

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Bc. Eliška Pospíšilová

Studium receptoru dendritických buněk DCL-1 pomocí technik NMR

Studies on DCL-1, receptor of dendritic cells, using NMR techniques

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Daniel Kavan, Ph.D.

Praha, 2012

PROHLÁŠENÍ:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2012

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala RNDr. Danielu Kavanovi, Ph.D. a Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D. za jejich cenné rady, ochotu a bezmeznou trpělivost, dále prof. RNDr. Karlu Bezouškovi, DSc. za umožnění vypracování diplomové práce a kolektivu Laboratoře přirozené imunity za vytvoření příjemné pracovní atmosféry a jejich ochotu vždy pomoci.

V neposlední řadě patří dík mé rodině a blízkým, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

ABSTRAKT (ČJ)

Receptor DCL-1 (CD302) vyskytující se především na povrchu dendritických buněk je na základě sekvenční podobnosti zařazen do rodiny C-lectinových receptorů. Jelikož však jeho extracelulární doména postrádá jakékoli motivy pro vazbu sacharidových struktur v koordinaci s kationtem vápníku, lze předpokládat, že pokud bude sacharidové struktury vázat, nebude se tak dít klasickou cestou jako například u manosového receptoru nebo receptoru DEC-205. V rámci kolokalizace DCL-1 s F-aktinem se nabízí předpoklad, že hraje určitou roli v buněčné adhezi a migraci. Další předpokládanou funkcí DCL-1 je receptorem zprostředkovaná endocytóza a následné směřování do lysozomů. V posledních letech byl tento receptor také spojován s rozličnými patologickými stavy.

Experimentální část této práce lze rozdělit do tří úrovní. V první fázi proběhla produkce proteinového konstruktů založeného na extracelulární doméně DCL-1 v M9 minimálním médiu, kde byl přítomen jako jediný zdroj dusíku $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a jediný zdroj uhlíku ^{13}C glukóza. Tímto byl získán ^{15}N a ^{13}C značený protein, který byl použit pro NMR měření. Druhá část práce se zabývá vyhodnocením NMR spekter, která umožnila přiřazení frekvencí atomům peptidové páteře i alifatických postranních řetězců aminokyselin. Na základě informace o chemických posunech jader peptidové páteře byly provedeny predikce sekundárních struktur, které byly porovnány s homologním modelem.

V poslední části je popsán experiment chemického zesílení proteinu, při kterém byla použita dvě homobifunkční činidla (DSG, DSS) a jedno činidlo heterobifunkční (EDC). Analýza síťovacích reakcí byla provedena technikou hmotnostní spektrometrie. Jelikož ještě není hotová predikce terciární struktury proteinu, nebyly výsledky analýzy na modely aplikovány.

ABSTRACT (EN)

The DCL-1 receptor (CD302) is predominantly expressed on the surface of dendritic cells and according to its sequence similarity DCL-1 is classified as a C-type lectin. Since its extracellular domain lacks single motives for carbohydrate binding in coordination with calcium ions, it is probable that the process of carbohydrate binding does not occur through the classical pathway as described in the case of mannose receptor or the DEC-205 receptor. Due to its colocalization with F-actin there is a presumption, that DCL-1 plays a role in cell adhesion and migration. Another role of DCL-1 could be the participation in endocytosis and subsequent targeting to lysosomes. DCL-1 was also put in connections with various pathologies in last few years

Experiments described in this work can be divided into three sections. In the first part I dealt with production of a protein construct based on the extracellular domain of DCL-1. The protein was produced in M9 minimal medium with the only source of nitrogen $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ and the only source of carbon ^{13}C glucose. The result was $^{15}\text{N},^{13}\text{C}$ labelled protein, used for NMR measurements. The second part is dedicated to the analysis of NMR spectra, which enabled us to assign frequencies of protein backbone and aliphatic side chains atoms. On the base of the backbone chemical shifts the secondary structure predictions were made.

The experiment described in the last part is applied to protein chemical cross-linking. Two homobifunctional (DSG and DSS) and one heterobifunctional (EDC) agents were used. The analysis of cross-linking reaction was made by mass spectrometry. Since the tertiary structure prediction is not finished yet, the results of this analysis were not applied on the current models.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	- 8 -
(1) ÚVOD	- 11 -
1.1) Receptor DCL-1	- 11 -
1.2) DCL-1 – C-lektin.....	- 12 -
1.3) DEC-205/DCL-1 fúzní protein	- 15 -
1.4) Patologie spojené s DCL-1 a fúzním proteinem.....	- 16 -
(2) CÍLE PRÁCE	- 19 -
(3) MATERIÁL.....	- 20 -
3.1) Přístroje.....	- 20 -
3.2) Chemikálie.....	- 21 -
3.3) Roztoky, pufrý a ostatní materiál	- 23 -
3.4) Vektor	- 25 -
3.5) Bakteriální kmen.....	- 25 -
(4) METODY	- 26 -
(A) PRODUKCE ¹³ C, ¹⁵ N ZNAČENÉHO PROTEINU	- 26 -
4.1) Transformace kompetentních buněk.....	- 26 -
4.2) Výběr vhodných produkčních klonů	- 26 -
4.3) SDS-PAGE.....	- 27 -
4.4) Produkce proteinu v M9 minimálním médiu.....	- 27 -
4.5) Izolace inkluzních tělísek	- 28 -
4.6) Renaturace proteinů metodou rychlého naředění.....	- 28 -
4.7) Dialýza, ultrafiltrace.....	- 29 -
4.8) Orientační stanovení koncentrace proteinů.....	- 29 -
4.9) Gelová filtrace	- 30 -
4.10) Zakoncentrování značeného DCL-1, stanovení koncentrace.....	- 30 -

(B) VYHODNOCENÍ NMR SPEKTER.....	- 31 -
4.11) ^1H , ^{15}N -HSQC experiment	- 31 -
4.12) 3D experimenty.....	- 32 -
4.13) Přiřazení signálů jednotlivým atomům	- 33 -
4.14) Přiřazení atomů peptidové páteře	- 36 -
4.15) Přiřazení signálů jader postranních řetězců.....	- 41 -
(C) PREDIKCE SEKUNDÁRNÍCH STRUKTUR.....	- 44 -
(D) CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ	- 45 -
4.16) Reakce proteinu se síťovacími činidly	- 45 -
4.17) Výběr vhodných reakčních podmínek – gradientová NuPAGE.....	- 46 -
4.18) Štěpení endopeptidasami	- 48 -
4.19) Izolace peptidů.....	- 48 -
(5) VÝSLEDKY	- 50 -
(A) PRODUKCE ^{13}C , ^{15}N ZNAČENÉ EXTRACELULÁRNÍ DOMÉNY DCL-1..	- 50 -
5.1) Výběr vhodných produkčních klonů transformovaných buněk.....	- 50 -
5.2) Produkce proteinu ve velkém objemu.....	- 51 -
5.3) Izolace inkluzních tělísek, renaturace.....	- 52 -
5.4) Purifikace proteinu	- 53 -
5.5) Stanovení koncentrace proteinu	- 54 -
(B) VYHODNOCENÍ NMR SPEKTER.....	- 57 -
5.6) ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum.....	- 57 -
5.7) Přiřazení karbonylových uhlíků	- 58 -
5.8) Přiřazení signálů uhlíků $\text{C}\alpha$ a postranních řetězců.....	- 59 -
5.9) Přiřazení signálů jader vodíků jednotlivým aminokyselinám.....	- 60 -
5.10) Statistické shrnutí.....	- 62 -
(C) PREDIKCE SEKUNDÁRNÍCH STRUKTUR.....	- 63 -
(D) CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ	- 65 -
5.11) Příprava vzorků pro reakce chemického zesítní.....	- 65 -
5.12) Stanovení koncentrace proteinů	- 66 -
5.13) Výběr vhodných reakčních podmínek pro zesítní proteinu	- 67 -

(6) DISKUSE.....	- 73 -
(7) ZÁVĚR.....	- 76 -
(8) LITERATURA.....	- 77 -
(9) PŘÍLOHY	- 80 -
9.1) Tabulka chemických posunů jader	- 80 -

SEZNAM ZKRATEK

ABHD14B	abhydrolasová doména obsahující 14B
AcN	acetonitril
APS	peroxodisíran amonný
BCA	bicinchoninová kyselina
BSA	hovězí sérový albumin (angl. bovine serum albumine)
CBB	Coomassie Brilliant Blue
CBCA(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α a C ^β uhlíkům peptidu
CD	systematické rozdělení receptorů (cluster of differentiation)
cDNA	DNA syntetizovaná reverzní transkriptasou podle mRNA
CRD	doména rozpoznávající sacharidové struktury (angl. carbohydrate recognition domain)
CTLD	doména lektinů typu C vázající sacharidové struktury (angl. C-type lectin domain)
DC	dendritické buňky (angl. dendritic cells)
DCL-1	lektin typu C asociovaný s DEC-205 (angl. DEC-205-associated C-type lectin-1)
DC-SIGN	receptor typu C lektinů (dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin)
DEC-205	receptor typu C lektinů
DMSO	dimethyl sulfoxid
DSG	disukcinimidyl glutarát - deuterovaný
DSS	disukcinimidyl suberát - deuterovaný
DTT	dithiothreitol
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
GEP-NET	gastroenteropankreatický neuroendokrinní tumor
HAc	kyselina octová
(H)CC(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů uhlíkům postranních řetězců aminokyselin
H(CC)(CO)NH	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců aminokyselin v peptidu

HCCH-TOCSY	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců aminokyselin v peptidu
hDSG	DSG – nedeuterovaný
hDSS	DSS – nedeuterovaný
HIV	virus způsobující imunodeficienci (angl. human immunodeficiency virus)
HNCA	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α uhlíkům peptidu
HNCACB	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α a C ^β uhlíkům peptidu
HN(CA)CO	3D NMR experiment pro přiřazení signálů karbonylovým uhlíkům peptidu (C')
HNCO	3D NMR experiment pro přiřazení signálů karbonylovým uhlíkům peptidu
HN(CO)CA	3D NMR experiment pro přiřazení signálů C ^α uhlíkům peptidu
HN-TOCSY-HSQC	3D NMR experiment pro přiřazení signálů vodíkům postranních řetězců aminokyselin v peptidu
HRS	Hodgkinovy buňky a buňky Reedové a Sternberka
HSQC	2D NMR experiment (angl. heteronuclear single quantum coherence)
ICAM-3	molekula účastnící se mezibuněčné adheze (angl. intercellular adhesion molecule 3)
IL	interleukin
IPTG	izopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB (médium)	na živiny bohaté médium (angl. lysogeny broth)
M9 MM	M9 minimální médium
MBL	manózu vázající lektin (angl. mannose-binding lectin)
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (angl. major histocompatibility complex)
MR	manósový receptor
mRNA	mediátorová kyselina ribonukleová
NHS	N-hydroxysukcinimid
NK (buňky)	přirozené zabíječské buňky (angl. natural killer cells)
NMR	nukleární magnetická rezonance

NOE	nukleární Overhauserův efekt
PAMP	molekulární struktury charakteristické pro patogeny (angl. pathogen-associated molecular patterns)
PDB	databáze strukturních dat biologických makromolekul (angl. protein data bank)
PIPES	kyselina piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová)
PMSF	fenylmethansulfonylfluoride
PPT	databáze databází proteinových vlastností (angl. protein property prediction and testing database)
PPWD1	peptidylprolylisomerasa obsahující WD40 repetice
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS-PAGE	SDS elektroforéza na polyakrylamidovém gelu (angl. SDS polyacrylamide gel electrophoresis)
siRNA	dvouvláknová RNA ovlivňující expresi genů (angl. short interfering RNA)
TEA	triethanolamin
TEMED	tetramethylethyldiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TGF	faktor nádorového růstu (angl. tumor growth factor)
TNF	faktor nádorové nekrózy (angl. tumor necrosis factor)
TOCSY	typ NMR experimentu (angl. total correlation spectroscopy)
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethan

(1) ÚVOD

1.1) Receptor DCL-1

Receptor DCL-1 (v CD systému zařazený pod indexem CD302) byl objeven zcela náhodou M. Katoem et al při pokusu o naklonování multilektinového receptoru DEC-205 (CD205) z linie nádorových buněk L428 (odvozené od linie buněk Hodgkinova lymfomu).^[1]

Gen pro DCL-1 je lokalizován na chromozomu 2, který obsahuje tzv. klastr transmembránových C-lektinů I typu. Kromě genu pro DCL-1 jsou zde lokalizovány například geny pro receptor fosfolipasy A (PLA₂R) a DEC-205. Sekvence genu pro DCL-1 se skládá ze šesti exonů, přičemž exon 1 kóduje N-terminální signální sekvenci, exony 2, 3 a 4 kódují C-lektinovou doménu (CTLD) na kterou navazuje exonem 5 kódovaná spojka a exonem 6 kódovaná transmembránová a cytoplazmatická doména.

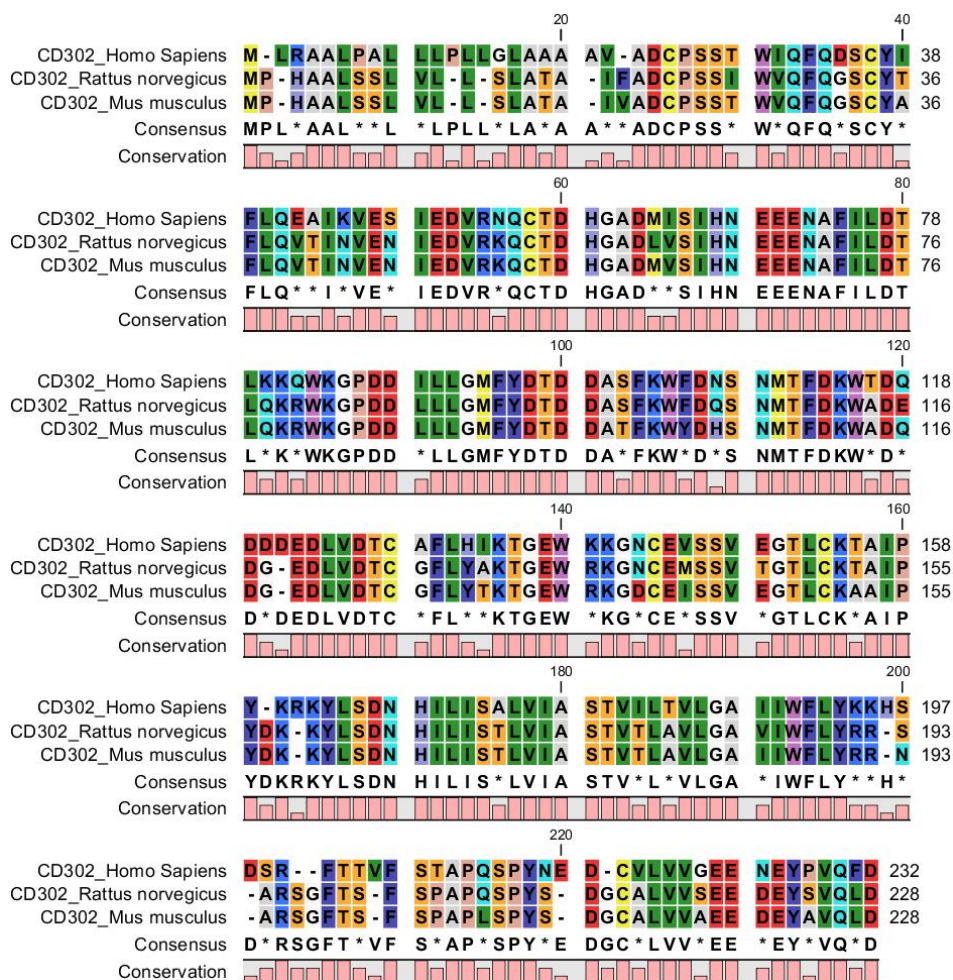
U myši, potkanů – obecně savců (nikoli dalších obratlovců) je možné nalézt orthologní formy tohoto receptoru (Obr. 2, str. 12). Jelikož se zatím nepodařilo nalézt žádné paralogní formy DCL-1, nabízí se myšlenka, že funkce tohoto receptoru je v rámci zmíněných živočišných druhů velmi zachovalá – bez možnosti náhrady jiným receptorem.^[2]

Z hlediska zastoupení receptoru v jednotlivých tkáních lidského těla dosahuje nejvyšší úrovně exprese mRNA pro DCL-1 ve tkáni jater, plic, slinivky a dále v rámci populace leukocytů periferní krve. V těchto tkáních byla mRNA detekována především v buňkách účastnících se procesu fagocytózy a prezentace antigenů – tedy hlavně na monocytech, myeloidních a plazmocytoidních dendritických buňkách (DC), makrofázích a granulocytech, nikoli však na B-lymfocytech, T-lymfocytech a přirozených zabíječských buňkách (NK buňkách). Největší množství povrchového receptoru pak bylo detekovatelné na monocytech a myeloidních DC (Obr. 1), zatímco (ve shodě s úrovní exprese mRNA) na B-lymfocytech, T-lymfocytech a NK buňkách nebyl DCL-1 detekován vůbec.



Obr. 1 Dendritické buňky^[3]

Povrchový DCL-1 byl navíc identifikován ve dvou verzích. Na monocytech převládala forma o molekulové hmotnosti 24 kDa, kdežto na makrofázích a DC byla dominantní forma o hmotnosti 30 kDa. U myši byla pozorována zkrácená forma, která postrádala exon 5, kódující úsek mezi CTLD a transmembránovou doménou, která však nebyla u lidské formy potvrzena, tudíž je stále záhadou, jak přesně tento kratší, 24 kDa, alternativní protein vzniká.^[2]



Obr. 2 Aminokyselinové sekvence lidského^[4], potkaního^[5]a myšího^[6]DCL-1

1.2) DCL-1 – C-lektin

DCL-1 byl na základě lokalizace genu a sekvenční podobnosti zařazen do třídy C-lektinových receptorů.

C-lektinové receptory obecně hrají klíčovou roli v mnoha imunitních procesech. Přirozené imunitní odpovědi se účastní jak rozpustné formy (kolektiny), které se podílejí například na neutralizaci patogenů aktivací komplementové kaskády, tak formy membránové, které zprostředkovávají endocytózu a následného dopravení patogenů do vnitrobuněčných

kompartmentů. Součástí adaptivní imunitní odpovědi jsou potom selektiny, které zprostředkovávají interakce mezi leukocyty a endoteliálními buňkami, a receptory na povrchu NK buněk.^[7]

DCL-1 obsahuje ve své sekvenci několik motivů společných C-lectinům (Obr. 3).

- v extracelulární doméně najdeme 6 vysoce konzervovaných cysteinů, jejichž role bude pravděpodobně spočívat ve stabilizaci terciární struktury sacharidy rozpoznávající domény (CRD) ^{[1][7]}
- v cytoplazmatické doméně jsou pak lokalizovány sekvence, které mohou umožnit endocytózu/internalizaci receptoru, jeho nasměrování do lysozomů, případně fosforylaci a N-glykosylaci^[3]

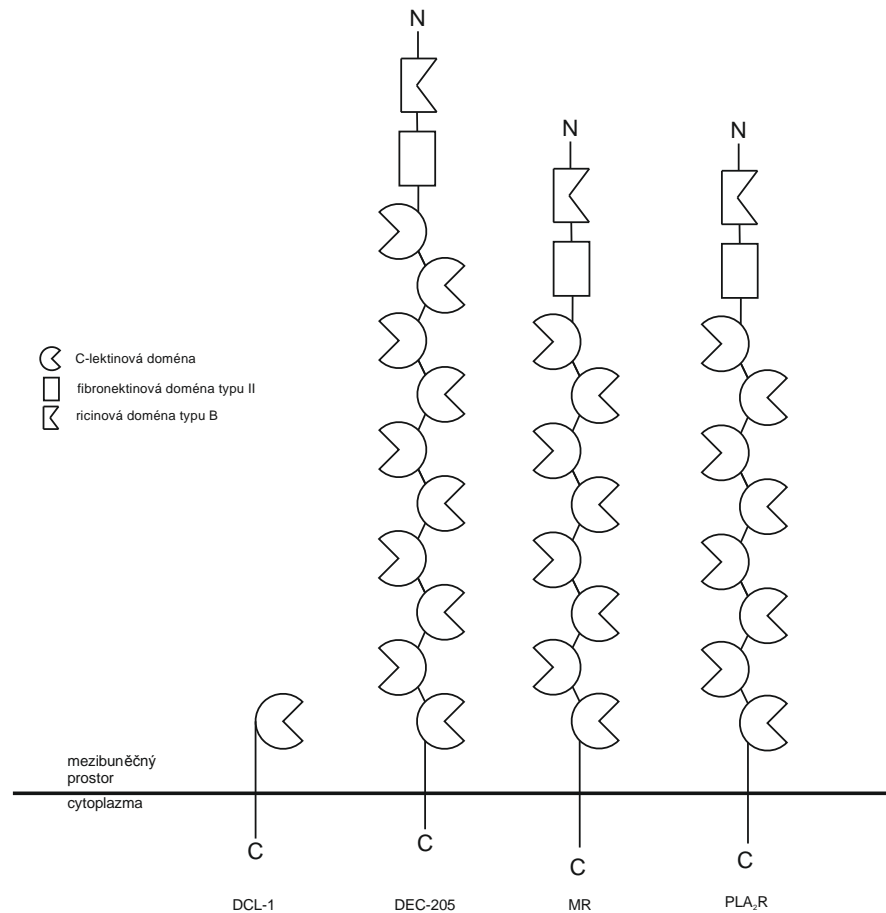


Obr. 3 Aminokyselinová sekvence lidského DCL-1^[4] s vyznačenými motivy, které jsou společné C-lectinovým receptorům.

Modře podtržené – cysteiny (C²⁴, C³⁶, C⁵⁶, C¹³⁸, C¹⁴³ a C¹⁵²), zeleně je podtržené potenciální místo pro N-glykosylaci (N¹⁰⁹ M¹¹⁰ T¹¹¹), červeně podtržený je možný internalizační motiv (F²⁰⁵ - Y²¹³), fialové podtržení označuje potenciální endocytický signál (L²¹⁹ V²²⁰ V²²¹) a oranžově podtržená sekvence E²²³ – E²²⁶ je potenciálním signálem pro směrování do lysozomů.^[2]

Do rodiny C-lectinových receptorů (Obr. 4, str. 14) jsou zařazeny proteiny živočišného původu, jejichž funkce – tedy vazba sacharidových struktur – je závislá na přítomnosti Ca²⁺ kationtu. Vazba sacharidů je zprostředkována tzv. sacharidy rozpoznávající doménou. Dvojmocný kation Ca²⁺ je v rámci CRD koordinován přes postranní řetězce kyselých a bazických aminokyselin. V případě motivu „WND“ se koordinace vápníku kromě postranních řetězců účastní i karbonylová skupina asparaginu, která je součástí peptidové vazby. Celkem jsou zde 3 koordinační vazby (W se koordinace neúčastní). Například u manosu vázajícího lektinu (MBL) se koordinace účastní „EPN“ motiv – konkrétně karbonylové skupiny postranních řetězců E a N, které jsou do správné polohy situovány prostřednictvím mezi nimi ležícího prolinu. Zároveň pak tvoří vodíkové můstky s vázaným

sacharidem (v případě tohoto motivu manosou). Obdobná situace nastává u motivu „QPD“, tedy s tím rozdílem, že zde vázaným cukrem je galaktosa.^{[3][8][9]} Tato schopnost C-lektinů je důležitá pro rozpoznávání povrchových molekulárních znaků asociovaných s patogeny (PAMPs).^[10]



Obr. 4 Schematické znázornění receptoru DCL-1 spolu s vybranými zástupci rodiny manosového receptoru.

DCL-1 však postrádá jakékoli aminokyselinové motivy zodpovědné za vazbu sacharidů v koordinaci s vápníkem. Lze tedy předpokládat, že pokud bude sacharidy vázat, nebude se tak dít klasickou cestou (jako například u MR nebo DEC-205).^[3]

Další nezanedbatelnou funkcí C-lektinů – konkrétně rodiny manosového receptoru, je směřování imunitních buněk do místa imunitní odpovědi na základě vazby sulfatovaných sacharidů prostřednictvím N-koncové domény obsahující 3 cysteinové páry. Takto mohou být DC směřovány například do germinálního centra.^[8]

Jistě nikoli poslední funkcí C-lectinových receptorů je aktivace proliferace T-lymfocytů (interakcí DC-SIGN s ICAM-3)^[8], nebo naopak vazba ligandů vyskytujících se na apoptotických/nekrotických lymfocytech (v tomto případě jsou ligandy proteinové povahy a jako receptor jim slouží DEC-205).^[11]

U DCL-1 byla prostřednictvím značených protilátek pozorována schopnost endocytózy povrchového receptoru s navázanou protilátkou a následné směřování komplexu do fagolysosomů. Jako endocytický receptor nebyl DCL-1 nejefektivnější, například oproti manosovému receptoru makrofágů a DEC-205, což je nejspíš přímý důsledek kolokalizace receptoru s F-aktinem, která zde probíhá pravděpodobně nepřímým mechanismem. Důsledkem je lokalizace receptoru hlavně na filopodiích a bazálním kortexu, což naznačuje, že DCL-1 může hrát určitou roli v buněčné adhezi a migraci.

1.3) DEC-205/DCL-1 fúzní protein

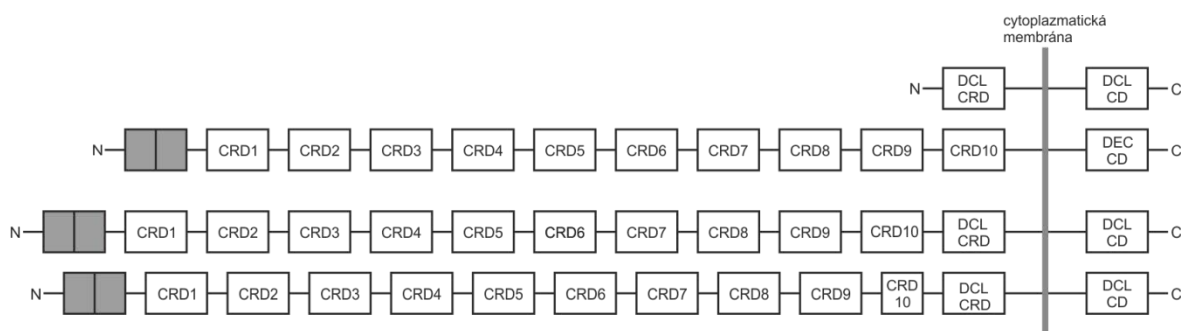
Jak již bylo řečeno, první zmínka o DCL-1 byla v souvislosti se snahou o naklonování receptoru DEC-205 z linie buněk L428.

DEC-205 hraje nezanedbatelnou roli při internalizaci antigenů prostřednictvím endocytických váčků, které jsou směřovány do pozdních endozomů nebo lysosomů, ve kterých probíhá zpracování antigenů a prostřednictvím MHC glykoproteinů II třídy jejich následná expozice na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk.^{[12][13]} Exprese tohoto receptoru je pak nejvyšší na maturovaných myeloidních DC (a to až v padesátkrát větším množství než na nematurovaných, což je následkem jak *de novo* syntézy, tak translokace z intracelulárních kompartmentů) a to především v uzlinných tkáních, dále na monocytech, B-lymfocytech a v menší míře i na T-lymfocytech a NK buňkách.^{[1][12][13][14][15]}

Na L428 buňkách docházelo k expresi dvou variant fúzního proteinu (Obr. 5, str. 16). První (delší) varianta sestávala z extracelulární domény pocházející od DEC-205, která byla za 10 CRD fúzována v místě spoje signálního peptidu a CRD na DCL-1, ze kterého byla přítomna kompletní CRD, transmembránová doména a cytoplazmatická doména. Druhá varianta byla zkrácena o poslední třetinu 10. CRD z DEC-205. Jelikož je gen pro DCL-1 lokalizován 5.4 kb za úsekem kódujícím DEC-205, není vznik fúzního proteinu dílem špatné terminace transkripce. Pravděpodobně zde dochází ke kotranskripci a intergenovému sestřihu.^[1] Tento jev není považován za zcela obvyklý. Do roku 2006 bylo v literatuře popsáno pouze 13 molekul, u kterých k němu docházelo. Akiva et al však ve své práci uvádí, že tento „fúzní chimerismus“ může být mnohem rozšířenější. Pro střední vzdálenost, kdy může dojít

ke kotranskripci uvádí hodnotu 8.5 kb (ovšem našli i případy, kdy byla vzdálenost mezi geny větší než 50 kb).^[16]

mRNA pro fúzní protein DEC-205/DCL-1 je nevyšší měrou exprimována v buňkách Hodgkinova lymfomu^[1], dále v monocytech, nematurovaných DC a v poněkud větším množství v maturovaných DC. Přítomnost fúzního proteinu byla ovšem detekována pouze na maturovaných DC^[17] (Dr. Kato et al se zabývali pouze úrovní exprese mRNA)



Obr. 5 Schéma receptoru DCL-1, DEC-205 a dvou fúzních variant, jejichž mRNA byla identifikována v L428 buňkách.

CRD – sacharidy vázající doména, CD – cytoplazmatická doména

1.4) Patologie spojené s DCL-1 a fúzním proteinem

DCL-1 byl poprvé zmíněn v souvislosti s buňkami Hodgkinova lymfomu. Thomas Hodgkin již v první polovině 19. století dal do souvislosti úmrtí pacientů se zvětšením lymfatických uzlin – včetně sleziny, na kterých bylo možné pozorovat i změnu struktury.^[18] Hodgkinův lymfom byl později charakterizován přítomností tzv. Hodgkinových buněk – velkých jednojaderných buněk) a buněk Reedové a Sternberka (velkých vícejaderných buněk) ve tkáních zasažených nádorem.^{[19][20]} Na základě exprese povrchových struktur se původně předpokládalo, že HRS buňky mají původ v buňkách dendritických, které podlely maligní transformaci.^[21]

Novější studie se však přiklání k teorii, že dochází k transformaci B-lymfocytu v rámci germinálního centra (může to být lymfocyt, který tímto způsobem unikne před apoptózou, nebo zde může působit vnější podnět – diskutován byl virus Epsteinova a Barrové). Všichni se ale shodují na tom, že HRS buňky pochází z jednoho maligního klonu.^{[20][22]} Zajímavé je, jaké si kolem sebe tyto nádorové buňky vytvářejí mikroprostředí. Samy HRS buňky exprimují řadu receptorů – především z rodiny TNF receptorů, běžně se vyskytujících na aktivovaných i neaktivovaných lymfocytech (CD30, CD40, CD80, CD86 atd.), které podporují proliferaci,

diferenciaci a aktivaci především T a B-lymfocytů. Samy pak produkují řadu interleukinů, stimujících růst a diferenciaci hlavně B a T-lymfocytů (IL-5, IL-6, IL-7, IL-13), dále i prozánětlivý TNF- α , proapoptotický TGF- β a funkci makrofágů inhibující IL-10. Od buněk v okolí (granulocytů, T a B-lymfocytů, mastocytů, eozinofilů i buněk fibroblastu) se HRS buňkám dostává bezpočet signálů – například kostimulační signál pro T-lymfocyty prostřednictvím CD30L, signál pro indukci proliferace a aktivaci B-lymfocytů prostřednictvím CD40L, dále jsou stimulovány i prostřednictvím IL-6, IL-7, atd.^{[23][24]} Důsledkem je kompletní vyřazení T-buněčné odpovědi, k čemuž navíc přispívají i makrofágy asociované s nádorem.^[25] Otázkou ale stále zůstává, jakou roli zde hraje fúzní protein DEC-205/DCL-1, jehož mRNA je v buňkách přítomna v hojném množství, zatímco mRNA pro samotný DCL-1 zde detekována nebyla.^[1]

V roce 2004 publikoval Fujimoto et al práci, ve které se zabývali indukcí genů v souvislosti s rezistencí na inzulin způsobenou vysokokalorickou stravou u potkanů. Výsledkem byla identifikace genů, jejichž exprese byla u takto manipulovaných potkanů podstatně vyšší – především genů pro prozánětlivé cytokiny, chemokiny a mezi nimi i pro DCL-1, a které by tedy mohly sloužit jako markery diabetu a inzulinové rezistence.^[26]

V dalším případě Yasuda et al identifikovali 24 genů spojených s kardiomyogenezí. Na základě RNA interference oproti DCL-1 zjistili, že má negativní účinek na vývoj tlukoucích svazků (v buňkách embryonálního karcinomu, transfekovaných siRNA cílenou na DCL-1, docházelo k jejich lepšímu vývoji). Po vyřazení genu pro DCL-1 byla podpořena kardiomyogeneze jak u buněk embryonálního karcinomu, tak u embryonálních kmenových buněk. Závěr je tedy takový, že DCL-1 je negativním regulátorem diferenciace buněk embryonálního karcinomu i embryonálních kmenových buněk.^[27]

Při studii zabývající se genetickým profilem GEP-NET a jejich metastází byly Posorskim et al identifikovány 3 geny, které mohou pomoci určit lokalizaci primárního nádoru. Pokud bylo v metastázích zjištěno více jak třináctnásobné navýšení exprese genu pro DCL-1, primární nádor je lokalizován v ileu, při čtyřnásobném nárůstu mRNA pro ABHD14B byl původní nádor lokalizován v žaludku a naopak při snížení exprese mRNA pro PPWD1 byla místem primárního nádoru slinivka. Jelikož je obvykle místo, odkud se metastáze šíří špatně identifikovatelné, mohou tyto výsledky výrazně napomoci při terapii. Otázkou ale nadále zůstává, zda úroveň exprese mRNA koreluje s expresí proteinu.^[28]

V souvislosti s nefropatií spojenou s HIV infekcí byla na základě biopsií prokázána přítomnost viru v podocytech, vnitřních epitelálních buňkách glomerulu. Jelikož bylo prokázáno, že DEC-205 umožňuje prostřednictvím endocytózy vstup HIV do buněk renálního kanálku, Mikulak et al předpokládali, že bude hrát podobnou roli i u podocytů. Zde však k endocytóze zprostředkované DEC-205 nedocházelo. Příčinou nejspíš bude exprese fúzního proteinu DEC-205/DCL-1, který vstup HIV do těchto buněk neumožňuje.^[29]

Těchto několik případů, kdy byl DCL-1 dán do souvislosti s rozličnými patologiemi naznačuje, že další výzkum tohoto proteinu je přinejmenším žádoucí.

