 je pak víceméně stabilní až do pH 1,0.



Obr. 22: Změny parametru *d* ze spektra druhé derivace cyt *c* při pH (3,0; 2,7; 2,5; 2,3; 2,0; 1,7; 1,5; 1,3; 1,0)

Jako alternativa k derivačním spektrům byla pro studium vlivu pH na strukturu cytochromu *c* v oblasti absorpce aromatických aminokyselin (250-310 nm) vynesena diferenční spektra pro hodnoty pH 7,0; pH 3,0; pH 2,0 a pH 1,0. Diferenční spektrum „perturované“-„neperturovaného“ cytochromu *c* naznačuje obrázek 23.



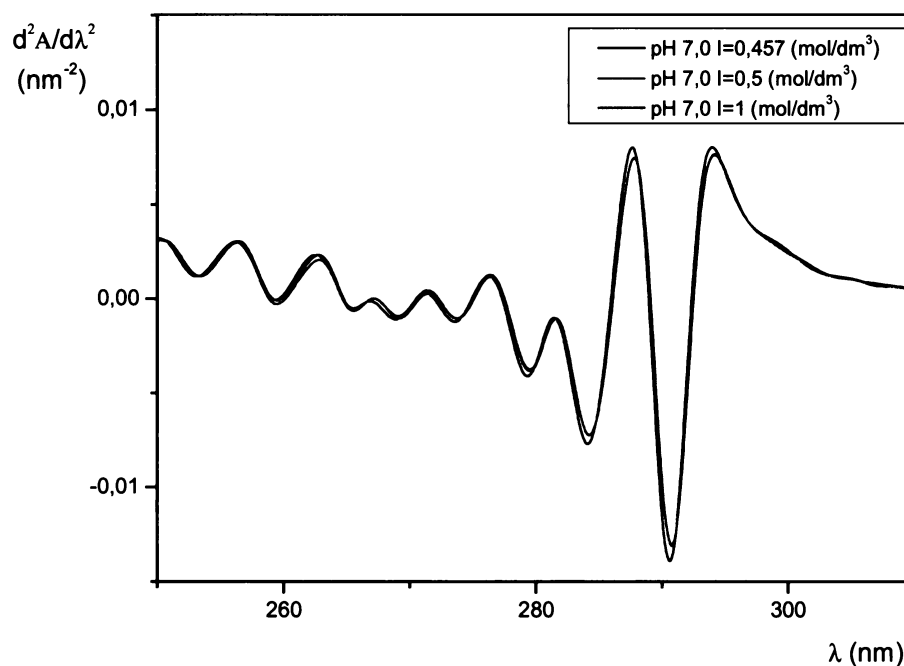
Obr.23: Diferenční spektrum cyt *c* („perturované“-„neperturované“ spektrum)

( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 3,0 - \text{pH } 7,0$ ;  $\text{pH } 2,0 - \text{pH } 7,0$ ;  $\text{pH } 1,0 - \text{pH } 7,0$ )

Z naznačeného obrázku je vidět, že diferenční spektrum pH 3,0 - pH 7,0 (černá křivka) je velmi ploché. Vlivem přechodu cytochromu *c* z neutrálního prostředí do prostředí s pH 3,0 nedochází v oblasti absorpce aromatických aminokyselin prakticky k žádným změnám. Naopak další okyselení roztoku na pH 2,0 (červená křivka) způsobuje dosti výrazný úbytek intenzity s minimem při 291 nm, který je doprovázen dalšími méně výraznými změnami (projevují se jako „posun“ pozadí při 300 nm, zvlnění průběhu diferenční křivky v oblasti 275-285 nm a dále jako široký nestruturovaný „pík“ mezi 260 a 275 nm). Další snížení pH (modrá křivka pro pH 1,0- pH 7,0) již k výrazným změnám nevede a charakter diferenčního spektra se v zásadě nemění.