(2) CÍLE PRÁCE

- produkovat ^{13}C , ^{15}N značený proteinový konstrukt, odpovídající extracelulární části receptoru DCL-1
- připravený protein renaturovat a purifikovat

- přiřadit signály NMR spekter atomům peptidové páteře
- přiřadit signály NMR spekter atomům postranních řetězců aminokyselin

(3) MATERIÁL

3.1) Přístroje

Analytické váhy AL 54	Mettler Toledo, ČR
Automatické pipety	Gilson, USA
Centrifuga Avanti J-26 XP	Beckman, USA
Centrifuga Induction Drive Centrifuge, J-6M	Beckman, USA
Centrifuga MiniSpin	Eppendorf, Německo
Centrifuga Spectrafuge 16M	Edison, USA
Dialyzační trubice	Sigma-Aldrich, USA
Chromatograf BioSys 510, Protein Purification	Beckman, USA
Inkubátor (37 °C)	
Kolona Superdex 75 HR, 10/300	Pharmacia Biotech, Švédsko
Koncentrátor 10 000 MWCO	Millipore, USA
Magnetická míchačka MM 2A	Laboratorní přístroje Praha, ČR
Membrána na ultrafiltraci MWCO 10 kDa	Millipore, USA
Mikrokolonka Peptide Microtrap (0,1×0,8 cm)	Michrom Bioresources, USA
Mikrostříkačky	Hamilton, Švýcarsko
Mikrotitrační destičky	Nunc, Dánsko
Mikrozkušavky (V=1,5 ml)	Trefflab, Švýcarsko
Mrazicí box (-80 °C) Biofreezer	Forma Scientific, USA
pH metr Orion 2D star	Thermo Scientific, USA
pH metr Φ200	Beckman, USA
Předvážky HF1200G	AND, USA
Souprava pro elektroforézu	Bio-Rad, USA
Souprava pro elektroforézu	Invitrogen, USA
Spektrofotometr DU-70	Beckman, USA
Spektrofotometr SAFIRE II	Tecan, Rakousko
Sterilní filtr, 0,2 μm, PS	Whatman, USA
Třepačka na Erlenmayerovy baňky	Sanyo Gallenkamp Ltd., UK
Třepačka na zkumavky BigGer Bill	Thermolyne, USA
Ultrazvuková lázeň	Bandellin, Německo
Ultrazvuková sonda Ultrasonic homogenizer 4710	Cole-Parmer Instrum. Co., USA

Vakuová odparka Savant SPD 121P	Thermo Fischer, USA
Vakuová odparka Speedvac RC1010	Jouan, Francie
Viálky se septem	Agilent, USA
Zdroj deionizované vody MilliQ	Millipore, USA
Zdroj napětí PowerPac	Biorad, USA

3.2) Chemikálie

1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid	Thermo Scientific, USA
2-merkaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
4-ethylmorfolin	Sigma-Aldrich, USA
Acetonitril	Merck, Německo
Agar	Oxoid, USA
Akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Azid sodný (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, USA
Bacto-tryptone	Oxoid, USA
Bacto-yeast extract	Oxoid, USA
Bromfenolová modř	Sigma-Aldrich, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Německo
Cystamin	Sigma-Aldrich, USA
Cysteamin	Sigma-Aldrich, USA
Deoxyribonukleasa	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrogenfosforečnan draselný (KH ₂ PO ₄)	PENTA, ČR
Dimethyl sulfoxid	Sigma-Aldrich, USA
Disukcinimidyl glutarát	Thermo Scientific, USA
Disukcinimidyl suberát	Thermo Scientific, USA
Dithiothreitol	Sigma-Aldrich, USA
Dodecylsulfát sodný	Jersey Lab Supply, USA
Ethanol	Lachema, ČR
Ethylendiamintetraoctová kyselina	Sigma-Aldrich, USA
Fenylmethansulfonylfluorid	Serva, Německo
GluC (zásobní roztok 1 mg/ml)	Roche, Německo
Glukosa ¹³ C	Euriso-Top, Francie
Glycerol	Sigma-Aldrich, USA

Glycin	Sigma-Aldrich, USA
Guanidin hydrochlorid	Serva, Německo
Hovězí sérový albumin	Sigma-Aldrich, USA
Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$)	Lach-Ner, ČR
Hydroxid sodný (NaOH)	Lachema, ČR
Chlorid amonný ($^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$)	Euriso-Top, Francie
Chlorid hořečnatý (MgCl_2)	Lachema, ČR
Chlorid sodný (NaCl)	Lachema, ČR
Chlorid vápenatý (CaCl_2)	Lachema, ČR
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková (HCl)	Lachema, ČR
Kyselina octová (CH_3COOH)	Lachema, ČR
Kyselina piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonová))	Sigma-Aldrich, USA
L-Arginin	Serva, Německo
Leupeptin (zásobní roztok 100mM)	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	Merck, Německo
N,N'-methylen-bis-akrylamid	Sigma-Aldrich, USA
Oxid uhličitý (CO_2)	Linde, ČR
Dusík (N_2)	Linde, ČR
Peroxodisíran amonný	Sigma-Aldrich, USA
Pyridin	Fluka, Švýcarsko
Ribonukleasa A	Raanal, Maďarsko
Sacharosa	Lachema, ČR
Síran hořečnatý (MgSO_4)	Lachema, ČR
Tetramethylethyldiamin	Serva, Německo
Thiaminhydrochlorid	Sigma-Aldrich, USA
Triethanolamin	Jersey Lab Supply, USA
Trifluoroctová kyselina	Fluka, Švýcarsko
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Serva, Německo
Triton X-100	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin (zásobní roztok 0,2 mg/ml)	Promega, USA

Všechny použité chemikálie byly v nejvyšší komerčně dostupné kvalitě.

3.3) Roztoky, pufrы a ostatní materiál

Antibiotikum kanamycin (zásobní roztok 50 mg/ml v dH₂O)

Sigma-Aldrich, USA

Antibiotikum tetracyklin hydrochlorid (zásobní roztok 5 mg/ml v EtOH)

Jersey Lab Supply, USA

LB médium:

1% bacto – tryptone, 0,5% bacto – yeast extract, 1% NaCl, pH 7,4

LB agar:

1,5% agar v LB médiu

1× vzorkový pufr pro SDS elektroforézu redukující:

50mM TRIS-HCl, 100mM DTT, 7mM SDS, 1,5mM bromfenolová modř, 1M glycerol, pH 6,8

1× vzorkový pufr pro SDS elektroforézu neredukující:

50mM TRIS-HCl, 7mM SDS, 1,5mM bromfenolová modř, 1M glycerol, pH 6,8

Gel pro SDS elektroforézu – zaostřovací – 5%, V=2 ml:

1,4 ml dH₂O, 0,33 ml 30% roztoku akrylamidu (směs 29 g akrylamidu a 1 g bis-akrylamidu v 100 ml dH₂O), 0,25 ml 1,0M TRIS-HCl (pH 8,8), 0,02 ml 10% SDS, 0,004 ml TEMED a 0,02 ml 10% APS (přidán jako poslední)

Gel pro SDS elektroforézu – rozdělovací – 15%, V=10 ml:

2,3 ml dH₂O, 5,0 ml 30% roztoku akrylamidu (směs 29 g akrylamidu a 1 g bis-akrylamidu v 100 ml dH₂O), 2,5 ml 1,5M TRIS-HCl (pH 6,8), 0,1 ml 10% SDS, 0,004 ml TEMED a 0,1 ml 10% APS (přidán jako poslední)

Zásobní roztok akrylamidu:

1% N,N'-metylen-bis-akrylamid, 29% akrylamid

Elektrodový pufr pro SDS elektroforézu:

10mM TRIS, 20mM glycin, 3,5mM SDS, pH 8,3

Marker pro SDS elektroforézu

Sigma-Aldrich, USA

Barvicí roztok pro polyakrylamidové gely:

0,25% CBB R-250, 45% methanol, 10% HAc

Odbarvovací roztok pro polyakrylamidové gely:

35% ethanol, 10% HAc

Solný roztok M9 minimálního média (2l):

34,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, 6,0 g KH_2PO_4 , 1,0 g NaCl, 2,0 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$

M9 minimální médium:

0,5 l M9 MM solného roztoku, 0,1M CaCl_2 , 0,002M MgSO_4 , 0,001M thyaminhydrochlorid, 1,7 g ^{13}C glukosy

Sacharosový lyzační pufr pro izolaci inkluzních tělísek:

0,73M sacharosa, 50mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, 1mM NaN_3 , pH 7,4

Pufr bez detergentu pro izolaci inkluzních tělísek:

50mM TRIS-HCl, 100mM NaCl, 1mM ME, 1mM NaN_3 , pH 7,4

Pufr s detergentem pro izolaci inkluzních tělísek:

Pufr bez detergentu + 0,5% Triton X-100, pH 7,4

Roztok guanidinu pro renaturaci proteinů:

6M guanidin, 100mM TRIS, pH 8,0

Renaturační roztok:

0,4M arginin, 100mM TRIS, 1mM EDTA, 5mM cystamin, 1mM cysteamin, 1mM NaN_3 , pH 8,0

Roztok na dialýzu:

10mM TRIS, 15mM NaCl, 1mM NaN_3 , pH 8,0

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinů dle Bradfordové

Bio-Rad, USA

Činidlo pro stanovení koncentrace proteinů reakcí s bicinchoninovou kyselinou

Sigma-Aldrich, USA

Pufr pro NMR měření:

25mM PIPES, 50mM NaCl, 1mM NaN_3 , pH 6,5

Pyridinový pufr pro reakce chemického zesílení proteinů:

50mM pyridin, 100mM NaCl, pH 6,5

TEA pufr pro reakce chemického zesílení proteinů:

50mM TEA, 100mM NaCl, pH 7,5

Marker pro gradientovou elektroforézu See Blue

Invitrogen, USA

NuPAGE LDS vzorkový pufr

Invitrogen, USA

NuPAGE MES pufr pro elektroforézu – 20×

Invitrogen, USA

NuPAGE gradientové gely – 4-12%

Invitrogen, USA

3.4) Vektor

phDCL1E – připravil RNDr. Daniel Kavan, Ph.D. Z komerčně dostupného vektoru pET 30a(+) od firmy Merck (Německo)

3.5) Bakteriální kmen

Escherichia coli BL21 (DE3) Gold, Stratagene, USA

(4) METODY

(A) PRODUKCE ^{13}C , ^{15}N ZNAČENÉHO PROTEINU

4.1) Transformace kompetentních buněk

K 0,5 ml alikvotě kompetentních buněk *E. coli* BL21 (DE3) Gold bylo po rozmrazení na ledu přidáno 0,5 μg expresního vektoru. Po půlhodinové inkubaci na ledu byly buňky na 40 s ponořeny do 42°C lázně a následně opět vráceny na led. K alikvotě byl pipetován 1 ml sterilního LB média. Následovala 70min inkubace při 37 °C, po které byly buňky centrifugovány (5 min, 5000 \times g). Tímto způsobem byly buňky transformovány tzv. metodou tepelného šoku, kdy byl umožněn vstup plazmidu s inkorporovanou cDNA pro cílový protein do kompetentních buněk.

Centrifugací získaná peleta byla resuspendována v malém množství supernatantu a nanášena na LB agarovou plotnu, ve které byla přítomna antibiotika. Miska s bakteriální kulturou byla ponechána přes noc inkubovat při 37 °C.

4.2) Výběr vhodných produkčních klonů

Po inkubaci bylo z misky s narostlými koloniemi vybráno 8 jednotlivých klonů. Jelikož byly buňky ponechány růst na agaru obsahujícím antibiotika, můžeme říct, že veškeré vzniklé kolonie pocházejí z klonů, které se úspěšně povedlo transformovat plazmidem.

Takto selektovanými buňkami bylo zaočkováno čisté LB médium s antibiotiky. Buňky byly za stálého třepání (240 ot/min) inkubovány přes noc při 37 °C. Z každé takto připravené stacionární kultury byla v poměru 1/100 zaočkována dvě čistá LB média s antibiotiky a tři hodiny třepána při 37 °C. Následně byl vždy k jedné z identických kultur přidán induktor exprese – IPTG, jehož výsledná koncentrace byla 0,5mM (tyto kultury ponesou označení (+)), zatímco druhá kultura byla ponechána bez indukce (negativní kontrola (-)). Takto byly buňky ponechány třepat ještě 2,5 hod.

IPTG zde působí jako induktor exprese tím, že se váže na *lac* represor, čímž umožní transkripci genu pro virovou T7 RNA polymerasu, který je zanesen v genomu kompetentních *E. coli*, a následně transkripci cílového proteinu, jehož cDNA je v rámci plazmidu umístěna za T7 promotorem. T7 RNA polymerasa je velice efektivní enzym, který svou funkcí a následnou translací nasyntetizované mRNA zaměstná veškerý proteosyntetický aparát buňky, což nám zaručí majoritní podíl cílového proteinu.

4.3) SDS-PAGE

Po ukončení inkubace byly buňky centrifugovány (5 min, 8000× g) a pelety resuspendovány - vždy ve 100 µl jednou koncentrovaného redukujícího SDS vzorkového pufru, dále povařeny (5 min) a centrifugovány (5 min, 12000× g).

SDS přítomné ve vzorkovém pufru se váže na proteiny, uděluje jim uniformní záporný náboj a zároveň zapříčiňuje denaturaci jejich nekovalentních struktur, čemuž napomáhá i výrazné zahřátí vzorku. Pro rozrušení disulfidových můstků je do pufru přidán DTT.

Připravené vzorky byly nanášeny do jamek v zaostřovacím gelu připraveném pro SDS elektroforézu. Zaostřovací gel obsahoval 5 % akrylamidového mixu, zatímco dělicí (spodní) gel obsahoval akrylamidového mixu 15 %. Do krajní jamky gelu byl v objemu 5 µl pipetován marker.

SDS-PAGE probíhala v prostředí SDS elektrodového pufru za konstantního proudu, který byl nastaven na 30 mA pro zaostřovací gel (15 mA na jeden gel) a 50 mA pro dělicí gel (25 mA/1 gel).

Jelikož mají při této metodě všechny proteiny záporný náboj, jehož velikost koreluje s velikostí proteinu, je možné odlišit od sebe malé, střední až velké proteiny – v závislosti na hustotě zesíťování dělicího gelu.

4.3.(A) Vizualizace gelů

Po ukončení elektroforézy byly gely na 10 min ponořeny do barvicího roztoku CBB R-250 a poté odbarvovány v odbarvovacím roztoku, dokud nebyly jasně zřetelné jednotlivé proužky.

4.4) Produkce proteinu v M9 minimálním médiu

Produkce buněk v minimálním médiu umožňuje definovat zdroje pro stavbu základních komponent buňky, jako jsou nukleové kyseliny a proteiny. V našem případě byl jediným zdrojem dusíku $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ a jediným zdrojem uhlíku ^{13}C glukosa.

Nejprve byly připraveny 2 litry M9 MM solného roztoku, který byl po 0,5 l rozdělen do 2 l Erlenmayerových baněk a následně sterilizován. V dalším kroku byla přidána vápenatá a hořečnatá sůl, antibiotika a vitamin B₁. Nakonec byl přes filtr do každé baňky přidán připravený roztok ^{13}C glukosy, aby její výsledná koncentrace byla vždy 1,7 g/0,5 l média.

Vybrané stacionární kultury byly resuspendovány a každá převedena vždy do jedné z baněk. Ty byly ponechány třepat (240 ot/min, 37 °C). Jelikož je růst bakterií v minimálním médiu oproti klasickým – na živiny bohatým médiům – značně zpomalen, indukce exprese 0,5mM IPTG byla provedena, když optická hustota přesáhla hodnotu 0,6 – měřeno oproti dH₂O.

Po indukci následovala ještě šestihodinová kultivace při 37 °C.

4.5) Izolace inkluzních tělísek

Naprodukované bakterie byly centrifugovány (10 min, 5000× g, 4 °C) a získané pelety dále zpracovány.

Pro získání inkluzních tělísek ze sedimentovaných buněk bylo využito metody fyzického i chemického rozrušení buněk.

Nejprve byly pelety krátkými pulsy ultrazvukové sondy resuspendovány vždy ve 20 ml sacharosového lyzačního pufru s přidanými inhibitory proteas leupeptinem (c=2μM) a PMSF (c=1mM). V dalším kroku byly resuspendované pelety zmrazeny na -80 °C a následně rozmrazeny. Cyklus sonikace – zmrazení – rozmrazení byl proveden celkem čtyřikrát.

Poté bylo ke směsím pipetováno vždy 400 μl 1M MgCl₂, 2 μl deoxyribonukleasy (10 U/μl) a 5 μl ribonukleasy A (10 mg/ml). Inkluzní tělíška byla takto ponechána při laboratorní teplotě po dobu 30 min, během které byla dvakrát sonikována ultrazvukovou sondou.

Následovala centrifugace (15 min, 12000× g, 4 °C). Pelety byly ultrazvukovou sondou resuspendovány v pufru obsahujícím detergent (Triton X-100) a inhibitory proteas leupeptin a PMSF. V dalším kroku byly směsi centrifugovány (15 min, 12000× g, 4 °C) a opět ultrazvukovou sondou resuspendovány – tentokrát v pufru bez detergentu, ovšem s inhibitory proteas. Znovu byla provedena centrifugace (stejně podmínky) a promytí puftrem bez detergentu a závěrečná centrifugace, po které byla v peletách přítomna inkluzní tělíška, jež bylo nutné dále renaturovat.

4.6) Renaturace proteinů metodou rychlého naředění

Získané pelety byly každá rozpuštěna v 1.5 ml roztoku guanidinu. Následně byly spojeny do jedné a metodou rychlého naředění převedeny do renaturačního roztoku.

Při této metodě je vzorek obsahující protein po kapičkách převáděn do renaturačního roztoku, jehož objem je minimálně stonásobně větší, než objem vzorku.

4.7) Dialýza, ultrafiltrace

Vzniklá směs byla rozdělena do dialyzačních trubic a ponechána dialyzovat při 4 °C v osmi litrech dialyzačního roztoku (kontinuálně míchaného) po dobu šesti hodin. Dialýza pak byla ještě jednou zopakována.

Po dialýze bylo zapotřebí vnitřní obsah trubic zakonzentrovat. Pro zakonzentrování velkého objemu vzorku byla použita ultrafiltrační membrána s vylučovacím limitem (MWCO) 10 kDa, přes kterou byl roztok pod tlakem inertního plynu (N₂) filtrován. Pro zakonzentrování vzorku o malém objemu byly využity centrifugační koncentrátoři obsahující podobný typ membrány. Zde byl tlak inertního plynu nahrazen přetížením při centrifugaci (4500× g).

4.8) Orientační stanovení koncentrace proteinů

4.8.(A) Stanovení koncentrace proteinů metodou dle Bradfordové

Princip této metody spočívá ve změně barvy činidla (Coomassie Brilliant Blue G-250), které se v kyselých podmínkách váže na protein (především na postranní řetězce argininu), čímž je stabilizována jeho existence jako aniontu.^[30]

Orientační stanovení koncentrace bylo provedeno na základě vizuálního porovnání barvy vzorku a kalibračních roztoků, které obsahovaly BSA v koncentracích 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 a 0,5 mg/ml.

Vzorky pro stanovení byly připraveny smísením 5 µl roztoku obsahujícího protein s 200 µl činidla a ponechány 15 min inkubovat při laboratorní teplotě.

Absorbance vzorků spolu s kalibračními roztoky a slepým vzorkem pak byla měřena na spektrofotometru SAFIRE II při vlnové délce 595 nm.

4.8.(B) Stanovení koncentrace proteinů reakcí s bicinchoninovou kyselinou

Stanovení koncentrace proteinů reakcí s bicinchoninovou kyselinou je založeno na redukci Cu²⁺ iontu prostřednictvím postranních řetězců aminokyselin cysteinu, tryptofanu a tyrosinu. Podstatné však je, že se na redukci podílí i sama páteř proteinu, díky čemuž je stanovení úměrné i celkovému zastoupení proteinů v roztoku. S redukováným iontem Cu⁺ tvoří kyselina bicinchoninová barevný komplex, jehož množství lze stanovit spektrofotometricky (absorpční maximum komplexu je při vlnové délce 562 nm).^[30]

Vzorky byly pro stanovení připraveny smísením 10 μ l roztoků s 200 μ l činidla připraveného dle pokynů výrobce a ponechány 45 min inkubovat při laboratorní teplotě. Absorbance vzorků spolu s kalibračními roztoky a slepým vzorkem pak byla měřena na spektrofotometru SAFIRE II při vlnové délce 562 nm.

Na základě naměřených absorbancí kalibračních roztoků byly zkonstruovány kalibrační přímky a získané rovnice regrese byly použity pro výpočet množství proteinů ve vzorcích, které byly pro stanovení přiměřeně naředěny.

4.9) Gelová filtrace

Gelová permeační chromatografie je separační metoda, na jejímž základě je možné od sebe oddělit komponenty směsi dle jejich velikosti. Kolony pro tuto metodu jsou obecně plněny porézním materiálem, tvořeným zesít'ovanými polymery, což má za následek, že malé molekuly, které mohou snadno proniknout do dutinek v náplni, se oproti velkým molekulám na koloně podstatně zpožďují. Některé molekuly – například velké agregáty a komplexy – jsou elučním činidlem unášeny skrz kolonu, kterou projdou bez jakékoli interakce s pevnou fází a my je tak můžeme od cílových proteinů separovat.^[31]

Pro rozdělení naší směsi byla použita kolona plněná Superdexem 75 HR, jehož matrice je tvořena zesít'ovanou agarosou, na níž je kovalentně vázán dextran.^[32] Detekce proteinů v eluátu byla provedena spektrofotometricky při vlnové délce 280 nm, rychlost průtoku mobilní fáze kolonou byla nastavena na 0,4 ml/min.

4.10) Zakoncentrování značeného DCL-1, stanovení koncentrace

Frakce z gelové chromatografie obsahující cílový protein byly zakoncentrovány (2500 \times g) a metodou dle Bradfordové v nich byla stanovena koncentrace proteinu.

Na základě vypočtené koncentrace byl vzorek dále zakoncentrován (2500 \times g) na výsledný objem 0,5 ml, ve kterém byla opět metodou dle Bradfordové stanovena koncentrace proteinu.

Měření značeného proteinu technikou NMR a zpracování dat pro vyhodnocení bylo provedeno Mgr. Josefem Chmelíkem, Ph.D. z MBÚ AV ČR Praha.

(B) VYHODNOCENÍ NMR SPEKTER

Analýza zpracovaných NMR spekter probíhala prostřednictvím grafického programu Sparky verze 3.115^[33]. Přestože program zvládá automatický výběr signálů, prováděla jsem tyto operace manuálně. Pro jednoduchá 2D spektra může fungovat automatický výběr signálu velmi dobře. V případě 3D spekter však může nastat situace, kdy nebudou správně identifikovány překrývající se signály. Lepší je tedy přístup manuální.

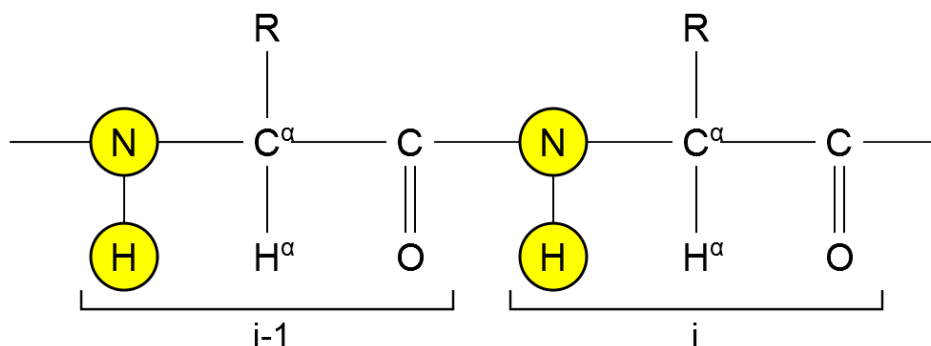
4.11) ^1H , ^{15}N -HSQC experiment

Experiment HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) je založen na přenosu magnetizace z ^1H na kovalentně vázaný ^{15}N a zpět, kde dochází k detekci.^[34]

Pro každý $^1\text{H}^{15}\text{N}$ pár molekuly podrobené tomuto experimentu, lze v odpovídajícím spektru nalézt právě jeden signál. Většina jich tedy pochází od NH skupin přítomných v rámci peptidové páteře (Obr. 6), k nalezení jsou však i další, které odpovídají NH skupinám postranních řetězců aminokyselin (například $\text{H}^{\delta 2}$, $\text{N}^{\delta 2}$ asparaginu, $\text{H}^{\epsilon 2}$, $\text{N}^{\epsilon 2}$ glutaminu, $\text{H}^{\epsilon 1}$, $\text{N}^{\epsilon 1}$ tryptofanu). Co zde však nenajdeme, jsou signály odpovídající NH skupině prolinu, který v peptidu nedisponuje amidovým vodíkem, a signál NH_2 skupiny N-koncové aminokyseliny.

Na základě disperze signálů ve spektru lze také říct, zda je protein dobře poskládaný – tehdy jsou jednotlivé signály dobře rozlišitelné, nebo zda vytváří nepřírozené struktury – signály ve spektru by byly nahroučeny v jedné části a nebyly by snadno identifikovatelné.

Z prvního pohledu nelze určit, který signál odpovídá jaké aminokyselině, proto byly v první fázi zpracování tohoto spektra všechny přítomné signály označeny a očíslovány.



Obr. 6 Schéma peptidové páteře s vyznačenými atomy, jejichž signál je patrný v HSQC spektru.^[34]

4.12) 3D experimenty

V této práci bylo využito celkem desíti 3D experimentů (Tab. 1), ve kterých dochází k přenosu magnetizace mezi jádru kovalentně spojených atomů.

Tab. 1 Provedené 3D NMR experimenty

experiment	typ jádra			signál atomu							
	osa x	osa y	osa z	C'(i-1)	C'(i)	Ca(i-1)	Ca(i)	Cβ(i-1)	Cβ(i)	Cx(i-1)	Cx(i)
HNCO	¹ H	¹³ C	¹⁵ N	×							
HN(CA)CO	¹ H	¹³ C	¹⁵ N	×	×						
HN(CO)CA	¹ H	¹³ C	¹⁵ N			×					
HNCA	¹ H	¹³ C	¹⁵ N			×	×				
CBCA(CO)NH	¹ H	¹³ C	¹⁵ N			×		×			
HNCACB	¹ H	¹³ C	¹⁵ N			×	×	×	×		
(H)CC(CO)NH	¹ H	¹³ C	¹⁵ N			×		×		×	
HCCH-TOCSY	¹ H	¹ H	¹³ C				×		×		×

experiment	typ jádra			signál atomu		
	osa x	osa y	osa z	H(i)	Hx(i-1)	Hx(i)
HCCH-TOCSY	¹ H	¹ H	¹³ C			×
HN-TOCSY-HSQC	¹ H	¹ H	¹⁵ N	×		
H(CC)(CO)NH	¹ H	¹ H	¹⁵ N		×	

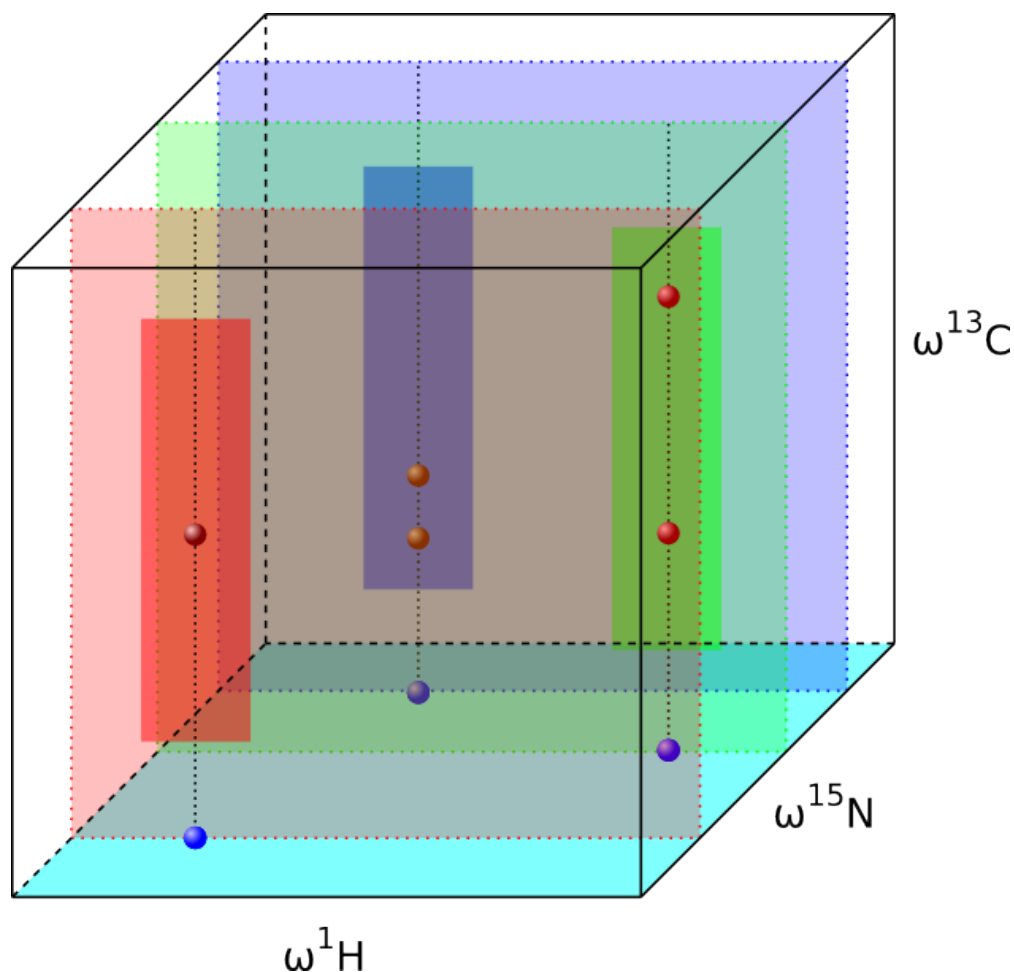
Cx – uhlíky aminokyselin – vyjma C', C^α a C^β

H – amidový vodík peptidové vazby

Hx – vodíky aminokyselin – vyjma amidového vodíku peptidové vazby

Z tabulky 1 je patrné, že na ose x a y se (vyjma HCCH-TOCSY experimentu) nemění typ NMR aktivních jader. Všechny tyto experimenty si můžeme představit jako kvádr, jehož podstavu tvoří ¹H,¹⁵N-HSQC spektrum a do prostoru vystupuje osa z, která představuje korelaci příslušné dvojice ¹H, ¹⁵N atomů na ¹H atomy postranních řetězců, nebo ¹³C atomy peptidové páteře (C', C^α), případně postranních řetězců – dle experimentu (Obr. 7, str. 33).

Stejně jako u HSQC byly přítomné signály ve spektrech označeny a očíslovány tak, aby indexy odpovídaly daným ¹H¹⁵N dvojicím.



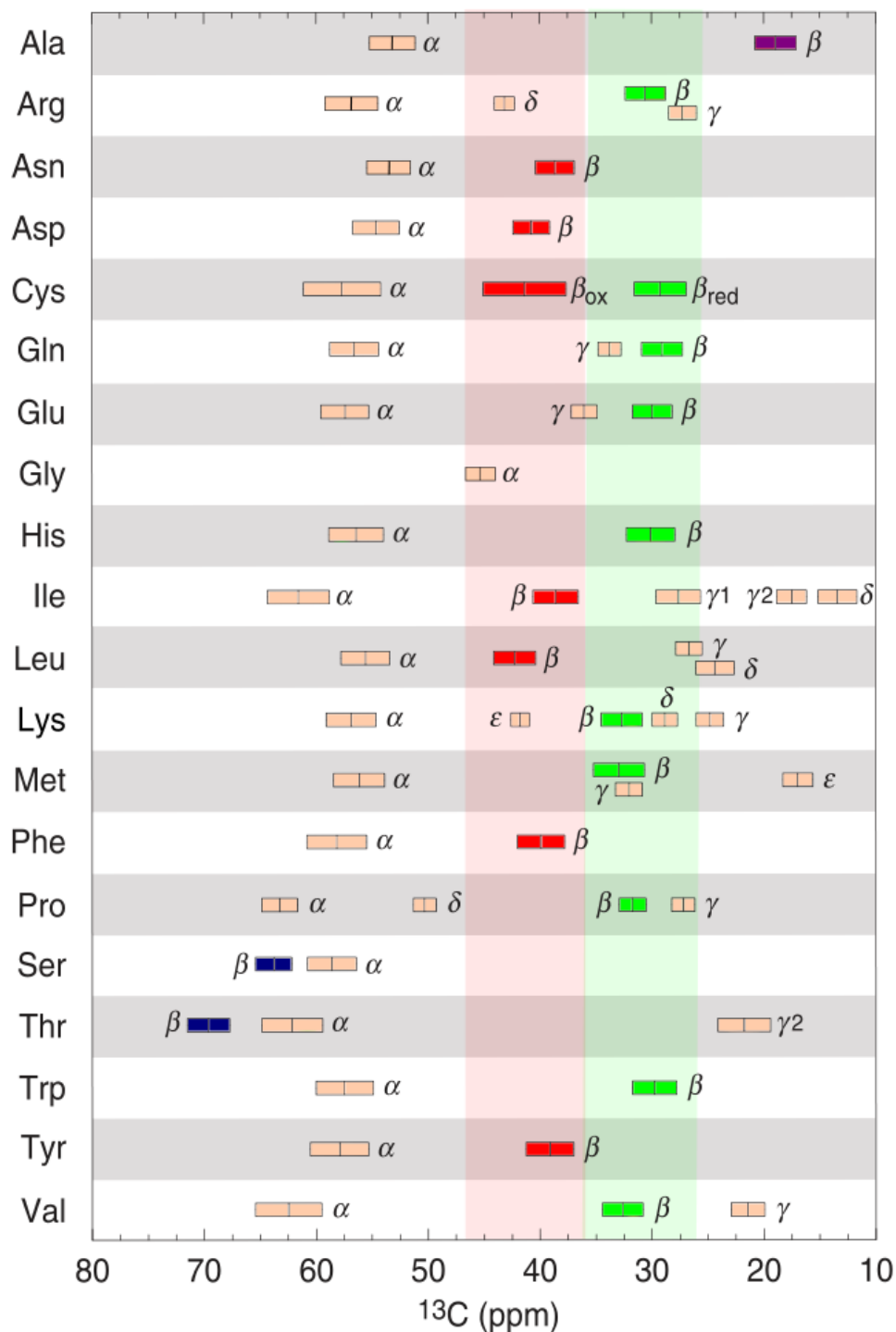
Obr. 7 Schematické znázornění 3D NMR spektra

4.13) Přřazení signálů jednotlivým atomům

Pro identifikaci signálů jednotlivých jader je klíčový jejich chemický posun vzhledem ke standardu, na základě kterého lze více či méně atomy jednotlivých aminokyselin odlišit. Pro správnou identifikaci typu aminokyseliny je nezbytné dohledat i jádra postranních řetězců, která mají posuny relativně specifické (Obr. 8, str. 34).

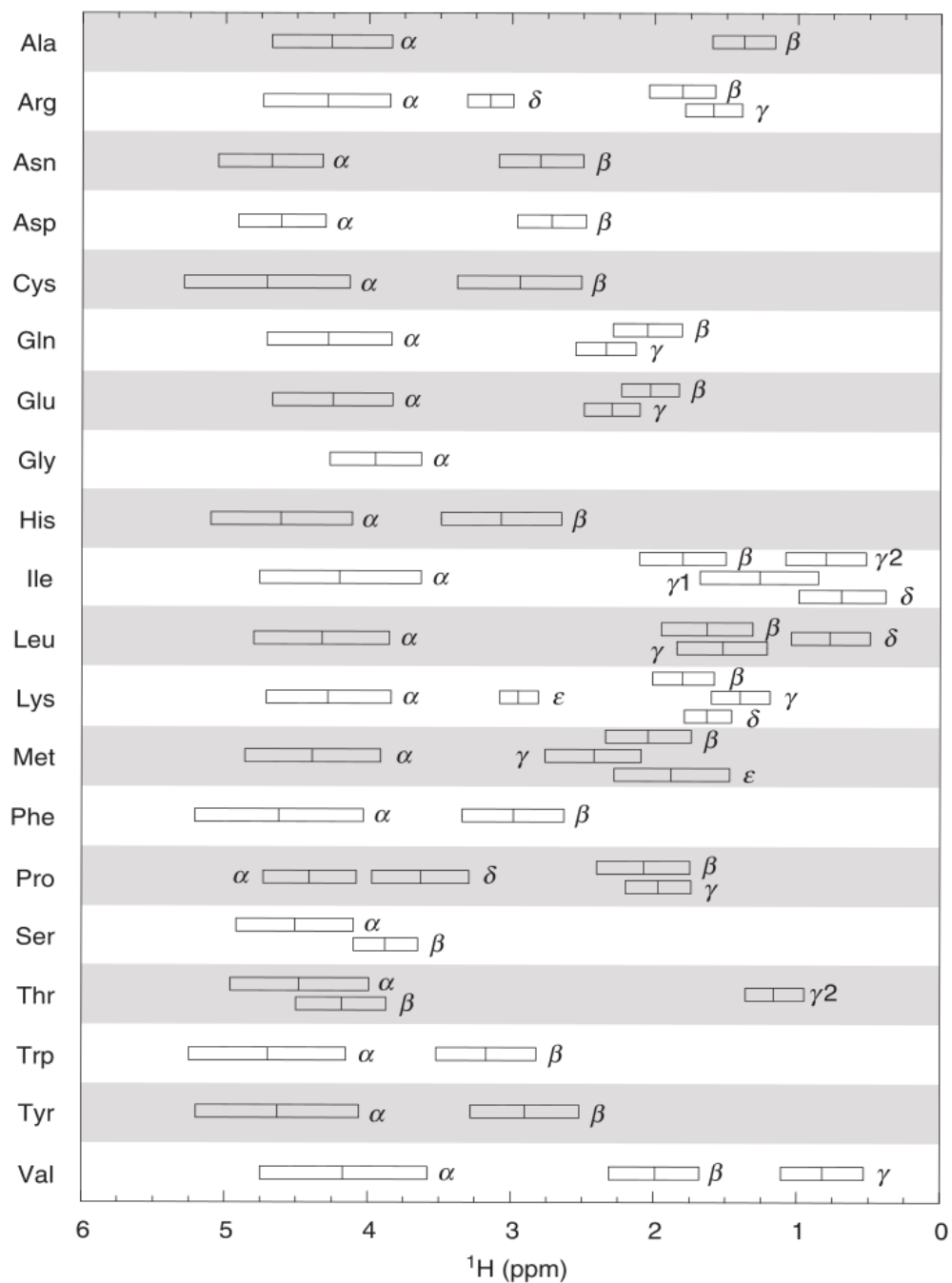
Podle zmíněného obrázku lze aminokyseliny rozdělit, především na základě chemického posunu jader C^β uhlíků, do několika skupin. C^β aminokyselin Val, Trp, Pro, Met, Lys, His, Glu, Gln, Cys (redukovaného) a Arg mají chemický posun okolo 30 ppm (v Obr. 8, str. 34 jsou v zeleném poli), kdežto C^β Tyr, Phe, Leu, Ile, Cys (oxidovaného), Asp a Asn mají posun okolo 45-50 ppm (v Obr. 8, str. 34 jsou v červeném poli). Pak jsou zde aminokyseliny Ser a Thr (v Obr. 8, str. 34 jsou vyznačeny modře), jejichž typické chemické posuny C^β jsou okolo 60-70 ppm. Ala je naopak jediná aminokyselina, jejíž signál pro C^β se vyskytuje okolo 20 ppm (v Obr. 8, str. 34 vyznačen fialově). Nepřítomnost signálu pro C^β ukazuje na Gly.

Tyto informace jsou tedy pro správnou identifikaci aminokyselin nedostačující, proto je vhodné provést i experimenty, které nám poskytnou informaci o pozici atomů postranních řetězců (jak uhlíkových, tak vodíkových).



Obr. 8 Chemické posuny signálů pocházejících od alifatických uhlíků esenciálních aminokyselin.^[34]

Na Obr. 9 jsou znázorněny chemické posuny signálů jader alifatických vodíků jednotlivých aminokyselin. Z obrázku je vidět, že signály postranních řetězců bude u některých aminokyselin těžké specifikovat, jelikož zde často dochází k překryvu.



Obr. 9 Chemické posuny signálů pocházejících od alifatických vodíků esenciálních aminokyselin.^[34]

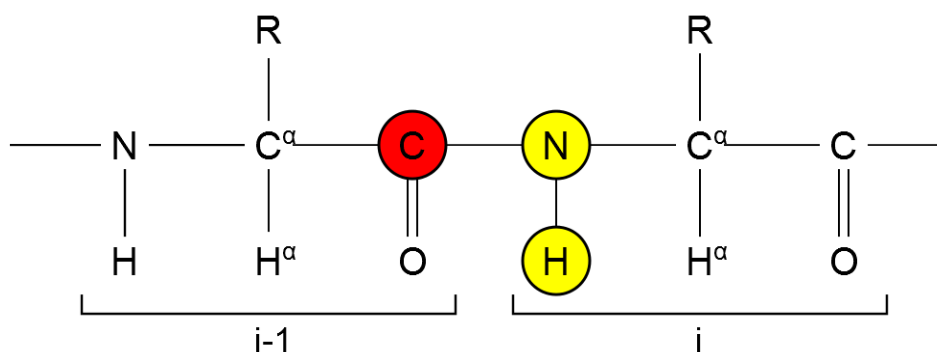
4.14) Přiřazení atomů peptidové páteře

Přiřazení atomů páteře peptidu lze teoreticky rozdělit do dvou fází. Přiřazení signálů karbonylových uhlíků a přiřazení signálů C^α uhlíků, které jde ruku v ruce s přiřazením signálů uhlíků C^β . Tyto dva postupy však prakticky oddělit nelze. Pro správnou identifikaci typu aminokyselinových zbytků a jejich pořadí v sekvenci se nelze obejít bez znalosti chemických posunů jejich jednotlivých atomů a primární struktury proteinu.

4.14.(A) Přiřazení signálů uhlíků karbonylu

HNCO experiment

Ve spektru tohoto experimentu jsou patrné signály karbonylových uhlíků, které jsou kovalentně vázány na konkrétní $^1H^{15}N$ dvojici. Dochází tedy k detekci karbonylového uhlíku předchozí aminokyseliny v řetězci (Obr. 10).



Obr. 10 Schéma peptidové páteře s vyznačením atomů, jejichž signál je patrný v HNCO spektru.

Dochází zde ke korelaci mezi H_iN_i skupinou a C_{i-1}^β atomem.^[34]

HN(CA)CO experiment

Na základě tohoto experimentu je možné přiřadit jedné dvojici $^1H^{15}N$ atom uhlíku karbonylu té samé aminokyseliny a navíc zde získáme i chemický posun pro karbonylový uhlík aminokyseliny předchozí (Obr. 11, str 37).

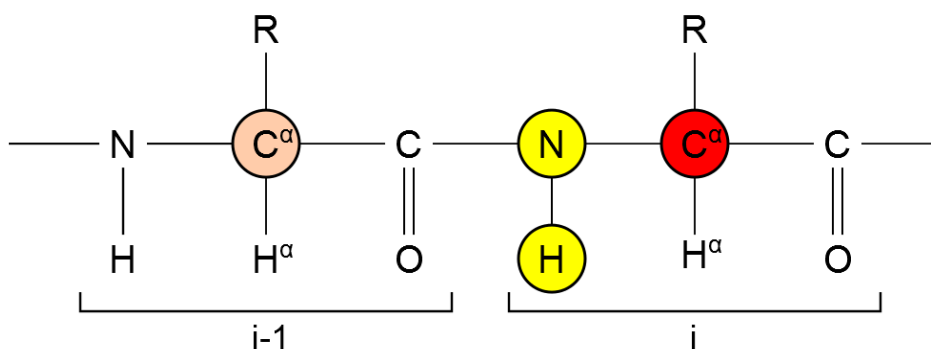
Oba dva tyto experimenty mají v uhlíkové dimenzi dobrou disperzi signálů, jejichž frekvence přímo závisí na struktuře proteinu a jsou tedy pro každý protein unikátní.

4.14.(B) Přřazení signálů uhlíků C^α a C^β

HNCA, HN(CO)CA

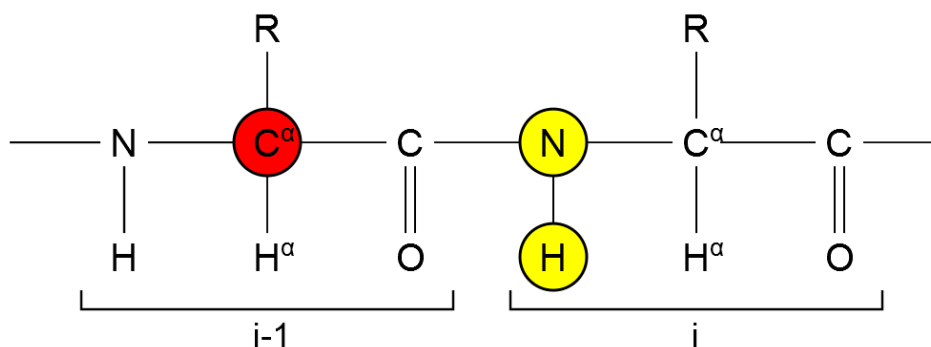
Ve spektru HNCA můžeme identifikovat signály uhlíků C^α té samé aminokyseliny, které přísluší dvojici $^1H^{15}N$ a slabší signály C^α uhlíku aminokyseliny předchozí (Obr. 13).

Experiment HN(CO)CA je založen a přenosu magnetizace z amidového vodíku na dusík, ze kterého je dále po vazbách přenesena na uhlík karbonylu předcházející aminokyseliny, ze kterého pokračuje na C^α uhlík (Obr. 14). Detekce pak probíhá na amidovém vodíku^[34]. Protože ve spektru HNCA experimentu nemusí být vždy pozorovatelná korelace H_iN_i na C^{α}_{i-1} , je vhodné oba tyto experimenty zkombinovat.



Obr. 13 Schéma peptidové páteře s vyznačením atomů, jejichž signál je patrný v HNCA spektru.

Zde dochází ke korelaci mezi H_iN_i dvojicí a C^α uhlíkem předchozí i vlastní aminokyseliny.^[34]



Obr. 14 Schéma peptidové páteře s vyznačením atomů, jejichž signál je patrný v HN(CO)CA spektru.

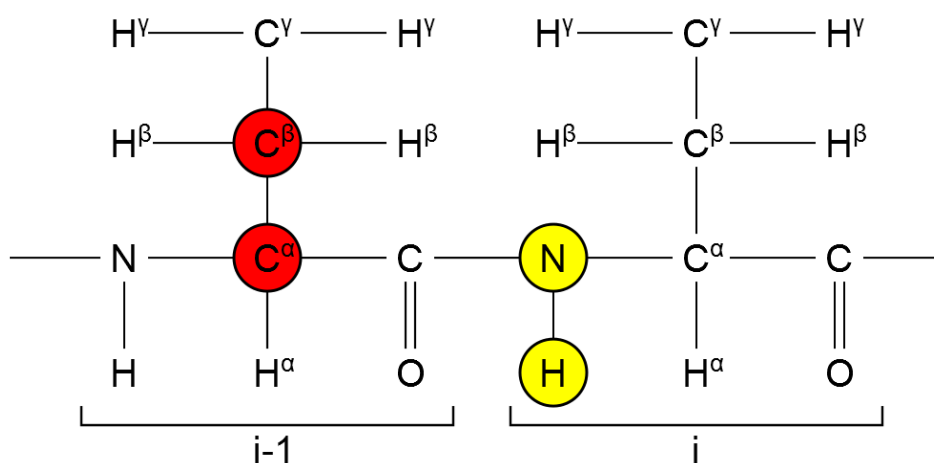
V tomto spektru je patrná korelace mezi H_iN_i a C^α uhlíkem předchozí aminokyseliny.^[34]

Sekvenční přřazení probíhá stejným způsobem, jako bylo popsáno v odstavci 4.14.(A) a zároveň ukázáno na Obr. 12, str. 37.

CBCA(CO)NH, HNCACB

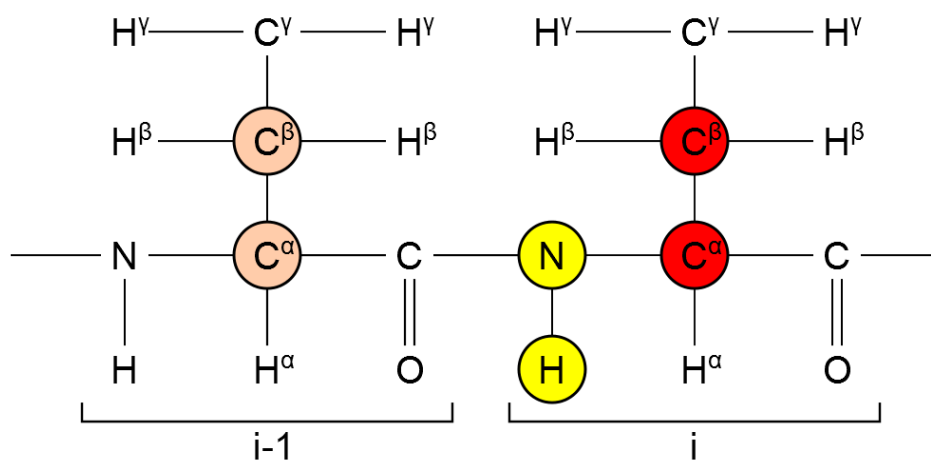
Dalšími dvěma experimenty, které byly využity pro přiřazení signálů C^α atomům, jsou *CBCA(CO)NH* a *HNCACB*. Z obou dvou je navíc možné získat informaci o chemickém posunu jader C^β uhlíků a tedy typu aminokyseliny, jak bylo diskutováno v odstavci 4.13 a názorně ukázáno na Obr. 8, str. 34.

Ve spektru *CBCA(CO)NH* jsou zřetelné signály C^α a C^β uhlíků předchozí aminokyseliny vzhledem k vybrané dvojici $^1H^{15}N$ (Obr. 15), kdežto u *HNCACB* přísluší jediné kombinaci frekvencí vodíku a dusíku 2 intenzivní signály, které pochází od C^α , C^β uhlíků vlastní aminokyseliny, a dva signály slabší, které pochází od uhlíků C^α a C^β aminokyseliny předchozí (Obr. 16).



Obr. 15 Schéma peptidu s vyznačením atomů, jejichž signál je patrný v *CBCA(CO)NH* spektru.

Zobrazena je zde korelace H_iN_i s C_{i-1}^α a C_{i-1}^β .^[34]



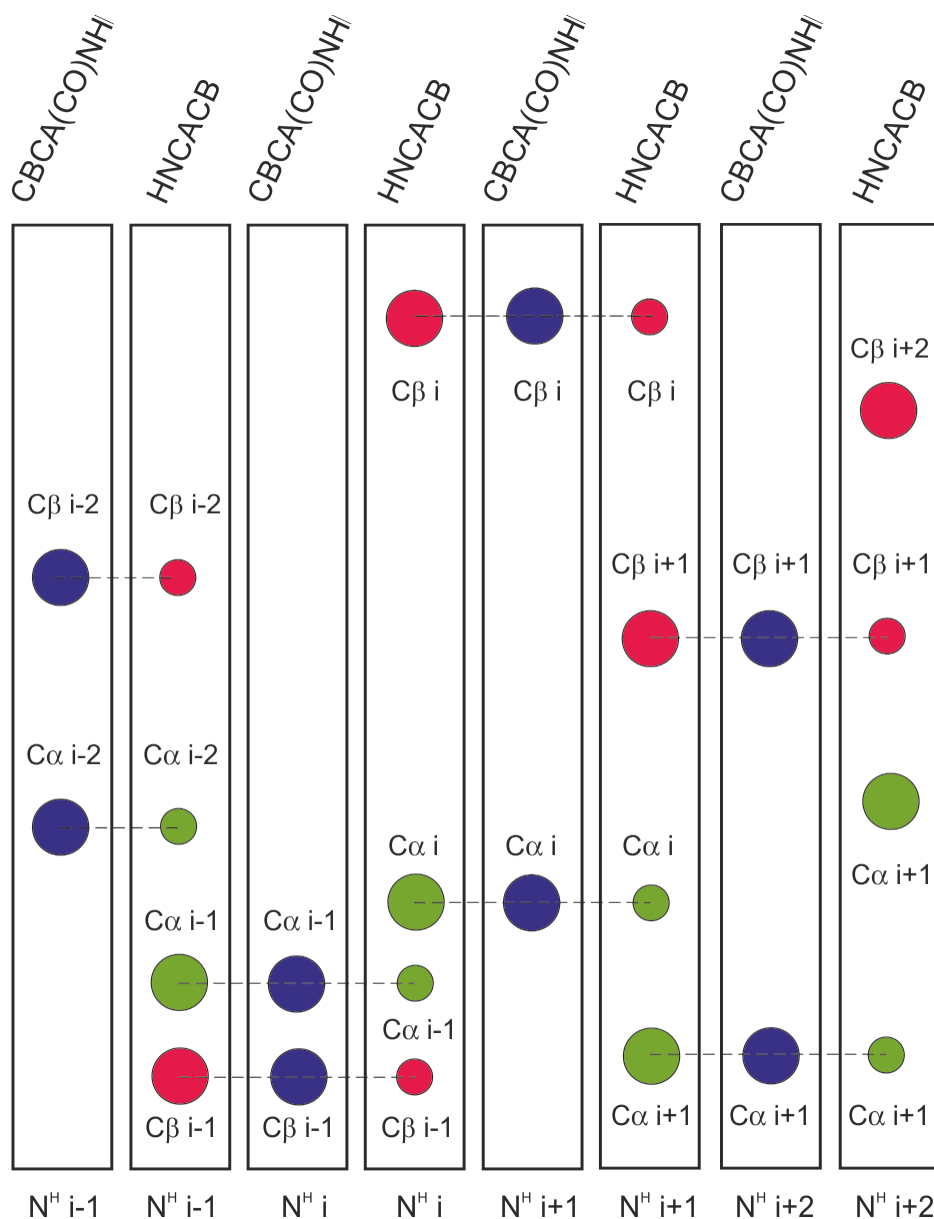
Obr. 16 Schéma peptidu s vyznačením atomů, jejichž signál je patrný v *HNCACB* spektru.

Zde dochází ke korelaci H_iN_i s C_i^α a C_i^β a zároveň s C_{i-1}^α a C_{i-1}^β .^[34]

CBCA(CO)NH a HNCACB experimenty nám oproti HNCA a HN(CO)CA experimentům poskytují více informací, v uhlíkové dimenzi však mají menší citlivost a tedy horší rozlišení.

Na Obr. 17, je obecné schéma postupu přiřazení signálů v těchto spektrech atomům po sobě jdoucích aminokyselin.

Abychom získali informaci o tom, jaké aminokyselině dané signály přísluší a jak na sebe navazují, je vhodné dívat se vždy při jedné frekvenci amidového vodíku a dusíku na všechna dosud zmíněná spektra a informace, které nám samostatně poskytují, vzájemně zkombinovat.



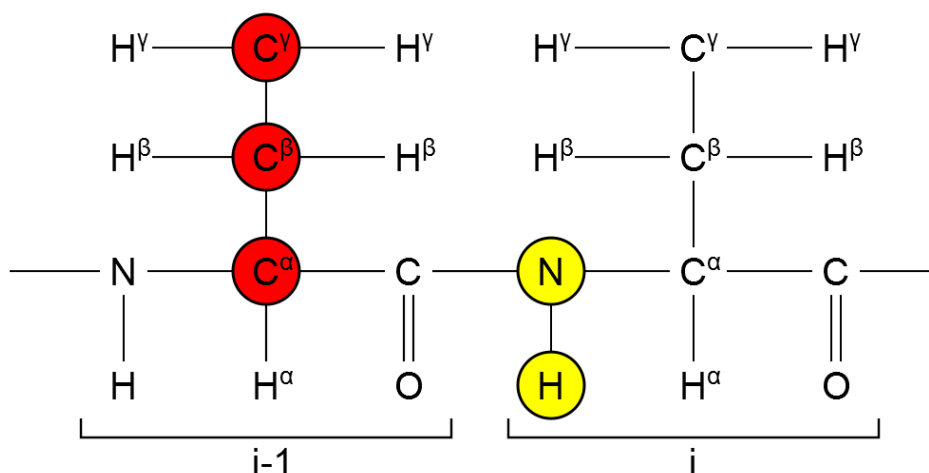
Obr. 17 Obecné schéma postupu přiřazování signálů pro C^α a C^β uhlíky navazujících aminokyselin.

4.15) Přiřazení signálů jader postranních řetězců

4.15.(A) Přiřazení uhlíkových atomů postranních řetězců



Informace, kterou nám toto spektrum poskytne je často klíčová pro ověření identifikace aminokyseliny. Teoreticky jsou zde viditelné signály všech alifatických uhlíků, vyjma uhlíku karbonylu, a to od aminokyseliny předcházející vybraným $^1H^{15}N$ frekvencím (Obr. 18).



Obr. 18 Schéma peptidu s vyznačením atomů, jejichž signály jsou patrné v $(H)CC(CO)NH$ spektru.

V tomto experimentu dochází ke korelaci H_iN_i s C^α atomem peptidové páteře a dalšími uhlíky postranního řetězce předchozí aminokyseliny.^[34]

4.15.(B) Přiřazení vodíkových atomů postranních řetězců

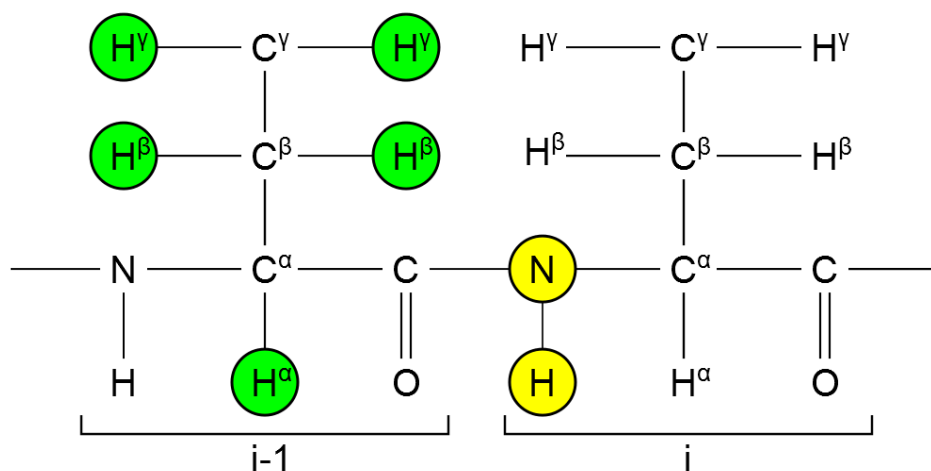


Tento experiment lze považovat co do výsledného spektra za analogický experimentu $(H)CC(CO)NH$, ovšem s rozdílem, že nyní vidíme signály pocházející od alifatických vodíkových atomů postranního řetězce aminokyseliny předcházející vybrané $^1H^{15}N$ dvojici (Obr. 19, str. 42).

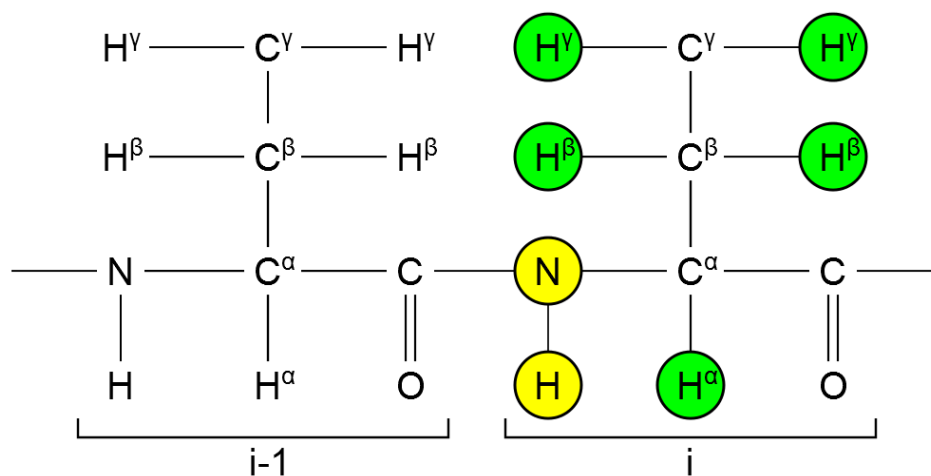


Pro jednodušší identifikaci aminokyselin bylo využito i tohoto spektra, ve kterém jsou patrné signály odpovídající vodíkům postranních řetězců aminokyseliny, které náležejí vybranému $^1H^{15}N$ páru, na jehož frekvencích se ve spektru pohybujeme (Obr. 20, str. 42).

Navíc jsou zde velmi zřetelné i signály, které leží v obou vodíkových dimenzích na frekvenci amidového vodíku a tvoří tak diagonálu.



Obr. 19 Schéma peptidu s vyznačenými atomy, jejichž signály jsou patrné v $H(CC)(CO)NH$ spektru. [34]

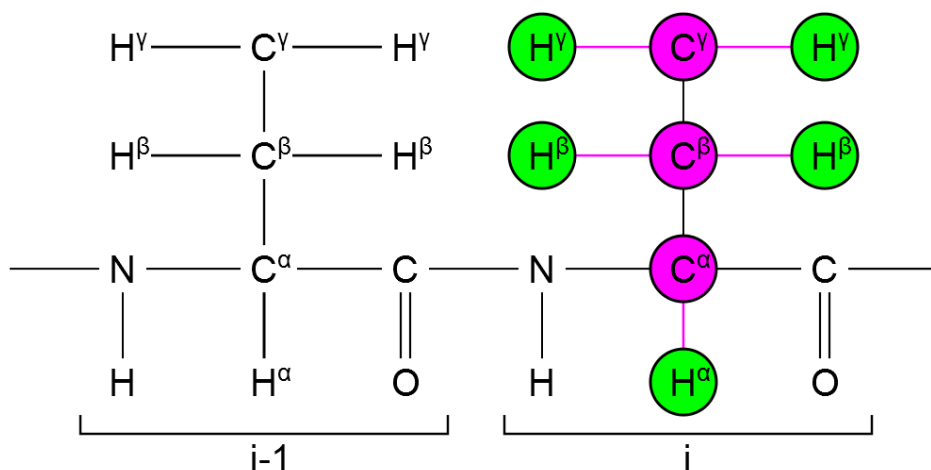


Obr. 20 Schéma peptidu s vyznačenými atomy, jejichž signály jsou patrné z $HN-TOCSY-HSQC$ experimentu, kde dochází ke vzájemné korelaci mezi vodíkovými atomy postranního řetězce ipeptidové páteře a amidovou skupinou. [34]

HCCH-TOCSY

Na rozdíl od ostatních doposud zmíněných experimentů v HCCH-TOCSY nedochází ke korelaci H_iN_i , ale C_iH_i s ostatními vodíkovými atomy v postranním řetězci (Obr. 21). Jeho rozlišení je vyšší než rozlišení experimentů $(H)CC(CO)NH$, $H(CC)(CO)NH$ a HN-TOCSY-HSQC. Pokud zvolíme dvojici frekvencí pro uhlíkový a jemu odpovídající vodíkový atom, jsme schopni dohledat signály od ostatních vodíkových atomů v řetězci – takto pro každý $^1H^{13}C$ pár.

Většinou je zde možné rozlišit i signály, které jsou v $H(CC)(CO)NH$ a HN-TOCSY-HSQC spektrech nerozlišitelné. To především na základě faktu, že v každé rovině zvolené dvojice $^1H^{13}C$ je zde diagonální signál - například na pozici $^{13}C^\delta-^1H^{\delta 1}-^1H^{\delta 1}$ a další na frekvenci $^{13}C^\delta-^1H^{\delta 2}-^1H^{\delta 2}$, čímž je možné tyto signály odlišit a správně určit.



Obr. 21 Schéma peptidu s vyznačenými atomy, jejichž signály jsou patrné v HCCH-TOCSY spektru.

Na rozdíl od všech doposud zmíněných experimentů zde nedochází ke korelaci vodíkových atomů postranních řetězců na H_iN_i , ale na C_iH_i .^[34]

(C) PREDIKCE SEKUNDÁRNÍCH STRUKTUR

Pro predikci sekundárních struktur proteinu bylo využito tří metod.

1) *PSIPRED*, který je založen na vytvoření lokálních srovnání sekvencí. Vstupní informací této metody je pouze aminokyselinová sekvence proteinu ve FASTA formátu^[35].

2) *GeNMR* je metoda, pro kterou jsou vstupními údaji aminokyselinová sekvence a chemické posuny jader (minimálně ^1H , ^{15}N). Na základě prohledání PDB a PPT databáze pak vytvoří strukturní model – pokud je to vzhledem ke kvalitě vstupních údajů možné^[36].