*Vliv iontové síly:*

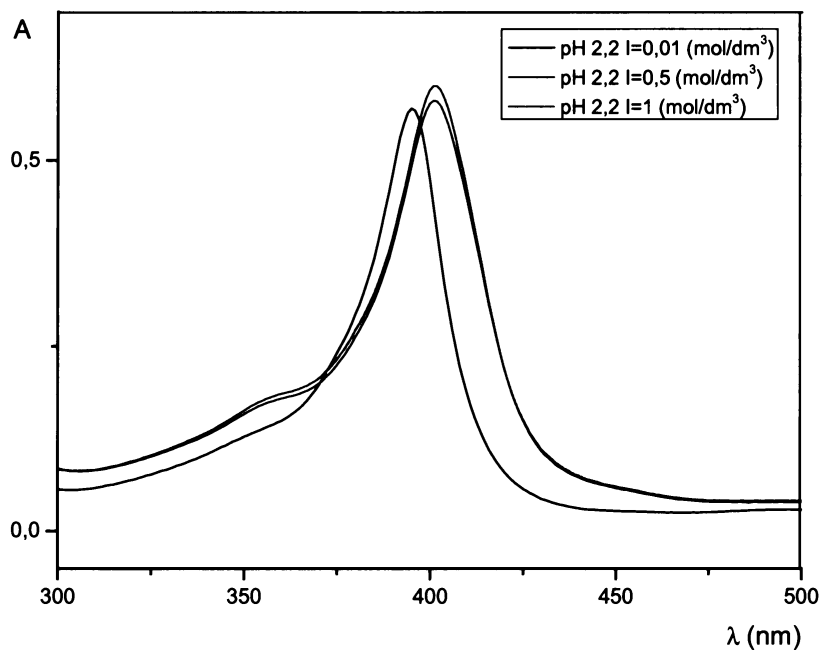
Aby bylo možno posoudit vliv iontové síly na konformaci cytochromu *c* v kyselé oblasti pH, byla nejprve změřena spektra pro roztoky v neutrálním pH 7,0 s rozdílnou iontovou silou ( $I=0,457 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ ). Při tomto pH se změna iontové síly ve spektrech prakticky nijak neprojeví (data nejsou prezentována); tento fakt je doložen na obr. 24, na němž jsou srovnána spektra druhé derivace v oblasti vlnových délek. Získaná spektra při pH 7,0 a různých iontových silách jsou téměř nerozlišitelná.



Obr.24: Druhá derivace absorpčního spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm

( $c_{\text{cyt}} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 7,0$ ;  $I=0,457 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ )

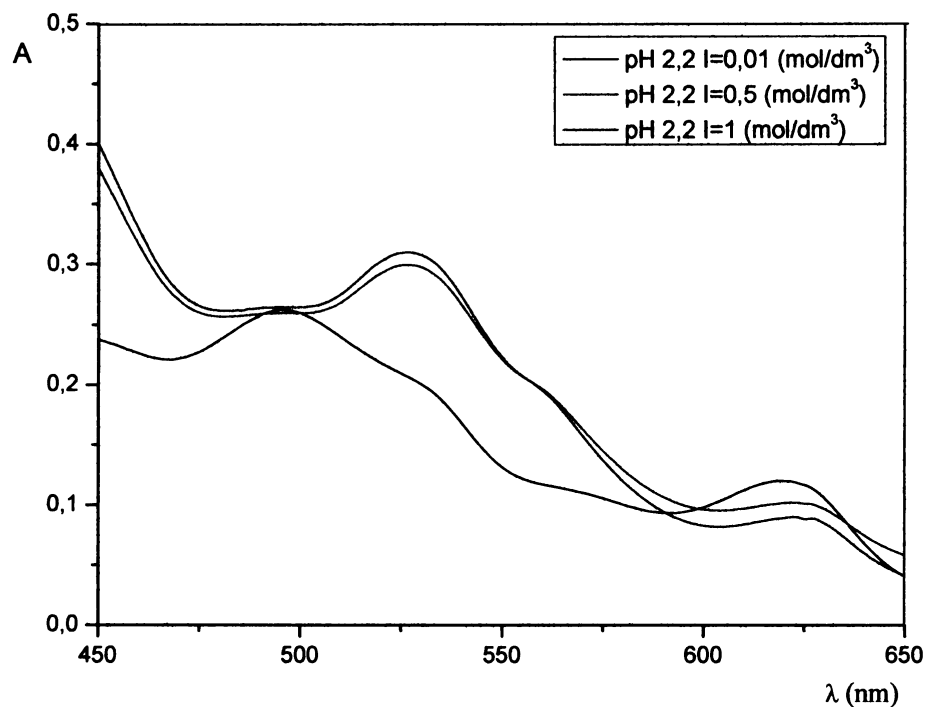
Naopak při kyselém pH se vlivem iontové síly spektra mění (obr. 25-27, str. 55-57). Je zde naznačen průběh křivek při pH 2,2 a různé iontové síle ( $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ ). Zvýšením iontové síly dochází k posunu Soretova pásu (viz obr. 25, str. 55) k vyšší vlnové délce (posun od 395 nm k 401 nm) a mírnému zvýšení intenzity ve srovnání s  $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ .



Obr.25: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 300-500 nm

( $c_{\text{cyt}} \approx 0,05 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M}$  fosfát,  $\text{pH } 2,2$ ;  $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ )

Také v oblasti Q pásu se absorpční křivky pro vyšší hodnoty iontové síly kvalitativně odlišují od křivky pro nejnižší hodnotu ( $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ). Zatímco při nízké iontové síle jsou ve spektru v rozmezí vlnových délek (450-650 nm) dvě maxima (500 a 620 nm), zvýšení iontové síly vede ke změně tvaru spektra a vzniku maxima při 530 nm.

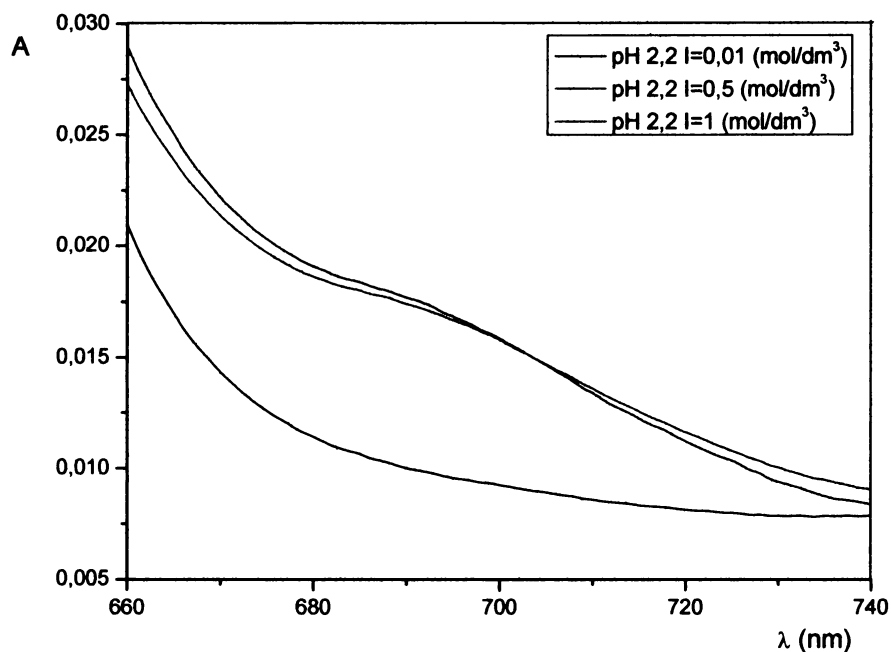


Obr.26: Absorpční spektrum cyt c v oblasti vlnových délek 450-650 nm

( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 2,2$ ,  $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ )

Na obrázku 27 (str. 57) jsou vynesena spektra v oblasti CT pásu (660–740 nm) pro různé hodnoty iontové síly ( $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ ) a  $\text{pH } 2,2$ . Zvýšení hodnot iontové síly vede k objevení CT pásu přechodu při 695 nm.