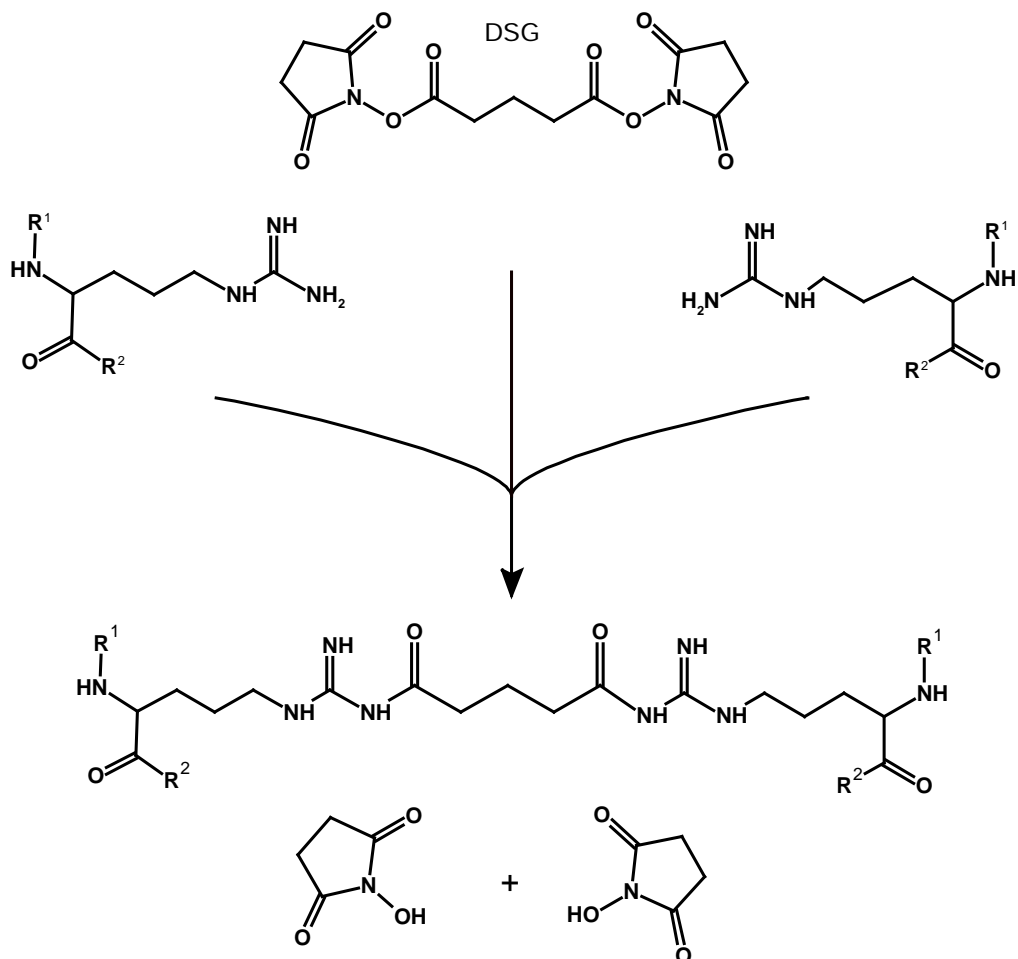
3) *TALOS+* je program, který rozdělí aminokyselinovou sekvenci peptidu na tripeptidy a jim pak na základě interní databáze 200 proteinů, u kterých jsou více méně kompletní chemické posuny jader atomů proteinové páteře a zároveň dostupné PDB koordináty krystalových struktur, přiřadí adekvátní hodnoty torsních úhlů ϕ a ψ . Kromě aminokyselinové sekvence je nutné zadat jako vstupní data i chemické posuny příslušných jader^[37].

(D) CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ

4.16) Reakce proteinu se síťovacími činidly

4.16.(A) *DSG, DSS*

Pro reakce byla vybrána dvě homobifunkční činidla: DSG, jehož spojovací raménko je dlouhé 7,7 Å, a DSS s raménkem dlouhým 11,4 Å. Obě činidla jsou ve formě NHS esteru schopná reagovat s funkčními skupinami nukleofilního charakteru, se kterými následně tvoří vazbu (za současného odstoupení NHS skupiny) – Obr. 22. V rámci proteinu reakce probíhají především s primární aminoskupinou na N-konci a ε-aminoskupinou lysinu. Nelze však 100% vyloučit adukty na serinu, tyrosinu, případně histidinu. Tyto vazby však nejsou dostatečně stabilní a (především v alkalických podmínkách) podléhají hydrolyze.^{[38][39][40]}



Obr. 22 Reakce DSG se dvěma aminoskupinami za odstoupení NHS skupiny činidla

Celkem byly pipetovány – pro DSG a DSS zvlášť – tři reakce, kdy byla činidla v třímolárním, devítimolárním a dvacetisedmimolárním nadbytku oproti proteinu, jehož množství bylo 50 µg na reakci. Směs byla ponechána reagovat po dobu 1 hod při laboratorní teplotě. Pro jednodušší interpretaci naměřených dat byly použity směsi činidel, obsahující deuterovaná/nedeuterovaná činidla rozpuštěná v DMSO v poměru 1:1 (připravena Mgr. Zdeňkem Kukačkou a RNDr. Danielem Kavanem, Ph.D.).

4.16.(B) EDC

Dalším vybraným činidlem bylo heterobifunkční EDC, které zprostředkovává tvorbu amidové vazby mezi dvěma odlišnými funkčními skupinami přítomnými v rámci proteinu. Je to tedy činidlo s nulovou délkou spojovacího raménka. Reakce je v tomto případě dvoukroková, kdy v prvním kroku činidlo reaguje s karboxylovou skupinou peptidu, což vede ke vzniku vysoce reaktivního intermediátu ve formě esteru, který je následně atakován nukleofilní skupinou za vzniku amidové vazby (Obr. 23, str. 47).^{[39][41]}

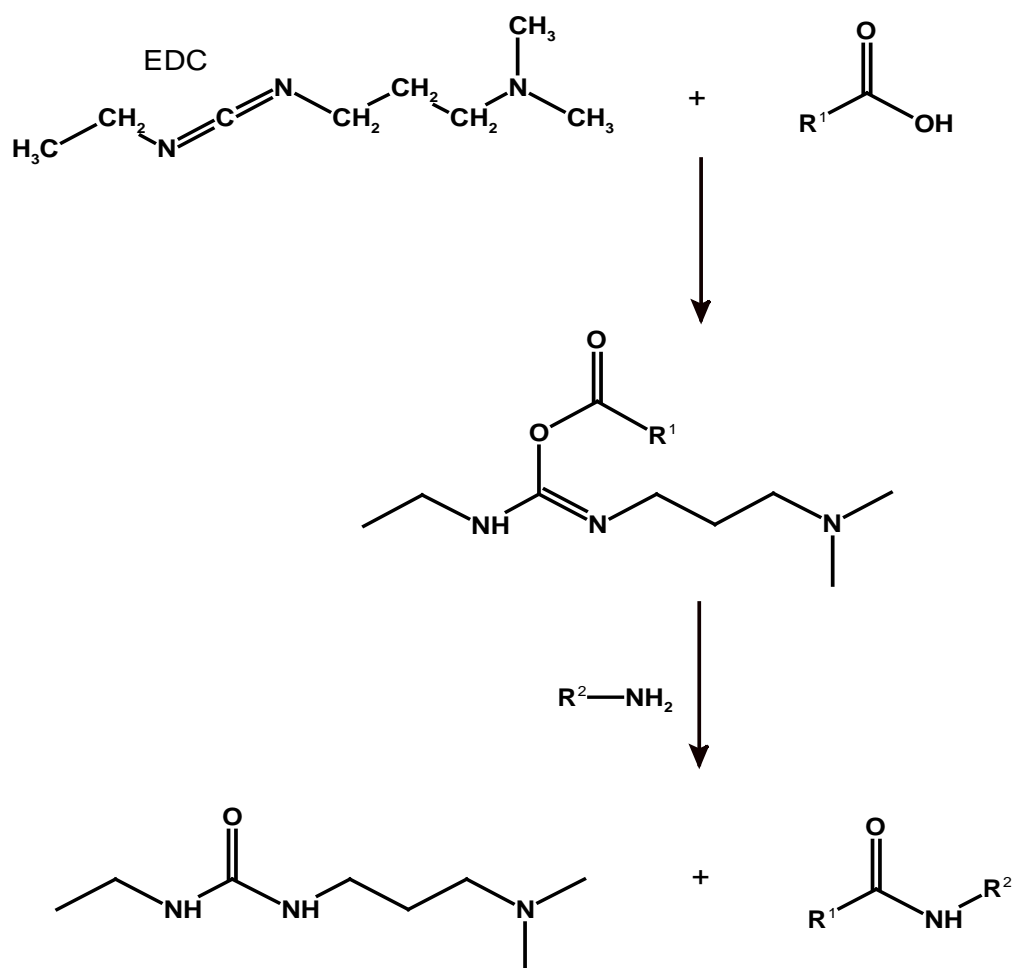
V případě tohoto činidla byly pipetovány 4 reakce, kdy EDC bylo v padesáti, sto, dvouset a pětisetmolárním nadbytku oproti proteinu (50 µg/reakce). Inkubace v tomto případě probíhala po dobu 4 hod při laboratorní teplotě. EDC bylo pro reakce připraveno rozpuštěním v 500 µl 50mM roztoku pyridinu a 100mM NaCl (bez úpravy pH).

4.17) **Výběr vhodných reakčních podmínek – gradientová NuPAGE**

Po zreagování směsí následovalo vysušení vzorků pod vakuem a jejich opětovné rozpuštění v příslušných pufrech (cca 70 ml).

K 21 µl jednotlivých vzorků bylo pipetováno 7 µl NuPAGE vzorkového pufru a DTT, jehož finální koncentrace byla 50mM. Připravené vzorky byly po dobu 3 min zahřáty na 95 °C, centrifugovány (12000× g) a naneseny do jamek prefabrikovaného, 4-12% gradientového Bis-Tris gelu. Spolu se vzorky byl do krajní jamky gelu pipetován v objemu 5 µl marker. Elektroforéza probíhala v prostředí MES SDS elektrodového pufru za konstantního napětí 200 V. Po doputování vzorků byly gely obarveny a následně odbarveny.

Na základě výsledku této elektroforézy byly vybrány vhodné reakční podmínky pro zesílení proteinu. S těmito podmínkami byly reakce i elektroforéza stejným způsobem zopakována. Tentokrát byl v každém gelu navíc přítomen vzorek obsahující negativní kontrolu – protein nevystavený vlivu síťovacích činidel. Ten byl na gel nanesen v množství 25 µg.



Obr. 23 Reakce EDC se dvěma různými funkčními skupinami, u kterých dojde k propojení amidovou vazbou

Po obarvení a odbarvení byly proužky gelu obsahující proteiny vyříznuty skalpelem, nakrájeny na malé kostičky o velikosti cca 1 mm³ a rozděleny vždy do dvou mikrozkušavek. Nařezané kousky byly pro důkladné odbarvení převrstveny 200 μl roztoku obsahujícího 100mM ethylmorfolin (pH 8,4) a acetonitril v poměru 1:1. Po 1 hod byl roztok vyměněn za čistý. Po dalších 3 hod byly kousky gelu již dostatečně odbarveny a po odebrání odbarvovacího roztoku převrstveny acetonitrem. Po pěti minutách byl acetonitril odebrán a kousky gelu rehydratovány dH₂O. Cyklus dehydratace (AcN) a rehydratace (dH₂O) byl proveden celkem třikrát.

4.18) Štěpení endopeptidasami

Jedna polovina kostiček gelu se zaputovanými proteiny byla převrstvena 35 μ l pufru obsahujícího 50mM ethylmorfolin (pH 8,23) a 10% AcN, ke kterému byl přidán 1 μ l roztoku s peptidasou trypsinem. Druhá polovina kostiček byla převrstvena 35 μ l 50mM kyseliny octové (pH 4,0) s 10% AcN, ke které byly pipetovány vždy 3 μ l roztoku peptidasy GluC. Štěpení probíhalo v obou případech přes noc při laboratorní teplotě.

Obě vybrané peptidasy patří do skupiny serinových peptidas, pro něž je charakteristická přítomnost katalytické triády (sestavající z aminokyselin His, Asp, Ser), která se podílí na hydrolýze substrátu – především prostřednictvím vodíkových vazeb, které formuje jak v rámci katalytické triády a aktivního serinu, tak i se substrátem samotným.^{[42][43][44]}

Trypsin i GluC navíc patří do stejné rodiny – rodiny chymotrypsinových peptidas.^[45] Specifita enzymů je však jiná. Trypsin zprostředkovává hydrolýzu peptidového řetězce na C-konci aminokyselin Arg a Lys (v menší míře i za hydrofobními aminokyselinami Phe, Tyr, Trp)^[42], zatímco GluC štěpí peptidovou vazbu v místě karbonylu za negativně nabitými Glu a v menší míře i za Asp.^[44]

4.19) Izolace peptidů

Aby bylo možné získat peptidy vzniklé štěpením endopeptidasami z gelu, byly vzorky centrifugovány (12000 \times g) – získané směsi byly pipetovány do čistých mikrozkuvek a následně pod vakuem ponechány odpařit na objem cca 2 μ l. Ke vzorkům byly pipetovány 2 μ l roztoku 80% AcN a 0,5% TFA a následně ještě 25 μ l 0,1% roztoku TFA. Takto byly vzorky 15 min sonikovány.

Pro separaci proteinů od látek, které by mohly rušit hmotnostně spektrometrickou analýzu, bylo použito mikrokolonky, jejíž náplň sestává z velkých polymerních částic hydrofobního charakteru. Jelikož byla eluce peptidů z kolonky zprostředkována tzv. iontově párovým činidlem (TFA), lze tuto metodu připodobnit k chromatografii na obrácené fázi.

Kolonka byla před nanesením vzorku 2 \times promyta roztokem „A“ (0,1% TFA), 1 \times roztokem „B“ (80% AcN, 0,1% TFA) a opět 2 \times roztokem „A“. Na takto připravenou kolonku byl nanesen vzorek. Následovalo odsolení, kdy byla kolonka 2 \times promyta roztokem „A“. Eluce proteinu probíhala promytím kolonky 10 μ l roztoku „C“ (80% AcN, 1% TFA) a roztokem „B“. Eluát (10 μ l roztoku „C“ a prvních 40 μ l roztoku „B“) byl jímán do čisté mikrozkuvky. Následně byla kolonka 2 \times promyta roztokem „A“, čímž byla připravena na pro nanesení dalšího vzorku. Tímto způsobem byly zpracovány všechny vzorky.

Po odsolení byly vzorky opět zakoncentrovány (na cca 2 μ l) a následně smíchány s 2 μ l 80% AcN s 0,5% TFA, ke kterým bylo přidáno ještě 25 μ l 0,1% TFA.

Vzorky byly převedeny do viálek uzavřených septem a předány RNDr. Petrovi Novákovi, Ph.D. (MBÚ AV ČR Praha), který provedl jejich analýzu technikou hmotnostní spektrometrie.

(5) VÝSLEDKY

(A) PRODUKCE ^{13}C , ^{15}N ZNAČENÉ EXTRACELULÁRNÍ DOMÉNY DCL-1

Proteinový konstrukt, použitý v této práci, byl vytvořen na základě extracelulární domény proteinu DCL-1 (Obr. 24).



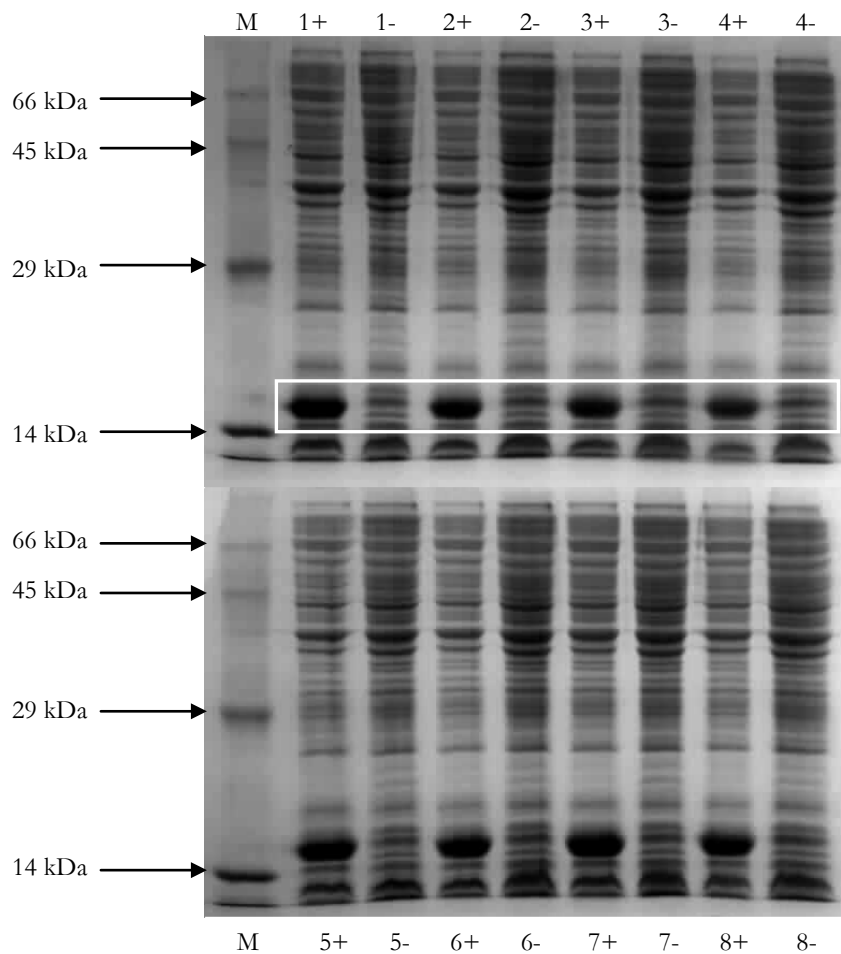
Obr. 24 Aminokyselinová sekvence DCL-1 s vyznačenými doménami a sekvencí proteinového konstruktů připraveného na základě C-lektinové domény receptoru.

SP – sekvence signálního peptidu, silným písmem je vyznačena sekvence proteinového konstruktů ($\text{D}^{23}\text{-R}^{162}$), CTLD – C-lektinová doména ($\text{D}^{23}\text{-L}^{152}$ žlutě), zeleně – krček, modře – transmembránová doména, červeně – intracelulární doména.

Molekulová hmotnost produkovaného proteinu je 16 240 Da a jeho teoretický isoelektrický bod se nachází na úrovni pH 4,3.

5.1) Výběr vhodných produkčních klonů transformovaných buněk

Na základě výsledku SDS-PAGE (fotografie gelu na Obr. 25, str. 51) pokusné produkce proteinu v kapalném médiu indukované 0,5mM IPTG, byly vybrány 4 bakteriální kultury (1, 2, 3 a 4) kterými bylo zaočkováno vždy 0,5 l připraveného M9 minimálního média.



Obr. 25 Fotografie gelu SDS-PAGE pokusné produkce proteinu – proteinové složení bakteriálního lyzátu.

Vyznačené kultury (1–4) byly vybrány za vhodné producenty DCL-1.

V první dráze marker (M), v každé sudé pak vzorky z bakteriálních kultur indukovaných IPTG (+), v lichých drahách naopak kultury bez indukce (-).

5.2) Produkce proteinu ve velkém objemu

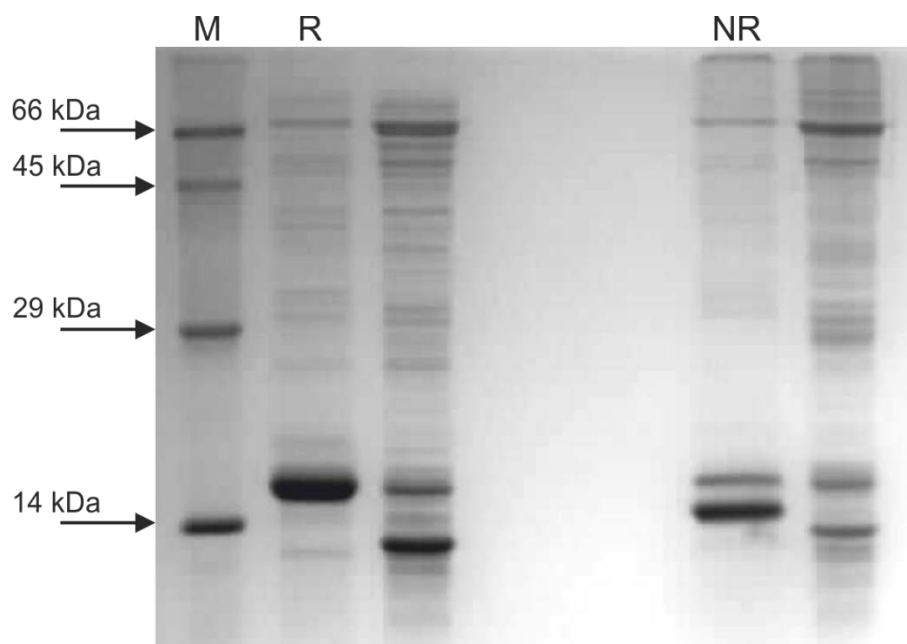
Po 4, 6 a 11 hodinách od začátku inkubace byla změřena absorbance vzorků odebraných z bakteriálních kultur produkovaných v minimálním médiu – Tab. 2, str. 52. Indukce 0,5mM IPTG proběhla právě po 11 hod.

Tab. 2 Naměřené hodnoty absorpance (měřeno při vlnové délce 550 nm) vzorků bakteriálních kultur pěstovaných v M9 minimálním médiu.

čas od počátku inkubace	kultura č. 1 optická hustota	kultura č. 2 optická hustota	kultura č. 3 optická hustota	kultura č. 4 optická hustota
4 hod	0,06	neměřeno		
6 hod	0,15	0,07	0,15	0,14
11 hod	0,85	0,76	0,86	0,85

5.3) Izolace inkluzních tělísek, renaturace

Naprodukované proteiny, izolované z médií ve formě inkluzních tělísek, která byla renaturována, převedena do fyziologických podmínek a zakoncentrována, byly naneseny do jamek zaostřovacího gelu SDS-PAGE. Nanáška proteinu byla přibližně 2 µg na jamku s tím, že jednou byl vzorek smíchán s redukujícím a podruhé s neredukujícím SDS vzorkovým pufrům (fotografie gelu na Obr. 26). Z fotografie je patrný posun zóny proteinu v neredukujících podmínkách, což může ukazovat na zapojení disulfidových můstků.

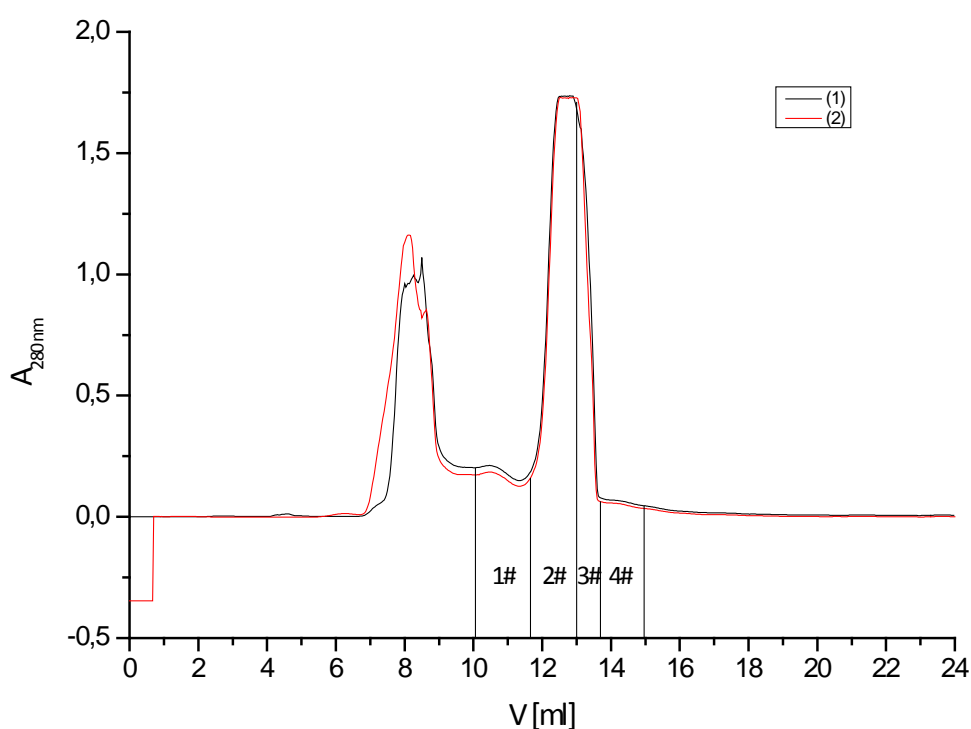


Obr. 26 Fotografie gelu SDS-PAGE renaturovaného DCL-1.

V první dráze marker (M), ve dráze označené (R) vzorek obsahující DCL-1 v redukujících podmínkách, (NR) značí neredukující podmínky stanovení. Neoznačené dráhy nemají s tímto experimentem žádnou souvislost.

5.4) Purifikace proteinu

Agregáty přítomné ve vzorku (patrné na Obr. 26, str. 52) byly odstraněny metodou gelové permeační chromatografie. Touto metodou byl zároveň protein převeden do pufru vhodnějšího pro NMR měření. S ohledem na kapacitu kolony byl vzorek rozdělen na dvě části (300 μ l a 290 μ l) – metoda tedy byla provedena dvakrát. Záznam hodnot absorbance eluátu i s označením frakcí, které byly dále zakoncentrovány a využity k naměření NMR dat, je na Obr. 27.



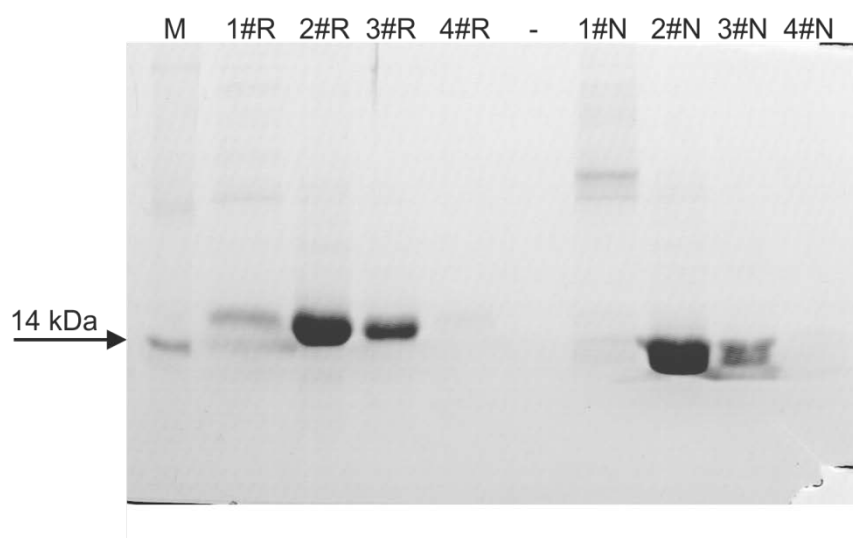
Obr. 27 Graf závislosti absorbance na objemu mobilní fáze.

Kolona Superdexu 75 HR, rychlost průtoku elučního činidla kolonou 0,4 ml/min, absorbance měřena při 280 nm.

Černá křivka (1) znázorňuje první nástřik vzorku v objemu 300 μ l, červená křivka znázorňuje druhý nástřik v objemu 290 μ l. S vyznačenými frakcemi byla provedena SDS elektroforéza, frakce 2# a 3# byly dále připraveny pro NMR měření.

Pro další využití byly uchovány frakce s označením 2# a 3# posbírané mezi 29,7-34,4 min (tomuto odpovídá cca 11,9-13,7 ml elučního činidla).

Frakce 1# - 4# byly naneseny na SDS elektroforézu v redukujících i neredukujících podmínkách, jejíž výsledek je zobrazen na Obr. 28.



Obr. 28 Fotografie gelu SDS elektroforézy provedené s frakcemi z gelové filtrace (viz Obr. 27, str.53) v redukujících (R) a neredukujících (N) podmínkách.

Na fotografii gelu (Obr. 28) je patrný posun zóny proteinu v neredukujících podmínkách, který ukazuje na zapojení disulfidových můstků. Čistota proteinu byla po purifikaci značně vysoká – pro NMR měření dostačující.

5.5) Stanovení koncentrace proteinu

Frakce 2# a 3# z gelové filtrace byly spojeny a zakoncentrovány na 0,5 ml. Následně v nich bylo stanoveno množství proteinu metodou dle Bradfordové. Měření bylo provedeno dvakrát.

Na základě naměřených absorbancí kalibračních roztoků (Tab. 3 a Tab. 4, str. 55) byly zkonstruovány kalibrační přímky (Obr. 29, str. 55), přičemž získané rovnice regrese byly použity pro výpočet množství proteinů v našem vzorku, který byl pro stanovení 10×, 100× a 150× naředěn (Tab. 5 a Tab. 6, str. 56).

Tab. 3 Naměřené hodnoty absorbance odpovídající kalibračním roztokům (měření (1))

koncentrace standardu [mg/ml]	$A_{595\text{ nm}}$		$\bar{\varnothing} A_{595\text{ nm}}$	$(\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}) - (\bar{\varnothing}A_{dH_2O})$
0,0	0,2916	0,2880	0,2898	0,0000
0,1	0,3418	0,3593	0,3506	0,0608
0,2	0,4153	0,4075	0,4114	0,1216
0,3	0,5219	0,4948	0,5084	0,2186
0,4	0,5334	0,5629	0,5482	0,2584
0,5	0,5818	0,5921	0,5870	0,2972

$A_{595\text{ nm}}$: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 595 nm (stanovení podle Bradfordové)

$\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}$: zprůměrované hodnoty naměřených absorbancí (duplety)

$(\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}) - (\bar{\varnothing}A_{dH_2O})$: průměrné hodnoty absorbancí po odečtení slepého vzorku (dH₂O)

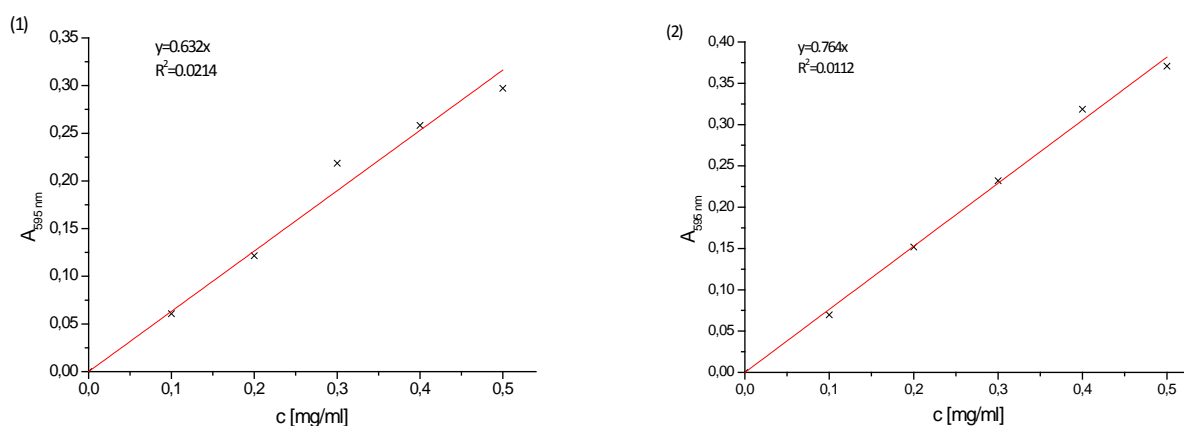
Tab. 4 Naměřené hodnoty absorbance odpovídající kalibračním roztokům (měření (2))

koncentrace standardu [mg/ml]	$A_{595\text{ nm}}$		$\bar{\varnothing} A_{595\text{ nm}}$	$(\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}) - (\bar{\varnothing}A_{dH_2O})$
0,0	0,3230	0,3120	0,3175	0,0000
0,1	0,3826	0,3920	0,3873	0,0698
0,2	0,4727	0,4660	0,4694	0,1519
0,3	0,5344	0,5646	0,5495	0,2320
0,4	0,6508	0,6178	0,6343	0,3168
0,5	0,6641	0,7125	0,6883	0,3708

$A_{595\text{ nm}}$: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 595 nm (stanovení podle Bradfordové)

$\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}$: zprůměrované hodnoty naměřených absorbancí (duplety)

$(\bar{\varnothing}A_{595\text{ nm}}) - (\bar{\varnothing}A_{dH_2O})$: průměrné hodnoty absorbancí po odečtení slepého vzorku (dH₂O)



Obr. 29 Kalibrační přímky pro stanovení koncentrace proteinů metodou podle Bradfordové konstruované na základě hodnot absorbance naměřených pro standardní roztoky BSA při vlnové délce 595 nm. V prvním stanovení (1) má směrnice přímky hodnotu 0,632, ve druhém (2) 0,764. V obou případech se směrodatná odchylka pohybuje v rámci setin.

Tab. 5 Naměřené hodnoty absorbance pro ředěný vzorek pocházející z gelové filtrace, včetně vypočtených hodnot koncentrace proteinu. Měření (1)

ředění vzorku	A _{595 nm}		Ø A _{595 nm}	(ØA _{595nm})-(ØA _{dH2O})	korekce ředění	koncentrace proteinů ve vzorku [mg/ml]	průměrná koncentrace proteinů*
10×	0,5240	0,5581	0,5411	0,2513	2,513	3,97	7,69 [mg/ml] = 0,47mM
100×	0,3732	0,3509	0,3621	0,0723	7,23	11,4	
150×	0,4021	0,3650	0,3836	0,0938	14,1	22,3	

A_{595 nm}: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 595 nm (stanovení podle Bradfordové)

ØA_{595 nm}: zprůměrované hodnoty naměřených absorbancí (duplety)

(ØA_{595 nm}) - (ØA_{dH2O}): průměrné hodnoty absorbancí po odečtení slepého vzorku (dH₂O) – viz Tab. 3, str. 55.

Výpočet hodnoty koncentrace pro 10× ředěný vzorek:

$$y = (kx + q) \times 10 \rightarrow x = 10 \times \frac{y}{k} + 0 = 10 \times \frac{0,2513}{0,6325} = \underline{\underline{3,97 \text{ mg/ml}}}$$

- výpočty pro zbylé vzorky analogicky

Převedení hmotnostní koncentrace na koncentraci molární (C_M):

$$c_M = \frac{n}{V} = \frac{m}{MV} \rightarrow c_M = \frac{7,69}{16212 \times 1} = \underline{\underline{0,47 \text{ mM}}}$$

* pro výpočet průměrné hodnoty koncentrace nebyla použita hodnota 150× ředěného vzorku

Tab. 6 Naměřené hodnoty absorbance pro ředěný vzorek pocházející z gelové filtrace, včetně vypočtených hodnot koncentrace proteinu. Měření (2)

ředění vzorku	A _{595 nm}		Ø A _{595 nm}	(ØA _{595 nm})-(ØA _{dH2O})	korekce ředění	koncentrace proteinů ve vzorku [mg/ml]	průměrná koncentrace proteinu
10×	0,6857	0,7952	0,7405	0,4230	4,23	5,54	7,40 [mg/ml] = 0,46mM
100×	0,3890	0,3894	0,3892	0,0717	7,17	9,39	
150×	0,3448	0,3643	0,3546	0,0371	5,56	7,28	

A_{595 nm}: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 595 nm (stanovení podle Bradfordové)

ØA_{595 nm}: zprůměrované hodnoty naměřených absorbancí (duplety)

(ØA_{595 nm}) - (ØA_{dH2O}): průměrné hodnoty absorbancí po odečtení slepého vzorku (dH₂O) – viz Tab. 4, str. 55.

Výpočty koncentrací viz Tab. 5.

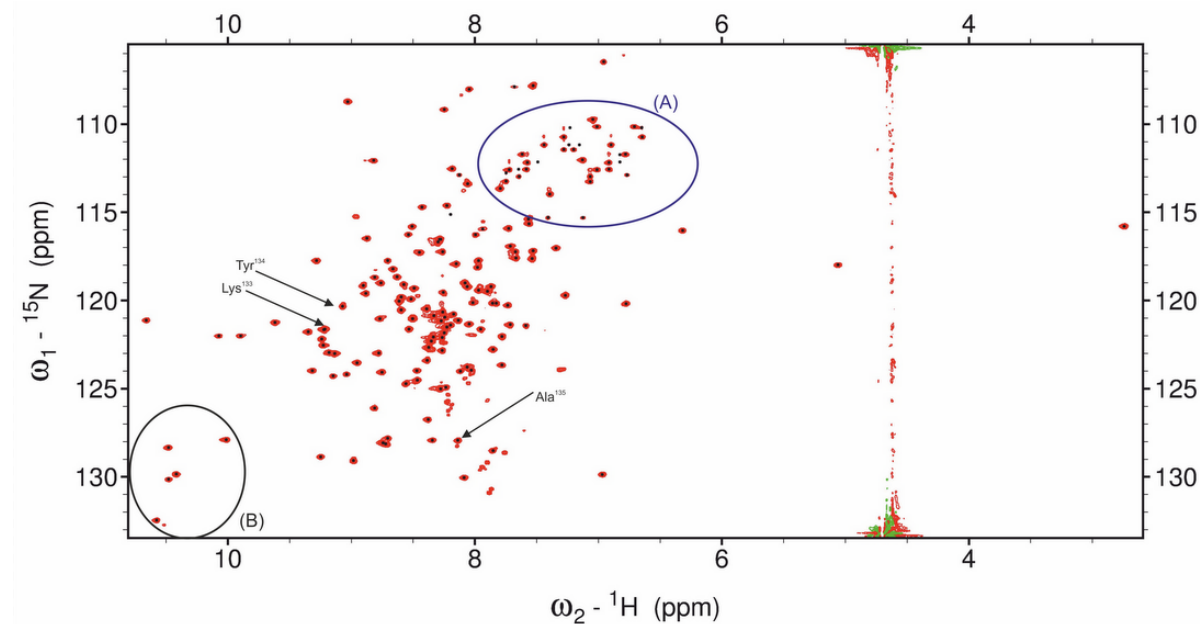
0,5 ml vzorku, jenž obsahoval naprodukovaný protein v cca 0,47mM koncentraci, bylo předáno Mgr. Josefovi Chmelíkovi, Ph.D. k provedení NMR experimentů. Měření byla provedena na spektrometru Bruker AVANCE III 600 MHz vybaveném TCI – kryosondou (Bruker, Německo) při 30 °C.

(B) VYHODNOCENÍ NMR SPEKTER

V následujících odstavcích je popsán postup přiřazení signálů pro konkrétní aminokyseliny. První aminokyselinou (i), pro kterou byla vybrána dvojice $^1\text{H}^{15}\text{N}$ v HN-HSQC spektru, je zde Thr¹³⁴, jemuž předchází Lys¹³³ a za nímž následuje Ala¹³⁵.

5.6) ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum

Spektrum HN-HSQC s označenými signály je na Obr. 30. Jsou zde vyznačeny signály pro zmíněné aminokyseliny (K¹³³ s chemickým posunem $\delta(^1\text{H})=9,214$ a $\delta(^{15}\text{N})=121,626$; T¹³⁴ s $\delta(^1\text{H})=9,071$ ppm a $\delta(^{15}\text{N})=120,3$ ppm; A¹³⁵ s $\delta(^1\text{H})=8,138$ ppm a $\delta(^{15}\text{N})=127,9$ ppm). Dále jsou zde vyznačeny dvě specifické oblasti, kde bylo možné najít signály pocházející a) od postranních řetězců asparaginu a glutaminu a b) od postranních řetězců tryptofanu.



Obr. 30 ^1H , ^{15}N -HSQC spektrum s označením signálů 3 po sobě jdoucích aminokyselin (K¹³³, T¹³⁴ a A¹³⁵)

(A) Modře vyznačená oblast – signály postranních řetězců Asn a Gln

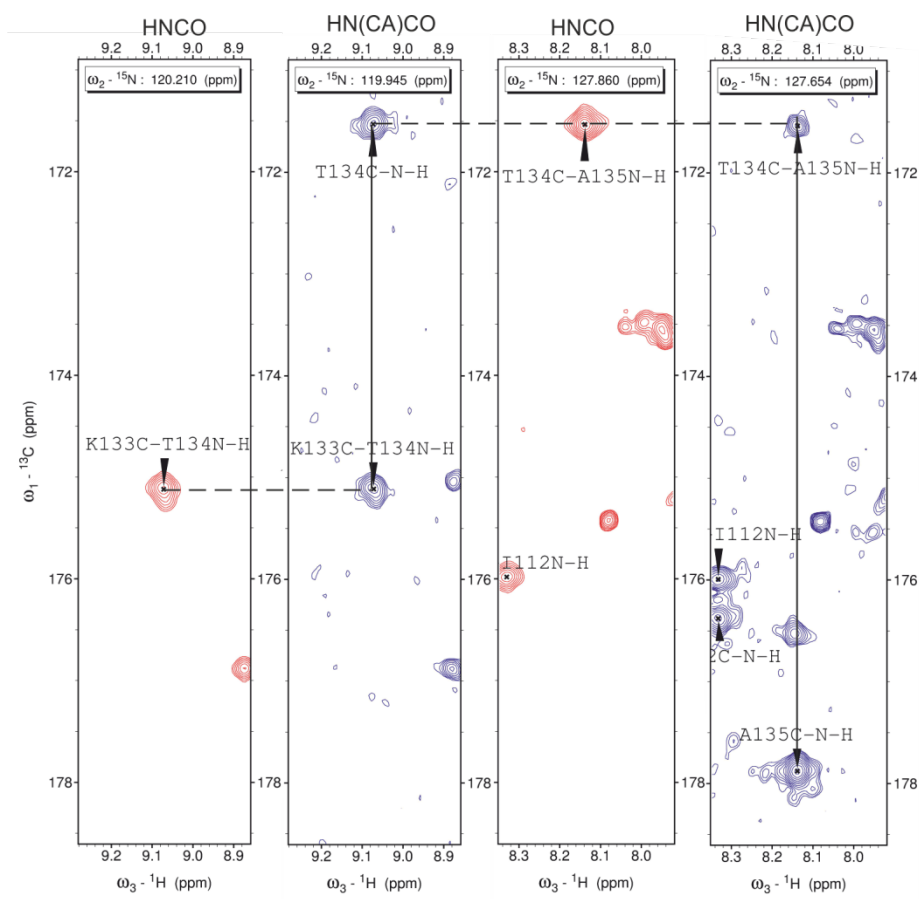
(B) Černě vyznačená oblast – signály postranních řetězců Trp

5.7) Přiřazení karbonylových uhlíků

Chemické posuny uhlíků karbonylové skupiny byly získány ze spektrech HNCO a HN(CA)CO. Jejich přiřazení nebylo vždy zcela snadné, jelikož se nezdálo, že ve spektru HN(CA)CO nebyl patrný signál odpovídající karbonylovému uhlíku předchozí aminokyseliny, tudíž chyběla kontrola správného postupu v řetězci. Z tohoto důvodu bylo nutné informaci, kterou tato spektra poskytla zkombinovat s výsledky dalších spekter.

V některých případech se může stát, že na základě chemických posunů jader C^α a C^β uhlíků není možné určit, jak přesně jdou aminokyseliny (a tedy jim odpovídající signály) v sekvenci za sebou – například pokud jsou v sekvenci aminokyseliny stejného typu jedna za druhou. Vzhledem k vysoké disperzi signálů ve spektrech HNCO a HN(CA)CO v jejich uhlíkové dimenzi je možné tuto komplikaci do značné míry eliminovat.

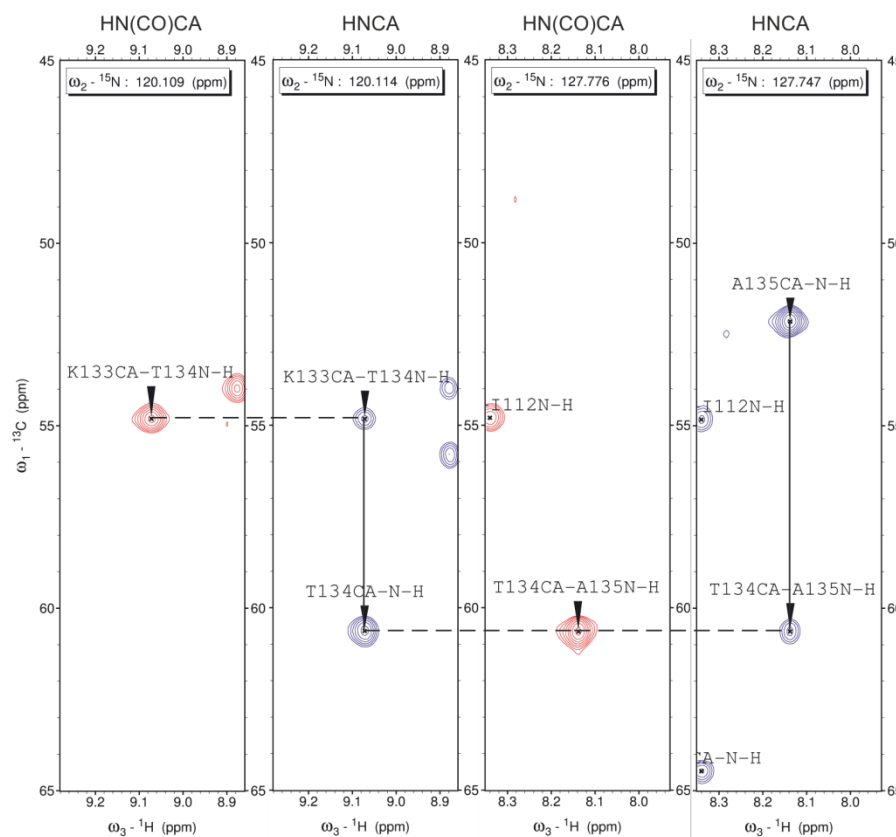
Na Obr. 31 jsou 2D řezy spektry na pozicích T^{134} a A^{135} .



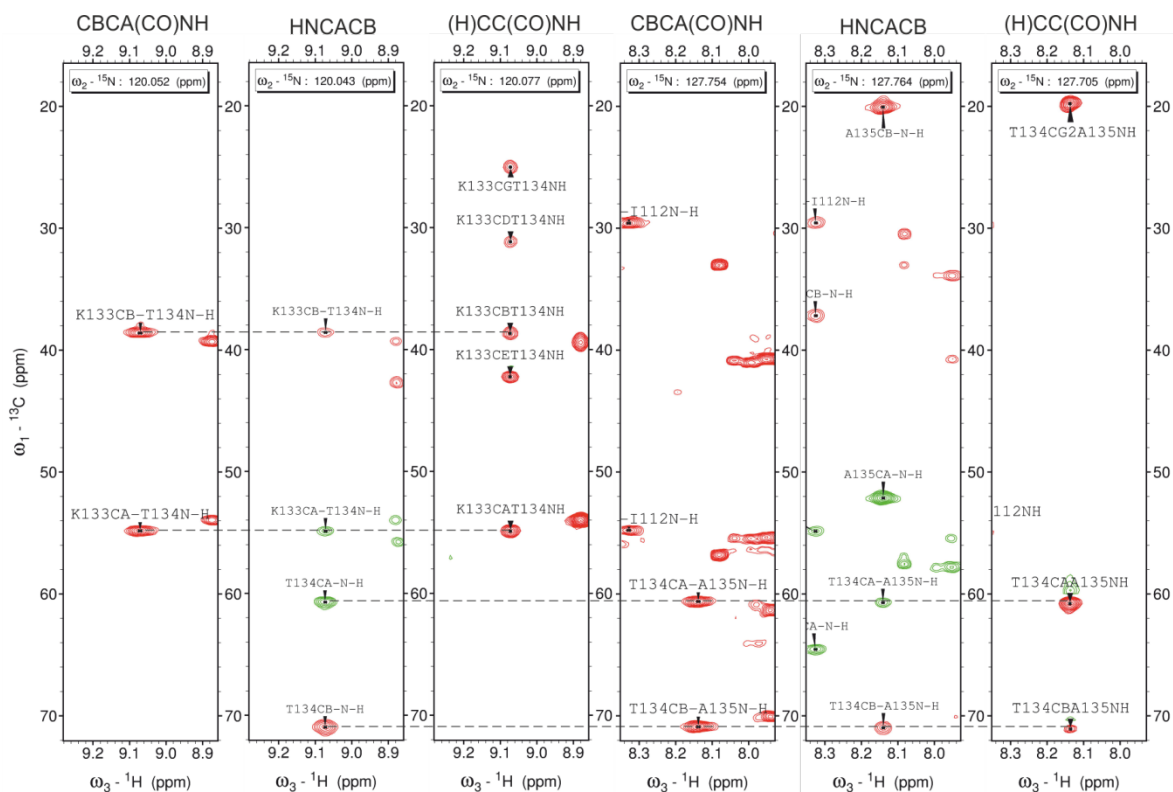
Obr. 31 2D řezy spektry HNCO a HN(CA)CO

5.8) Přiřazení signálů uhlíků C^α a postranních řetězců

Pro přiřazení signálů C^α uhlíků bylo využito dvou spekter: HN(CO)CA a HNCA (Obr. 32). Byť bylo jejich rozlišení vyšší, než u experimentů CBCA(CO)NH a HNCACB, samotná informace o posunu C^α uhlíků není stoprocentně směrodatná vzhledem k určení typu aminokyseliny (viz Obr. 8, str. 34), proto jich bylo využito spíše ke kontrole pozic signálů při zpracování spekter CBCA(CO)NH a HNCACB, ve kterých bylo možné získat informaci o chemickém posunu jader C^α i C^β a navíc tedy i o typu aminokyseliny. Nezanedbatelnou roli v celém postupu hrálo spektrum (H)CC(CO)NH ve kterém byly potvrzeny pozice C^α a C^β a navíc identifikovány signály pocházející od dalších jader uhlíků alifatických postranních řetězců (Obr. 33, str. 60).



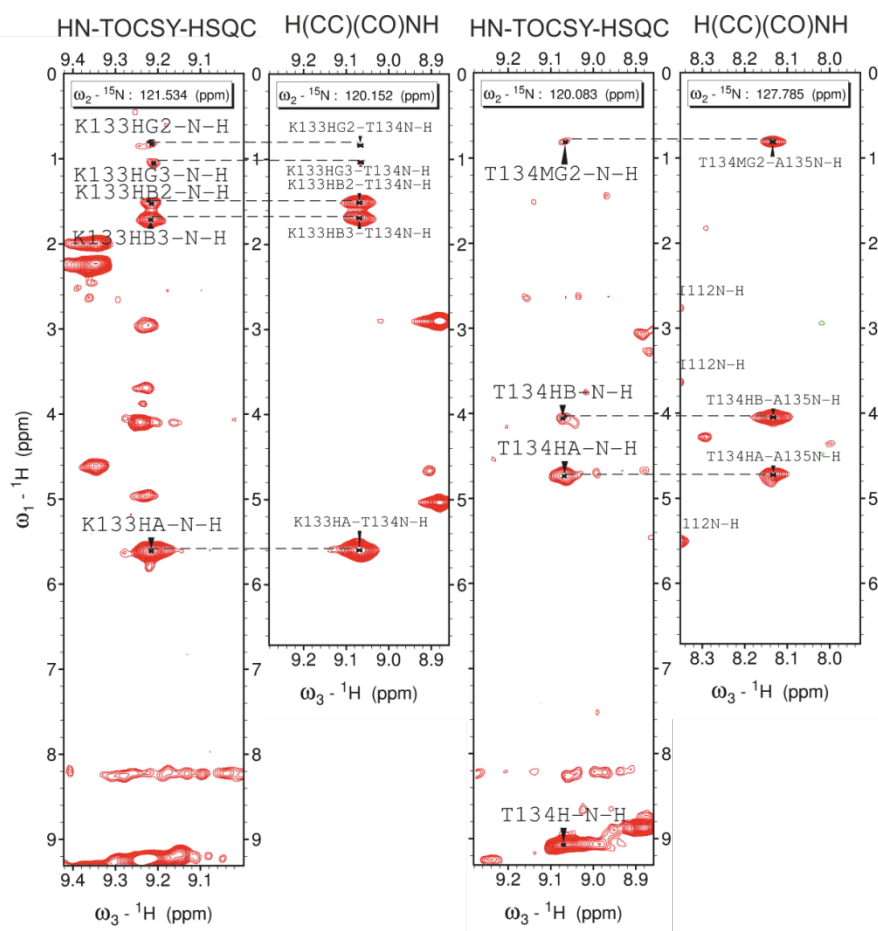
Obr. 32 2D řezy spektry HNCA a HN(CO)CA



Obr. 33 2D řezy spektry CBCA(CO)NH, HNCACB a (H)CC(CO)NH

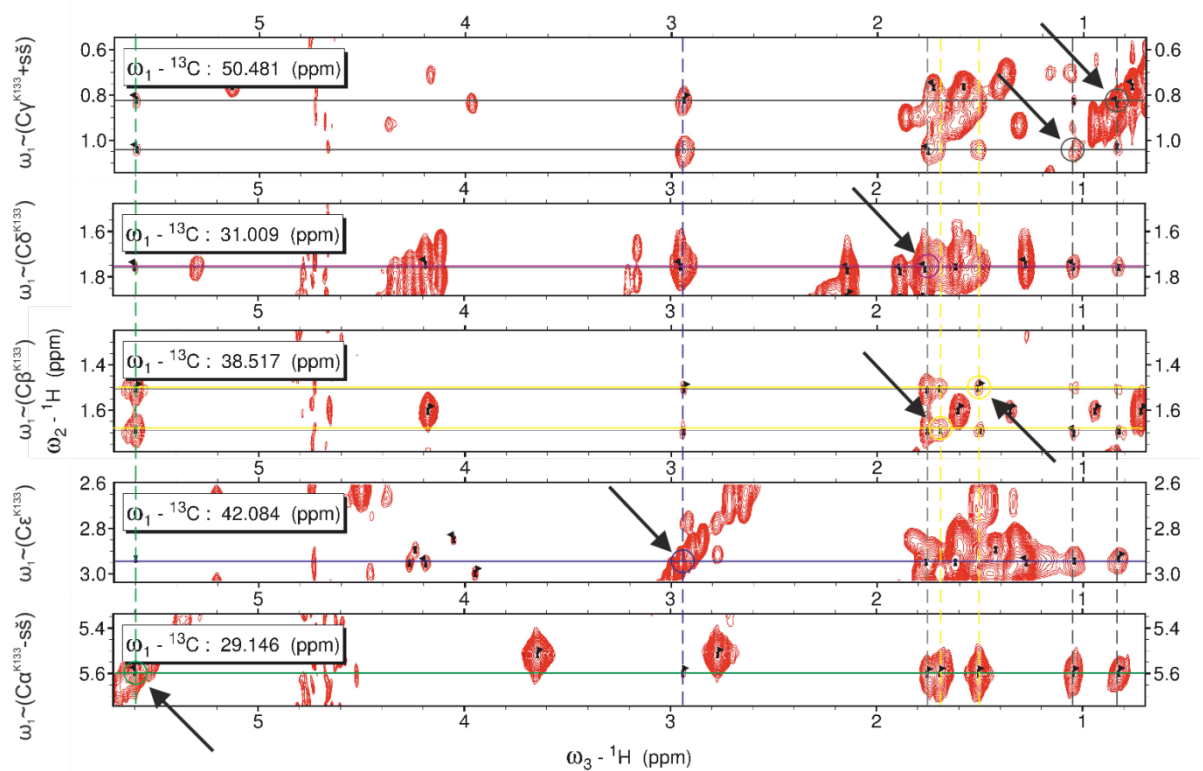
5.9) Přiřazení signálů jader vodíků jednotlivým aminokyselinám

Konkrétní přiřazení signálů jader ^1H je na Obr. 34, str. 61. Ve spodní části spektra HN-TOCSY-HSQC je u T^{134} patrný diagonální signál amidového vodíku. Tento signál není identifikovaný u K^{133} , což není výjimkou. V této oblasti se signály často překrývají, což značně ztěžuje, až znemožňuje jejich přiřazení.



Obr. 34 2D řezy spektry HN-TOCSY-HSQC a H(CC)(CO)NH

Chemické posuny jader vodíků se obecně často překrývají (nejen na diagonále) – viz Obr. 9, str. 35 – a spektra HN-TOCSY-HSQC ani H(CC)(CO)NH nemají takové rozlišení a citlivost, aby bylo možné jednotlivé signály vždy přesně určit. Obtíže nastávají především při snaze o rozlišení ekvivalentních protonů (např. Lys má v postranním řetězci 4 dvojice ekvivalentních vodíků $H^{\beta 2,3}$, $H^{\gamma 2,3}$, $H^{\delta 2,3}$ a $H^{\epsilon 2,3}$). Tento problém byl ve většině případů vyřešen vyhodnocením spektra HCCH-TOCSY (Obr. 35, str. 62).



Obr. 35 2D řezy spektrem HCCH-TOCSY

Ve všech řezech je patrný diagonální signál konkrétního atomu vodíku (vyznačen šipkou a zakroužkovaný). Například v řezu, jehož ω_1 odpovídá chemickému posunu C^α je diagonální signál na pozici H^α - H^α (jelikož spektrální šířka (sš) na ose ^{13}C (zde 25,60 ppm) – není dostačující, byl signál přeložen: pokud k hodnotě 29,146 ppm přičteme jednu spektrální šířku, dostaneme hodnotu 54,746, která odpovídá chemickému posunu jádra C^α K^{133}). Z rovin odpovídajících C^β a C^γ je zřejmé, že v těchto případech se podařilo odlišit ekvivalentní protony - v každém řezu jsou dva diagonální signály.

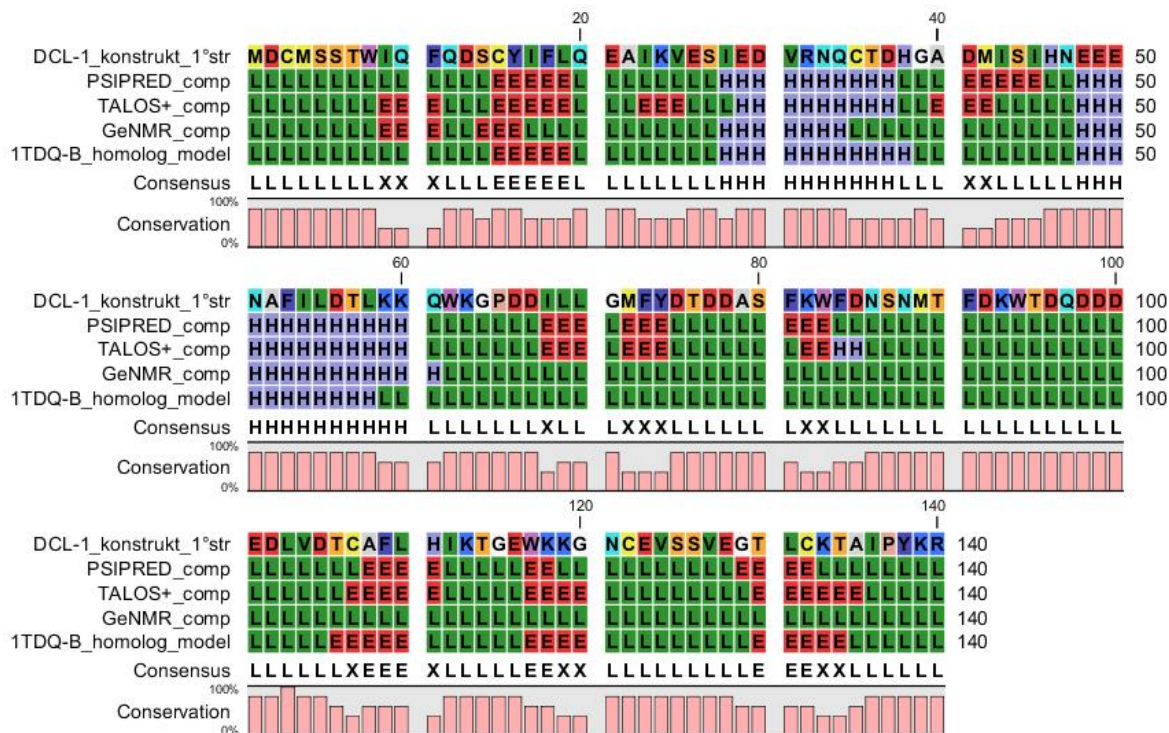
5.10) Statistické shrnutí

Uvedeným postupem bylo identifikováno 96,5 % atomů peptidové páteře (NH, C^α , H^α , C'). Atomy postranních řetězců aminokyselin byly identifikovány z 68,9 %, z toho alifatické postranní řetězce z 86,6 %.

(C) PREDIKCE SEKUNDÁRNÍCH STRUKTUR

Na Obr. 36 je srovnání predikovaných sekundárních struktur jednotlivými metodami. Navíc je zde srovnání i s homologním modelem vytvořeným na základě C-lectinové domény 1TDQ-B potkaního proteinu tenascin-R.

Na dalších dvou obrázcích jsou modely, zkonstruované na základě homologie s potkaním proteinem 1TDQ-B (Obr. 37, str. 64) a podle výsledku predikčního programu GeNMR (Obr. 38, str. 64).



Obr. 36 Srovnání predikovaných sekundárních struktur extracelulární domény receptoru DCL-1 metodou PSIPRED, TALOS+ a GeNMR s homologním modelem na základě domény 1TDQ-B.

E – β skládaný list, H – α helix, L – struktura, která neodpovídá ani E, ani H.



Obr. 37 Homologní model proteinového konstruktu DCL-1 založený na doméně 1TDQ-B.



Obr. 38 Model proteinového konstruktu DCL-1 vytvořený na základě dat predikčního programu GeNMR.

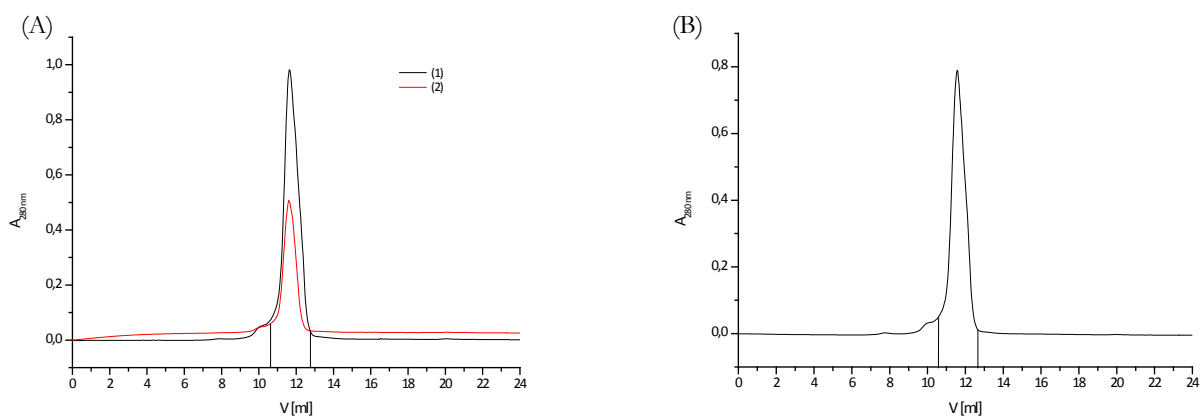
(D) CHEMICKÉ SÍŤOVÁNÍ

5.11) Příprava vzorků pro reakce chemického zesítění

Vzorky obsahující protein v koncentraci 25 mg/ml byly metodou gelové filtrace převedeny do vhodných reakčních pufrů. Jelikož EDC, DSG i DSS reagují s aminovými skupinami, bylo zapotřebí převést proteiny do pufrů, které tyto funkční skupiny neobsahují. Pro reakci proteinu s EDC, jehož pH optimum pro tvorbu amidové vazby leží v intervalu od 4,5 do 7,5^[38], byl zvolen pyridinový pufr, pro reakci DSS a DSG s proteiny byl zvolen pufr, jehož hlavní složkou byl triethanolamin (pH optimum kdy jsou tato dvě činidla ve formě esteru schopna tvořit amidovou vazbu je v rozmezí pH 7 – 9)^[38].

Gelová filtrace probíhala na koloně Superdexu 75 HR. Na základě sestavených chromatogramů byly spojeny frakce obsahující protein a v nich byla stanovena jeho koncentrace.

Na kolonu Superdexu 75 HR bylo třikrát naneseno vždy 100 μ l původního roztoku, které byly převedeny dvakrát do TEA pufru a jednou do pyridinového pufru. Záznam absorbance eluátu je na Obr. 39.



Obr. 39 Graf závislosti absorbance na objemu mobilní fáze.

Kolona Superdex 75 HR, průtoková rychlost 0,4 ml/min, absorbance měřena při 280 nm.

(A) Elučním činidlem je zde TEA pufr. Byly provedeny 2 nástřiky vzorku na kolonu, frakce pro další pokusy byly zachyceny v časech 26,5-32 min (10,6-12,8 ml eluátu).

(B) Elučním činidlem je zde pyridinový pufr. Byl proveden 1 nástřik vzorku na kolonu, frakce pro další pokusy byla zachycena v čase 26,5-31,5 min (10,6-12,6 ml eluátu).

5.12) Stanovení koncentrace proteinů

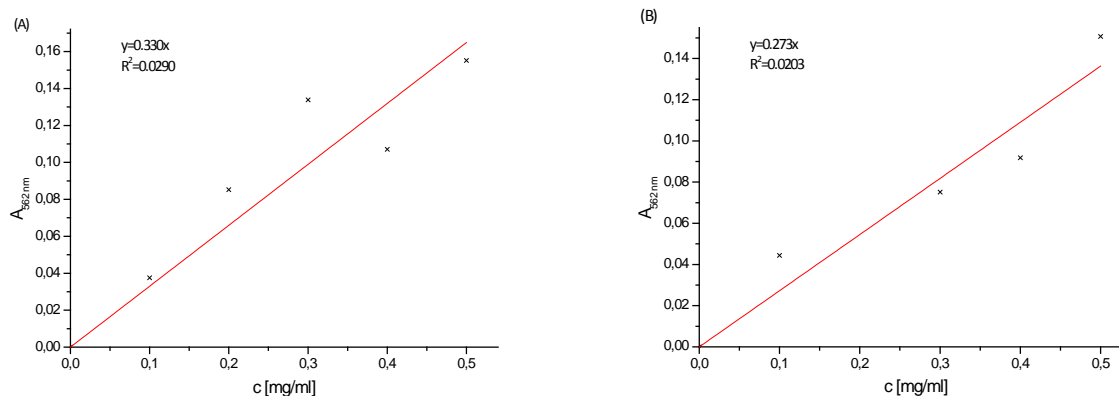
Ve frakcích z gelové chromatografie (Obr. 39, str. 65) byla stanovena koncentrace proteinů reakcí s bicinchoninovou kyselinou. Nejprve byly na základě absorbcí standardních roztoků BSA vytvořeny kalibrační přímky (Tab. 7, Obr. 40), jejichž směrnice byly následně využity k výpočtu koncentrace proteinů v získaných vzorcích, které byly pro stanovení vždy 2×, 5× a 10× naředěny (Tab. 8 a Tab. 9, str. 67).