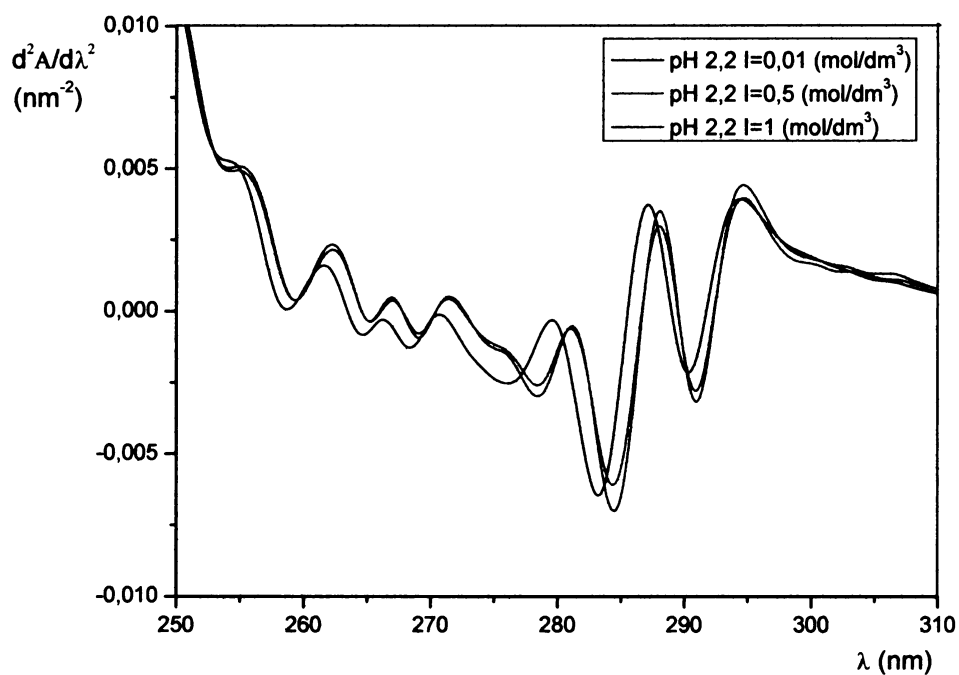




Obr.27: Absorpční spektrum cyt *c* v oblasti vlnových délek 660-740 nm

( $c_{\text{cyt } c} \approx 0,5 \text{ mg/ml}$ ,  $0,005 \text{ M fosfát}$ ,  $\text{pH } 2,2$ ,  $I=0,01 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=0,5 \text{ mol/dm}^3$ ,  $I=1 \text{ mol/dm}^3$ )

Absorpční spektra cytochromu *c* v rozmezí vlnových délek 250-300 nm pro různé hodnoty iontové síly poskytují poměrně málo informací. Podrobnější rozbor umožňuje vynesení druhé derivace spekter (obr. 28, str. 58). Také v tomto případě se průběh spektra pro pH 2,2 a iontovou sílu 0,01 výrazně odlišuje od spekter pro vyšší hodnoty iontové síly. Spektra pro roztoky o vyšší iontové síle jsou si velmi podobná, s maximy posunutými vesměs k vyšším vlnovým délkám.



Obr.28: Druhá derivace absorpčního spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm

( $c_{\text{cyt}} \approx 0,5$  mg/ml, 0,005 M fosfát, pH 2,2,  $I=0,1$  mol/dm<sup>3</sup>,  $I=0,5$  mol/dm<sup>3</sup>,  $I=1$  mol/dm<sup>3</sup>)

## 5. DISKUSE

Získaná spektra neutrálního roztoku cytochromu *c* jsou v souladu s literárními daty<sup>[59]</sup> pro nativní oxidovanou formu tohoto hemoproteinu (Soretův pás 408 nm, Q-pásky jsou spojeny v jeden při 530 nm s postraním raménkem na dlouhovlnné straně-565 nm, pozorovatelný *charge transferový* pás při 695 nm). Přítomnost malého pásu při cca 550 nm může naznačovat, že malá část cytochromu *c* v roztoku je v redukovaném stavu ( $\alpha$ -pás čisté redukované formy při 550 nm je velmi výrazný, i její stopy se tedy mohou projevit ve spektru). Proto možným vysvětlením raménka při 550 nm může být částečný pozůstatek  $\alpha$ -pásu. Spektrum redukované formy cytochromu *c* se od oxidované liší také polohou maxima Soretova pásu (410-413 nm)<sup>[59]</sup> a přítomností dvou samostatných Q pásů (také  $\beta$ -pásu při cca 520 nm). Tyto spektrální „stopy“ redukované formy, vyjma již zmíněného pásu při 550 nm, nejsou v získaných spektrech nijak patrné. Z orientačního výpočtu bylo je usuzováno, že přítomnost redukované formy cytochromu *c* v roztoku je menší než 2,5%.

Byla dále sestrojena spektra první a druhé derivace cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm (obr. 12, str. 43). Tabulka 3 str. 44 uvádí přesné pozice minim a maxim příslušných pásů ve spektru druhé derivace. Tvar spektra druhé derivace se dobře shoduje s prací Ruckpaula a spol.<sup>[30]</sup> Poloha maxim a minim ve spektru druhé derivace se však již s výsledky Ruckpaula a spol.<sup>[30]</sup> zcela neshodují. Pozice maxim a minim v mé práci jsou posunuty v průměru o 0,7 nm ke kratším vlnovým délkám. Rozdíly ve vlnových délkách jednotlivých maxim a minim lze připsat odlišnému postupu derivace (elektronický derivační nástavec), který používali citovaní autoři.

Za účelem charakterizace vzniku konformačního stavu „*molten globule*“ pozorovaného v průběhu rozbalování struktury cytochromu *c* v kyselé oblasti pH byla naměřena absorpční spektra v rozmezí pH 3,0-1,0.

Pozorováním spekter cytochromu *c* zaměřených na viditelnou oblast spektra (obr.14-16, str. 46-48) lze usuzovat, že cytochrom *c* získá strukturu konformačního stavu MG mezi pH 2,3 a 2. Tato hodnota se velmi dobře shoduje s články autorů Goto a spol.<sup>[62]</sup>, kteří k získání konformace „*molten globule*“ obdobně použili kyselé denaturace proteinu pomocí přídavku HCl při nízké hodnotě iontové síly.

Na vznik konformačního stavu MG lze usuzovat z chování absorpčních spekter ve viditelné oblasti. Soretův pás je detailněji zobrazený na obrázku 14 (str. 46) při různých hodnotách pH. Maximum Soretova pásu pro pH 3,0 a 2,7 leží při 408 nm. Tato hodnota se shoduje s polohou maxima nativní konformace cytochromu *c* při pH 7,0. Při postupném snižování hodnot pH dochází k posunu Soretova pásu nejprve k 401 nm (při pH 2,5 a 2,3). Další snížení pH k hodnotě 2,0 a méně vede k posunu Soretova pásu opět k nižším vlnovým délkám; maximum 396 nm. Tato pozice již poukazuje podle citace<sup>[61]</sup> na vznik konformace MG. Tvar Soretova pásu při pH 2,5 a 2,3, stejně jako jeho větší pološířka, naznačují, že by mohlo jít o směs stavů, odpovídající kyselé formě (s maximem při 396 nm) a formě nativní (s maximem při 408 nm). Pokus o matematický rozklad spektra v tomto smyslu pomocí programu Origin nebyl zcela úspěšný, součtová křivka vždy vykazovala minimum mezi absorpčními vrcholy těchto forem.

Charakteristický posun pásu odpovídá přechodu proteinu z nízkospinového nativního stavu do stavu vysokospinového<sup>[64]</sup>. Charakter spektrálních změn Soretova pásu při přechodu k nižším pH odpovídá údajům, uváděným v literatuře<sup>[61,64,73]</sup> pro vznik stavu „*molten globule*“.

Také změny v oblasti Q-pásu (obr. 15, str. 47) naznačují postupný zánik pásu při 530 nm a vznik nových pásů při 500 a 620 nm, což je v souladu s literárními údaji<sup>[61,64,73]</sup> pro konformaci MG. Zánik CT pásu (obr. 16, str. 48) není s touto představou v rozporu, tento děj je ovšem možné spojit s prakticky každým rozbalováním cytochromu *c*.

Nejsou nám známy literární údaje, které by spojovaly tvar derivačního spektra a vznik MG stavu u cytochromu *c*. Pozorované změny jsou v souladu s trendem, pozorovaným již v práci<sup>[30]</sup> a v zásadě (posun maxim ke kratším vlnovým délkám) odpovídají rozbalování proteinu. Postupné snižování parametru *d* odpovídá zvětšování relativního rozdílu mezi aromatickými chromofory (resp. jejich okolím) a mohl by odrážet odlišné chování tyrosinu a tryptofanu při snižování pH. Změny tvaru spektra druhé derivace (obr. 21, str. 50) při 275-285 nm mohou dorážet stejný děj, popřípadě mohou být spojeny s absorpcí hemu v této oblasti<sup>[74]</sup>.

Na dynamiku pozorovaného přechodu lze usuzovat z rozboru závislosti velikosti změn ve spektrech na pH (obr. 17-19, str 49, 50). Ve většině případů (Q-pás, CT pás, parametr *d* derivačních spekter) je přechod jednoznačně dvoufázový, s prudší změnou mezi pH 2,3 a 2,0. Za podmínek experimentu je vzniklý stav při dalším snižování pH až

do hodnoty pH 1,0 víceméně stabilní (resp. málo proměnný), nejvýraznější je tento trend v derivačních spektrech. Pouze změny v intenzitě Soretova pásu naznačují možnost vznik jakéhosi „mezistupně“ při pH 2,5 a 2,3. Je ovšem možné, že tento průběh změn souvisí s výše zmiňovaným „směsným“ charakterem spekter pro tyto hodnoty pH. Charakter závislostí spektrálních intenzit na pH podporuje představu, že přechod v konformaci MG je kooperativní děj<sup>[61,64]</sup>.

Také tvar diferenčního spektra na obr. 23, str. 53 ukazuje na posun spektra ke kratším vlnovým délkám při přechodu do nižšího pH a vzniku konformace MG (pH 2,0; 1,0). Tento závěr platí přinejmenším pro oblast vlnových délek 260-275 nm, tedy pro oblast absorpance fenylalaninu. Méně jasný je průběh diferenčních spekter v oblasti absorpance tyrosinů a tryptofanu. Atypický tvar spektra naznačuje, že jde o kombinaci různých jevů, pravděpodobně se zde vedle sebe uplatňuje výraznější změna polarizability v okolí tyrosylů s menšími efekty v okolí tryptofanu. Vyloučen není ani příspěvek porfyrinové skupiny hemu.