Tab. 7 Naměřené hodnoty absorpance odpovídající kalibračním roztokům – pro stanovení koncentrace proteinu v pyridinovém a TEA pufru

	TEA PUFR			PYRIDINOVÝ PUFR		
	koncentrace standardu [mg/ml]	$A_{562\text{ nm}}$	$A_{562\text{ nm}} - A_{dH_2O}$	koncentrace standardu [mg/ml]	$A_{562\text{ nm}}$	$A_{562\text{ nm}} - A_{dH_2O}$
	0,0	0,1377	0,0000	0,0	0,1339	0,0000
	0,1	0,1752	0,0375	0,1	0,1783	0,0444
	0,2	0,2229	0,0852	0,2	0,1513	0,0174
	0,3	0,2715	0,1338	0,3	0,2090	0,0751
	0,4	0,2448	0,1071	0,4	0,2257	0,0918
	0,5	0,2929	0,1552	0,5	0,2846	0,1507

$A_{595\text{ nm}}$: absorpance vzorku byla měřena při vlnové délce 562 nm (stanovení bicinchoninovou kyselinou)

$A_{595\text{ nm}} - A_{dH_2O}$: hodnoty absorpací po odečtení hodnot slepého vzorku (dH_2O)



Obr. 40 Kalibrační přímky pro stanovení koncentrace proteinů reakcí s bicinchoninovou kyselinou, konstruované na základě hodnot absorpance naměřených pro standardní roztoky BSA při vlnové délce 562 nm – viz Tab. 7

(A) kalibrační křivka pro stanovení v TEA pufru – směrnice má hodnotu 0,330

(B) kalibrační křivka pro stanovení v pyridinovém pufru – směrnice má hodnotu 0,273

Tab. 8 Naměřené hodnoty absorbance pro ředěné vzorky proteinu v TEA, včetně vypočtených hodnot koncentrace proteinu.

ředění vzorku	$A_{562 \text{ nm}}$		$\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}$	$(\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}) - (\bar{\varnothing} A_{\text{dH}_2\text{O}})$	korekce ředění	koncentrace proteinů ve vzorku [mg/ml]	průměrná koncentrace proteinu
2×	0,2278	0,2370	0,2324	0,0947	0,190	0,574	0,57 mg/ml*
5×	0,1755	0,2048	0,1902	0,0525	0,262	0,795	
10×	0,1603	0,1523	0,1563	0,0186	0,186	0,564	

$A_{562 \text{ nm}}$: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 562 nm (stanovení reakcí s bicinchoninovou kyselinou)

$\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}$: zprůměrované hodnoty naměřených absorbcí

$(\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}) - (\bar{\varnothing} A_{\text{dH}_2\text{O}})$: průměrné hodnoty absorbcí po odečtení slepého vzorku (dH_2O) – viz Tab. 7, str. 66.

Výpočty koncentrací viz Tab. 5, str. 56.

* Pro výpočet nebyla použita hodnota odpovídající 5× ředěnému vzorku.

Tab. 9 Naměřené hodnoty absorbance pro ředěné vzorky proteinu v pyridinovém pufru, včetně vypočtených hodnot koncentrace proteinu.

ředění vzorku	$A_{562 \text{ nm}}$		$\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}$	$(\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}) - (\bar{\varnothing} A_{\text{dH}_2\text{O}})$	korekce ředění	koncentrace proteinů ve vzorku [mg/ml]	průměrná koncentrace proteinu
1×	0,3893	0,3789	0,3841	0,2502	0,2502	0,916	0,92 mg/ml*
2×	0,2782	0,2418	0,2600	0,1261	0,2522	0,924	
5×	0,1389	0,1436	0,1413	0,0074	0,0368	0,135	
10×	0,1584	0,1544	0,1564	0,0225	0,0225	0,824	

$A_{562 \text{ nm}}$: absorbance vzorku byla měřena při vlnové délce 562 nm (stanovení reakcí s bicinchoninovou kyselinou)

$\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}$: zprůměrované hodnoty naměřených absorbcí

$(\bar{\varnothing} A_{562 \text{ nm}}) - (\bar{\varnothing} A_{\text{dH}_2\text{O}})$: průměrné hodnoty absorbcí po odečtení slepého vzorku (dH_2O) – viz Tab. 7, str. 66.

Výpočty koncentrací viz Tab. 5, str. 56.

* Pro výpočet nebyla použita hodnota odpovídající 5× a 10× ředěnému vzorku.

5.13) Výběr vhodných reakčních podmínek pro zesílení proteinu

Jakmile byla stanovena koncentrace proteinu v obou roztocích, bylo možné jej přidat do reakčních směsí pro zesílení.

Na základě výsledku NuPAGE bylo vybráno několik podmínek (v Obr. 41, str. 68) jsou červeně vyznačeny), které byly podle Tab. 10 na str. 68 naneseny na 4-12% gradientový Bis-Tris gel. Tento gel již fotografován nebyl, proto jsou v Obr. 41, str. 68 červené rámečky, označující jednotlivé proužky, které byly z gelu izolovány a připraveny pro štěpení endopeptidasami.

Tab. 10 Schéma nanesení produktů síťovacích reakcí na gradientový Bis-TRIS gel pro jejich izolaci

M	E50	E50	E50	E100	E100	E100	S3#	S3#	S9#	S9#	DCL
5 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	16 μ l	16 μ l	16 μ l	20 μ l	20 μ l	24 μ l	24 μ l	20 μ l
G3#	G3#	G3*	G3*	G9*	G9*	G9*	S3*	S3*	S9*	S9*	DCL
24 μ l	24 μ l	16 μ l	16 μ l	20 μ l	20 μ l	20 μ l	14 μ l	14 μ l	14 μ l	14 μ l	20 μ l

DCL – negativní kontrola – nezesíťovaný protein

M – marker

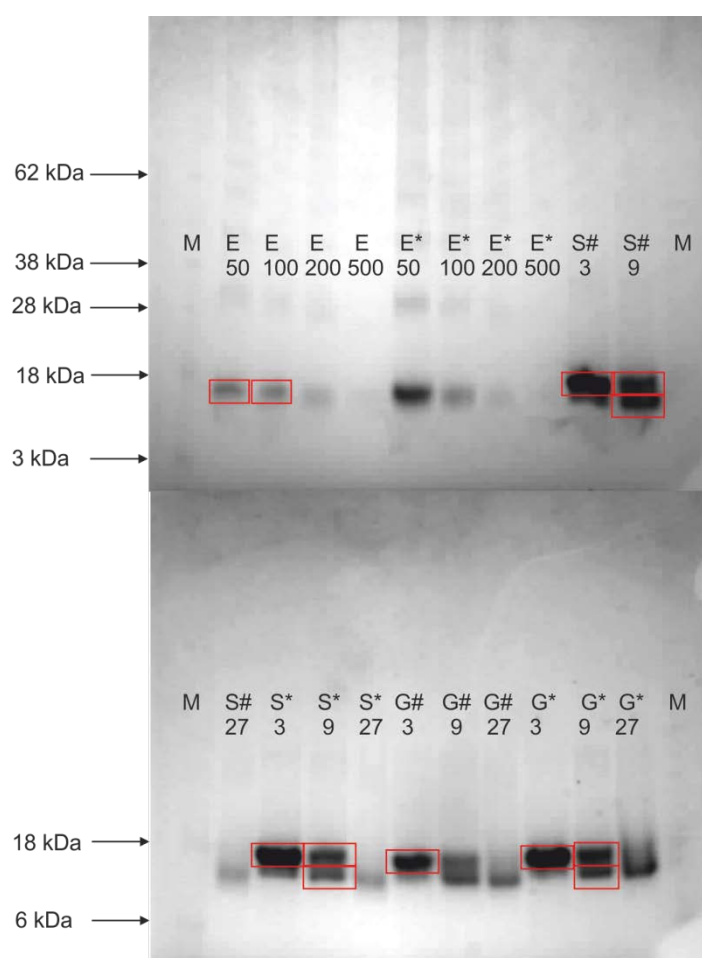
E – reakce s EDC: 50 značí 50M nadbytek oproti proteinu, atp.

S – reakce s DSS: 3 značí 3M nadbytek oproti proteinu, atp.

G – reakce s DSG: 3 značí 3M nadbytek oproti proteinu, atp.

* – činidla s tímto označením byla připravena Mgr. Zdeňkem Kukačkou

– činidla s tímto označením byla připravena RNDr. Danielem Kavanem, Ph.D.



Obr. 41 Fotografie gelu gradientové NuPAGE pro výběr vhodných reakčních podmínek zesíťování DCL-1.

M – marker

E – reakce s EDC: 50 značí 50M nadbytek oproti proteinu, atp.

S – reakce s DSS: 3 značí 3M nadbytek oproti proteinu, atp.

G – reakce s DSG: 3 značí 3M nadbytek oproti proteinu, atp.

* – činidla s tímto označením byla připravena Mgr. Zdeňkem Kukačkou

– činidla s tímto označením byla připravena RNDr. Danielem Kavanem, Ph.D.

Z gelu izolované proteiny byly následně štěpeny endopeptidasami, odsoleny a předány na analýzu hmotnostní spektrometrií. Výsledky analýzy viz Tab. 11, str. 69 (EDC), Tab. 12, str. 70 (DSG) a Tab. 13, str. 71 (DSS).

Tab. 11 Výsledky MS analýzy peptidových fragmentů

E50 T		E50 G	
33-59,61-93+1ox-M+1EDC	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK	49-50,106-128+1EDC	EE-TCAFLHIKTGEWKKGNCEVSVSE
33-59,94-119+1ox-M+1EDC	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLK-WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK	49-66+2EDC	EENAFILDTLKKQWKGP
33-60,83-113+1EDC+1ox-M	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKK-WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIK	76-78,102-123+2EDC	TDD-DLVDTCAFLHIKTGEWKKGNCE
60-63,64-118+1ox-M+3EDC	KQWK-GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK	76-92,1-21+1ox-M+1EDC	TDDASFKWFDNSNMTFD-MDCPSSTWIQFQDSCYIFLOE
60-82,83-118+2EDC+1ox-M+1EDC	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK-WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK	86-96,101-116+1EDC	NSNMTFDKWTD-EDLVDTCAFLHIKTGE
61-82,83-118+1EDC+1EDC	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK-WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK	93-101,106-123+1EDC+1EDC	KWTDQDDDE-TCAFLHIKTGEWKKGNCE
61-82,83-119+1EDC+1ox-M+2EDC	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK-WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK	97-102,57-77+1ox-M+1EDC	QDDDED-TLKKQWKGPDDILLGMFYDTD
64-93,1-32+1EDC	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK-MDCPSSTWIQFQDSCYIFLOEAIKVESIEDVR	100-116,50-66+1EDC+1EDC	DEDLVDTCAFLHIKTGE-ENAFILDTLKKQWKGP
64-93,1-32+1ox-M+1EDC+1EDC	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK-MDCPSSTWIQFQDSCYIFLOEAIKVESIEDVR	117-123,67-85+1ox-M+1EDC	WKKGNCE-DILLGMFYDTDDASFKWFD
64-93+2ox-M+1EDC	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
94-118,33-60+1EDC+1ox-M	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK-NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKK		
94-118,60-93+1EDC+1ox-M+2EDC	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
94-118,61-93+1EDC+1EDC	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
94-119,61-93+2EDC+1ox-M+1EDC	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
114-118,61-113+2EDC	TGEWKK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIK		
114-119,61-113+1ox-M+3EDC	TGEWKK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIK		
E100 T		E100 G	
33-59,61-93+1ox-M+1EDC	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLK-QWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK	49-66+2EDC	EENAFILDTLKKQWKGP
60-82+1EDC	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	93-101,106-123+1EDC+1EDC	KWTDQDDDE-TCAFLHIKTGEWKKGNCE
60-93+1ox-M+3EDC	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
61-82+1ox-M+1EDC	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK		
64-93+2ox-M+1EDC	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		

E50 – použité síťovací činidlo EDC bylo použito v 50M nadbytku oproti proteinu

E100- použité síťovací činidlo EDC bylo použito v 100M nadbytku oproti proteinu

T – štěpeno trypsinem

G – štěpeno GluC

Tab. 12 Výsledky MS analýzy peptidových fragmentů

3 hDSG T		3 DSG T	
60-63+1hSG	KQWK	60-82+1DSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
60-82+1ox-M+1hSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	83-119+1ox-M+1DSG	WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK
61-82+1ox-M+1hSG	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	119-139+1DSG	KGNCVSSVEGTLCKTAIPYK
94-119+1hSG	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK		
9 hDSG T		9 DSG T	
33-60+1ox-M+1hSG	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKK	33-63+1ox-M+1DSG	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWK
33-63+1hSG	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWK	60-82+1DSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
33-82+2ox-M+1hSG	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	60-82+1ox-M+1DSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
60-63+1hSG	KQWK	94-119+1DSG	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK
60-82+1ox-M+1hSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	119-139+1DSG	KGNCVSSVEGTLCKTAIPYK
60-82+1ox-M+2hSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	120-140,64-118+1ox-M+1DSG	GNCEVSSVEGTLCKTAIPYKR-GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWK
60-93+3hSG	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
61-82+1ox-M+1hSG	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK		
64-93+2ox-M+1hSG	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMTFDK		
83-119+1hSG	WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK		
94-118+1hSG	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK		
94-119+1hSG	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGEWKK		
114-133+1hSG	TGEWKKGNCEVSSVEGTLCK		
134-140+1hSG	TAIPYKR		
3 hDSG G		3 DSG G	
		51-66,76-92+1DSG	NAFILDTLKKQWKGPDDTDDASFKWFDNSNMTFDK
		93-101,50-67+1DSG	KWTDQDDDE-ENAFILDTLKKQWKGPDD
9 hDSG G		9 DSG G	
22-29+1hSG	AIKVESIE	124-140+1DSG	VSSVEGTLCKTAIPYKR

3 hDSG/DSG – použité síťovací činidlo DSG bylo použito v 3M nadbytku oproti proteinu

9 hDSG/DSG - použité síťovací činidlo DSG bylo použito v 9M nadbytku oproti proteinu

T – štěpeno trypsinem

G – štěpeno GluC

Tab. 13 Výsledky MS analýzy peptidových fragmentů

3 hDSS T		3 DSS T	
1-32+1hSS	MDCPSSTWIQFDSCYIFLQEAIK ESIEDVR	33-63+1ox-M+1DSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWK
33-60+1ox-M+1hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKK	60-82+1DSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
33-82+2ox-M+1hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKKQWKGPDDILLGMFYDTDDASF K	83-119+1ox-M+1DSS	WFDNSNMFTDKWTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEW KK
60-63+1hSS	KQWK	94-119+1DSS	WTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEWKK
60-82+1ox-M+1hSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	119-133,60-93+1DSS	KGNCVSSVEGLTCK- KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMFTDK
60-93+2ox-M+2hSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK WFDNSNMFTDK		
61-82+1ox-M+1hSS	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK		
64-93+2ox-M+1hSS	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNS NMFTDK		
64-113+2hS S	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNS NMFTDKWTDQDDDEDLVDTC AFL HIK		
83-119+1hS S	WFDNSNMFTDKWTDQDDDEDLV DTC AFLHIKTGEWKK		
94-118+1hS S	WTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGE WK		
9 hDSS T		9 DSS T	
1-24+1hSS	MDCPSSTWIQFDSCYIFLQEAIK	33-63+1ox-M+1DSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWK
1-32+1ox-M+1hSS	MDCPSSTWIQFDSCYIFLQEAIK ESIEDVR	33-63+1ox-M+1DSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWK
33-60+1ox-M+1hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKK	60-82+1DSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
33-63+2hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKKQWK	60-82+1ox-M+1DSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK
33-82+1hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKKQWKGPDDILLGMFYDTDDASF K	83-119+1DSS	WFDNSNMFTDKWTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEW KK
33-82+2ox-M+1hSS	NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDT LKKQWKGPDDILLGMFYDTDDASF K	94-118,33-82+2ox-M+1DSS	WTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEWK- NOCTDHGADMISIHNEEENAFILDTLKKQWKGPDDIL LGMFYDTDDASFK
60-63+1hSS	KQWK	94-119+1DSS	WTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEWKK
60-82+1ox-M+1hSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	94-119+1DSS	WTDQDDDEDLVDTC AFLHIKTGEWKK
60-82+1ox-M+2hSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK	119-133,60-93+1DSS	KGNCVSSVEGLTCK- KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNSNMFTDK
60-93+2ox-M+1hSS	KQWKGPDDILLGMFYDTDDASFK WFDNSNMFTDK		
61-82+1ox-M+1hSS	QWKGPDDILLGMFYDTDDASFK		
64-93+2ox-M+1hSS	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNS NMFTDK		
64-113+2hS S	GPDDILLGMFYDTDDASFKWFDNS NMFTDKWTDQDDDEDLVDTC AFL HIK		

Tab. 13 – pokračování

83- 113+1ox- M+1hSS	WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLV DTCAFLHIK
83- 119+1hS S	WFDNSNMTFDKWTDQDDDEDLV DTCAFLHIKTGEWKK
94- 118+1hS S	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGE WK
94- 119+1hS S	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGE WKK
94- 119+2hS S	WTDQDDDEDLVDTCAFLHIKTGE WKK
114- 119+1hS S	TGEWKK
134- 140+1hS S	TAIPYKR

3 hDSS G	
22- 26+1hSS	AIKVE

3 DSS G	
57-67,68- 85+1DSS+1o x-M	TLKKQWKGPDD-ILLGMFYDTDDASFKWFD
76-85,57- 75+1ox- M+1DSS	TDDASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYD
78-85,57- 77+1ox- M+1DSS	DASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYDTD
79-85,57- 78+1ox- M+1DSS	ASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYDTDD

9 hDSS G	
22- 26+1hSS	AIKVE
22- 29+1hSS	AIKVESIE

9 DSS G	
57-67,68- 85+1DSS+1o x-M	TLKKQWKGPDD-ILLGMFYDTDDASFKWFD
76-85,57- 75+1ox- M+1DSS	TDDASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYD
78-85,57- 77+1ox- M+1DSS	DASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYDTD
79-85,57- 78+1ox- M+1DSS	ASFKWFD-TLKKQWKGPDDILLGMFYDTDD
124- 140+1DSS	VSSVEGTLCKTAIPYKR
129- 140+1DSS	GTLC TAIPYKR

3 hDSS/DSS – použité síťovací činidlo DSS bylo použito v 3M nadbytku oproti proteinu

9 hDSS/DSS - použité síťovací činidlo DSS bylo použito v 9M nadbytku oproti proteinu

T – štěpeno trypsinem

G – štěpeno GluC

Data získaná z analýzy chemického zesíťení proteinu mohou napomoci při řešení 3D struktury proteinu.

(6) DISKUSE

Na základě předchozích zkušeností s produkcí proteinového konstruktů byl zvolen expresní systém *E. coli* BL21 (DE3) Gold. Bakterie byly transformovány plazmidem metodou tepelného šoku a následně selektovány na agarové plotně s antibiotiky kanamycinem a tetracyklinem.

S vybranými klony buněk byla provedena pokusná produkce proteinu, indukovaná přidávkou IPTG. Produkce proteinu byla výborná u všech vybraných klonů, pro velkoobjemovou produkci v ^{13}C , ^{15}N značeném M9 minimálním médiu však byly zapotřebí pouze čtyři. Oproti klasickému LB médiu byla doba, za kterou kultury dosáhly hodnoty optické hustoty 0,6, podstatně delší. Proteiny produkované ve formě inkluzních tělísek byly dle standardního protokolu používaného v laboratoři renaturovány, vyjma použití lysozymu, který má podobnou molekulovou hmotnost jako náš konstrukt, a následně dialýzou převedeny do fyziologických podmínek. Výsledek SDS-PAGE renaturovaných proteinů ukázal přítomnost agregátů, které byly odstraněny metodou gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 75 HR. Na základě předchozích zkušeností a s ohledem na co nejmenší ztráty značeného proteinu byla z purifikačních experimentů vyřazena ionexová chromatografie, která by jinak probíhala na koloně Q-Sepharosy FF. Oprávněnost tohoto rozhodnutí je potvrzena na obrázku zobrazujícím výsledek SDS-PAGE proteinu v redukujících a neredukujících podmínkách, provedené s frakcemi z gelové filtrace. Gelovou filtrací byl protein zároveň převeden do pufru vhodného pro NMR měření a ve druhém případě (neznačený protein) do pufru pro chemické zesílení.

Při vyhodnocování naměřených spekter bylo prvním krokem ověření, zda je protein dobře poskládaný a zda má tedy smysl v práci pokračovat. Toto bylo provedeno na základě HN-HSQC spektra. Jelikož nebyly signály jednotlivých HN dvojic nahloučené, ale naopak krásně odlišitelné, mohlo být konstatováno, že protein netvoří žádné nefyziologické struktury. Ve snaze o přiřazení signálů konkrétním atomům aminokyselin bylo využito desíti 3D experimentů. Signály těchto spekter vždy pocházely od atomů, které jsou vzájemně spojené přes jednu či více kovalentních vazeb. Pro přiřazení atomů proteinové páteře bylo využito šesti experimentů: HNC(O) a HN(CA)CO experimentů pro identifikaci signálů příslušejících uhlíkům karbonylové skupiny, HNCA a HN(CO)CA pro přiřazení signálů C^α uhlíkům a HNCACB s CBCA(CO)NH, díky kterým bylo možné přiřadit signály jak C^α uhlíkům proteinové páteře, tak C^β uhlíkům postranních řetězců. Pro přiřazení atomů postranních

řetězců bylo využito spekter již zmíněných experimentů HNCACB a CBCA(CO)NH (C^β uhlíky), tak spektra (H)CC(CO)NH, ve kterém jsou patrné signály pocházející od všech uhlíků alifatického postranního řetězce. Identifikace vodíkových atomů probíhala na základě spekter HN-TOCSY-HSQC a H(CC)(CO)NH, jejichž výsledek byl upřesněn díky analýze spektra HCCH-TOCSY. Výstupem této práce je tabulka chemických posunů pro jednotlivé atomy, které byly zadány jako vstupní hodnoty do programů GeNMR a TALOS+ pro predikci sekundárních struktur.

Jelikož je receptor DCL-1 zařazen na základě lokalizace genu a sekvenční podobnosti do rodiny C-lektinových receptorů, je vysoce pravděpodobné, že jeho extracelulární doména bude tvořit tzv. motiv C-lektinové domény. Celkovým tvarem této struktury je smyčka, jejíž konce jsou v blízkosti a tvoří antiparalelní β skládaný list. Struktura domény sestává ještě z druhé („dlouhé“) smyčky. Obě smyčky na svých koncích disponují každá dvěma vysoce konzervovanými cysteiny, které spolu tvoří disulfidové můstky. Pokud je lektinová doména delší, jsou zde přítomny ještě dva cysteiny (tak je tomu i v případě našeho konstruktů), které tvoří další disulfidový můstek. V rámci motivu jsou přítomny i dvě α šroubovice a druhý β skládaný list.^[9] Všechny provedené predikce sekundárních struktur se shodují ohledně lokalizace dvou α helikálních struktur, ovšem co do počtu a lokalizace potenciálních β listů se již mírně rozcházejí. V jakém stavu jsou v doméně přítomny cysteiny bylo možné určit na základě chemických posunů jader C^β uhlíků. Pokud je cystein ve stavu redukovaném, je možné identifikovat signál jeho C^β uhlíku na pozici okolo 30 ppm, pokud ale tvoří disulfidový můstek, nebo je jiným způsobem oxidovaný, je tento posun okolo 42 ppm. V našem případě byly všechny cysteiny ve stavu oxidovaném – tudíž pravděpodobně tvoří disulfidové můstky. Pro zjištění jakým způsobem mohou být spárované byl sice proveden dodatečný experiment, jehož výsledek byl ale natolik nesměrodatný, že jej bude zapotřebí zopakovat.

Prozatím tedy byla získána pouze sekvenční informace. V další fázi bude pro určení terciární struktury proteinu následovat analýza spekter založených na nukleárním Overhauserově efektu (NOE), kdy bude možné určit, které protony jsou v definovaných vzdálenostech v rámci prostoru.

Pro náhled na terciární strukturu byly provedeny pokusy chemického zesílení. Použita byla homobifunkční činidla DSG a DSS, která tvoří můstek mezi aminovými skupinami postranních řetězců aminokyselin (případně N koncem peptidu), na které se kovalentně vážou. V případě DSG je můstek dlouhý 7,7 Å, u DSS 11,4 Å. Dalším použitým činidlem bylo heterobifunkčním EDC, které umožňuje tvorbu amidové vazby v rámci dvou postranních řetězců aminokyselin. Pro získání peptidových fragmentů pak byly použity serinové peptidasy

trypsin a GluC. Pokud vezmeme v úvahu výsledky získané při použití DSG a DSS zjistíme, že nám moc konkrétní informací neposkytují. V rámci jednoho peptidového fragmentu je obvykle více než jeden lysin, jehož postranní řetězec je velice dlouhý – až 7,3 Å, dle konformace. Při použití DSS se tedy teoreticky můžeme dostat až na vzdálenost 26 Å mezi C^α uhlíky proteinové páteře a jelikož je zatím k dispozici pouze model, není možné určit, která kombinace svázaných řetězců je ta pravá. Při pokusech, kdy bylo jako síťovací činidlo použito EDC zde nastává jiný problém. Náš konstrukt obsahuje značné množství asparagové a glutamové kyseliny, které jsou v sekvenci často jedna za druhou, což nám opět ztěžuje identifikaci konkrétních vazebných partnerů.

Do budoucna by tedy bylo vhodné tyto experimenty zopakovat s použitím ještě jiných síťovacích činidel, případně zkusit další peptidasu.

Snaha o vyřešení trojrozměrné struktury receptoru DCL-1 je součástí širšího úsilí laboratoře o rozřešení 3D struktur leukocytárních receptorů podobných lektinům. Paralelně s touto prací, kdy byla data pro strukturní analýzu získána z rozpustné formy proteinu, probíhá i analýza krystalových struktur (ÚMCH AV ČR). Z předešlého textu je také zřejmé, že analýza dalších NMR spekter je pro určení terciární struktury proteinu nezbytná. V první fázi budou přiřazeny atomy aromatických postranních řetězců a následně proběhne analýza NOE spekter, na jejímž základě pak bude možné správně vyhodnotit i informaci získanou z pokusů chemického zesíťení.

(7) ZÁVĚR

- proteinový konstrukt byl úspěšně naprodukován v M9 minimálním médiu
- následně byla renaturována inkluzní tělíska a protein purifikován
- bylo získáno 0,5 ml 0,5mM roztoku ^{13}C , ^{15}N značeného proteinu
- kromě první aminokyseliny v sekvenci (Met) jsou identifikovány signály příslušející jednotlivým atomům peptidové páteře – z 96,5 %
- přiřazena je i více jak polovina signálů, pocházející od atomů postranních řetězců aminokyselin (celkem 68,9 %)
- atomů alifatických postranních řetězců je přiřazeno 86,6 %
- ◆ provedené pokusy chemického zesíťení byly úspěšné, ale zatím jejich informační hodnotu není možné plně využít

(8) LITERATURA

- [1] Kato, M., Khan, S., Gonzales, N., O'Neill, B., McDonald, K. J., Cooper, B. J., Angel, N. Z. & Hart, D. N. J.: *J. Biol. Chem.* **278**, 34035–34041 (2003).
- [2] Kato, M., Khan, S., d' Aniello, E., McDonald, K. J. & Hart, D. N. J.: *J. Immunol.* **179**, 6052–6063 (2007).
- [3] CD4 Stock Photography Images From SuperStock.
<http://www.superstock.co.uk/stock-photography/CD4> (poslední přístup 18. 4. 2012)
- [4] CD302 antigen precursor - Homo sapiens (Human).
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q8IX05> (poslední přístup 18. 4. 2012)
- [5] CD302 antigen precursor - Mus musculus (Mouse).
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9DCG2> (poslední přístup 18. 4. 2012)
- [6] CD302 antigen precursor - Rattus norvegicus (Rat).
<http://www.uniprot.org/uniprot/Q5FVR3> (poslední přístup 18. 4. 2012)
- [7] Weis, W. I., Taylor, M. E. & Drickamer, K.: *Immunol. Rev.* **163**, 19–34 (1998).
- [8] Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J.: *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 77–84 (2002).
- [9] Zelensky, A. N. & Gready, J. E.: *FEBS J.* **272**, 6179–6217 (2005).
- [10] Cambi, A., Koopman, M. & Figdor, C. G.: *Cell. Microbiol.* **7**, 481–488 (2005).
- [11] Shrimpton, R. E., Butler, M., Morel, A., Eren, E., Hue, S. S., & Ritter, M. A.: *Mol. Immunol.* **46**, 1229–1239 (2009).
- [12] Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C.: *Nature* **375**, 151–155 (1995).
- [13] Mahnke, K., Guo, M., Lee, S., Sepulveda, H., Swain, S. L., Nussenzweig, M. & Steinman, R. M.: *J. Cell Biol.* **151**, 673–684 (2000).
- [14] Kato, M., Neil, T. K., Clark, G. J., Morris, C. M., Sorg, R. V. & Hart, D. N.: *Immunogenetics* **47**, 442–450 (1998).
- [15] Kato, M., McDonald, K. J., Khan, S., Ross, I. L., Vuckovic, S., Chen, K., Munster, D., MacDonald, K. P. A. & Hart, D. N. J.: *Int. Immunol.* **18**, 857–869 (2006).

- [16] Akiva, P., Toporik, A., Edelheit, S., Peretz, Y., Diber, A., Shemesh, R., Novik, A., & Sorek, R.: *Genome Res.* **16**, 30–36 (2006).
- [17] Butler, M., Morel, A., Jordan, W. J., Eren, E., Hue, S., Shrimpton, R. E. & Ritter, M. A.: *Immunology* **120**, 362–371 (2007).
- [18] Hodgkin, T.: *Med Chir Trans* **17**, 68–114 (1832).
- [19] Ellis, P. A., Hart, D. N., Colls, B. M., Nimmo, J. C., MacDonald, J. E. & Angus, H. B.: *Clin. Exp. Immunol.* **90**, 117–123 (1992).
- [20] Küppers, R. & Rajewsky, K.: *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 471–493 (1998).
- [21] Gruss, H. J., Hirschstein, D., Wright, B., Ulrich, D., Caligiuri, M. A., Barcos, M., Strockbine, L., Armitage, R. J. & Dower, S. K.: *Blood* **84**, 2305–2314 (1994).
- [22] Marafioti, T., Hummel, M., Foss, H. D., Laumen, H., Korbjuhn, P., Anagnostopoulos, I., Lammert, H., Demel, G., Theil, J., Wirth, T. & Stein, H.: *Blood* **95**, 1443–1450 (2000).
- [23] Aldinucci, D., Gloghini, A., Pinto, A., De Filippi, R. & Carbone, A.: *J. Pathol.* **221**, 248–263 (2010).
- [24] Yurchenko, M. & Sidorenko, S. P.: *Exp. Oncol.* **32**, 214–223 (2010).
- [25] Montes-Moreno, S.: *Adv Hematol* **2011**, 142395 (2011).
- [26] Fujimoto, S., Mochizuki, K., Shimada, M., Hori, T., Murayama, Y., Ohashi, N. & Goda, T.: *Life Sci.* **87**, 679–685 (2010).
- [27] Yasuda, S., Hasegawa, T., Hosono, T., Satoh, M., Watanabe, K., Ono, K., Shimizu, S., Hayakawa, T., Yamaguchi, T., Suzuki, K. & Sato, Y.: *Biochem. J.* **437**, 345–355 (2011).
- [28] Posorski, N., Kaemmerer, D., Grabowski, P., Hoersch, D., Hommann, M. & von Eggeling, F.: *Clin. Exp. Metastasis* **28**, 637–647 (2011).
- [29] Mikulak, J., Teichberg, S., Arora, S., Kumar, D., Yadav, A., Salhan, D., Pullagura, S., Mathieson, P. W., Saleem, M. A. & Singhal, P. C.: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **299**, F664–673 (2010).

- [30] Noble, J. E. & Bailey, M. J. A.: *Meth. Enzymol.* **463**, 73–95 (2009).
- [31] Nelson, D. L., Lehninger, A. L. & Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry*. (W.H. Freeman: New York, 2008).
- [32] GE Healthcare: High Performance Columns. Instructions 71-5017-96 AG
- [33] T. D. Goddard and D. G. Kneller, SPARKY 3, University of California, San Francisco
- [34] Cavanagh, J. *Protein NMR spectroscopy : principles and practice*. (Academic Press: San Diego; London, 2007).
- [35] Jones, D. T.: *J. Mol. Biol.* **292**, 195–202 (1999).
- [36] Berjanskii, M., Tang, P., Liang, J., Cruz, J. A., Zhou, J., Zhou, Y., Bassett, E., MacDonell, C., Lu, P., Lin, G. & Wishart, D. S.: *Nucleic Acids Res.* **37**, W670–677 (2009).
- [37] Shen, Y., Delaglio, F., Cornilescu, G. & Bax, A.: *J. Biomol. NMR* **44**, 213–223 (2009).
- [38] Hermanson, G. T.: *Bioconjugate techniques*. (Academic Press: Amsterdam; Boston, 2008).
- [39] Thermo Scientific: Product instructions: Product number 20593. DSG
- [40] Thermo Scientific: Product instructions: Product number 21555. DSS
- [41] Thermo Scientific: Product instructions: Product number 22980. EDC
- [42] Di Cera, E.: *IUBMB Life* **61**, 510–515 (2009).
- [43] Hedstrom, L.: *Chem. Rev.* **102**, 4501–4524 (2002).
- [44] Ono, T., Ohara/Nemoto, Y., Shimoyama, Y., Okawara, H., Kobayakawa, T., Baba, T. T., Kimura, S. & Nemoto, T. K.: *Biol. Chem.* **391**, 1221–1232 (2010).
- [45] MEROPS - the Peptidase Database. at <http://merops.sanger.ac.uk/index.shtml> (poslední přístup 18. 4. 2012)

(9) PŘÍLOHY

9.1) Tabulka chemických posunů jader

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení	Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
W_1	NE	15N	127.8920.000		1	S5	CA	13C	57.185	0.039	3
W_1	QE	1H	10.014	0.000	1	S5	CB	13C	65.817	0.026	3
D2	C	13C	175.7800.004		2	S5	H	1H	6.957	0.002	19
D2	CA	13C	55.109	0.047	5	S5	HA	1H	4.744	0.004	5
D2	CB	13C	42.157	0.220	5	S5	HB2	1H	4.114	0.001	2
D2	HA	1H	4.737	0.005	5	S5	HB3	1H	4.352	0.003	2
D2	HB2	1H	2.446	0.002	3	S5	N	15N	106.4620.041		18
D2	HB3	1H	2.686	0.002	3	W_5	NE	15N	132.4640.000		1
W_2	NE	15N	128.3450.000		1	W_5	QE	1H	10.579	0.000	1
W_2	QE	1H	10.483	0.000	1	S6	C	13C	174.4780.000		1
C3	C	13C	173.2620.000		1	S6	CA	13C	60.704	0.048	3
C3	CA	13C	52.673	0.030	3	S6	CB	13C	63.274	0.052	4
C3	CB	13C	38.272	0.031	2	S6	HA	1H	4.512	0.002	2
C3	H	1H	7.994	0.003	19	S6	HB2	1H	4.045	0.000	1
C3	HA	1H	4.846	0.007	4	S6	HB3	1H	4.216	0.007	2
C3	HB2	1H	2.847	0.000	1	Q_7	HE21	1H	7.491	0.000	1
C3	HB3	1H	2.890	0.003	2	Q_7	HE22	1H	6.826	0.000	1
C3	N	15N	116.2670.025		18	Q_7	NE2	15N	112.1550.006		2
C3	QB	1H	2.874	0.000	1	T7	C	13C	175.1480.011		3
Q_3	HE21	1H	7.239	0.000	1	T7	CA	13C	63.906	0.069	5
Q_3	HE22	1H	7.154	0.000	1	T7	CB	13C	69.177	0.037	6
Q_3	NE2	15N	111.1690.001		2	T7	CG2	13C	22.837	0.014	4
W_3	NE	15N	129.8530.000		1	T7	H	1H	8.194	0.002	17
W_3	QE	1H	10.419	0.000	1	T7	HA	1H	4.292	0.006	5
P4	C	13C	176.2270.003		2	T7	HB	1H	4.107	0.005	6
P4	CA	13C	65.978	0.050	7	T7	MG2	1H	1.271	0.003	7
P4	CB	13C	32.106	0.034	14	T7	N	15N	115.0570.049		17
P4	CD	13C	49.852	0.051	11	Q_8	HE21	1H	7.232	0.000	1
P4	CG	13C	27.226	0.000	1	Q_8	HE22	1H	6.651	0.000	1
P4	HA	1H	3.967	0.001	9	Q_8	NE2	15N	110.2010.000		2
P4	HB2	1H	1.369	0.004	11	W8	C	13C	175.7870.005		3
P4	HB3	1H	2.253	0.003	10	W8	CA	13C	57.466	0.048	4
P4	HD2	1H	1.677	0.003	5	W8	CB	13C	30.193	0.016	4
P4	HD3	1H	3.133	0.003	10	W8	H	1H	7.586	0.004	20
P4	HG2	1H	0.851	0.003	5	W8	HA	1H	4.875	0.003	2
P4	HG3	1H	1.445	0.001	5	W8	N	15N	121.4320.025		19
W_4	NE	15N	130.1430.000		1	W8	QB	1H	3.298	0.004	2
W_4	QE	1H	10.480	0.000	1	I9	C	13C	175.3570.014		3
S5	C	13C	175.1680.000		1	I9	CA	13C	60.694	0.047	9

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
I9	CB	13C	41.236	0.076	8
I9	CD1	13C	13.266	0.095	7
I9	CG1	13C	27.947	0.049	11
I9	CG2	13C	18.270	0.039	7
I9	H	1H	9.896	0.003	20
I9	HA	1H	4.636	0.005	11
I9	HB	1H	2.039	0.005	11
I9	HG12	1H	1.357	0.011	11
I9	HG13	1H	1.764	0.003	12
I9	MD1	1H	0.743	0.003	12
I9	MG2	1H	1.185	0.003	14
I9	N	15N	122.0100	0.030	19
Q10	C	13C	175.3940	0.001	2
Q10	CA	13C	55.557	0.027	7
Q10	CB	13C	30.670	0.046	10
Q10	CG	13C	34.060	0.042	8
Q10	H	1H	8.981	0.002	24
Q10	HA	1H	5.352	0.002	8
Q10	HG2	1H	2.282	0.000	2
Q10	HG3	1H	2.382	0.005	2
Q10	N	15N	129.0490	0.023	23
Q10	QB	1H	2.152	0.007	4
Q10	QG	1H	2.323	0.000	1
Q10/Q97	H22	1H	7.199	0.002	2
Q10/Q97	HE21	1H	7.500	0.221	10
Q10/Q97	HE22	1H	7.081	0.092	8
Q10/Q97	NE2	15N	112.0100	0.572	4
F11	C	13C	174.0410	0.005	3
F11	CA	13C	58.845	0.051	7
F11	CB	13C	40.968	0.056	6
F11	H	1H	8.810	0.002	20
F11	HA	1H	4.264	0.003	8
F11	HB2	1H	1.891	0.004	4
F11	HB3	1H	2.242	0.006	4
F11	N	15N	126.1260	0.032	19
Q12	C	13C	174.8220	0.000	1
Q12	CA	13C	57.825	0.035	5
Q12	CB	13C	25.544	0.043	8
Q12	CG	13C	33.436	0.090	12
Q12	H	1H	8.555	0.002	21
Q12	HA	1H	3.333	0.003	8
Q12	HE21	1H	7.009	0.000	5
Q12	HE22	1H	6.711	0.001	5
Q12	HG2	1H	1.049	0.009	5

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
Q12	HG3	1H	1.543	0.011	5
Q12	N	15N	124.7100	0.044	20
Q12	NE2	15N	110.1460	0.000	2
Q12	QB	1H	1.760	0.003	8
D13	C	13C	175.4210	0.004	2
D13	CA	13C	54.522	0.047	3
D13	CB	13C	40.749	0.364	4
D13	HA	1H	4.721	0.000	1
D13	QB	1H	2.822	0.000	1
S14	C	13C	171.2120	0.008	3
S14	CA	13C	58.737	0.044	6
S14	CB	13C	67.418	0.358	6
S14	H	1H	8.225	0.003	20
S14	HA	1H	5.195	0.002	5
S14	HB2	1H	3.439	0.006	4
S14	HB3	1H	3.845	0.006	4
S14	N	15N	114.6040	0.034	19
C15	C	13C	173.3210	0.002	3
C15	CA	13C	55.469	0.032	6
C15	CB	13C	47.029	0.307	6
C15	H	1H	8.806	0.004	19
C15	HA	1H	5.680	0.005	5
C15	HB2	1H	2.861	0.004	4
C15	HB3	1H	3.035	0.004	3
C15	N	15N	118.6430	0.044	18
C15	QB	1H	3.039	0.000	1
Y16	C	13C	174.7450	0.010	3
Y16	CA	13C	57.237	0.056	6
Y16	CB	13C	42.565	0.049	6
Y16	H	1H	10.065	0.005	19
Y16	HA	1H	5.758	0.001	6
Y16	HB2	1H	3.131	0.012	4
Y16	HB3	1H	3.288	0.007	4
Y16	N	15N	122.0030	0.049	18
I17	C	13C	170.4890	0.000	1
I17	CA	13C	59.983	0.000	1
I17	CB	13C	40.890	0.000	1
I17	H	1H	8.517	0.004	18
I17	HA	1H	4.422	0.000	1
I17	N	15N	119.9190	0.057	17
F18	C	13C	174.1590	0.005	2
F18	CA	13C	54.726	0.061	3
F18	CB	13C	38.925	0.021	3
L19	C	13C	176.0320	0.004	3

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

L19	CA	13C	53.585	0.022	8
L19	CB	13C	42.079	0.033	12
L19	CD1	13C	22.420	0.024	5
L19	CG	13C	26.100	0.112	5
L19	CQD	13C	22.164	0.000	1
L19	H	1H	8.720	0.004	17
L19	HA	1H	4.136	0.004	9
L19	HB2	1H	1.148	0.003	9
L19	HB3	1H	1.520	0.002	7
L19	HG	1H	1.152	0.013	6
L19	MD1	1H	0.216	0.001	10
L19	MD2	1H	0.421	0.000	5
L19	N	15N	128.1380	0.025	16
L19	QB	1H	1.524	0.004	2
Q20	C	13C	174.8330	0.007	3
Q20	CA	13C	55.371	0.028	6
Q20	CB	13C	29.755	0.118	15
Q20	CG	13C	34.644	0.074	10
Q20	H	1H	8.468	0.002	20
Q20	HA	1H	4.232	0.003	7
Q20	HB2	1H	1.772	0.005	8
Q20	HB3	1H	2.060	0.003	6
Q20	HE21	1H	7.573	0.001	5
Q20	HE22	1H	6.918	0.001	5
Q20	HG2	1H	1.980	0.005	6
Q20	HG3	1H	2.047	0.010	7
Q20	N	15N	123.9790	0.048	20
Q20	NE2	15N	112.1860	0.001	2
E21	C	13C	175.1470	0.007	3
E21	CA	13C	55.854	0.071	8
E21	CB	13C	31.053	0.129	13
E21	CG	13C	36.104	0.017	4
E21	H	1H	7.711	0.008	22
E21	HA	1H	4.265	0.004	10
E21	HB2	1H	1.775	0.012	10
E21	HB3	1H	1.892	0.014	11
E21	N	15N	121.3600	0.032	21
E21	QG	1H	2.142	0.003	8
A22	C	13C	177.2130	0.005	3
A22	CA	13C	52.004	0.084	6
A22	CB	13C	18.207	0.030	6
A22	H	1H	8.378	0.003	21
A22	HA	1H	4.602	0.005	6
A22	MB	1H	1.313	0.006	6

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

A22	N	15N	126.7620	0.060	20
I23	C	13C	174.9820	0.006	3
I23	CA	13C	59.875	0.033	10
I23	CB	13C	41.253	0.032	10
I23	CD	13C	13.657	0.000	1
I23	CD1	13C	13.706	0.041	6
I23	CG1	13C	26.446	0.045	10
I23	CG2	13C	17.618	0.038	6
I23	H	1H	7.902	0.006	18
I23	HA	1H	4.402	0.003	14
I23	HB	1H	1.732	0.003	14
I23	HG12	1H	0.961	0.004	9
I23	HG13	1H	1.336	0.005	10
I23	MD1	1H	0.718	0.006	11
I23	MG2	1H	0.806	0.044	14
I23	N	15N	119.4880	0.017	17
I23	QG1	1H	1.350	0.000	1
K24	C	13C	175.8230	0.007	3
K24	CA	13C	56.239	0.066	10
K24	CB	13C	32.464	0.067	9
K24	CD	13C	28.984	0.088	5
K24	CE	13C	42.294	0.108	2
K24	CG	13C	24.701	0.043	9
K24	H	1H	8.278	0.003	25
K24	HA	1H	4.458	0.004	13
K24	HG2	1H	1.345	0.008	8
K24	HG3	1H	1.471	0.008	9
K24	N	15N	124.9800	0.044	24
K24	QB	1H	1.778	0.014	9
K24	QD	1H	1.689	0.024	8
K24	QE	1H	2.995	0.001	7
K24	QG	1H	1.423	0.000	1
V25	C	13C	175.0830	0.005	3
V25	CA	13C	60.818	0.060	8
V25	CB	13C	34.849	0.087	6
V25	CG1	13C	22.373	0.058	5
V25	CG2	13C	20.033	0.039	5
V25	H	1H	8.134	0.003	24
V25	HA	1H	4.444	0.004	9
V25	HB	1H	2.079	0.006	7
V25	MG1	1H	0.806	0.000	8
V25	MG2	1H	0.751	0.007	9
V25	N	15N	121.1240	0.062	23
E26	C	13C	176.2010	0.007	3

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

E26	CA	13C	56.450	0.060	4
E26	CB	13C	31.636	0.040	4
E26	CG	13C	36.740	0.000	1
E26	H	1H	9.346	0.003	22
E26	HA	1H	4.604	0.009	2
E26	N	15N	121.7960	0.027	21
E26	QB	1H	1.996	0.009	2
E26	QG	1H	2.220	0.015	2
S27	C	13C	175.0600	0.009	2
S27	CA	13C	57.022	0.040	6
S27	CB	13C	66.537	0.021	6
S27	H	1H	8.060	0.003	20
S27	HA	1H	4.872	0.001	6
S27	HB2	1H	3.978	0.006	4
S27	HB3	1H	4.270	0.000	3
S27	N	15N	113.3750	0.019	19
I28	C	13C	176.5150	0.004	2
I28	CA	13C	63.280	0.051	10
I28	CB	13C	37.902	0.049	10
I28	CD1	13C	14.255	0.010	6
I28	CG1	13C	29.526	0.025	6
I28	CG2	13C	17.639	0.037	7
I28	H	1H	9.237	0.003	18
I28	HA	1H	4.084	0.003	14
I28	HB	1H	2.108	0.001	10
I28	HG12	1H	1.672	0.002	6
I28	HG13	1H	1.756	0.002	7
I28	MD1	1H	1.274	0.002	10
I28	MG2	1H	1.238	0.002	13
I28	N	15N	122.1690	0.048	17
E29	C	13C	178.1600	0.009	3
E29	CA	13C	60.251	0.058	8
E29	CB	13C	28.857	0.068	8
E29	CG	13C	36.922	0.026	3
E29	H	1H	8.354	0.005	21
E29	HA	1H	3.785	0.002	9
E29	HG2	1H	2.253	0.004	2
E29	HG3	1H	2.311	0.003	2
E29	N	15N	122.3160	0.026	20
E29	QB	1H	1.949	0.006	9
E29	QG	1H	2.280	0.003	4
D30	C	13C	178.8670	0.006	3
D30	CA	13C	57.458	0.030	6
D30	CB	13C	41.668	0.036	6

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

D30	H	1H	7.665	0.004	20
D30	HA	1H	4.454	0.005	6
D30	HB2	1H	2.883	0.001	3
D30	HB3	1H	3.028	0.003	4
D30	N	15N	117.5620	0.045	19
V31	C	13C	177.8030	0.007	3
V31	CA	13C	65.916	0.039	8
V31	CB	13C	31.669	0.075	7
V31	CG1	13C	23.014	0.055	4
V31	CG2	13C	22.799	0.052	4
V31	H	1H	7.265	0.002	20
V31	HA	1H	3.667	0.002	10
V31	HB	1H	2.393	0.004	8
V31	MG1	1H	1.027	0.002	8
V31	MG2	1H	1.123	0.004	7
V31	N	15N	119.6740	0.014	19
R32	C	13C	179.1700	0.009	3
R32	CA	13C	60.704	0.000	1
R32	CB	13C	29.429	0.057	4
R32	CD	13C	43.160	0.000	1
R32	H	1H	8.241	0.004	18
R32	HA	1H	4.194	0.012	2
R32	N	15N	120.9450	0.047	17
R32	QB	1H	1.599	0.000	1
R32	QG	1H	1.476	0.000	1
N33	C	13C	177.1700	0.006	3
N33	CA	13C	54.805	0.046	9
N33	CB	13C	38.127	0.058	7
N33	H	1H	8.280	0.008	17
N33	HA	1H	4.740	0.032	4
N33	HD21	1H	7.616	0.001	3
N33	HD22	1H	6.782	0.000	4
N33	N	15N	116.5480	0.034	16
N33	ND2	15N	111.7240	0.000	2
N33	QB	1H	2.844	0.002	4
Q34	C	13C	179.0190	0.007	2
Q34	CA	13C	58.983	0.051	8
Q34	CB	13C	28.929	0.058	12
Q34	CG	13C	34.425	0.133	14
Q34	H	1H	7.537	0.002	18
Q34	HA	1H	4.190	0.010	11
Q34	HB2	1H	2.167	0.011	4
Q34	HB3	1H	2.235	0.011	8
Q34	HE21	1H	7.441	0.002	5

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

Q34	HE22	1H	6.899	0.001	5
Q34	HG2	1H	2.321	0.003	7
Q34	HG3	1H	2.501	0.004	9
Q34	N	15N	117.6270	0.039	17
Q34	NE2	15N	111.1820	0.000	2
Q34	QB	1H	2.497	0.000	1
C35	C	13C	178.9050	0.005	3
C35	CA	13C	55.012	0.050	6
C35	CB	13C	35.027	0.105	6
C35	H	1H	7.395	0.007	21
C35	HA	1H	4.672	0.008	4
C35	HB2	1H	2.488	0.005	5
C35	HB3	1H	2.949	0.010	4
C35	N	15N	113.9080	0.079	20
T36	C	13C	179.4860	0.007	3
T36	CA	13C	66.294	0.055	4
T36	CB	13C	68.154	0.132	6
T36	CG2	13C	21.632	0.103	3
T36	H	1H	8.902	0.004	17
T36	HA	1H	4.555	0.005	3
T36	HB	1H	4.381	0.002	5
T36	MG2	1H	1.314	0.004	3
T36	N	15N	119.1720	0.076	16
D37	C	13C	177.2980	0.005	3
D37	CA	13C	57.024	0.053	6
D37	CB	13C	40.406	0.034	6
D37	H	1H	8.465	0.013	20
D37	HA	1H	4.511	0.002	6
D37	HB2	1H	2.444	0.006	4
D37	HB3	1H	2.777	0.006	4
D37	N	15N	124.5090	0.061	19
H38	C	13C	174.6180	0.004	2
H38	CA	13C	56.143	0.073	6
H38	CB	13C	29.346	0.108	4
H38	H	1H	7.563	0.007	19
H38	HA	1H	4.739	0.006	4
H38	HB2	1H	2.926	0.008	3
H38	HB3	1H	3.805	0.011	3
H38	N	15N	115.3480	0.102	18
G39	C	13C	173.5090	0.003	3
G39	CA	13C	46.544	0.021	8
G39	H	1H	8.047	0.003	17
G39	HA2	1H	3.957	0.004	4
G39	HA3	1H	4.040	0.003	4

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

G39	N	15N	108.0060	0.043	16
G39	QA	1H	4.005	0.012	2
A40	C	13C	174.0270	0.016	3
A40	CA	13C	49.925	0.080	6
A40	CB	13C	23.151	0.041	5
A40	H	1H	7.778	0.005	14
A40	HA	1H	4.965	0.003	6
A40	MB	1H	1.452	0.006	4
A40	N	15N	122.0400	0.022	13
D41	C	13C	176.1890	0.008	3
D41	CA	13C	51.960	0.021	6
D41	CB	13C	44.297	0.184	6
D41	H	1H	8.448	0.002	19
D41	HA	1H	4.884	0.004	6
D41	HB2	1H	2.525	0.013	4
D41	HB3	1H	3.085	0.004	4
D41	N	15N	117.2950	0.031	18
M42	C	13C	177.8880	0.005	3
M42	CA	13C	57.657	0.046	7
M42	CB	13C	37.183	0.085	6
M42	CG	13C	34.639	0.031	4
M42	H	1H	10.656	0.003	20
M42	HA	1H	4.770	0.009	8
M42	N	15N	121.0970	0.050	19
M42	QB	1H	1.888	0.003	6
M42	QG	1H	2.609	0.011	7
I43	C	13C	172.2050	0.034	3
I43	CA	13C	62.486	0.060	10
I43	CB	13C	39.856	0.050	10
I43	CD1	13C	15.498	0.032	7
I43	CG1	13C	27.898	0.017	3
I43	CG2	13C	19.298	0.019	7
I43	H	1H	8.254	0.002	15
I43	HA	1H	3.803	0.002	13
I43	HB	1H	1.758	0.002	11
I43	HG12	1H	1.277	0.002	5
I43	HG13	1H	1.351	0.002	5
I43	MD1	1H	1.030	0.001	10
I43	MG2	1H	1.095	0.001	11
I43	N	15N	119.5550	0.035	15
I43	QG1	1H	1.318	0.000	1
S44	CA	13C	55.262	0.028	3
S44	CB	13C	64.638	0.094	3
S44	H	1H	6.319	0.003	21

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

S44	N	15N	116.0310	0.028	20
I45	C	13C	176.7380	0.005	2
I45	CA	13C	60.547	0.072	8
I45	CB	13C	41.534	0.005	5
I45	CD1	13C	14.422	0.011	6
I45	CG1	13C	27.878	0.052	10
I45	CG2	13C	18.619	0.030	7
I45	H	1H	5.060	0.002	13
I45	HA	1H	4.317	0.006	14
I45	HB	1H	1.949	0.004	12
I45	HG12	1H	0.685	0.005	9
I45	HG13	1H	1.110	0.007	9
I45	MD1	1H	0.859	0.001	9
I45	MG2	1H	1.255	0.166	14
I45	N	15N	117.9960	0.053	12
I45	QG1	1H	1.309	0.000	1
H46	C	13C	172.5720	0.010	3
H46	CA	13C	57.080	0.036	5
H46	CB	13C	31.342	0.105	7
H46	H	1H	9.228	0.008	20
H46	HA	1H	4.956	0.004	6
H46	HB2	1H	2.971	0.009	6
H46	HB3	1H	3.673	0.015	4
H46	N	15N	121.6710	0.060	19
N47	C	13C	173.6040	0.003	3
N47	CA	13C	52.257	0.034	10
N47	CB	13C	39.873	0.036	10
N47	H	1H	7.125	0.003	20
N47	HA	1H	3.563	0.003	6
N47	HB2	1H	2.845	0.006	4
N47	HB3	1H	3.220	0.006	4
N47	HD21	1H	7.410	0.001	5
N47	HD22	1H	7.123	0.002	5
N47	N	15N	112.0170	0.046	19
N47	ND2	15N	115.3110	0.001	2
E48	C	13C	177.6390	0.002	2
E48	CA	13C	58.554	0.047	8
E48	CB	13C	29.474	0.049	9
E48	CG	13C	34.914	0.012	6
E48	H	1H	8.596	0.003	15
E48	HA	1H	3.809	0.001	9
E48	HB2	1H	1.906	0.002	9
E48	HB3	1H	2.159	0.003	7
E48	HG2	1H	2.321	0.002	3

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

E48	HG3	1H	2.484	0.005	5
E48	N	15N	120.5210	0.069	15
E49	C	13C	179.5330	0.005	3
E49	CA	13C	60.752	0.062	9
E49	CB	13C	28.626	0.065	6
E49	CG	13C	37.792	0.014	7
E49	H	1H	8.613	0.005	19
E49	HA	1H	4.069	0.004	10
E49	HB2	1H	2.090	0.002	4
E49	HB3	1H	2.255	0.002	4
E49	HG2	1H	2.367	0.003	4
E49	HG3	1H	2.503	0.004	6
E49	N	15N	120.0500	0.070	18
E49	QB	1H	2.079	0.005	2
E49	QG	1H	2.260	0.016	2
E50	C	13C	177.5190	0.006	3
E50	CA	13C	59.577	0.046	7
E50	CB	13C	30.159	0.015	4
E50	CG	13C	36.240	0.026	5
E50	H	1H	8.779	0.003	20
E50	HA	1H	3.934	0.002	7
E50	HG2	1H	2.354	0.005	4
E50	HG3	1H	2.525	0.000	3
E50	N	15N	122.9830	0.032	19
E50	QB	1H	2.184	0.004	4
N51	C	13C	176.4730	0.009	3
N51	CA	13C	58.639	0.035	10
N51	CB	13C	41.053	0.142	12
N51	H	1H	7.730	0.005	19
N51	HA	1H	4.102	0.018	6
N51	HB2	1H	2.515	0.002	5
N51	HB3	1H	3.156	0.007	6
N51	HD21	1H	8.129	0.001	5
N51	HD22	1H	6.769	0.001	5
N51	N	15N	120.2480	0.068	18
N51	ND2	15N	112.8860	0.002	2
A52	C	13C	180.1210	0.009	3
A52	CA	13C	55.193	0.042	5
A52	CB	13C	18.363	0.025	6
A52	H	1H	8.662	0.002	19
A52	HA	1H	4.033	0.004	4
A52	MB	1H	1.527	0.005	6
A52	N	15N	118.2160	0.026	18
F53	C	13C	178.3240	0.009	3

Skupina AtomJádرو Posun SDevPřřazenř

F53	CA	13C	60.361	0.052	6
F53	CB	13C	38.589	0.027	6
F53	H	1H	8.048	0.003	18
F53	HA	1H	4.064	0.014	5
F53	HB2	1H	2.312	0.000	1
F53	HB3	1H	2.368	0.002	3
F53	N	15N	121.3280	0.064	17
F53	QB	1H	2.340	0.003	3
I54	C	13C	177.3220	0.004	3
I54	CA	13C	64.080	0.044	10
I54	CB	13C	36.630	0.065	8
I54	CD1	13C	13.125	0.008	6
I54	CG1	13C	28.484	0.032	11
I54	CG2	13C	18.027	0.064	6
I54	H	1H	8.064	0.002	21
I54	HA	1H	2.901	0.006	12
I54	HB	1H	1.962	0.006	12
I54	HG12	1H	1.162	0.002	11
I54	HG13	1H	1.551	0.002	8
I54	MD1	1H	0.721	0.001	10
I54	MG2	1H	0.624	0.002	14
I54	N	15N	123.7770	0.033	20
L55	C	13C	178.4250	0.045	3
L55	CA	13C	58.619	0.040	9
L55	CB	13C	42.388	0.026	16
L55	CD1	13C	24.741	0.033	7
L55	CD2	13C	25.872	0.022	7
L55	CG	13C	26.958	0.040	5
L55	H	1H	7.869	0.003	22
L55	HA	1H	3.760	0.003	12
L55	HB2	1H	1.566	0.003	13
L55	HB3	1H	1.801	0.003	12
L55	HG	1H	1.861	0.002	9
L55	MD1	1H	0.898	0.002	12
L55	MD2	1H	0.956	0.001	12
L55	N	15N	119.2260	0.037	21
L55	QB	1H	1.781	0.000	1
L55	QMD	1H	0.891	0.000	1
D56	C	13C	178.5280	0.004	2
D56	CA	13C	57.589	0.041	6
D56	CB	13C	41.683	0.036	6
D56	H	1H	8.153	0.004	23
D56	HA	1H	4.172	0.005	6
D56	HB2	1H	2.416	0.005	4

Skupina AtomJádرو Posun SDevPřřazenř

D56	HB3	1H	2.611	0.007	4
D56	N	15N	117.9360	0.043	22
T57	C	13C	177.2480	0.009	3
T57	CA	13C	66.641	0.039	7
T57	CB	13C	67.899	0.089	6
T57	CG2	13C	20.475	0.051	3
T57	H	1H	7.725	0.002	20
T57	HA	1H	3.444	0.002	7
T57	HB	1H	3.267	0.007	5
T57	MG2	1H	-0.025	0.002	6
T57	N	15N	115.9090	0.041	19
L58	C	13C	177.9620	0.008	2
L58	CA	13C	57.809	0.061	10
L58	CB	13C	41.718	0.022	10
L58	CD1	13C	23.409	0.006	6
L58	CD2	13C	27.189	0.020	6
L58	CG	13C	27.176	0.036	6
L58	CQD	13C	23.319	0.000	1
L58	H	1H	8.263	0.004	17
L58	HA	1H	3.994	0.004	14
L58	HB2	1H	1.298	0.003	8
L58	HB3	1H	1.898	0.003	7
L58	HG	1H	1.727	0.004	9
L58	MD1	1H	0.505	0.000	12
L58	MD2	1H	0.648	0.001	12
L58	N	15N	122.8060	0.082	16
K59	C	13C	178.0590	0.009	3
K59	CA	13C	58.699	0.055	10
K59	CB	13C	32.925	0.046	7
K59	CD	13C	29.507	0.058	3
K59	CE	13C	42.270	0.000	2
K59	CG	13C	25.635	0.064	8
K59	H	1H	7.713	0.009	21
K59	HA	1H	4.058	0.003	14
K59	HG2	1H	1.328	0.002	7
K59	HG3	1H	1.574	0.005	4
K59	N	15N	116.9390	0.040	20
K59	QB	1H	1.827	0.005	7
K59	QD	1H	1.598	0.012	6
K59	QE	1H	2.849	0.000	6
K60	C	13C	176.9840	0.004	3
K60	CA	13C	57.900	0.071	9
K60	CB	13C	33.889	0.025	7
K60	CD	13C	29.088	0.088	3

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

K60	CE	13C	42.198	0.012	3
K60	CG	13C	25.439	0.060	6
K60	H	1H	7.530	0.004	23
K60	HA	1H	4.238	0.004	12
K60	HB2	1H	1.733	0.000	1
K60	HB3	1H	1.786	0.000	1
K60	HE	1H	2.894	0.001	7
K60	HG2	1H	1.316	0.000	3
K60	HG3	1H	1.425	0.001	4
K60	N	15N	117.1980	0.043	22
K60	QB	1H	1.762	0.003	5
K60	QD	1H	1.580	0.004	5
K60	QG	1H	1.391	0.000	1
Q61	C	13C	176.1740	0.006	3
Q61	CA	13C	57.478	0.070	9
Q61	CB	13C	29.943	0.058	13
Q61	CG	13C	33.456	0.015	4
Q61	H	1H	7.973	0.003	23
Q61	HA	1H	4.332	0.004	11
Q61	HB2	1H	1.599	0.002	8
Q61	HB3	1H	1.748	0.004	6
Q61	HE21	1H	7.279	0.001	5
Q61	HE22	1H	6.644	0.001	5
Q61	HG2	1H	2.029	0.001	2
Q61	HG3	1H	2.086	0.010	3
Q61	N	15N	117.7330	0.058	22
Q61	NE2	15N	110.7310	0.001	2
Q61	QB	1H	1.670	0.075	2
Q61	QG	1H	2.062	0.005	4
W62	C	13C	174.9550	0.000	1
W62	CA	13C	56.215	0.082	3
W62	CB	13C	30.082	0.050	6
W62	H	1H	8.017	0.011	20
W62	HA	1H	4.793	0.003	4
W62	N	15N	120.1160	0.082	19
W62	QB	1H	2.835	0.025	6
K63	C	13C	176.4500	0.004	2
K63	CA	13C	56.025	0.068	7
K63	CB	13C	31.207	0.079	7
K63	CD	13C	28.974	0.052	4
K63	CE	13C	42.261	0.023	4
K63	CG	13C	24.467	0.057	5
K63	H	1H	7.860	0.006	15
K63	HA	1H	4.191	0.001	9

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

K63	HB2	1H	1.715	0.000	1
K63	N	15N	120.1570	0.074	14
K63	QB	1H	1.744	0.008	5
K63	QD	1H	1.620	0.003	6
K63	QE	1H	2.955	0.007	8
K63	QG	1H	1.281	0.009	10
G64	C	13C	171.5360	0.000	1
G64	CA	13C	45.325	0.011	5
G64	H	1H	7.670	0.022	18
G64	HA2	1H	3.555	0.003	4
G64	HA3	1H	4.043	0.019	5
G64	N	15N	107.8860	0.048	18
P65	C	13C	175.1970	0.004	2
P65	CA	13C	62.824	0.019	10
P65	CB	13C	32.801	0.046	16
P65	CD	13C	50.019	0.040	11
P65	CG	13C	27.055	0.043	13
P65	HA	1H	4.635	0.002	13
P65	HB2	1H	2.240	0.005	13
P65	HB3	1H	2.400	0.004	14
P65	HD2	1H	3.562	0.003	12
P65	HD3	1H	3.688	0.002	10
P65	HG2	1H	2.018	0.002	12
P65	HG3	1H	2.155	0.003	13
D66	C	13C	175.9650	0.008	3
D66	CA	13C	56.054	0.055	5
D66	CB	13C	41.817	0.143	5
D66	H	1H	8.299	0.003	21
D66	HA	1H	4.504	0.002	4
D66	N	15N	116.6920	0.042	20
D66	QB	1H	2.633	0.004	6
D67	C	13C	174.9930	0.007	2
D67	CA	13C	53.539	0.019	5
D67	CB	13C	44.306	0.145	6
D67	H	1H	7.670	0.006	17
D67	HA	1H	5.744	0.007	4
D67	N	15N	117.2130	0.049	16
D67	QB	1H	2.377	0.003	6
I68	C	13C	174.9820	0.001	3
I68	CA	13C	58.455	0.059	10
I68	CB	13C	41.399	0.045	10
I68	CD1	13C	13.915	0.084	7
I68	CG1	13C	27.480	0.064	5
I68	CG2	13C	18.078	0.039	7

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
I68	H	1H	8.631	0.005	19
I68	HA	1H	4.838	0.004	13
I68	HB	1H	1.824	0.003	13
I68	HG12	1H	1.136	0.011	8
I68	HG13	1H	1.460	0.006	7
I68	MD1	1H	0.689	0.002	10
I68	MG2	1H	0.881	0.004	13
I68	N	15N	118.6820	0.046	18
L69	C	13C	176.3810	0.008	2
L69	CA	13C	56.133	0.077	8
L69	CB	13C	43.743	0.051	10
L69	CD1	13C	25.177	0.034	6
L69	CD2	13C	26.216	0.030	6
L69	CG	13C	27.097	0.076	5
L69	H	1H	8.703	0.003	22
L69	HA	1H	3.969	0.002	11
L69	HB2	1H	1.524	0.002	6
L69	HB3	1H	1.610	0.010	7
L69	HG	1H	1.620	0.002	5
L69	MD1	1H	0.839	0.001	11
L69	MD2	1H	0.680	0.001	11
L69	N	15N	127.8230	0.053	21
L70	C	13C	178.5410	0.009	3
L70	CA	13C	52.876	0.060	7
L70	CB	13C	44.390	0.039	11
L70	CD1	13C	23.406	0.048	5
L70	CD2	13C	23.667	0.000	1
L70	CG	13C	26.384	0.063	2
L70	CQD	13C	23.442	0.000	1
L70	H	1H	8.534	0.002	21
L70	HA	1H	4.402	0.006	8
L70	HB2	1H	1.095	0.003	7
L70	HB3	1H	1.484	0.004	9
L70	HG	1H	1.347	0.001	4
L70	MD1	1H	0.421	0.001	9
L70	MD2	1H	0.421	0.000	2
L70	N	15N	121.6330	0.046	20
L70	QB	1H	1.480	0.000	1
L70	QMD	1H	1.093	0.000	1
G71	C	13C	174.3050	0.012	3
G71	CA	13C	50.637	0.048	5
G71	H	1H	8.249	0.003	20
G71	N	15N	109.1650	0.034	19
G71	QA	1H	3.705	0.007	4

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
M72	C	13C	172.8770	0.005	3
M72	CA	13C	53.762	0.032	8
M72	CB	13C	39.376	0.070	12
M72	CE	13C	19.424	0.000	1
M72	CG	13C	30.798	0.166	5
M72	H	1H	8.233	0.002	15
M72	HA	1H	5.301	0.001	10
M72	HB2	1H	1.523	0.005	8
M72	HB3	1H	1.622	0.005	8
M72	ME	1H	1.557	0.041	3
M72	N	15N	124.9530	0.076	15
M72	QB	1H	1.767	0.006	2
M72	QG	1H	1.765	0.003	8
F73	C	13C	171.7750	0.003	3
F73	CA	13C	54.993	0.039	6
F73	H	1H	8.761	0.003	23
F73	HA	1H	5.205	0.002	6
F73	HB2	1H	2.713	0.010	4
F73	HB3	1H	3.096	0.004	4
F73	N	15N	119.0100	0.047	22
Y74	C	13C	173.7800	0.007	3
Y74	CA	13C	57.956	0.054	6
Y74	CB	13C	39.159	0.030	6
Y74	H	1H	9.227	0.005	20
Y74	HA	1H	3.910	0.003	6
Y74	HB2	1H	2.253	0.003	4
Y74	HB3	1H	2.796	0.011	4
Y74	N	15N	122.5360	0.056	19
D75	C	13C	176.1300	0.003	3
D75	CA	13C	52.359	0.050	4
D75	CB	13C	42.265	0.010	3
D75	H	1H	8.087	0.002	20
D75	HA	1H	4.720	0.005	2
D75	HB2	1H	2.097	0.005	2
D75	HB3	1H	2.986	0.011	2
D75	N	15N	130.0490	0.048	19
T76	C	13C	176.5150	0.009	2
T76	CA	13C	64.484	0.051	4
T76	CB	13C	68.691	0.100	4
T76	CG2	13C	22.270	0.061	4
T76	H	1H	8.262	0.003	18
T76	HA	1H	4.343	0.002	2
T76	HB	1H	3.776	0.006	3
T76	MG2	1H	1.444	0.019	6

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

T76	N	15N	117.2310.048	17
D77	C	13C	177.1850.006	3
D77	CA	13C	57.350 0.050	6
D77	CB	13C	40.626 0.095	6
D77	H	1H	8.375 0.003	19
D77	HA	1H	4.474 0.002	6
D77	HB2	1H	2.609 0.001	2
D77	HB3	1H	2.815 0.005	2
D77	N	15N	122.6740.139	18
D77	QB	1H	2.734 0.092	3
D78	C	13C	175.2360.019	3
D78	CA	13C	53.468 0.024	5
D78	CB	13C	41.253 0.220	7
D78	H	1H	7.344 0.004	19
D78	HA	1H	4.589 0.010	3
D78	HB2	1H	2.415 0.001	5
D78	N	15N	117.0190.033	18
D78	QB	1H	2.399 0.008	2
A79	C	13C	175.4340.001	3
A79	CA	13C	52.462 0.047	5
A79	CB	13C	16.509 0.089	6
A79	H	1H	7.780 0.003	18
A79	HA	1H	3.653 0.002	4
A79	MB	1H	1.317 0.004	6
A79	N	15N	123.6630.039	17
S80	C	13C	172.5520.001	2
S80	CA	13C	57.031 0.051	6
S80	CB	13C	66.446 0.026	7
S80	H	1H	7.042 0.002	18
S80	HA	1H	4.607 0.006	4
S80	HB2	1H	3.577 0.001	2
S80	HB3	1H	3.609 0.010	5
S80	N	15N	109.7470.022	17
S80	QB	1H	3.601 0.006	2
F81	C	13C	175.6980.005	3
F81	CA	13C	59.044 0.028	6
F81	CB	13C	41.329 0.107	6
F81	H	1H	8.502 0.002	17
F81	HA	1H	4.827 0.005	6
F81	HB2	1H	2.816 0.005	4
F81	HB3	1H	2.983 0.009	4
F81	N	15N	120.9990.033	16
K82	C	13C	175.0220.004	3
K82	CA	13C	54.119 0.027	9

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

K82	CB	13C	36.821 0.030	18
K82	CD	13C	29.436 0.054	6
K82	CE	13C	42.663 0.015	9
K82	CG	13C	25.559 0.059	8
K82	H	1H	8.493 0.002	21
K82	HA	1H	4.321 0.002	12
K82	HB2	1H	0.510 0.004	16
K82	HB3	1H	1.536 0.002	10
K82	HD2	1H	1.501 0.006	8
K82	HD3	1H	1.722 0.002	9
K82	HE2	1H	2.770 0.002	9
K82	HE3	1H	2.915 0.003	7
K82	N	15N	119.3100.040	20
K82	QG	1H	1.039 0.002	17
W83	C	13C	180.1690.009	3
W83	CA	13C	55.780 0.045	6
W83	CB	13C	31.651 0.041	7
W83	HA	1H	5.242 0.005	6
W83	HB2	1H	3.214 0.007	5
W83	HB3	1H	3.604 0.003	4
W83	N	15N	119.7860.057	21
F84	C	13C	176.8640.005	3
F84	CA	13C	62.201 0.052	6
F84	CB	13C	39.282 0.055	5
F84	H	1H	9.149 0.002	17
F84	HA	1H	4.652 0.001	5
F84	HB2	1H	3.023 0.002	3
F84	HB3	1H	3.509 0.005	3
F84	N	15N	124.2950.039	16
D85	C	13C	177.2100.006	3
D85	CA	13C	54.218 0.043	5
D85	CB	13C	39.484 0.070	6
D85	H	1H	8.425 0.002	17
D85	HA	1H	4.457 0.004	5
D85	HB2	1H	2.579 0.003	2
D85	HB3	1H	3.225 0.003	3
D85	N	15N	114.7190.026	16
N86	C	13C	174.8220.007	3
N86	CA	13C	55.203 0.043	10
N86	CB	13C	37.819 0.043	10
N86	H	1H	8.183 0.003	20
N86	HA	1H	4.790 0.007	6
N86	HB2	1H	3.118 0.004	4
N86	HB3	1H	3.247 0.005	4

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
N86	HD21	1H	7.581	0.001	5
N86	HD22	1H	6.912	0.001	5
N86	N	15N	112.5020	0.029	19
N86	ND2	15N	112.5690	0.001	2
S87	C	13C	173.8990	0.009	3
S87	CA	13C	58.678	0.061	6
S87	CB	13C	63.836	0.045	6
S87	H	1H	8.542	0.002	18
S87	HA	1H	4.463	0.002	5
S87	HB2	1H	3.831	0.006	3
S87	HB3	1H	3.968	0.003	3
S87	N	15N	116.2620	0.030	17
N88	C	13C	175.6540	0.032	3
N88	CA	13C	53.961	0.026	7
N88	CB	13C	39.485	0.046	7
N88	H	1H	8.704	0.004	18
N88	HA	1H	4.840	0.004	4
N88	N	15N	117.7410	0.070	17
N88	QB	1H	2.904	0.005	4
N88/N121	HD21	1H	7.660	0.039	6
N88/N121	HD22	1H	7.640	0.200	6
N88/N121	ND2	15N	113.1140	0.142	4
M89	CA	13C	55.109	0.000	1
M89	CB	13C	30.456	0.020	2
M89	CG	13C	31.542	0.000	1
M89	H	1H	9.039	0.006	18
M89	HA	1H	5.514	0.009	3
M89	ME	1H	1.997	0.000	1
M89	N	15N	124.1750	0.040	17
M89	QB	1H	2.427	0.004	3
M89	QG	1H	2.644	0.001	3
T90	C	13C	173.7310	0.000	2
T90	CA	13C	62.197	0.101	3
T90	CB	13C	69.726	0.149	3
T90	CG2	13C	22.540	0.040	2
T90	HA	1H	4.697	0.000	1
T90	HB	1H	4.582	0.000	1
T90	MG2	1H	1.336	0.004	3
F91	C	13C	172.7840	0.004	3
F91	CA	13C	57.421	0.041	6
F91	CB	13C	43.562	0.022	4
F91	H	1H	8.120	0.007	21
F91	HA	1H	4.717	0.002	4
F91	HB2	1H	2.679	0.003	3

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
F91	HB3	1H	3.307	0.006	3
F91	N	15N	124.0040	0.051	20
D92	C	13C	172.2300	0.004	3
D92	CA	13C	52.401	0.023	6
D92	CB	13C	44.615	0.046	6
D92	H	1H	6.776	0.003	20
D92	HA	1H	3.341	0.006	6
D92	HB2	1H	1.261	0.004	4
D92	HB3	1H	2.309	0.007	4
D92	N	15N	120.1720	0.026	19
K93	C	13C	175.8840	0.000	1
K93	CA	13C	52.906	0.037	9
K93	CB	13C	30.844	0.059	11
K93	CD	13C	28.438	0.040	6
K93	CE	13C	41.775	0.043	8
K93	CG	13C	24.342	0.074	11
K93	H	1H	2.743	0.004	23
K93	H?	1H	-0.337	0.009	2
K93	HA	1H	3.815	0.002	13
K93	HD2	1H	1.522	0.004	5
K93	HD3	1H	1.593	0.002	4
K93	HE2	1H	2.782	0.002	9
K93	HE3	1H	2.918	0.003	7
K93	HG2	1H	0.741	0.004	9
K93	HG3	1H	0.819	0.003	10
K93	N	15N	115.7800	0.028	22
K93	QB	1H	1.032	0.004	17
K93	QD	1H	1.563	0.014	3
K93	QE	1H	2.959	0.000	1
K93	QG	1H	0.783	0.000	1
W94	C	13C	178.4570	0.007	3
W94	CA	13C	57.605	0.048	6
W94	CB	13C	30.203	0.077	8
W94	H	1H	8.249	0.003	17
W94	HA	1H	4.928	0.023	6
W94	HB2	1H	2.893	0.003	6
W94	HB3	1H	3.332	0.003	4
W94	N	15N	121.8490	0.091	16
T95	C	13C	174.1990	0.005	3
T95	CA	13C	61.528	0.066	6
T95	CB	13C	70.197	0.071	6
T95	CG2	13C	20.986	0.031	3
T95	H	1H	8.870	0.005	20
T95	HA	1H	4.457	0.005	6

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
T95	HB	1H	4.239	0.004	7
T95	MG2	1H	1.297	0.022	5
T95	N	15N	116.4730	0.030	19
D96	C	13C	175.9230	0.003	2
D96	CA	13C	54.696	0.041	4
D96	CB	13C	40.873	0.131	4
D96	H	1H	8.386	0.002	20
D96	HA	1H	4.641	0.007	2
D96	N	15N	123.4100	0.066	19
D96	QB	1H	2.687	0.008	2
Q97	C	13C	175.2040	0.013	3
Q97	CA	13C	55.587	0.053	8
Q97	CB	13C	30.656	0.073	13
Q97	CG	13C	34.039	0.078	8
Q97	H	1H	8.226	0.003	19
Q97	HA	1H	4.417	0.003	10
Q97	HB2	1H	1.959	0.004	7
Q97	HB3	1H	2.123	0.008	9
Q97	N	15N	121.4670	0.053	18
Q97	QG	1H	2.326	0.005	10
D98	C	13C	175.9270	0.002	2
D98	CA	13C	54.449	0.052	4
D98	CB	13C	41.457	0.098	3
D98	H	1H	8.334	0.004	21
D98	HA	1H	4.620	0.005	3
D98	HB2	1H	2.574	0.003	2
D98	HB3	1H	2.682	0.005	3
D98	N	15N	122.0430	0.082	20
D99	C	13C	175.9370	0.012	2
D99	CA	13C	54.395	0.011	3
D99	CB	13C	41.382	0.136	3
D99	H	1H	8.332	0.003	16
D99	HA	1H	4.583	0.004	2
D99	N	15N	120.9250	0.073	15
D99	QB	1H	2.624	0.005	2
D100	C	13C	176.1100	0.010	3
D100	CA	13C	54.259	0.041	3
D100	CB	13C	41.325	0.152	4
D100	H	1H	8.259	0.004	16
D100	HA	1H	4.543	0.001	2
D100	N	15N	120.7830	0.084	15
D100	QB	1H	2.598	0.002	2
E101	C	13C	175.9370	0.000	1
E101	CA	13C	56.699	0.045	9

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
E101	CB	13C	30.501	0.050	4
E101	CG	13C	36.118	0.015	2
E101	H	1H	8.174	0.003	18
E101	HA	1H	4.174	0.002	9
E101	HB2	1H	1.871	0.010	3
E101	HB3	1H	1.970	0.003	2
E101	HG2	1H	2.174	0.000	1
E101	HG3	1H	2.221	0.000	1
E101	N	15N	120.7850	0.062	17
E101	QG	1H	2.197	0.002	3
D102	C	13C	175.7480	0.005	3
D102	CA	13C	54.176	0.054	4
D102	CB	13C	40.905	0.353	5
D102	H	1H	8.273	0.004	19
D102	HA	1H	4.509	0.002	2
D102	N	15N	121.1970	0.042	18
D102	QB	1H	2.508	0.009	2
L103	C	13C	177.0590	0.006	3
L103	CA	13C	54.940	0.050	10
L103	CB	13C	42.094	0.028	12
L103	CD1	13C	23.163	0.021	6
L103	CD2	13C	25.290	0.031	6
L103	CG	13C	26.597	0.024	7
L103	H	1H	7.852	0.006	20
L103	HA	1H	4.167	0.002	14
L103	HB2	1H	1.074	0.004	7
L103	HB3	1H	1.154	0.010	10
L103	HG	1H	1.370	0.014	14
L103	MD1	1H	0.681	0.001	12
L103	MD2	1H	0.705	0.002	10
L103	N	15N	122.7580	0.024	19
V104	C	13C	176.0360	0.006	2
V104	CA	13C	64.001	0.056	8
V104	CB	13C	32.154	0.062	8
V104	CG1	13C	21.074	0.043	2
V104	CG2	13C	21.227	0.000	1
V104	CQG	13C	21.125	0.000	1
V104	H	1H	7.966	0.003	24
V104	HA	1H	3.895	0.003	10
V104	HB	1H	2.062	0.005	9
V104	MG1	1H	0.954	0.008	4
V104	MG2	1H	0.996	0.004	3
V104	N	15N	119.3960	0.056	23
V104	QMG	1H	0.973	0.002	2

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
D105	C	13C	175.0980	0.004	3
D105	CA	13C	54.230	0.073	5
D105	CB	13C	40.903	0.290	7
D105	H	1H	8.197	0.008	20
D105	HA	1H	4.784	0.003	3
D105	HB2	1H	2.685	0.004	7
D105	HB3	1H	2.841	0.006	4
D105	N	15N	121.3740	0.069	19
T106	C	13C	173.6210	0.009	3
T106	CA	13C	63.216	0.072	6
T106	CB	13C	69.996	0.168	6
T106	CG2	13C	22.008	0.022	2
T106	H	1H	7.792	0.004	20
T106	HA	1H	4.526	0.003	5
T106	HB	1H	4.146	0.005	7
T106	MG2	1H	1.125	0.003	4
T106	N	15N	113.6170	0.034	19
C107	C	13C	171.2530	0.006	3
C107	CA	13C	59.650	0.054	5
C107	CB	13C	43.956	0.026	4
C107	H	1H	8.951	0.003	20
C107	HA	1H	5.003	0.004	4
C107	N	15N	123.5240	0.041	19
C107	QB	1H	2.752	0.002	4
A108	C	13C	175.1340	0.005	3
A108	CA	13C	50.481	0.035	5
A108	CB	13C	24.309	0.070	6
A108	H	1H	9.184	0.002	17
A108	HA	1H	5.320	0.001	4
A108	MB	1H	1.170	0.004	6
A108	N	15N	122.9370	0.038	16
F109	C	13C	174.9020	0.003	3
F109	CA	13C	55.953	0.018	5
F109	CB	13C	43.019	0.042	5
F109	H	1H	9.279	0.003	18
F109	HA	1H	5.196	0.003	4
F109	N	15N	117.7380	0.036	17
F109	QB	1H	2.694	0.009	4
L110	C	13C	174.4900	0.007	3
L110	CA	13C	54.301	0.029	9
L110	CB	13C	44.084	0.036	14
L110	CD1	13C	24.748	0.043	5
L110	CD2	13C	25.950	0.034	6
L110	CG	13C	27.776	0.088	4

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
L110	H	1H	9.313	0.005	20
L110	HA	1H	4.667	0.002	7
L110	HB2	1H	1.058	0.003	12
L110	HB3	1H	1.702	0.005	12
L110	HG	1H	1.310	0.008	11
L110	MD1	1H	0.938	0.005	9
L110	MD2	1H	0.643	0.001	11
L110	N	15N	123.9800	0.064	19
H111	C	13C	175.9820	0.009	3
H111	CA	13C	54.827	0.076	6
H111	CB	13C	29.597	0.088	6
H111	H	1H	9.245	0.006	24
H111	HA	1H	5.517	0.006	6
H111	HB2	1H	2.773	0.007	5
H111	HB3	1H	3.645	0.008	5
H111	N	15N	128.8540	0.026	23
I112	C	13C	176.3770	0.000	1
I112	CA	13C	64.510	0.044	3
I112	CB	13C	37.153	0.035	3
I112	H	1H	8.341	0.017	18
I112	HB	1H	2.548	0.000	1
I112	N	15N	127.9450	0.109	17
I112	QG1	1H	1.948	0.000	1
K113	C	13C	177.7650	0.001	2
K113	CA	13C	59.092	0.057	9
K113	CB	13C	32.810	0.043	8
K113	CD	13C	28.961	0.000	1
K113	CE	13C	42.156	0.001	2
K113	CG	13C	25.578	0.029	6
K113	H	1H	7.980	0.030	9
K113	HA	1H	3.951	0.002	10
K113	HG2	1H	1.362	0.004	4
K113	HG3	1H	1.429	0.007	6
K113	N	15N	116.0100	0.043	8
K113	QB	1H	1.669	0.003	6
K113	QE	1H	2.998	0.001	4
K113	QG	1H	1.394	0.007	3
T114	C	13C	176.1420	0.009	3
T114	CA	13C	60.885	0.074	6
T114	CB	13C	71.504	0.035	5
T114	CG2	13C	22.175	0.074	3
T114	H	1H	6.968	0.004	21
T114	HA	1H	4.646	0.003	5
T114	HB	1H	4.407	0.003	6

Skupina AtomJádro Posun SDevPřřazení

T114	MG2	1H	1.281	0.003	5
T114	N	15N	101.8720	0.091	20
G115	C	13C	172.1210	0.005	3
G115	CA	13C	47.030	0.020	8
G115	H	1H	8.817	0.004	18
G115	HA2	1H	3.572	0.005	6
G115	HA3	1H	4.166	0.004	6
G115	N	15N	112.0570	0.042	17
E116	C	13C	174.6910	0.015	3
E116	CA	13C	55.405	0.032	6
E116	CB	13C	32.212	0.091	5
E116	CG	13C	37.058	0.019	3
E116	H	1H	7.561	0.007	16
E116	HA	1H	4.409	0.006	7
E116	HG2	1H	2.173	0.002	2
E116	HG3	1H	2.218	0.002	2
E116	N	15N	115.6220	0.037	15
E116	QB	1H	1.974	0.012	3
E116	QG	1H	2.191	0.008	2
W117	C	13C	175.6970	0.002	3
W117	CA	13C	52.776	0.036	6
W117	CB	13C	30.646	0.033	5
W117	H	1H	8.390	0.006	20
W117	HA	1H	6.039	0.002	5
W117	HB2	1H	2.357	0.000	1
W117	HB3	1H	2.414	0.005	2
W117	N	15N	120.4470	0.074	19
W117	QB	1H	2.401	0.008	2
K118	C	13C	175.5330	0.002	3
K118	CA	13C	54.533	0.054	10
K118	CB	13C	36.402	0.031	20
K118	CD	13C	29.134	0.088	6
K118	CE	13C	41.908	0.020	6
K118	CG	13C	24.657	0.043	8
K118	H	1H	9.621	0.002	21
K118	HA	1H	5.196	0.002	14
K118	HB2	1H	1.767	0.004	14
K118	HB3	1H	1.867	0.006	15
K118	HE2	1H	2.650	0.004	6
K118	HE3	1H	2.716	0.005	6
K118	HG2	1H	1.341	0.010	9
K118	HG3	1H	1.449	0.005	10
K118	N	15N	121.2420	0.021	20
K118	QD	1H	1.495	0.022	11

Skupina AtomJádro Posun SDevPřřazení

K118	QE	1H	2.681	0.008	3
K119	C	13C	177.4270	0.003	3
K119	CA	13C	55.881	0.037	9
K119	CB	13C	34.051	0.047	12
K119	CD	13C	29.747	0.046	7
K119	CE	13C	41.438	0.000	1
K119	CG	13C	26.357	0.039	9
K119	H	1H	9.136	0.003	27
K119	HA	1H	5.381	0.001	12
K119	HB2	1H	1.665	0.004	8
K119	HB3	1H	1.787	0.004	8
K119	HG2	1H	1.025	0.008	12
K119	HG3	1H	1.226	0.008	12
K119	N	15N	123.0110	0.069	26
K119	QD	1H	1.329	0.002	12
G120	C	13C	171.6110	0.006	3
G120	CA	13C	45.362	0.041	8
G120	H	1H	9.030	0.002	23
G120	HA2	1H	4.014	0.162	7
G120	HA3	1H	4.424	0.010	5
G120	N	15N	108.7190	0.040	22
N121	C	13C	176.8750	0.009	3
N121	CA	13C	53.984	0.023	7
N121	CB	13C	39.352	0.031	7
N121	H	1H	8.576	0.004	15
N121	HA	1H	5.036	0.002	4
N121	N	15N	119.1110	0.053	14
N121	QB	1H	2.906	0.005	4
C122	C	13C	175.0470	0.010	3
C122	CA	13C	55.786	0.016	5
C122	CB	13C	42.707	0.030	5
C122	H	1H	8.878	0.003	19
C122	HA	1H	4.639	0.007	6
C122	HB2	1H	3.052	0.006	4
C122	HB3	1H	3.262	0.001	4
C122	N	15N	119.5980	0.019	18
E123	C	13C	176.6240	0.009	3
E123	CA	13C	56.233	0.142	8
E123	CB	13C	28.570	0.090	10
E123	CG	13C	36.284	0.016	4
E123	H	1H	8.267	0.002	18
E123	HA	1H	4.423	0.004	10
E123	HB2	1H	1.990	0.006	7
E123	HB3	1H	2.114	0.002	9

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
E123	N	15N	122.0790	0.073	17
E123	QG	1H	2.285	0.008	7
V124	C	13C	176.1540	0.011	3
V124	CA	13C	62.132	0.063	8
V124	CB	13C	32.742	0.060	8
V124	CG1	13C	19.132	0.022	3
V124	CG2	13C	21.812	0.046	4
V124	H	1H	8.080	0.003	21
V124	HA	1H	4.319	0.007	10
V124	HB	1H	2.223	0.002	9
V124	MG1	1H	0.806	0.008	7
V124	MG2	1H	0.969	0.003	7
V124	N	15N	119.0280	0.066	20
S125	C	13C	175.3220	0.006	2
S125	CA	13C	60.474	0.072	6
S125	CB	13C	63.515	0.053	5
S125	H	1H	8.508	0.005	22
S125	HA	1H	4.538	0.006	4
S125	HB2	1H	3.996	0.000	1
S125	HB3	1H	4.061	0.000	1
S125	N	15N	115.8060	0.026	21
S125	QB	1H	4.038	0.005	3
S126	C	13C	173.9120	0.005	3
S126	CA	13C	58.086	0.051	5
S126	CB	13C	64.300	0.026	5
S126	H	1H	8.284	0.004	16
S126	HA	1H	4.869	0.005	3
S126	N	15N	116.5450	0.025	15
S126	QB	1H	3.903	0.002	4
V127	C	13C	175.7900	0.001	3
V127	CA	13C	62.020	0.063	8
V127	CB	13C	33.826	0.069	7
V127	CG1	13C	21.023	0.019	4
V127	CG2	13C	22.183	0.016	4
V127	H	1H	8.062	0.004	17
V127	HA	1H	4.407	0.002	9
V127	HB	1H	2.256	0.005	9
V127	MG1	1H	1.001	0.001	6
V127	MG2	1H	1.069	0.000	6
V127	N	15N	119.2120	0.022	16
V127	QMG	1H	1.034	0.007	2
E128	C	13C	175.6020	0.001	3
E128	CA	13C	56.653	0.051	8
E128	CB	13C	30.559	0.039	7

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
E128	CG	13C	36.548	0.023	3
E128	H	1H	8.751	0.005	22
E128	HA	1H	4.339	0.004	8
E128	HB2	1H	1.874	0.006	6
E128	HB3	1H	2.138	0.003	5
E128	HG2	1H	2.203	0.006	3
E128	HG3	1H	2.259	0.006	2
E128	N	15N	124.0450	0.049	21
G129	C	13C	172.1150	0.005	3
G129	CA	13C	45.857	0.023	6
G129	H	1H	7.529	0.002	18
G129	HA2	1H	3.837	0.006	2
G129	HA3	1H	3.885	0.006	2
G129	N	15N	107.8020	0.047	17
G129	QA	1H	3.870	0.001	2
T130	C	13C	171.4700	0.005	3
T130	CA	13C	61.902	0.084	7
T130	CB	13C	72.044	0.081	6
T130	CG2	13C	22.029	0.054	3
T130	H	1H	7.976	0.003	14
T130	HA	1H	4.455	0.005	8
T130	HB	1H	3.627	0.006	6
T130	MG2	1H	1.055	0.005	5
T130	N	15N	118.1070	0.035	13
L131	C	13C	175.2290	0.005	3
L131	CA	13C	53.709	0.010	8
L131	CB	13C	44.734	0.021	13
L131	CD1	13C	25.042	0.035	5
L131	CD2	13C	26.448	0.039	6
L131	CG	13C	27.712	0.005	6
L131	H	1H	8.746	0.004	21
L131	HA	1H	5.132	0.001	11
L131	HB2	1H	1.415	0.003	10
L131	HB3	1H	1.729	0.002	13
L131	HG	1H	1.580	0.004	12
L131	MD1	1H	0.764	0.001	10
L131	MD2	1H	0.765	0.001	5
L131	N	15N	128.0430	0.031	20
C132	C	13C	172.9190	0.008	3
C132	CA	13C	52.143	0.040	6
C132	CB	13C	40.106	0.028	6
C132	H	1H	8.767	0.005	24
C132	HA	1H	5.454	0.002	6
C132	HB2	1H	2.232	0.008	4

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
C132	HB3	1H	2.977	0.003	4
C132	N	15N	121.0330	0.038	23
K133	C	13C	175.1080	0.012	3
K133	CA	13C	54.864	0.054	11
K133	CB	13C	38.682	0.055	16
K133	CD	13C	31.176	0.055	4
K133	CE	13C	42.216	0.032	4
K133	CG	13C	25.058	0.067	6
K133	H	1H	9.215	0.003	20
K133	HA	1H	5.599	0.004	16
K133	HB2	1H	1.509	0.006	10
K133	HB3	1H	1.695	0.007	12
K133	HG2	1H	0.828	0.005	10
K133	HG3	1H	1.043	0.007	9
K133	N	15N	121.6710	0.082	20
K133	QD	1H	1.758	0.002	6
K133	QE	1H	2.939	0.003	7
T134	C	13C	171.5350	0.007	3
T134	CA	13C	60.672	0.080	6
T134	CB	13C	70.969	0.062	5
T134	CG2	13C	19.826	0.049	2
T134	H	1H	9.071	0.002	25
T134	HA	1H	4.728	0.006	5
T134	HB	1H	4.052	0.005	5
T134	MG2	1H	0.812	0.004	4
T134	N	15N	120.3020	0.045	24
A135	C	13C	177.8870	0.007	3
A135	CA	13C	52.109	0.048	5
A135	CB	13C	20.047	0.039	5
A135	H	1H	8.137	0.002	20
A135	HA	1H	4.666	0.008	4
A135	MB	1H	1.375	0.007	4
A135	N	15N	127.9670	0.035	19
I136	CA	13C	59.841	0.021	6
I136	CB	13C	38.611	0.018	6
I136	CD1	13C	13.956	0.002	3
I136	CG1	13C	27.970	0.021	7
I136	CG2	13C	17.259	0.029	5
I136	H	1H	7.953	0.001	20
I136	HA	1H	4.181	0.003	12
I136	HB	1H	1.606	0.002	12
I136	HG12	1H	0.943	0.002	9
I136	HG13	1H	1.355	0.002	6
I136	MD1	1H	0.734	0.006	4

Skupina	Atom	Jádro	Posun	SDev	Přirazení
I136	MG2	1H	0.718	0.003	10
I136	N	15N	121.6540	0.031	19
I136	QG1	1H	1.188	0.075	2
P137	C	13C	176.2060	0.001	2
P137	CA	13C	63.306	0.057	9
P137	CB	13C	31.650	0.050	13
P137	CD	13C	51.076	0.043	11
P137	CG	13C	27.310	0.058	7
P137	HA	1H	4.333	0.002	13
P137	HB2	1H	1.801	0.004	10
P137	HB3	1H	2.120	0.004	12
P137	HD2	1H	3.620	0.002	11
P137	HD3	1H	3.792	0.001	9
P137	QD	1H	3.919	0.000	1
P137	QG	1H	1.875	0.003	12
Y138	C	13C	175.3310	0.005	3
Y138	CA	13C	57.833	0.059	5
Y138	CB	13C	38.772	0.010	5
Y138	H	1H	7.825	0.002	22
Y138	HA	1H	4.479	0.004	4
Y138	N	15N	120.1670	0.093	21
Y138	QB	1H	2.949	0.004	4
K139	C	13C	174.9950	0.007	3
K139	CA	13C	56.038	0.045	8
K139	CB	13C	33.095	0.052	13
K139	CD	13C	28.935	0.069	2
K139	CE	13C	42.209	0.014	3
K139	CG	13C	24.543	0.038	4
K139	H	1H	8.029	0.002	20
K139	HA	1H	4.269	0.003	12
K139	HB2	1H	1.641	0.003	7
K139	HB3	1H	1.770	0.005	11
K139	N	15N	123.9670	0.048	19
K139	QD	1H	1.629	0.001	3
K139	QE	1H	2.952	0.002	5
K139	QG	1H	1.328	0.005	8
R140	C	13C	180.9520	0.000	1
R140	CA	13C	57.486	0.034	6
R140	CB	13C	31.576	0.036	11
R140	CD	13C	43.606	0.080	5
R140	CG	13C	27.278	0.081	5
R140	H	1H	7.852	0.002	25
R140	HA	1H	4.118	0.003	11
R140	HB2	1H	1.671	0.011	11

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

R140 HB3 1H 1.812 0.004 11

R140 N 15N 128.5190.048 24

Skupina AtomJádro Posun SDevPřirazení

R140 QD 1H 3.160 0.005 11

R140 QG 1H 1.565 0.002 10

SDev – směrodatná odchylka

* Označení některých skupin nedodrží mezinárodně uznávaná pravidla. Signály jsou přiřazeny určitému typu aminokyseliny (například Trp), které konkrétní aminokyselině ale patří, není možné v tuto chvíli definovat.