Zvýšení iontové síly se při pH 2,2 projeví změnami ve spektrech (ve všech studovaných oblastech, obr. 25-28, str. 55-58) (pozice Soretova pásu při 401 nm, návrat intenzity Q pásu při 530 nm a pokles pásů při 500 a 620 nm, návrat intenzity CT pásu, tvar derivačního spektra). Tento poznatek ukazuje na zvýšení stability cytochromu *c* vlivem vyšší iontové síly. Obdobný stabilizační efekt zvýšené iontové síly byl již popsán v literatuře<sup>[75]</sup>. Je pravděpodobné, že jeho podstatou je zvýšené stínění ionizovaných skupin vlivem protiontů z roztoku s vyšší iontovou silou. V neutrálním prostředí zvýšení iontové síly strukturu cytochromu nijak výrazněji neovlivňuje.

## 6. SOUHRN

1. V této práci byla změřena absorpční spektra cytochromu *c* z mitochondrií koňského srdečního svalu v rozmezí vlnových délek 200 až 1000 nm v roztocích o nízké iontové síle (0,005 M fosfát), neutrálním pH a dále pro 7 hodnot pH v kyselé oblasti v rozmezí 3,0 až 1,0. Detailně byly zkoumány části spektra ve viditelné oblasti, charakteristické pro absorpci hemu (300-500 nm pro Soretův pás, 450-650 nm pro Q pásy a okolí CT pásu, 660-750 nm). Dále byla zkoumána spektra druhé derivace v oblasti absorpce aromatických aminokyselin (250-300 nm).
2. Spektra v neutrální oblasti odpovídají literárním údajům pro oxidovanou formu cytochromu *c* v nativním stavu (Soretův pás při 408 nm, široký Q pás s maximem při 530 nm a CT při 695 nm, tento jejich charakter zůstává zachován i pro mírně kyselou oblast (pH3,0).
3. Snižování pH v kyselé oblasti se ve spektrech cytochromu *c* projevuje posunem Soretova pásu postupně nejprve k 400 nm (pH 2,5 a 2,3) a dále k 395 nm (pro pH 2,0 až 1,0) za současného snižování intenzity. Také v oblasti Q pásu dochází k význačným změnám: postupně zaniká maximum při 530 nm a vznikají nové pásy při 500 nm a 620 nm (tento charakter spektrum získává při pH 2,0 a dále se již výrazně nemění, pouze se mírně snižuje intenzita pásů. Také intezita pásu CT při 695 nm se snižováním pH klesá, po dosažení pH 2,0 již tento pás není prakticky pozorovatelný.
4. Výše popsané změny jsou v souladu s údaji v literatuře pro konformační přechod cytochromu *c* do stavu „*molten globule*“ se současnou změnou spinového stavu železa na vysokospinový formu. Tento stav podle mých spektroskopických dat převládá již pod pH 2,0 a až do pH 1 se výrazně nemění.
5. Rozbor postupného vzniku konformace „*molten globule*“ v závislosti na pH naznačuje, že se jedná o děj dvoufázový. Pouze chování spektra v oblasti absorpce Soretova pásu naznačuje možnost, že vznik „*molten globule*“ je dějem třífázovým s mezistupněm v rozmezí pH 2,5-2,3 (spektrum pro tyto hodnoty víceméně odpovídá součtu nativní a MG formy).
6. Změny ve spektrech druhé derivace v oblasti absorpce fenylyalaninu (250-270 nm) odpovídají posunu ke kratším vlnovým délkám, čili rozbalování nativní

struktury proteinu. Naproti tomu změny v oblasti absorpce tyrosinu a tryptofanu jsou složitější (275-295 nm) a zřejmě odrážejí odlišné chování tyrosinu a tryptofanu. Minimum při 292 nm, jehož pozice indikuje polaritu okolí tryptofanu, prakticky nemění polohu, zatímco v oblasti kolem 280 nm, kde se výrazněji projevuje přítomnost tyrosinových postranních řetězců, dochází k posunu spektra (poukazující na přesun tyrosinů do polárnějšího prostředí) změně tvaru spektra. Také změny intenzit v oblasti 285-295 nm jsou v souladu s představou o snižování polaritu v okolí tyrosinů.

7. Dále byl studován vliv zvýšení iontové síly na stabilitu cytochromu *c* při hodnotách pH, charakteristických pro vznik MG. Byla provedena měření spekter pro pufr podle McIlvaina o pH 2,2 a iontové síle 0,01 mol/dm<sup>3</sup>; 0,5 mol/dm<sup>3</sup> a 1,0 mol/dm<sup>3</sup>. Pro srovnání byla změřeny vzorky proteinu také v pufru o pH 7,0 a různých hodnotách iontové síly. Zvýšení iontové síly se ve spektrech roztoků cytochromu *c* s pH 2,2 projevuje zmenšením efektu kyselie indukované konformační změny. Tento stabilizační účinek má již iontová síla 0,5 mol/dm<sup>3</sup>. Ve spektrech cytochromu *c* v neutrálním roztoku se žádný vliv iontové síly neprojevuje.

## 7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. IUPAC-IUB: *J. Biol. Chem.* 241, 2491 (1966).
2. Kodíček M., Karpenko V.: *Biofyzikální chemie*, Academia, Praha (2002).
3. Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plzák Z.: *Základní analytická chemie*, Karolinum, Praha (2003).
4. Anzenbacher P., Hudeček J.: *Chem. Listy* 75, 180 (1981).
5. Owen A. J.: *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy*, Hewlett Packard, Böblingen (1996).
6. Anzenbacher P., Kovář J.: *Metody chemického výzkumu pro biochemiky*, VN MON, Praha (1989).
7. Cooper A.: *Biophysical Chemistry*, R.S.C Publishing, Londýn (2004).
8. Demchenko A. P.: *Ultraviolet Spectroscopy of Proteins*, Springer-Verlag, Berlín (1986).
9. Leach S.J., Scheraga H. A.: *J. Biol. Chem.* 235, 2872 (1960).
10. Demchenko A. P.: *Biophys. Chem.* 9, 393 (1978).
11. Demchenko A. P., Zyma V. L.: *Stud. Biophys.* 64, 143 (1977).
12. Nicola N. A., Leach S. J.: *Int. J. Peptide Protein Res.* 8, 394 (1976).
13. Lehrer G. M., Barker R.: *Biochemistry* 10, 1705 (1971).
14. Zayalov V. P., Troitsky G.V., Demchenko A. P., Generalov I. V.: *Biochim. Biophys. Acta* 386, 155 (1975).
15. Frechet D., Ehrlich R., Remy P.: *Nucleic Acids Res.* 7, 1981 (1979).
16. Herskovits T. T., Laskowski M.: *J. Biol. Chem.* 235, 57 (1960).
17. Herskovits T. T., Laskowski M.: *J. Biol. Chem.* 237, 2481 (1962).
18. Solli N., Herskovits T. T.: *Anal. Biochem.* 54, 370 (1973).
19. Williams E. J., Herskovits T. T., Laskowski M.: *J. Biol. Chem.*, 240, 3574 (1965).
20. Stellwagen E., Rysavy R.: *J. Biol. Chem.* 247, 8074 (1972).
21. Yanari S., Bovey F. A.: *J. Biol. Chem.* 235, 2818 (1960).
22. Slotboom A. J., Jansen E. H., Vlijm H., Pattus F., de Araujo S.P., Haas G.H.: *Biochemistry* 17, 4593 (1978).
23. Jones K. G., Sweeney G. D.: *Clin. Chem.* 25, 71 (1979).



24. Owen A. J.: *Quantitative UV-visible Analysis in the Presence of Scattering*, Hewlett Packard, Böblingen (1995).
25. O'Haver T.C., Green G.L.: *Anal. Chem.* **48**, 312 (1976).
26. Franzini C., Cattozzo G. L., Pagani A.: *Int. Lab.* **18**, 33 (1988).
27. Padrós E., Dunach M., Morros A.: *Trends Biochem. Sci.* **9**, 508 (1984).
28. Duñach M., Sábas M., Padrós E.: *Eur. J. Biochem.* **134**, 123 (1983).
29. Lange R., Balny C.: *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 80 (2002).
30. Ruckpaul K., Rein H.: *Acta Biol. Med. Germ.* **39**, 55 (1980).
31. Voet D., Voet G. J.: *Biochemistry*, John Wiley & Sons, USA (2004).
32. Alberts B., Bray D.: *Základy buněčné biologie*, Espero, Ústí nad Labem (1998).
33. Hudeček J., Kalous V.: *Fyzikálně chemická podmíněnost struktury bílkovin*, Academia, Praha (1989).
34. IUPAC-IUB: *Biochemistry* **9**, 3471 (1970).
35. Berg J., Tymoczko J., Stryer L.: *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York (2007).
36. Švec M., Vondrášek J.: *Chem. Listy* **94**, 494 (2000).
37. Anfinsen C. B., Haber E., Sela M., White F. H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **47**, 1309 (1961).
38. Anfinsen C. B.: *Science* **181**, 223 (1973).
39. Levinthal C. J.: *J. Chem. Phys.* **65**, 44 (1968).
40. Wetlaufer D. B.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70**, 697 (1973).
41. Wolynes P. G.; Onuchic, J. N.: *Science* **267**, 960 (1995).
42. Ohgushi M., Wada A.: *FEBS Lett.* **164**, 21 (1983).
43. Ptitsyn O.B., Pain R. H., Semisotnov G. V., Zerovnik E., Razgulyave O. I.: *FEBS Lett.* **262**, 20 (1990).
44. Barrick D., Baldwin R. L.: *Protein Sci.* **2**, 869 (1993).
45. Pawar S.A., Deshpande V. V.: *Eur. J. Biochem.* **267**, 6331 (2000).
46. Santos J., Gebhard L. G., Risso V. A., Ferreyra R. G., Rossi J., Ermácora M. R.: *Biochemistry* **43**, 1715 (2004).
47. Uversky V. N., Ptitsyn O. B.: *J. Mol. Biol.* **255**, 215 (1996).
48. Uversky V. N., Ptitsyn O. B.: *Biochemistry* **33**, 2782 (1994).
49. Dobson C. M.: *Curr. Biol.* **4**, 636 (1994).

50. Pineda T., Sevilla J., M., Román A. J., Blázquez M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1343, 227 (1997).
51. Kamiyama T., Sadahide Y., Nogusa Y, Gekko K.: *Biochim. Biophys. Acta* 1434, 44 (1999).
52. Jordan T., Eads J. C., Spiro T. G.: *Protein Sci* 4, 716 (1995).
53. Naeem A. N., Khan R. H.: *IJBCB* 36, 2281 (2004).
54. Banci L.; Assfalg M.: *Handbook of Metalloproteins*, John Wiley & Sons, New Jersey (2004).
55. Kadenbach B.: *Eur. J. Biochem.* 12, 392 (1970).
56. Margoliash E., Schejter A.: *Adv. Protein Chem.* 21, 113 (1966).
57. Margoliash E.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 50, 672 (1963).
58. Cassina A. M., Hodara R., Souza J. M., Thomson L., Astro L., Ischiropoulos H., Freeman B. A., Radi R.: *J. Biol. Chem.* 275, 28 (2000).
59. Moore G., Pettigrew G. W.: *Cytochromes c, Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects*, Springer-Verlag, Berlín (1990).
60. McKnight J., Cheesman M. R., Thomson A. J., Miles J. S., Munro W.: *Eur. J. Biochem.* 213, 683 (1993).
61. Bychkova V. E, Pain R.H., Ptitsyn O.B.: *FEBS Lett.* 238, 231 (1988).
62. Goto Y., Calciano L. J., Fink A. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 573 (1990).
63. Goto Y., Takahashi N., Fink A. L.: *Biochemistry* 29, 3480 (1990).
64. Drew H. R., Dickerson R. E.: *J. Biol. Chem.* 253, 8420 (1978).
65. Bychkova V. E., Dujsekina A. E., Kleinin S. I., Tiktopulo E. I., Uversky V. N., Ptitsyn O. B.: *Biochemistry* 35, 6058 (1996).
66. Sedlák E., Antalík M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1434, 347 (1999).
67. Bongiovanni C., Sinibaldi F., Ferri T., Santucci R.: *J. Protein Chem.* 21, 35 (2002).
68. Ferenčík M., Škárka B.: *Biochemické laboratorní metody*, SNTL, Bratislava (1981).
69. Kratochvílová H.: *Bakalářská práce*, Přf UK, Praha (2007).
70. <http://www.OriginLab.com/>, Origin V 7.5 User's Manual
71. Dayhoff M. O.: *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Nation. Biomed. Res. Fdu., Georgetown (1979).
72. Pletichová M.: *Diplomová práce*, Přf UK, Praha (2006).

73. Myer Y. P., Saturno A. F.: *J. Protein Chem.* 10, 481 (1991).
74. Servillo L., Colonna G., Balestrieri C., Ragone R., Irace G.: *Anal. Biochemistry* 126, 251 (1982).
75. Sinibaldi F., Howes B. D., Smulevich G., Claccio Ch., Colleta M., Santucci R.: *J. Biol. Inorg. Chem.* 8, 663 (2003).

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů:

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka