

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc., a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 10. 4. 2013:

Podpis:

Abstract

One part of my work was focused on literature review within the conformational changes of cytochrome *c* under various circumstances. Main goal of these studies is to clarify the importance of conformational changes of cytochrome *c* as the cell death messenger. Cytochrome *c* binds to cardiolipin-rich inner mitochondrial membrane and a molten globule-like intermediate is supposed to play still unknown role in cell death start. Cytochrom *c* is also common model protein in a „simple” protein folding problem. It is simple, small molecule and easy to obtain protein that can be studied by a broad variety of techniques. The second part of my work presents conformational study of horse heart ferricytochrome *c* under acidic conditions with addition of inorganic salts. These conformational changes were monitored using UV/VIS spectrophotometry in four areas of absorption spectrum – aromatic amino acids absorption area and so called Soret band, Q-band and CT band. Derivative of these spectra were used in order to obtain higher-resolution informations.

(In Czech)

Děkuju prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za jeho rady, rodině za podporu a Kláře Havlíčkové za pravopisné korekce.

Obsah

1	Cíl práce	10
2	Teoretický úvod	11
2.1	Historický pohled na sbalování proteinů	11
2.1.1	Počátky	11
2.1.2	Christian Anfinsen jako průkopník	12
2.1.3	Levinthalův paradox	13
2.1.4	Proteinová doména a první modely sbalování	14
2.1.5	Hledání meziproductů	15
2.1.6	Molten globule, priony a chaperony	16
2.1.7	Anfinsenovo dogma v ohrožení?	17
3	Cytochrom <i>c</i>	19
3.1	Základní charakteristiky cytochromů <i>c</i>	19
3.2	Evoluce	22
3.3	Molten globule u cytochromu <i>c</i> v kyselém prostředí – <i>A</i> -stav	23
3.4	Interakce cytochromu <i>c</i> s látkami lipofilního charakteru	25
3.5	Elektronová struktura hemové skupiny	27
4	UV-VIS Spektrofotometrie	30
4.1	Interakce látky s optickým zářením	30
4.1.1	Neelastické interakce optického záření s látkou	30
4.1.2	Vibrační struktura, Franckův-Condonův princip	31
4.1.3	Výběrová pravidla	32
4.1.4	Typy absorpčních přechodů	33

4.1.5	Intensita elektronových absorpčních přechodů - Lambert-Beerův zákon	34
4.1.6	Vliv mezimolekulových interakcí na elektronová absorpční spektra	35
5	Instrumentace UV-VIS spektroskopie	37
5.1	Monochromátor a polychromátor	37
5.2	Detektory	39
5.3	Zdroje záření	41
6	Materiál a metody	44
6.1	Použité chemikálie	44
6.2	Laboratorní přístroje	44
6.3	Metody	44
6.4	Měření absorpčních spekter	46
6.5	Zpracování experimentálních dat	46
7	Výsledky	47
7.1	Vliv různých aniontů na konformaci cytochromu <i>c</i>	47
7.1.1	Oblast absorpce aromatických aminokyselin	47
7.1.2	Soretův pás (B pás)	52
7.1.3	Q pás	58
7.1.4	CT pás	61
8	Diskuse	65
9	Souhrn	69
	Literatura	70

Seznam skratek

<i>A</i>	absorbance
<i>c</i>	koncentrace
AO	atomový orbital
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ATP	adenosintrifosfát
ATPasa	adenosintrifosfátasa
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma extra large
BHCL	bovine heart cardiolipin
CcO	cytochrom <i>c</i> oxidasa
CD	cirkulárníí dichroismus
CL	kardiolipin
CT	charge transfer
cyt <i>c</i>	cytochrom <i>c</i>
dATP	deoxyadenosintrifosfát
EPR	elektronová paramagnetická resonance
GdmCl	guanidinium hydrochlorid
HeLa	kultura „nesmrtelných“ buněk
HOMO	nejvyšší obsazený orbital
IR	infračervená oblast
LUMO	nejnižší neobsazený orbital
<i>K</i>	rovnovážná konstanta
MDR1	multi drug resistance 1

MG	molten globule
MK	mastná kyselina
MO	molekulový orbital
P-gp	P-glykoprotein
PrP ^C	prionový protein – common
PrP ^{Sc}	prionový protein – scrapie
RNAsa A	ribonukleasa A
ROS	reaktivní kyslíkové druhy
RR	Ramanův rozptyl
SDS	dodecylsulfát sodný
SERR	povrchově zesílený rezonanční Ramanův (rozptyl)
T	teplota
T-jump	teplotní skok
TDF	translation dependent folding
TLCL	1,1',2,2'-tetralinoleoylkardiolipin
T_m	teplota fázového přechodu
TMCL	1,1',2,2'-tetramyristoylkardiolipin
TOCL	1,1',2,2'-tetraoleoylkardiolipin
UV	ultrafialová oblast
VIS	viditelná oblast
λ	vlnová délka

Dále byly použity standardní třípísmenné i jednopísmenné zkratky aminokyselin

Kapitola 1

Cíl práce

Cílem práce bylo seznámit se s literaturou pojednávající o cytochromu *c* a pomocí absorpční a derivační spektrofotometrie zkoumat chování perturbovaného cytochromu *c* v kyselé pH oblasti.

Kapitola 2

Teoretický úvod

2.1 Historický pohled na sbalování proteinů

Když si člověk otevře nějakou odbornou monografii, na začátku najde zpravidla úvodní informace k danému tématu, jako definice elementárních pojmů nebo třeba historický vývoj daného problému. Koneckonců je tomu tak nejednou i na přednáškách. I já jsem se rozhodl úvod své diplomové práce věnovat krátké rešerši odborné literatury a přiblížit problém sbalování bílkovin (kam obecně mé téma spadá) trochu chronologicky s vyzdvihnutím, dle mého soudu těch nejdůležitějších, průkopnických prací, které náš názor na problém sbalování formovaly. Jistý základní přehled se dá najít v první kapitole z knihy *Protein folding handbook* od Baldwina [1].

2.1.1 Počátky

Ve dvacátých letech minulého století vyšla od Mirského a Ansona série článků, ve kterých autoři diskutovali rozdíly mezi flokulací, koagulací a denaturací proteinů. Poprvé tak byly tyto pojmy jasně rozlišeny. Denaturace se dle nich skládá z dvou procesů, nejdřív protein denaturuje a potom aglutinuje (fokuluje). Z článku je ale rovněž patrné, že jen velice málo bylo známo o podstatě procesu denaturace [2]. S domněnkou, že denaturace je proces rozbalování struktury proteinu držené pospolu slabými nekovaletními vazbami v denaturujících podmínkách, přišel v roce 1931 Wu [3]. Na potvrzení jeho hypotézy se ale čekalo poměrně dlouhou až do šedesátých let 20. století. V padesátých letech minulého století se započala odkrývat tajenka prostorové struktury bílkovin.

Nejdřív skupina vědců kolem Linuse Paulinga a Roberta Coreyho navrhla struktury jak α -helixu, tak β -hřebenů [4, 5]. Ke konci desetiletí pak přišly první celé trojrozměrné struktury bílkovin - myoglobin z laboratoře Johna Kendrewa a rok poté hemoglobin od Maxe Perutze [6, 7]. Původně se předpokládalo, že jsou to právě vodíkové vazby, které jsou rozhodující pro udržení nativní struktury bílkovin. Význam hydrofobního efektu pro utváření struktury bílkovin poprvé postuloval W. Kauzmann v r. 1959. Z této práce pak vzešel model hydrofobního kolapsu zbalování [8].

2.1.2 Christian Anfinsen jako průkopník

Moderní dějiny výzkumu sbalování proteinu sahají do šedesátých let 20. století a spojují se se jménem Christiana Anfinsena. V roce 1961 jeho tým zkoumal chování enzymu RNAsy A v redukujícím prostředí. V tomto prostředí dojde k přerušení disulfidových můstků. Anfinsen zjistil, že ribonukleasa se pak správně sbalí a nepotřebuje k tomu žádné jiné molekuly, tj. informace k správnému sbalení je obsažena v primární struktuře enzymu [9]. Ribonukleasa obsahuje 8 thiolových skupin a tvoří v nativním stavu 4 disulfidové můstky. Těchto 8 thiolových skupin může tedy vytvořit 105 možných uspořádání disulfidových můstků – jen jedno uspořádání je ale správné, a po renaturaci enzymu dojde k obnovení biologické aktivity. Anfinsen tak ve své práci tehdy odpověděl dohadům bezmála třicet let starým (Anson a Mirsky), že denaturace proteinu může být vratná [2]. Sám hlavní autor pak ve své práci rok po udělení Nobelovy ceny v roce 1972 jednou otázkou definoval problém sbalování: Jak pořadí aminokyselin v proteinu určuje jeho třírozměrnou strukturu? [9] Tady ale přínos Anfinsena nekončí. Přišel dále s termodynamickou hypotézou: Hnací silou sbalování nově syntetizovaného polypeptidového řetězce je gradient „volné energie“, a protein nakonec dosáhne termodynamicky nejstabilnější konformace [10]. Od konce padesátých let se vědci snažili přijít na to, jakým mechanismem se proteiny sbalují. Konkrétně či existují nějaké meziprodukty při sbalování. Harrington a Schellman, a i jiné skupiny, dělaly pokusy s reversibilní denaturací RNAsy A. Zjistily, že závislost $\ln K$ na $1/T$ není lineární, ale zakřivená. Vysvětlením by byla přítomnost nějakého meziprojektu [11]. S jiným vysvětlením daného problému přišel v roce 1965 J. Brandts. Nelineární závislost $\ln K$ na $1/T$ je termodynamickou vlastností denaturace enzymu. Veličina ΔC_p , rozdíl tepelných kapacit při

konstantním tlaku „produktu“ a „reaktantu“, má velkou kladnou hodnotu a to způsobuje zakřivení van't Hoffova výnosu. Následující výzkum dal Brandtsovi za pravdu [12]. V roce 1968 přišel se svojí, a pak dále také hojně citovanou, prací Tanford. Uvádí, že při pokusech denaturace proteinu musí dojít k úplnému rozrušení struktury. Roztok 6 M GdmCl odstraní i zbytky reziduálních struktur. Při tepelné denaturaci tomu tak není. Nepopřel tím však závěry předchozích badatelů. U mnoha proteinů zjistil, že se skutečně sbalují a rozbalují reversibilně a v jednom kroku [13].

2.1.3 Levinthalův paradox

Konec šedesátých let byl v oblasti problematiky sbalování proteinů velice plodný. Svědčí o tom kratičký článek amerického vědce Cyruse Levinthala, opět z roku 1968, který vzbudil veliký rozruch. Levinthal se podíval na kinetickou stránku sbalování proteinů. Pohrál si s myšlenkou, že čas potřebný ke sbalení proteinu je totožný s časem, kdy molekula proteinu musí jaksi „najít“ z obrovského množství dostupných konformací tu svoji správnou – nativní konformaci. Zkusil pak odhadnout čas potřebný ke sbalení proteinu jako počet dostupných konformací vynásobený časem potřebným k „odzkoušení“ jedné konformace molekulou proteinu. Pomohl si přitom zjednodušením, že stačí zvažovat jen možné konformace polypeptidového řetězce. Vyšel mu z toho čas delší než stáří vesmíru, což je samozřejmě v rozporu s realitou, protože mnoho proteinů se sbalí v řádu mikrosekund. Po něm se pak tento rozpor nazývá Levinthalův paradox. Levinthal sám pak navrhl, že sbalování probíhá po jistých definovaných cestách (z angl. kinetic pathway) [14]. Tímto paradoxem se pak zabývalo mnoho vědců. Dnes se má za to že:

1. počet dostupných konformací je značně menší, než z jakého vycházel sám Levinthal – jsou zde totiž jen jisté povolené hodnoty torzních úhlů vazeb mezi atomy peptidové jednotky;
2. pokud budeme uvažovat model sbalování, ve kterém dojde rychle k tzv. hydrofobnímu kolapsu a vzniku kompaktní molekuly, pak z toho vzejde další redukce dostupných konformací;
3. pokud existuje při sbalování cesta k nativní konformaci, logicky z toho plyne, že

není splněn předpoklad o náhodném prohledávání prostoru [15].

Výstup z Levinthalova paradoxu můžeme chápat tak, že se protein sbalí do struktury po nejrychlejší kinetické cestě, a nikoliv tedy do struktury, která je nejstabilnější (Anfinsenova dogma [10]). Je tedy sbalování řízeno kineticky nebo termodynamicky? Téměř třicet let pak trvalo, než se objevily první proteiny, jejichž sbalování je řízeno kineticky. Denaturovaná α -lytická proteasa není schopna se sama zpětně sbalit, protože protein v denaturované formě je termodynamicky stabilnější než v nativní [16]. S tímto problémem si příroda poradila, jak bude naznačeno v odstavci 2.1.6.

2.1.4 Proteinová doména a první modely sbalování

Myšlenky, že by sbalování bílkovin probíhalo náhodně, se ukázaly tedy jako nesprávné. Záhy v sedmdesátých letech se objevily vedle modelů hydrofobního kolapsu další modely sbalování bílkovin. Difusně-kolizní model od Karpluse a Weavera [17], „framework“ model od Ptitsyna [18] a model nukleace-propagace na základě prací Wetlaufera, Zimma a Bragga [19, 20]. Model nukleace-propagace je jakási analogie růstu krystalu. Nejdříve se vytvoří malé strukturované jednotky, které se pak rychle rozrůstají. Ve „framework“ modelu se jedná o hierarchické sbalování, kdy se nejdříve vytvoří sekundární struktury a pak terciární. Vznik sekundárních struktur, α -helixů a β -hřebenů, zdůrazňuje spíše význam interakcí blízkého dosahu (vodíkových vazeb). Naproti tomu model hydrofobního kolapsu je založen na nesespecifickém hydrofobním efektu a vznik hydrofobního jádra je prvním krokem při sbalování [21]. Model difusně-kolizní popisuje existenci mikrodomén, které se mohou skládat z prvků sekundárních struktur. Difusí těchto mikrodomén a jejich „srážkou“ vznikají složitější struktury. Celý děj se opakuje, až vznikne nativní, biologicky aktivní, bílkovina [17]. Každý tento model má přesto své nedostatky. Každý se snažil vysvětlit jednotlivé, v té době známé, aspekty sbalování (důležitost hydrofobního efektu apod.). Další významný průlom v chápání jak sbalování probíhá nastal v roce 1973. Wetlaufer přišel s myšlenkou, že v proteinech existují domény schopné samostatného sbalení. Ve své práci autor srovnává 18 různých proteinů, nicméně v závěru nabádá k opatrnosti u posuzování proteinů s některou prosthetickou skupinou nebo proteinů syntetisovaných ve formě prekursorů. Velikost domény je ve většině případů od 40 do 150 aminokyselin. Autor rovněž píše, že v první fázi sbalování

dojde k nukleaci (vzniku jádra), a následně se k jádru „nabalují“ segmenty blízkých aminokyselinových zbytků. Vzdálenější zbytky vyžadují delší čas k difuzi a správné orientaci k jádru. A tedy struktury, ve kterých najdeme aminokyseliny od sebe vzdálené v primární struktuře, vyžadují delší čas na sbalení [19]. Tyto myšlenky byly v 70. letech brány jako vysvětlení, proč nebyly tenkrát pozorovány žádné stabilnější meziproducty.

2.1.5 Hledání meziproductů

Charles Tanford, John Brandts a jiní badatelé svými pracemi na konci šedesátých let poukázali, že mnohé proteiny se sbalují v jednom kroku [13]. Byli si vědomi toho, že metody použité v jejich práci neumožňují spolehlivou detekci případných meziproductů. Tanfordova skupina se proto rozhodla zkoumat dvě bílkoviny, cytochrom *c* a lysozym, vhodnějšími metodami. Jiný badatelský tým kolem Tsonga zkoumal zase RNAsu A. Obě skupiny měřily fluorescenci tryptofanu, Tanfordova skupina technikou stopped-flow a Tsongova tzv. rychlým teplotním skokem (z angl. fast *T*-jump) [22, 23]. Výsledky první skupiny by se daly shrnout jednoduchým sekvenčním modelem sbalování, kde *U* je denaturovaná, *N* nativní forma a *I_n* jsou meziproducty [22]:



Kinetické studie s RNAsou A zase přinesly výsledky ve této formě, kde *U_S*, *U_F* jsou denaturované formy [23]:



Kromě těchto prvních, a nutno říct nekonkrétních, výsledků kinetických studií (autoři meziproducty nebo různé denaturované formy nespécifikovali), byl hlavní přínos v aplikaci a ve zdokonalení použitých metod. Výsledky Tsongovy skupiny s různými denaturovanými formami RNAsy A potvrdil Garel, Hagerman a Baldwin. Denaturovaná RNAsa A obsahuje dvě hlavní formy, rychle a pomalu sbalující se *U_S* (slow folding, 80 %) a *U_F* (fast folding, 20 %) [24, 25]. S vysvětlením, o co se jedná, přišel opět John Brandts. Navrhl isomerizační model, který byl založen na dvou myšlenkách. Dvě denaturované formy vznikají isomerizací peptidových vazeb před zbytky prolinu. Druhá Brandtsova hypotéza říká, že tyto dva druhy se jediné podílejí na komplexní

kinetice sbalování RNAsy A , a tedy, že neexistují žádné definované meziprodukty [26]. V roce 1978 se podařilo tu první část hypotézy potvrdit experimentálně [1].

2.1.6 Molten globule, priony a chaperony

Na začátku 80. let dvě skupiny přinesly zprávu o objevu nového konformačního stavu bílkoviny, pozorovaného v roztocích s mírnými denaturujícími podmínkami. Ohgushi a Wada dali tomuto stavu název *molten globule* [27, 28]. Oleg Ptitsyn pak přišel s hypotézou, že se jedná o dlouho hledané meziprodukty při sbalování bílkovin. Ač zde v tomto případě někteří vědci nechtějí generalisovat, v mnoha případech se potvrdila Ptitsynova hypotéza [29]. O další významný objev se postaral v roce 1982 Stanley Prusiner. Podařilo se mu izolovat infekční agens u choroby scrapie, neurodegenerativního onemocnění u ovcí. Infekční agens byl proteinové povahy. Rozluštila se tak dlouhotrvající záhada, ač již v šedesátých letech minulého století se vědci snažili vysvětlit, proč je infekční agens scrapie odolný vůči ionizačnímu záření a dalším postupům deaktivujících nukleové kyseliny. Padly návrhy, že infekčním agens jsou proteiny, polysacharidy nebo dokonce části membrán. Za zmínku stojí i to, že v té době se jednalo o velice kontroverzní myšlenky. Pro proteinový infekční agens se pak po jeho objevu vžil název *prion*, který navrhl sám Prusiner (původně z angl. protein infection) [30]. Prionový protein se nachází i ve zdravém organismu, ale jeho funkce není zcela jasná. Jsou známy dvě hlavní formy, PrP^C a PrP^{Sc} (infekční). PrP^C je složena převážně z α -helixů. Struktura PrP^{Sc} je nejasná, ale předpokládá se zvláštní struktura β -helixů. Heterodimerní model předpokládá, že molekula PrP^{Sc} se váže s molekulou PrP^C a funguje jako katalyzátor změny konformace:



Molekuly PrP^{Sc} pak agregují do formy dlouhých lineárních vláken (fibril) [31]. I přes jisté nedostatky tohoto modelu je to zatím obecně přijímaná hypotéza. Stanley Prusinerovi byla za objev prionu v roce 1997 udělena Nobelova cena.

Dlouhou dobu se předpokládalo, že nově syntetisované proteiny se *in vivo* sbalují samy a stejným mechanismem, jako *in vitro*. Kdežto objev Ellise z roku 1987 naznačil, že tomu tak nemusí být [32]. Sbalování proteinů do jejich nativních konformací *in vivo*, stejně jako skládání podjednotek při tvorbě oligomerních struktur vyžaduje

v mnoha případech pomoc dalších látek bílkovinné povahy zvaných *chaperony* (z franc. *gardedáma*). Dle Anfinsena je informace obsažená v sekvenci aminokyselin nezbytnou a postačující podmínkou pro zajištění funkční konformace proteinu, která je zároveň strukturou s nejnižší volnou energií. Ke správnému sbalení tedy není třeba žádné další informace ani vnější energie. Molekulové chaperony interagují se vznikajícími, stresem destabilizovanými nebo přemísťovanými, proteiny, a zabraňují tak jejich nesprávnému sbalení a následnému srážení. Nemohou ale interagovat s nativními proteiny, ani nejsou schopny správně sbalit již jednou zformované sraženiny bílkovin. Chaperony také nenesou informaci, která by umožnila proteinu dosáhnout jiné konformace, než jaká je mu diktována sekvencí aminokyselin. Molekulové chaperony pouze zvyšují výtěžek, nikoli rychlost reakce sbalování. Z tohoto pohledu tedy nejsou katalyzátory, a jejich funkce nezpochybňuje platnost Anfinsenova postulátu (viz 2.1.2) [33]. Nicméně i zde existují výjimky, tzv. foldasy. Jsou to v pravém slova smyslu enzymy, které zvyšují rychlostní konstantu sbalování molekuly bílkoviny. Příkladem je např. protein Lif, zabezpečující u bakterií rodu *Pseudomonas* správné sbalení specifických lipas. K nim patří v širším kontextu i peptidyl-prolyl *cis-trans* isomerasa a disulfidisomerasa. Většina peptidas je syntetisovaných ve formě prekurzorů. Jako například bakteriální enzymy elastasy, subtilisin nebo již zmiňovaná α -lytická peptidasa. Prekursory obsahují kromě finální sekvence také sekvenci signální a propeptid (nebo též prodoménu), který pomáhá ke správnému sbalení enzymu. Propeptid zde tedy funguje jako intramolekulární chaperon. Po správném sbalení je propeptid autoproteolyticky od zbytku enzymu oddělen [16, 34].

2.1.7 Anfinsenovo dogma v ohrožení?

Z nejnovějších objevů zde uvedu jen hypotézu TDF. Vše odstartoval článek Kimchi-Sarfatyho a spolupracovníků, kde kultura HeLa buňek modifikovaných předpokládanou tichou mutací (z angl. *silent mutation*) v genu MDR1, projevila sníženou schopnost efluxu. Tichá mutace v tom případě tichá nebyla. Autoři pak vyloučili vliv nesprávného splicingu, sníženou úroveň translace, apod. Produkt genu MDR1, membránová ATPasa P-gp, byl exprimován na stejné úrovni jako u HeLa buňek divokého typu. Vysvětlení poskytli autoři sami – ačkoliv měly exprimované bílkoviny divokého typu i pozměněné C3453T stejnou primární sekvenci aminokyselin, výskyt vzácného kodonu pro isoleucin

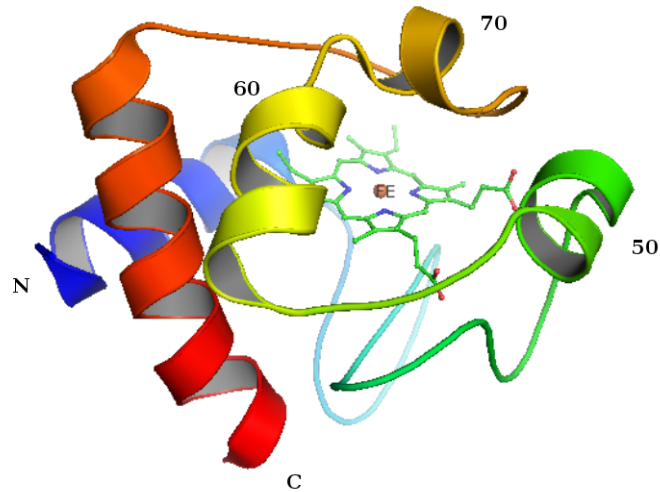
v sekvenci C3453T mRNA měl za následek pomalejší proteosyntézu, a následně odlišný kotranslační folding [35]. TDF hypotéza, jak ji formuloval Stuart Newman a Ramray Bhat: „Každá molekula mRNA, vystavená zpomalené translaci, může generovat proteiny s alternativními konformacemi“. Zatím se jedná spíše o výjimku, jak přiznávají autoři, nicméně je potřeba ji brát na vědomí [36].

Kapitola 3

Cytochrom *c*

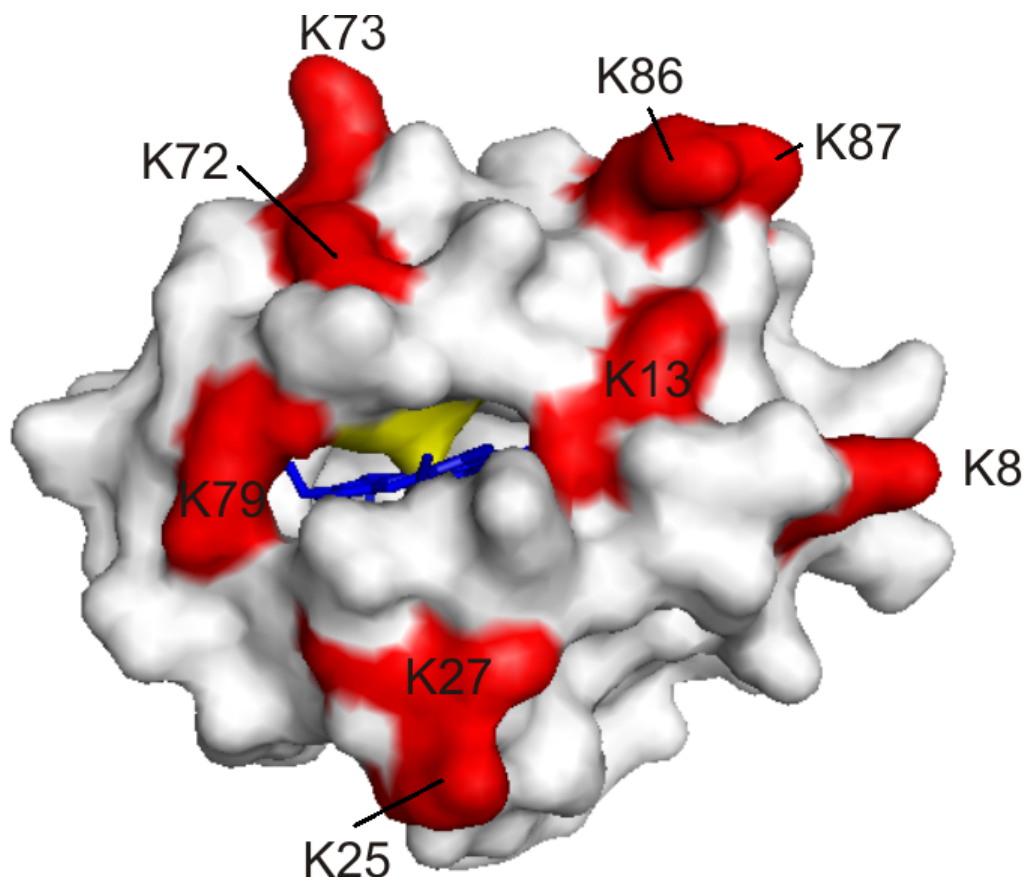
3.1 Základní charakteristiky cytochromů *c*

Dobrý přehled o cytochomech lze najít v článku od Bertiniho [37]. Cytochromy *c* jsou globulární proteiny s kovalentně vázanou hemovou skupinou, který se nacházejí ve všech organismech vyjma některých striktních anaerobních bakterií. Ambler rozdělil cyt *c* do čtyř tříd dle počtu hemových skupin, typu a polohy axiálních ligandů a redoxního potenciálu. Třída I dle Amblera, kterou se budu hlavně zabývat, jsou cyt *c* obsahující jednu doménu s hemovou skupinou, relativně vysokým redoxním potenciálem a jsou sbalené do tzv. cytochrom *c* foldu [38]. Tento fold je pak rozdělen do několika superrodin, včetně jednodoménových cyt *c* [39]. Všechny cyt *c* z této třídy obsahují motiv -Cys-X-X-Cys-His- (CXXCH). Hemová skupina je kovalentně vázána thioetherovými vazbami na sulfhydrylové skupiny těchto cysteinů a histidin je pak jedním z axiálních ligandů iontu železa [37]. Cyt *c* jsou all- α -proteiny – jsou složeny jen z α -helixů [39]. Terciární strukturu (obr. 3.1 na následující straně) cytochromu tvoří typicky tyto prvky: N-koncový helix a C-koncový helix (někdy značené jako $\alpha 1$ a $\alpha 5$ u mitochondriálních cytochromů) kratší helix 60 ($\alpha 3$) další krátký helix 70 ($\alpha 4$) následovaný smyčkou (angl. loop) obsahující druhý axiální ligand [37]. Druhým axiálním ligandem bývá zpravidla methionin, pouze výjimečně také asparagin nebo histidin [41, 37]. Zatímco koordinační vazba histidinu je pevná, a k jejímu přerušení dochází až v extrémních podmínkách, vazba methioninu je slabší, a jeho výměna za jiný ligand je častá součástí konformačních změn v molekule v důsledku perturbujících vnějších vlivů. Cyt *c* se v eukaryotických



Obrázek 3.1: Schematicky znázorněná struktura cytochromu *c* z koňského srdce, značení helixů je dle [37]. Uprostřed je hemová skupina (PDB kód 1HRC, rozlišení 2,0 Å [40], zpracováno v PyMol a CorelDraw X4)

buňkách nachází mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou, nebo v lumenu chloroplastů. V prokaryotických buňkách se nachází v periplazmatickém prostoru u Gram-negativních bakterií. U Gram-positivních bakterií je nutná jejich fixace k cytoplasmatické membráně pomocí kotev nebo fuse s nějakým membránovým proteinem. Mimo to zprostředkovává přenos elektronů při aerobním i anaerobním dýchání. Mitochondriální cyt *c* funguje jako druhý mobilní přenašeč elektronů mezi komplexem cytochromů *bc1* (komplex III) a CcO (komplex IV). Existuje ve dvou oxidačních stavech, jako redukovaný ferrocycyochrom *c* (Fe^{2+}) a oxidovaný ferricytochrom *c* (Fe^{3+}). Mitochondriální cyt *c* obsahují typicky 100-110 aminokyselinových zbytků. Člověk a ostatní primáti mají jeden cyt *c* kódovaný genem na chromozomu 7, a několik nefunkčních pseudogenů. Produkt tohoto genu má 105 aminokyselin (včetně prvního methioninu, který je v rámci posttranslačních úprav oddělen) [37]. Jednotlivé podrodiny cyt *c* se mimo motivu CXXCH homologicky značně liší. Pokud se budeme zabývat jen mitochondriálními cyt *c*, tak u nich nalezneme variabilnější sekvence i pozice prakticky invariantní. Ptitsyn analyzoval sekvence 86 mitochondriálních cyt *c*: 9 glycinových zbytků obsazuje v molekule cytochromu *c* pozice, kde by jinak jejich substituce za aminokyseliny s větší postranní skupinou vedla ke strukturním změnám. Glycin v pozici 6 se vyskytuje ve většině známých sekvencích cyt *c* všech podrodin s výjimkou cyt *cf*. Cyt *c* obsahuje velký počet bazických aminokyselin. Koňský cyt *c* má lysinové zbytky



Obrázek 3.2: Znázornění povrchu cyt *c* se zvýrazněnými lysinovými zbytky v okolí štěrbině vedoucí k hemové skupině (modrá barva). Žlutou barvou je zvýrazněn Met-80 (PDB kód 1HRC [40], zpracováno v PyMol a CorelDraw X4)

v polohách 8, 13, 25, 27, 72, 73, 79, 86 a 87 umístěn v okolí štěrbině vedoucí k hemové skupině (obr. 3.2).

Prostřednictvím nich se cyt *c* váže ke svým redoxním partnerům. U kvasinkového *iso*-1-cyt *c* nalezneme lysin v pozicích 13, 27, 72, 73, 79, 86 a 87 [42]. Postranní řetězce Tyr-48, Tyr-67, Tyr-74 a Tyr-97 jsou velice důležité pro udržení nativní konformace cytochromu v blízkosti hemu. Další konzervovaná aminokyselina je Phe-82 v blízkosti štěrbině vedoucí k prostetické skupině. Její aromatický kruh je umístěn rovnoběžně s protoporfyrinovým kruhem hemové skupiny a aktivně se zúčastňuje transferu elektronu. Mutace Phe-82 za jinou aminokyselinu podstatně snižuje efektivitu transferu elektronu. U jednotlivých podrodin cyt *c* je zachována i pozice 94, která je obsazena hydrofobní aminokyselinou (Leu, Val nebo Phe) a pozice 10, kde je vyžadován aromatický kruh (Phe nebo někdy Tyr). Tyto pozice spolu s již zmiňovanými aminokyselinami Gly-6 a Tyr-97 tvoří kontaktní místo C- a N-koncového helixu. Z motivu CXXCH mají tři aminokyseliny vazebnou funkci. Tento motiv se nachází zpravidla na N-konci polypeptidového řetězce. Další vazební aminokyselina, methionin, se nachází blíž k C-konci

v oblasti, kde je stupeň homologie mezi jednotlivými podrodinami relativně malý [43]. Myš (*Mus musculus*) a potkan (*Rattus norvegicus*) mají dva cyt *c*. Jeden mitochondriální a druhý vyskytující se ve spermiích. Japonská ryba *Takifugu rubripes* je mezi živočichy s kompletně známým genomem zatím jediným příkladem, kde se vyskytují tři isoformy cytochromu *c*. Tři cyt *c* mají i rostliny *Arabidopsis thaliana* a *Oryza sativa* (rýže) [37]. U vyšších eukaryot má cyt *c* funkci v apoptose. Cyt *c* je uvolněn z mezimembránového prostoru. Spolu s dalšími cytosolickými proteiny aktivuje prokaspasu-9. Proteinové faktory jako Bax, Bcl-2 a Bcl-xL se pravděpodobně regulují únik cyt *c* do cytosolu. Tam se zdařilo identifikovat jeho vazebného partnera – protein Apaf-1. Spolu s dATP tvoří Apaf-1, cyt *c* a prokaspasa-9 komplex, někdy zvaný apoptosom. Tento typ apoptosy je regulován hladinou ROS a představuje poslední obranu před ROS, a to na buněčné úrovni. Buňky produkující ve vysoké míře ROS jsou nebezpečné pro okolní buňky v tkánivech (pletivech) a proto se samy pomocí apoptosy zlikvidují [44]. Další možnou funkcí cyt *c* je antioxidační agens. Cyt *c* oxiduje superoxidové radikály $O_2^{\cdot-}$ na O_2 . Hlavním zdrojem těchto radikálů jsou komplexy I a III dýchacího řetězce. Redukovaný cyt *c* je pak v dýchacím řetězci reoxidován pomocí CcO [45]. Mitochondriální cyt *c* je důležitý pro sestavení komplexu CcO. Dle pozorování totiž mitochondrie bez funkčního cyt *c* nemají tento komplex plně a korektně sestavený. Předpokládá se, že jistou roli může mít i v odbourávání H_2O_2 skrze komplex s cyt *c* peroxidasou, a to jak u eukaryotických, tak u prokaryotických organismů: cyt *c1* z komplexu III je větší jako mitochondriální cyt *c* (cca. 200 aminokyselin) a je sbalen do cytochromu *c* foldu [46]. Komplex III přenáší elektrony z ubichinolu na cyt *c* a generuje přitom gradient protonů na mitochondriální membráně. Pravděpodobně se cyt *c1* a cyt *c* evolučně vyvinuly ze společného proteinu. Prokaryotické organismy mohou využívat cyt *c* jako prostetickou skupinu s oxidačně-redukční funkcí [37].

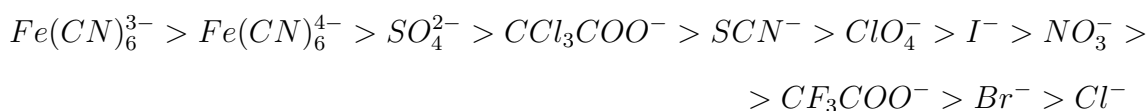
3.2 Evoluce

Cytochrom *c* je téměř univerzální eukaryotní protein, který je evolučně značně konzervován. Dýchací řetězec vznikl asi před 1,5-2 miliardami let. Od té doby se příliš nezměnil. Struktura a funkce cytochromu *c* byla vysoce konzervována během celého vývoje. Porovnáním sekvencí cytochromů z člověka, prasete, králíka, tuňáka, koňe, ku-

řete a kvasinek zjistíme, že až 53 % aminokyselin je identických ve vyjmenovaných proteinech, a pokud nebudeme brát v úvahu cyt *c* z kvasinek, tato hodnota stoupne na 73 %. Až 21 posic (některé jsem vyjmenoval v předchozím odstavci) je invariantních ve všech známých sekvencích mitochondriálních cyt *c* u eukaryotických organismů [47].

3.3 Molten globule u cytochromu *c* v kyselém prostředí – *A*-stav

Pomocí spektrálních metod bylo již před časem rozlišeno v rozmezí pH 0-14 pět různých forem, označovaných římskými číslicemi I až V (49) [48]. Za nativní konformaci je považován stav III. Molekuly cyt *c* mají velký kladný náboj. Repulze těchto nábojů způsobují destabilizaci terciární struktury molekuly a její následné rozbalení (vzniká stav označovaný II). Ale zvýšením iontové síly přídatkem $\approx 0,5$ M KCl nebo HCl dochází ke stabilizaci struktury molekuly a tvorbě kompaktní struktury – molten globule. Schopnost chloridových i jiných aniontů stabilisovat v kyselém prostředí denaturovaný stav roste v pořadí:



Kyselina sírová a chloristá indukují přechod do MG přímo [49, 50]. *A*-stav cyt *c* je poměrně dobře charakterisován. Studie resonančního RR a výměny protonů umožnila detailnější pohled na rozsah zachování jednotlivých helixů, terciární struktury a nekovalentních interakcí, které strukturu stabilizují. U MG dochází k poklesu míry helicity z 37 % na 27 % [51]. Tři helixy, N- a C-koncový a helix 60 jsou zachovány, zatímco dva kratší helixy 50 a 70 a dlouhé smyčky jsou flexibilní a rozbaleny [52]. Stabilita uvedených helixů v MG spočívá v zachování určitých stabilizujících nekovalentních interakcí, které nalzáme i v nativním proteinu. Jedná se především o interakce mezi Gly-6/Phe-10 a Leu-94, a patrové interakce mezi Phe-10 a Tyr-97. Na stabilitu MG mají vliv interakce a vazby mezi postranními řetězci aminokyselin a hemovou skupinou [51]:

- koordinační vazba mezi His-18 a iontem železa;
- van der Waalsovy interakce mezi Leu-94 a Leu-98 a methylovou skupinou B pyrrolového kruhu a van der Waalsovy interakce mezi Leu-64 a Leu-68 a pyrrolovým kruhem B;
- van der Waalsovy interakce mezi Arg-91 a Met65;
- iontový pár Lys-99 a Glu-61;
- kovalentní vazby s cysteinovými zbytky upevňující hemovou skupiny v hydrofobním jádru.

Interakce důležité pro stabilitu helixů 50 a 70 jsou v MG mnohem slabší nebo již vůbec v *A*-stavu neexistují:

- vodíkové vazby tyrosinových zbytků Tyr-74 s molekulou vody a Tyr-67 s atomem síry Met-80;
- vodíkové vazby Trp-59 a Tyr-48 s propionátovou skupinou A pyrrolového kruhu.

Molekuly porfyrin-cytochromu *c* (tj. bez atomu železa) a apocytochromu *c* (tj. bez hemové skupiny), kde koordinační vazba His-18 chybí, jsou méně stabilní jako cyt *c*. Apocytochrom *c* je v rozsahu pH 2-9 denaturovaný a MG tvoří v roztoku s vysokou iontovou silou [53]. Soretův pás v hemoproteinech odráží spinový stav železa a je proto užitečný ke sledování změn v jeho koordinaci a struktuře okolí. Vhodná metoda pro studium koordinace železa je i EPR. V nativním stavu se železo nachází v nízkospinovém stavu His – 18 – Fe³⁺ – Met – 80 a maximum Soretova pásu je při $\lambda = 410$ nm. Po denuraci kyselinou jsou oba axiální ligandy vytěsněny a nahrazeny úplně nebo částečně vodou. V denaturovaném stavu se pak železo nachází ve směsi vysokospinových stavů His – 18 – Fe³⁺ – H₂O, H₂O – Fe³⁺ – H₂O a pentakoordinovaného H₂O – Fe³⁺ – a poloha maxima se posouvá k 394 nm. V *A*-stavu je atom železa tvořen směsí stavů His – 18 – Fe³⁺ – H₂O a nízkospinových His – 18 – Fe³⁺ – His, His – 18 – Fe³⁺ – Met – 80 a His – 18 – Fe³⁺. Posice maxima je u 397-402 nm. His jako druhý ligand v nízkospinovém stavu je pravděpodobně His-26 nebo His-33 [49].

Podstata alkalické konformace (stav IV) není úplně známa. Strukturní změny postihují hlavně smyčku mezi C-koncovým helixem a helixem 70. Každopádně dojde také

k nahrazení ligandu Met-80 za jinou aminokyselinu, nejspíš za jeden z povrchových Lys-72/Lys-73/Lys-79 [54].

3.4 Interakce cytochromu *c* s látkami lipofilního charakteru

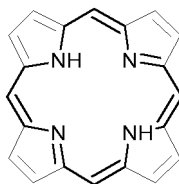
Cytochrom *c* se dokáže vázat na vnitřní mitochondriální membránu. Tento děj je doprovázen konformačními změnami [37]. Vazbou na membrány a změnou konformace začíná i apoptosa mitochondriálního typu. Proto se této oblasti věnuje poměrně značná pozornost. Jako modely, napodobující interakci s membránami, se využívají interakce s různými jednoduššími molekulami, např. SDS, polyanionty, fosfolipidové vesikuly, elektrody, mastné kyseliny nebo micely [37]. Z vesikul se studují zejména vesikuly obsahující kardiolipin, protože ten je obsažen ve vnitřní mitochondriální membráně (25 %) [55]. Indukovat přechod do stavu podobného MG dokáže SDS. Podle výsledků, získaných metodami RR, SERR a EPR, je součástí změn záměna nízkospinového nativního His – 18 – Fe³⁺ – Met80 za nízkospinové His – 18 – Fe³⁺ – His33, His – 18 – Fe³⁺ – H₂O a vysokospinový pentakoordinovaný His – 18 – Fe³⁺. Ke změnám dochází vlivem hydrofobního efektu a elektrostatických interakcí s oblastí, kde se nachází štěrbina. Kontakt tří helixů na druhé straně obálky hemové skupiny od smyčky zůstává zachován. Podobný efekt mají i vesikuly složené s dioleolylfosfatidylglycerolu [56]. Spektrální změny detekované pomocí cyklické voltametrie, fluorescenčních, CD, UV-VIS spektroskopických technik a RR rozptylu potvrdily změny v terciární struktuře v komplexu s kyselinou olejovou při neutrálním pH. K vazbě mastné kyseliny dochází v blízkosti tunelu vedoucího od hemové skupiny na povrch. K této vazbě přispívají elektrostatické interakce disociované karboxylové skupiny s bazickou aminokyselinou Lys-72 a interakce hydrofobního řetězce kyseliny s dosud neidentifikovaným shlukem hydrofobních aminokyselin. Potenciální vazebné oblasti jsou sekvence 43-46 nebo 81-85. Koordinační vazba Met-80-Fe je přerušena a na iont železa se váže nový ligand, podle autorů studie pravděpodobně Lys-73. Nedochozí ke změně spinového stavu železa. Přídavek ATP nebo dATP k tomuto komplexu indukuje zpětný přechod do nativního stavu [57]. Existuje korelace mezi fluorescencí dansylfosfatidylethanol-

minu inkorporovaného do CL vesikul ve vodě a interakcemi mezi cyt *c* a molekulami těchto lipidů. V případě ferricytochromu *c* převládají elektrostatické interakce, zatímco u ferrocycyochromu *c* hydrofobní efekt. Výsledky práce Letelliera a finské skupiny vědců se dají shrnout do těchto bodů [58, 59]:

1. přidavek fosfolipidů k ferricytochromu *c* vede k odstranění Met-80 jako šestého ligandu;
2. žádné pozorovatelné změny nenastávají po přidavku lipidů k ferrocycyochromu *c*;
3. redukce ferri- na ferrocycyochrom v přítomnosti lipidů doprovází strukturní změny z intermediárního stavu ferricytochromu do nativního ferrocycyochromu *c* [58];
4. cyt *c* obsahuje dvě vazebná místa. Přes A-místo se váže na membrány elektrostatickými silami, přes C-místo hydrofobním efektem;
5. způsob vazby na membrány je takový, že do prohlubně v C-místě se naváže jeden řetězec mastné kyseliny z kardiolipinu, zatímco ostatní jsou pohřbeny v membráně [59].

Indukce apoptosy je u cytochromu *c* spojována s jeho vazbou na mitochondriální membránu a zahrnuje perturbaci terciární struktury. Jaký význam mají tyto strukturní změny známo není. Když je cyt *c* navázaný na CL, zvyšuje se úroveň se jeho peroxidasová aktivita. a cyt *c* katalyzuje peroxidaci CL. Stechiometrie vazby cyt *c*:CL pro TOCL a BHCL je 1:4. Peroxidasová aktivita a síla vazby závisí na saturaci řetězců mastných kyselin CL, a stoupá v řadě TMCL < TOCL = TLCL < BHCL. CL obsahující polynenasycené MK, TLCL a BHCL, jsou přirozené substráty peroxidace cyt *c*, proto nepřekvapí, že úroveň peroxidace u těchto CL nezávisí na iontové síle (na rozdíl od TMCL). Peroxidasová aktivita se, aspoň *in vitro*, spouští za přítomnosti malého množství H₂O₂. *In vivo* by mohla být spouštěčem katalytické aktivity zvýšená hladina ROS, následně vedoucí k zahájení apoptosy [55]. Polyvinylsulfát při pH menším než 4 indukuje konformační změny v molekule cytochromu a její přechod do stavu podobného MG. Polyanionty:

- destabilizují strukturu cytochromu *c*;
- zmenšují T_m tepelného přechodu;
- s cytochromem *c* v kyselém pH interagují ireversibilně [60].



Obrázek 3.3: Molekula porfinu (tlustě je zvýrazněný 16-členný kruh s 18 π -elektrony, dle cit. [62] zpracováno v ACD/ChemSketch)

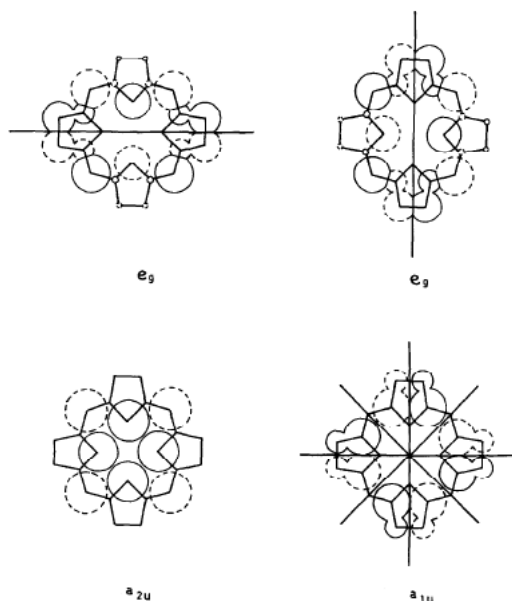
3.5 Elektronová struktura hemové skupiny

Elektronová struktura vychází z interpretace spekter, především UV-VIS. V současnosti se přijímá Goutermanův čtyřorbitalový model (angl. four-orbital model, [61]).

Nejdřív je užitečné se podívat na jednodušší systém – elektronovu strukturu porfinu. Na vliv externích substituentů, narušení konjugovaného systému π elektronů, centrálního kovu atp. se následně pohlíží jako na perturbaci tohoto modelu [62]. Porfin s vázaným iontem kovu je symetrická sloučenina (3.3) a lze jej zařadit do bodové grupy D_{4h} . Absorpční pásy v UV-VIS spektrech metaloporfinu jsou způsobeny hlavně přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$ a mají symetrii E_u , tj. přechodem se indukují dva ekvivalentní přechodné dipóly ve směru os x a y . Dva hlavní absorpční pásy v jejich spektrech se značí Q a B . U porfinu a porfyrinů ve formě volné zásady již nejsou osi x a y ekvivalentní (grupa D_{2h} nebo C_{2v} dle konfigurace dvojných vazeb) a pásy Q resp. B se rozštěpí na Q_x a Q_y resp. B_x a B_y [63].

Molekula porfinu má aromatický charakter – 18 z celkového počtu 26 π elektronů tvoří konjugovaný systém dvojných vazeb [64]. Aproximuje se 16 nebo 18 členným cyklickým konjugovaným polyenem ([16]- nebo [18]-anulenem, obr. 3.3). Orbitály participující na elektronových přechodech budou e_4 a e_5 . Oba orbitály jsou dvojnásobně degenerované a mají 4 a 5 nodálních ploch. U 16 členného polyenu přechodem $e_4 \rightarrow e_5$ vznikají singletní stavy E_{1u} a E_{7u} , druhý je dvojnásobně degenerován. Degenerace termů je dána teorií grup. Důvod rozštěpení spekter vysvětluje Gouterman tzv. konfigurační interakcí – protože excitované stavy mají vhodnou symetrii, dochází k jejich překryvu.

Hraniční molekulové orbitály (obr. 3.4 na následující straně) porfinu jsou orbitály HOMO se symetrií a_{2u} a a_{1u} se 4 nodálními plochami a dvojnásobně degenerovaný orbital LUMO se symetrií e_g (e_{gx} a e_{gy}) a 5 plochami. Narozdíl od orbitalů cyklického



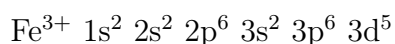
Obrázek 3.4: Hraniční molekulové orbitály porfinu (upraveno v GIMPe, převz. z cit.[61])

polyenu, HOMO orbitály porfinu – alespoň dle výpočtů – nejsou degenerované a orbital a_{2u} má mnohem větší energii než a_{1u} . Páso B by pak měl odpovídat přechod $a_{2u} \rightarrow (e_{gx}, e_{gy})$ a Q páso přechod $a_{1u} \rightarrow (e_{gx}, e_{gy})$, ale oba pásy by měly mít stejnou intenzitu. Tady teorie MO porfinu trochu selhává, protože v reálných spektrech je B pás intenzivnější než Q pás. Místo toho se předpokládá, že rozdíl energií orbitalů a_{2u} a a_{1u} není natolik velký a orbitály jsou „quasidegenerovány“ [61].

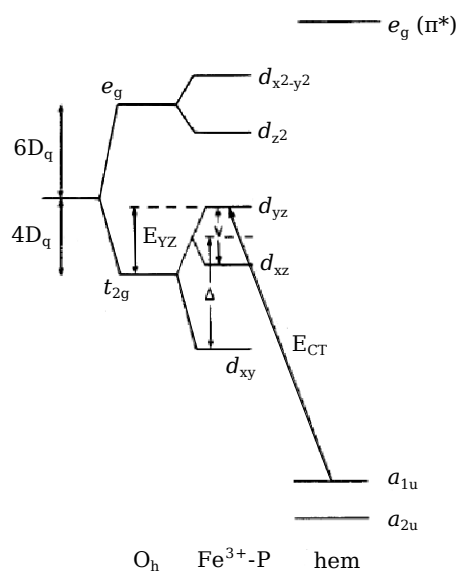
Hlavní efekt centrálního kovu s konfigurací nd spočívá v překryvu volného AO $(n+1)p_z$ s hraničním MO porfinu a_{2u} . I když energie $3d$ orbitalů centrálního kovu hemové skupiny – železa – leží v oblasti hraničních orbitalů HOMO i LUMO, ze symetrických důvodů je jejich vzájemný překryv zanedbatelný [61]. Čím víc stoupá elektronegativita kovu, tím víc klesá energie p_z orbitalu a tím víc se přesouvá elektronová hustota z π -systému do tohoto orbitalu [63]. Překryv a konjugace má dva efekty [61]:

- červený posun spektra;
- hyperchromní posun absorpčních pásů.

Iont železitý má obsazené orbitály následovně:



Co je dále důležité, že hladina HOMO má u nízkospinových porfyrinových ferrokomplexů povahu slabě protivazebného orbitalu a poměrně vysokou energii. Takové komplexy budou silné donory a velmi slabé akceptory π elektronů. Především vysokospinové ferrikomplexy mají malé hodnoty energie hladin HOMO i LUMO a budou dobré donory i akceptory elektronu [64]. Hladiny $3d$ iontu železa jsou v hemoproteinech rozštěpeny jako v distorzovaném oktaedrickém komplexu, jak je patrné z obr 3.5. Štěpení je důsledkem nestejných příspěvků ekvatoriálních a axiálních ligandů. Na obrázku je zaznačen CT přechod mezi hraničním HOMO orbitalem a d_{yz} centrálního kovu. Nacházejí se převážně v IR oblasti. Jeden CT přechod je u hemoproteinů His/Met jako ligandmi iontu železa viditelný ve VIS oblasti. Jedná se o přechod mezi orbitaly $p_y, p_z(S) \rightarrow d(Fe)$ [65].



Obrázek 3.5: Štěpení hladiny d iontu železa v oktaedrických komplexech (O_h) a porfyrinových komplexech ($Fe^{3+}-P$) (Δ - axiální distorze, V - rombická distorze, dle cit. [66], zpracováno v GIMPe)

Kapitola 4

UV-VIS Spektrofotometrie

Spektrofotometrické metody jsou v současnosti jedny z nejpoužívanějších v biochemické laboratoři. Zakládají se na interakci elektromagnetického záření různých vlnových délek s látkou. Teorii elektromagnetického záření (což je forma elektromagnetického pole), vypracovanou J. C. Maxwellem, tak i základy jeho interakce s látkou může čtenář najít prakticky v každé učebnici fyziky [67]. Zde se omezíme na aspekty důležité pro UV-VIS spektroskopii.

4.1 Interakce látky s optickým zářením

4.1.1 Neelastické interakce optického záření s látkou

Převážná část metod optické spektroskopie se soustřeďuje na studia přechodů mezi stacionárními vibračními nebo elektronově vibračními stavy. K indukci těchto přechodů dojde jen tehdy, kdy se energie fotonu (nejmenšího kvanta energie, které může elektromagnetické pole vyměnit s látkou) shoduje s rozdílem ΔE dvou energetických stavů v molekule. Rozeznáváme tři druhy jednofotonových procesů [68]:

1. *stimulovaná absorpce* – přechod z nižšího energetického stavu do vyššího. Einstein odvodil pro rychlost absorpce v_A vztah:

$$v_A = B \cdot \rho(\nu) \quad (4.1)$$

kde B je Einsteinův koeficient *stimulované absorpce* a $\rho(\nu) d\nu$ je energetická hustota elektromagnetického záření ve frekvenčním rozsahu ν do $\nu + d\nu$ daná

Planckovým zákonem vyzařování absolutně černého tělesa:

$$\rho(\nu) = \frac{8\pi h \nu^3}{c^3} \frac{1}{e^{h\nu/kT} - 1} \quad (4.2)$$

2. *stimulovaná emise* – opačný proces vyvolaný vnějším polem
3. *spontánní emise* – zářivý proces bez přítomnosti vnějšího pole. Pro rychlost *stimulované* i *spontánní emise* platí analogické vztahy jako (4.1 na předchozí straně). Pro celkovou emisi můžeme napsat:

$$v_E = (A + B') \rho(\nu) \quad (4.3)$$

Empirické konstanty B' a A jsou Einsteinovy koeficienty stimulované a spontánní emise.

Při nízkých frekvencích záření lze spontánní emisi zanedbat a lze prokázat, že koeficienty B a B' jsou číselně totožné [69]. Pro celkovou bilanci mezi stavy 1 a 2 s počtem molekul n_1 a n_2 platí [68]:

$$W = n_1 B \rho(\nu) - n_2 B' \rho(\nu) = (n_1 - n_2) B \rho(\nu) \quad (4.4)$$

4.1.2 Vibrační struktura, Franckův-Condonův princip

Pravděpodobnost povoleného přechodu (jeho intenzita ve spektru) závisí na druhé mocnině velikosti přechodového dipólového momentu $|\boldsymbol{\mu}_{\varepsilon_f, \varepsilon_i}|^2$. S daným přechodem mezi elektronovými stavy je spojena celá řada vibračních přechodů – mluvíme o elektronově vibrační struktuře nebo vibronické struktuře elektronových spekter.

Elektronově vibrační struktura absorpčního pásu je dle vztahu [68]:

$$\boldsymbol{\mu}_{fi} = -e \sum_i \langle \varepsilon_f | \mathbf{r}_i | \varepsilon_i \rangle \langle v_f | v_i \rangle = \boldsymbol{\mu}_{\varepsilon_f, \varepsilon_i} S(v_f, v_i) \quad (4.5)$$

dána velikostí překryvového integrálu $S(v_f, v_i)$.

Franckův-Condonův princip vychází z předpokladu, že pokud jsou jádra atomů mnohokrát těžší jako elektrony, elektronový přechod je mnohem rychlejší děj než pohyb jádra. Výsledkem přechodu je přeuspořádání elektronové hustoty v molekulách.

Uvažované stacionární jádra se nyní nacházejí v prostředí s jinou elektronovou konfigurací – jiným silovým polem – a dle Heisenbergova principu neurčitosti ($\Delta E \Delta t \geq \frac{h}{4\pi}$) reagují na tyto nové silové poměry až s jistým časovým odstupem [68, 70]. Začínají vibrovat kolem rovnovážných poloh. Kvantově-mechanický popis situace nám říká, že před přechodem se molekula nachází v základním vibračním stavu nejnižšího elektronického stavu; nejpravděpodobější poloha jader je pak ve vzdálenosti jejich rovnovážné vzdálenosti R_e . K elektronovému přechodu dojde s největší pravděpodobností, když jádra mají tuto vzdálenost. Po přechodu se molekula nachází v excitovaném stavu. V prvním přiblížení se vyjadřuje přechod vertikálními liniemi. Tato vertikální linie prochází několika vibračními hladinami vyšší elektronické úrovně. Vibrační hladina označená hvězdičkou je ta, při které jsou nejpravděpodobněji jádra ve stejné vzdálenosti jako na začátku – vlnová funkce má maximální amplitudu. Každopádně to není jediný přístupný vibrační stav, i několik dalších vibračních stavů má při dané geometrii jader velkou amplitudu vlnové funkce. Přechod proto proběhne do všech vibračních stavů v okolí, ale největší intenzitu bude mít vibrační přechod do stavu s maximální amplitudou vlnové funkce. Vibrační struktura spektra závisí na horizontální poloze obou křivek.. Pro excitovanou molekulu je R_e zpravidla větší než v základním stavu z důvodu relokace elektronové hustoty do ne vazebných nebo protivazebných molekulových orbitalů. Intenzita absorpce je úměrná výrazu $|S(v_f, v_i)|^2$, což je tzv. *Franckův-Condonův faktor* přechodu. Platí, že čím je větší překryv vibračních vlnových funkcí počátečního a excitovaného stavu, tím je intenzita absorpce větší [68].

4.1.3 Výběrová pravidla

Když elektron prochází změnou stavu (energetického) z jednoho orbitalu do druhého charakterizovaného kvantovými čísly, mění se tím zároveň jeho energie dle Bohrova vztahu $\Delta E = h\nu$. Přebytek energie je vyzářen (pohlčen) jako foton s frekvencí ν . Všechny možné přechody ale nejsou povoleny. Foton jako částice se řadí k fermionům a má svůj vlastní spin a to $s=1$ [70]. Změna úhlového momentu elektronu při přechodu musí kompenzovat foton. Kupříkladu přechod elektronu z orbitalu d ($l=2$) do orbitalu s ($l=0$) není možný, protože foton není schopen „unést“ změnu momentu. Říkáme, že přechod je zakázaný – zatímco jiné přechody se ve spektrech vyskytují – jsou povoleny.

Výběrová pravidla nám ukazují, které přechody jsou povoleny a které jsou zakázány [68].

Výběrová pravidla týkající se změny magnetického momentu pro molekuly jsou $\Delta S = 0$, $\Delta \Lambda = 0, \pm 1$, $\Delta \Sigma = 0$ a $\Delta \Omega = 0, \pm 1$, kde $\Omega = \Lambda + \Sigma$ je kvantové číslo celkového momentu hybnosti (orbitálního i spinového). Jsou dvě výběrová pravidla týkající se symetrie molekul. *Laportovo pravidlo* pro centrosymetrické molekuly říká, že povoleny jsou přechody mezi orbitály s rozdílnou paritou, tj. $g \rightarrow u$ a $u \rightarrow g$. Pro Σ termy, povoleny jsou přechody $\Sigma^+ \leftrightarrow \Sigma^+$ a $\Sigma^- \leftrightarrow \Sigma^-$ [68].

4.1.4 Typy absorpčních přechodů

Při popisu elektronových přechodů v mnohoatomových molekulách vycházíme z jednoelektronové aproximace. Základní typy přechodů se klasifikují dle molekulových orbitalů, mezi kterými elektron přechází. I když obecně (teoreticky) přispívají do molekulového orbitalu všechny valenční orbitály, někdy lze molekulový orbital přisoudit úzké skupině atomů v molekule a příspěvek zbytku molekuly k vlnové funkci lze zanedbat. Pak mluvíme o tzv. *chromoforu* [69].

Přechody typu $\pi \rightarrow \pi^*$ jsou středobodem elektronové absorpční spektroskopie, protože jsou to často jediné pozorovatelné přechody ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti spektra. Orbitály π vznikají překryvem atomových orbitalů p nebo d a v rovině molekuly, nebo chromoforu, mají nodální plochu. Směr dipólového momentu je $\pi \rightarrow \pi^*$ je rovnoběžný s rovinou molekuly [71].

V absorpčních spektrech některých molekul obsahujících heteroatomy dusíku, síry nebo kyslíku jsou pozorovatelné slabší pásy příslušející $n \rightarrow \pi^*$ přechodům, kde n je nevázebný atomový orbital heteroatomu obsazený elektronovým párem. Tyto orbitály se neúčastní vazeb. U rovinných molekul je nevázebný orbital symetrický k rovině molekuly s maximem elektronové hustoty v této rovině. Dipólový moment přechodu $n \rightarrow \pi^*$ je proto kolmý na rovinu molekuly [71]. Přechody $n \rightarrow \pi^*$ jsou slabší než $\pi \rightarrow \pi^*$ a jsou nimi často překryty [68].

Hladiny d jsou ve volném atomu degenerované. V komplexech d -prvků, kde okolní prostředí není sféricky symetrické, se degenerace nutně ztrácí. Např. v oktaedrickém poli se pět d orbitalů dělí na trojnásobně degenerovanou podslupku t_{2g} a dvojnásobně degenerovanou e_g . Přechody z níže položené hladiny t_{2g} do vyšších hladin e_g leží ve

viditelném oboru spektra záření a způsobují zbarvení těchto komplexů. Jsou to tedy v principu $d \rightarrow d$ přechody a nejsou nijak intenzivní, protože jsou dle Laportova pravidla zakázány.

Komplex může absorbovat záření jako výsledek transferu elektronu od ligandu do d -orbitalů centrálního prvku nebo naopak. Příklad je manganistanový anion MnO_4^- . Jeho intenzivní fialová barva je způsobena přeskoky elektronů z orbitalu kyslíku do orbitalu manganu. Je to typ přechodu LMCT (ligand-to-metal charge transfer). Jiný druh je přechod MLCT – metal-to-ligand charge transfer [68].

4.1.5 Intenzita elektronových absorpčních přechodů - Lambert-Beerův zákon

Lambert-Beerův zákon vznikl spojením Lambertova a Beerova zákona. Lambertův zákon tvrdí, že intenzita prošlého světla I vzorkem klesá exponenciálně s dráhou l , kterou urazí [71]:

$$\ln \frac{I_0}{I} = kl \quad (4.6)$$

kde k je konstanta úměrnosti a l je optická dráha. Analogicky, Beerův zákon říká, že intenzita prošlého světla I klesá exponenciálně s koncentrací látky c [71]:

$$\ln \frac{I_0}{I} = jc \quad (4.7)$$

kde j je konstanta úměrnosti. Byla zavedena veličina absorpance A :

$$A = \log \frac{I_0}{I} \quad (4.8)$$

V rovnicích 4.6 a 4.7 po převedení přirozených logaritmů na dekadické je můžeme spojit s rovnicí (4.8) a dostaneme Lambert-Beerův zákon:

$$A = \varepsilon cl \quad (4.9)$$

kde ε je tzv. molární extinkční koeficient. Je to vlastně absorpance roztoku o jednotkové koncentraci v kyvetě o jednotkové dráze. Pokud je v roztoku víc látek, které spolu neinteragují, je naměřená absorpance součtem všech dílčích absorpancí jednotlivých

látek [72]:

$$A = \sum_i A_i = l \sum_i \varepsilon_i c_i \quad (4.10)$$

4.1.6 Vliv mezimolekulových interakcí na elektronová absorpční spektra

Nespecifické interace, které zahrnují elektrostatické i disperzní silové působení, způsobují, že se okolí mnohoatomové molekuly polarizuje orientačním nebo induktivním způsobem v závislosti na velikosti dipólového momentu a polarizovatelnosti dané molekuly i okolních molekul (viz tabulka 4.1 na následující straně).

Polární molekuly rozpouštědla poblíž molekuly absorbující záření mohou být orientovány interakcemi s polárním chromoforem pomocí vodíkových vazeb a dipól-dipólových interakcí nebo interakcemi mezi sebou navzájem. Dle Franckova-Condonova principu se předpokládá, že orientace molekul rozpouštědla se nezmění bezprostředně po excitaci chromoforu. Jinak řečeno, relaxace molekul rozpouštědla je mnohem pomalejší děj než absorpce kvanta záření. Pokud se interakční energie mezi dipólovými momenty molekul rozpouštědla a chromoforu v excitovaném stavu liší od té v základním stavu, dojde k posunu spektra. Hovoří se o tzv. *orientačním posunu*.

Londonovy disperzní síly polarizují molekuly rozpouštědla i chromoforu a indukují v nich okamžitý dipólový moment. Při elektronovém přechodu dochází ke změně dipólového momentu i polarizovatelnosti molekuly, a tedy i ke změně velikosti interakční energie. Přechodný dipólový moment chromoforu indukovaný absorpcí indukuje redistribuci elektronové hustoty v okolních molekulách rozpouštědla. Tato *polarizace přechodným dipólovým momentem* vede vždy k červenému posunu (*batochromnímu posunu*). Velikost efektu je úměrná velikosti dipólového momentu a polarizovatelnosti rozpouštědla:

$$\Delta\tilde{\nu} = \frac{3e^2}{8\pi c^2 m_e} \frac{f}{\tilde{\nu} a^3} \frac{n^2 - 1}{2n^2 + 1} \quad (4.11)$$

kde n je index lomu rozpouštědla, a je průměr dutiny a $\tilde{\nu}$ je vlnčet absorpce. Molekuly rozpouštědla mohou být polarizovány také permanentním dipólovým momentem chromoforu. Týká se to samozřejmě jen polárních chromoforů. U molekul v polárním rozpouštědle závisí znaménko posunu na změně dipólového momentu. Pokud dojde během přechodu ke zvýšení dipólového momentu, posune se absorpční pás směrem k nižším

Tabulka 4.1: Posun spekter v závislosti na efektech rozpouštědla (dle cit. [73])

	<i>chromofor</i>	<i>solvent</i>	Δ	1	2	3	Σ
I	N	N	-	R	-	-	R
II	N	P	-	R	-	-	R
IIIa	P	N	↓	R	-	B	R/B
IIIb	P	N	↑	R	-	R	R
IVa	P	P	↓	R	B	B	B
IVb	P	P	↑	R	R	R	R

N - nepolární, P - polární, R - červený posun, B - modrý posun Delta - změna dipólového momentu molekuly při přechodu 1 - polarizace přechodným dipólovým momentem 2 - orientační efekt 3 - polarizace dipólovým momentem Sigma - výslední celkový efekt

frekvencím (*batochromní posun*), v opačném případě se frekvence zvýší (*hypsochromní posun*). Rozštěpení energie excitovaných hladin vychází z interakce mezi elektronovými přechody o stejné energii. Nespecifické interakce nezpůsobují pouze změnu polohy maxima absorpčního pásu, ale vzhledem k tomu, že okolí absorbujících molekul nejsou identická, a tedy je i poměrně značná variabilita těchto posunů, dochází i ke značnému nehomogennímu rozšíření čar absorpčních přechodů. U mnohoatomových molekul v roztoku za pokojových teplot tedy vibronická struktura přechodu není vůbec rozlišena. Absorpční spektra se skládají z širokých pásů zpravidla nesymetrického tvaru, které přísluší elektronovým přechodům [73].

knize Experimentální metody biofyziky [71]. Samotnou frekvenční analýzu střídavého elektromagnetického pole lze provádět pomocí laditelného úzkopásmového filtru. Tím bývá monochromátor nebo také interferometr. V monochromátoru dochází k diferenciaci záření dle vlnové délky pomocí disperzního prvku – hranolu nebo mřížky. V současnosti se mnohem víc jako disperzní prvek používá mřížka. Ta je tvořena sérií paralelních vrypů na tvrdém povrchu. Počet vrypů je i několik tisíc na jeden milimetr. Vrypy jsou vyryté nebo podsazené reflektivním materiálem tak, že mřížka funguje vlastně jako zrcadlo. Rovnice difrakce na mřížce je:

$$m\lambda = d(\sin \alpha \pm \sin \theta) \quad (5.1)$$

kde α a θ jsou úhly dopadu a odrazu měřených ke kolmici, λ je vlnová délka elektromagnetického vlnění a m je řád difrakce. *Úhlová disperze* na difrakční mřížce je:

$$\frac{d\theta}{d\lambda} = \frac{m}{d \cos \theta} \quad (5.2)$$

Teoretická *rozlišovací schopnost* difrakční mřížky je:

$$R = mN \quad (5.3)$$

kde N je celkový počet vrypů. Ze vzorců vyplývá, že úhlová disperze i *rozlišovací schopnosti* disperzní mřížky vzrůstají s řádem difrakce. Použití vysokých řádů ovšem brání jejich vzájemný překryv. Odraz bude neúčinnější, pokud paprsky dopadnou na povrch mřížky pod úhlem $\theta = \alpha$, rovnice 5.1 přejde v tvar:

$$m\lambda = 2d \sin \theta \quad (5.4)$$

Štěrbiny jsou charakterizovány především svou spektrální šířkou. U přístrojů s volitelnou šířkou štěrbin tím lze významně ovlivňovat především rozlišení a intenzitu signálu. Platí nepřímá úměra – čím užší štěrby, tím vyšší rozlišení spekter. Příliš úzké štěrby ale propouštějí málo záření a snižuje se tím intenzita měřeného signálu. Pološířka spektra $\Delta\lambda$ propuštěného monochromátorem je úměrná větší z šírek vstupní

(h_1) a výstupní štěrbiny (h_2):

$$\Delta\lambda = \frac{\max(h_1, h_2)}{d} \quad (5.5)$$

Přístroje s detektorem typu diodového pole, jakým je i Agilent 8453, neobsahují monochromátor, nýbrž polychromátor. Polychromátor je monochromátor bez výstupní štěrbiny a v ohniskové vzdálenosti od kondenzoru se nachází detektor, který snímá obraz celého úseku spektra. Vstupní štěrbina polychromátoru je u tohoto přístroje nastavena na 1 nm a nelze ji měnit.

5.2 Detektory

Pro výběr a užití detektoru a interpretaci signálu jsou rozhodující následující charakteristiky [71]:

1. *Relativní spektrální citlivost* detektoru, která určuje spektrální oblast jeho použitelnosti;
2. *Absolutní citlivost* detektoru definovaná jako poměr velikosti výstupního signálu k velikosti zářivého toku dopadajícího na vstup detektoru;
3. *Dosažitelný poměr mezi signálem a šumem* na výstupu detektoru. Tato veličina je principiálně omezena šumem dopadajícího záření, ale může být dále snížena šumem detektoru;
4. *Oblast linearity*, tj. oblast velikosti zářivého toku, kdy je odezva detektoru lineární;
5. *Časová odezva detektoru*. Udává se zpravidla doba náběžné hrany časového průběhu odezvy detektoru na ideální nekonečně krátký pulz záření (tzv. δ -pulz).

Detektory můžeme rozdělit na jednakanálové a vícekanálové (angl. single-/multi-channel). Pro potřeby UV-VIS spektrofotometrie se používají detektory fotoemisní nebo polovodičové. Mezi fotoemisní detektor se řadí *fotonásobič*.

Diodové pole nebo z angličtiny *photo-diode array* (PDA) patří k polovodičovým detektorům. Obsahuje od 128 do 4096 fotodiod (přístroj HP 8453 jich obsahuje 1024). Každá fotodioda je složená z polovodičového materiálu (pro UV-VIS oblast to bývá křemík) obsahující p-n přechod. Dle principů fyziky polovodičů, na p-n přechodu je

koncentrace nosičů náboje nejmenší (v důsledku rekombinace párů elektron-díra) a za tmy při teplotě T diodou protéká jen malý závěrný proud [74]:

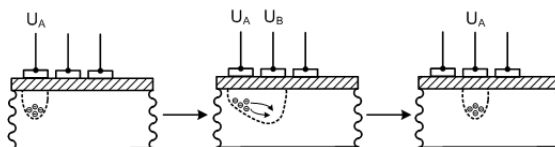
$$I = I_{sat} \left(e^{\frac{eV}{kT}} - 1 \right) \approx -I_{sat} \quad (5.6)$$

Fotonový tok J dopadající na p-n přechod stimuluje přeskok elektronu z valenčního pásu do pásu vodivostního. Vznikne tak dvojice elektron-díra a výsledkem je generovaný proud rovný $-\eta eJ$, kde η je kvantový výtěžek tvorby párů elektron-díra a e je elementární náboj. Efektivní koncentrace těchto páru je funkcí intezity světla a existují dva způsoby její monitorování. Ve fotonoltaických detektorech dojde na p-n spoji k separaci elektronu a díry a vzniklé napětí se pak měří. Nebo můžeme měřit proudový impuls – celkový proud je teď roven [74]:

$$I = -\eta eJ + I_{sat} \left(e^{\frac{eV}{kT}} - 1 \right) \quad (5.7)$$

Detekce a odečet naměřených proudových impulsů je nepřímou možný pomocí paralelně zapojených kondenzátorů. Závěrný proud navýšený o fotoproud vybíjí kondenzátor. V odečítací fázi se pak jednotlivé elementy připojí k zápornému pólu a jejich kapacita se dobije na původní hodnotu. Hodnota dobíjecího proudu je přímo úměrná energii zářivé energie osvětlení v periodě mezi dvěma po sobě následujícími odečítacími fázemi (tzv. integrační čas) [71]. Pokud připojíme diodu v závěrném směru, fotogenerovaný náboj stimuluje tvorbu dalších párů elektron-díra. Dochází tak k jisté amplifikaci signálu – takové diody se nazývají *lavinové* (angl. avalanche photodiodes) [74].

Třetí hlavní v současnosti používaný typ je CCD – *charge coupled detector*. Na tenké polovodičové destičce (opět křemíkové, typu n) pokryté oxidem křemičitým jsou naneseny elektrody (p-dopovaný křemík), které ve formě výstupního elektrického signálu odvádějí náboj vytvořený průletem fotonu - mluvíme o fotokondenzátorech. Elektrody jsou rozmístěny v husté pravidelné mřížce, vytvářející buňky - pixely - o rozměrech několika mikrometrů až desetin mm. dopadající světlo excituje valenční elektrony do vodivostního pásu a vytváří se nosiče elektrického proudu – vodivostní elektrony a díry. Nicméně, elektrony se nemohou volně pohybovat ve vodivostním pásu po čipu – na systém vodorovných elektrod je vloženo napětí tak, že vzniká jakási energetická bariéra,



Obrázek 5.2: Pohyb nábojů mezi elektrodami v CCD

tzv. „potenciálová studna“, z nich elektrony nemohou uniknout. Aby bylo možné přesouvat náboj, je potřeba na vrstvičku SiO_2 umístit více elektrod blízko sebe. Pokud na 2. elektrodě bude větší napětí, vytvoří se o něco větší potenciálová jáma než pod 1. elektrodou. Navíc, díky blízkosti elektrod, dojde ke spojení obou potenciálových jam a náboj se přesune do 2. jámy. Pokud odpojíme napětí na 1. elektrodě (potenciálová jáma zaniká) a na 2. napětí snížíme (potenciálová jáma se sníží), můžeme tento proces opakovat mezi 2. a 3. elektrodou, dále mezi 3. a 4. atd. (viz obr. 5.2). Proces posouvání náboje je používán, když je potřeba informaci z CCD čipu vyčíst. Elektrony, reprezentující jednotlivé pixely, jsou posouvány do výstupního zesilovače, kde je elektrický náboj převeden na napětí. Počet pixelů v horizontálním a vertikálním směru stejně jako velikost pixelu tvoří jedny z nejzákladnějších charakteristik CCD čipu. V odečítací fázi u CCD i PDA detektorů pochopitelně není žádoucí, aby byl čip nadále osvětlen paprskem elektromagnetického záření, a proto se používá mechanická uzávěrka (angl. shutter) [74].

5.3 Zdroje záření

Jako zdroje záření se v UV-VIS spektrofotometrii uplatňuje především tepelné zdroje, výbojky a lasery. Tepelné zdroje jsou pevná tělesa rozžhavená zpravidla procházejícím elektrickým proudem. Spektrální hustota intenzity vyzařování jejich povrchu I je dána Kirchhoffovým zákonem:

$$I(\nu) = [1 - R(\nu)] I_{abs}(\nu) \quad (5.8)$$

kde $R(\nu)$ je celková odrazivost zářícího povrchu a $I_{abs}(\nu)$ je intenzita vyzařování absolutně černého tělesa (viz vztah 4.2 na straně 31):

$$I_{abs}(\nu) = \rho(\nu) \frac{c}{4\pi} \quad (5.9)$$

Wolframové vlákno, součást běžně užívané wolframové lampy, má zanedbatelnou odrazivost a proto její spektrum přibližně odpovídá Planckově zákonu (4.2 na straně 31). Používá se zejména pro viditelnou (a blízkou infračervenou) oblast spektra. Do lamp se přidává někdy stopové množství jodu, což zvyšuje její životnost.

Výbojka je trubice z opticky transparentního materiálu naplněná plynem či parami kovu, do níž jsou zavedeny elektrody. Po vložení napětí na elektrody dochází k toku nosičů proudu (elektronů a kationtů) – vzniká výboj. Srážkami elektronů s molekulami plynu dochází k jednak k dalším ionizacím, jednak k elektronovým excitacím. Jejich zářivé relaxační procesy jsou podstatou záření výbojek a jejich čárovému charakteru spekter. Spojitý charakter způsobují relaxace eximerových nebo nevazebných excitovaných stavů. Dle tlaku plynu či par kovu rozlišujeme výbojky nízkotlaké, středotlaké a vysokotlaké. Nízkotlaké výbojky (He, Ne) poskytují ostrá čárová spektra a jsou užívány pro kalibraci. Středotlaké a vysokotlaké (D₂, Hg) s vyšší intenzitou spojitého záření jsou zase užívanými zdroji především ve viditelné a blízké ultrafialové oblasti elektromagnetického vlnění.

Funkce laserového zdroje je podmíněná vytvořením tzv. inverzní populace aktivního prostředí systému a jeho umístěním do rezonátoru. Generace laserového záření je založena na stimulované emisi. Představme si soubor N molekul, kterým prochází elektromagnetické záření, jehož frekvence je v rezonanci s přechodem mezi molekulárními stavy 1 a 2 o energiích E_1 a E_2 . Intenzita elektromagnetického záření se bude měnit dle Lambert-Beerova zákona. Velikost extinkčního koeficientu bude přímo úměrný rozdílu počtu molekul ve stavu 1 (n_1) a 2 (n_2):

$$\varepsilon \sim n_1 - n_2 = N e^{-E_1/kT} - N e^{-E_2/kT} \quad (5.10)$$

Pro systém v rovnováze platí $n_1 > n_2$ když $E_2 > E_1$ a ε je tudíž vždy kladné. Za jistých okolností ale může být populace excitovaných stavů větší než základního (inverzní populace, $n_1 < n_2$) a extinkční koeficient bude záporný. To znamená, že intenzita elektromagnetického vlnění se při průchodu systémem, který není v termodynamické rovnováze a došlo u něho k inverzi, bude zvyšovat. Rezonátor (typicky je to vlastně Fabry-Perotův interferometr) tvoří dve zrcadla nastavená proti sobě. Zabezpečuje navrácení části elektromagnetického záření spátky do systému (výbojky), kde v podstatě

udržuje rovnováhu mezi čerpáním inverzních stavů a relaxačními procesy. Lasery nacházejí uplatnění ve spektroskopii všude tam, kde je žádoucí vysoká intenzita záření nebo při měřeních s vysokým časovým rozlišením – úpravou laseru lze dosáhnout, že zdroj vydává krátké pulzy v řádu až 10^{-15} s. U aplikacích tohoto zdroje pak mluvíme o femto- nebo pikosekundové spektroskopii. Princip laseru je zde popsán velice stručně. Pro podrobnější popis a také další aplikace nejen v UV-VIS spektroskopii lze doporučit statě v monografiích uvedených v seznamu literatury, zejména pak knihu Experimentální metody biofyziky od Prossera [71] a učebnici fyzikální chemie od Atkinse [68].

Kapitola 6

Materiál a metody

6.1 Použité chemikálie

Cytochrom *c* (z koňského srdce) od firmy Loba Feinchemie jsem použil bez dalších úprav a čistících postupů. NaCl a NaH₂PO₄·2H₂O byly od firmy Lachema (ČR) čistoty p.a.

6.2 Laboratorní přístroje

- Spektrofotometr HP 8453, Agilent Technologies (USA)
- Automatické pipety, Nichiryo (Japonsko)
- Analytické váhy Ohaus Discovery, Schoeller (Švýcarsko)
- pH metr model 370, ATI Orion (USA), kalibrovaný standardními pufrů výrobce
- magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo)

6.3 Metody

1. Připravil jsem si 10 mM fosfátový pufrací roztok o pH 2,10 rozpuštěním 0,7801 g NaH₂PO₄·2H₂O v destilované vodě, ze kterého jsem vycházel. Roztok jsem dotitroval 85% roztokem H₃PO₄ (celková spotřeba 0,47 ml) do konečné hodnoty pH a doplnil jsem ho do objemu 500 ml.

Tabulka 6.1: Zásobní roztoky solí

sůl	navážka (g)	objem pufru	koncentrace soli (M)
NaCl	2,6727	22,9 ml	2
NaClO ₄ ·H ₂ O	0,5054	7204 µl	0,5
Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	0,0537	1667 µl	0,1

Tabulka 6.2: Vzorky cyt *c* s přidavkem NaCl

pufr (ml)	V (NaCl, ml)	cyt <i>c</i> (µl)	koncentrace NaCl (mM)
1,470	0	30	0
1,463	0,0075	30	10
1,395	0,075	30	100
1,282	0,188	30	250
1,095	0,375	30	500
1,497	0	3	0
1,4895	0,0075	3	10
1,422	0,075	3	100
1,309	0,188	3	250
1,122	0,375	3	500

- Spektra jsem měřil při dvou koncentracích cyt *c* – 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml. Zásobní roztok jsem si připravil navážením 0,0343 g cyt *c* a rozpustil ho v 1,372 ml 10 mM fosfátovém pufru (viz. bod 1).
- Připravil jsem si zásobní roztoky solí NaCl, NaClO₄, Na₂SO₄ dle tabulky 6.1.
- Měřil jsem spektra následujících vzorků dle tab. 6.2, 6.3 a 6.4 na následující straně. Vždy čerstvý vzorek bez přidavku NaCl (viz tab. 6.2) byl použit jako blank ve všech měřeních. Spektra jsem měřil do 15 minut od přípravy vzorků.

Tabulka 6.3: Vzorky cyt *c* s přidavkem NaClO₄

pufr (ml)	V (NaClO ₄ , ml)	cyt <i>c</i> (µl)	koncentrace NaClO ₄ (mM)
1,467	0,003	30	0,1
1,467	0,003	30	1
1,440	0,03	30	10
1,170	0,3	30	100
0,720	0,75	30	250
1,494	0,003	3	0,1
1,494	0,003	3	1
1,467	0,03	3	10
1,197	0,3	3	100
0,747	0,75	3	250

Tabulka 6.4: Vzorky cyt *c* s přidavkem NaCl

pufr (ml)	V (Na ₂ SO ₄ , μl)	cyt <i>c</i> (μl)	koncentrace Na ₂ SO ₄ (mM)
1,466	4,5	30	0,3
1,455	15	30	1
1,395	75	30	5
0,720	150	30	10
1,492	4,5	3	0,3
1,482	15	3	1
1,422	75	3	5
1,347	150	3	10

6.4 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra jsem měřil na spektrofotometru Agilent HP 8453 s následujícím nastavením:

1. Rozsah vlnových délek 190-1100 nm – ovládací program Chemstation sice umožňuje omezení rozsahu vlnových délek, ale to se týká jenom výstupních dat. Přístroj ve skutečnosti vždy měří celý dostupný rozsah vlnových délek.
2. Integrační čas 1 s.
3. Spektra jsem měřil v křemenné kyvetě s optickou délkou 1 cm.
4. Každý vzorek jsem měřil šestkrát a získaná data jsou aritmetickým průměrem z těchto měření.
5. Pro měření v oblasti Soretova pásu jsem použil vzorky s koncentrací 0,05 mg/ml cyt *c*, v ostatních případech byla koncentrace cyt *c* 0,5 mg/ml.

6.5 Zpracování experimentálních dat

Naměřená data jsem exportoval v ovládacím programu Chemstation do souborů *.csv. Dále jsem je zpracovával v programu Origin (verze 8.6). Pro výpočet derivačních spekter jsem označil příslušný sloupec hodnot, vybral *Analysis* → *Mathematics* → *Differentiate*. Nastavil jsem příslušný řád derivace (*Derivative Order*) a použil vyhlazení dle Savitzkého a Golaye s nastavením *Polynomial Order 2*, *Points of Window 5* (pro oblast absorpce aromatických aminokyselin), nebo 7 [75].

Kapitola 7

Výsledky

7.1 Vliv různých aniontů na konformaci cytochromu *c*

7.1.1 Oblast absorpce aromatických aminokyselin

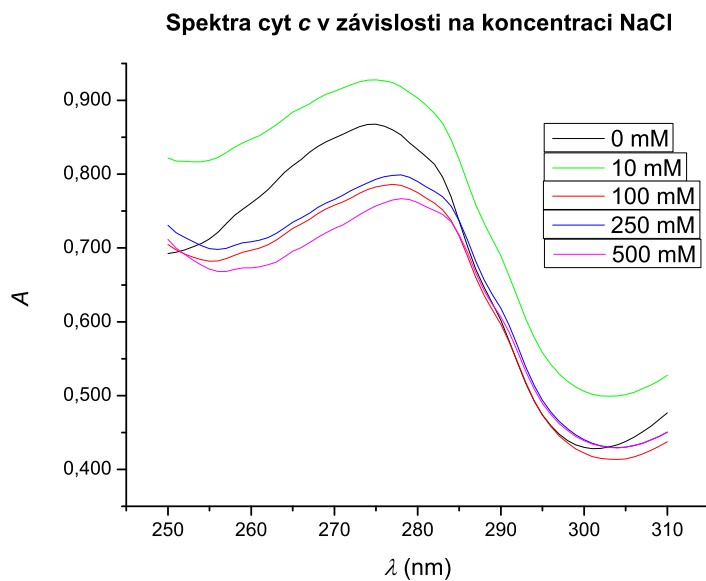
V sérii experimentů jsem zkoumal vliv solí se společným kationtem na chování cyt *c* při pH 2,10. Na obrázku 7.1 na následující straně jsou znázorněna absorpční spektra ferricytochromu *c* v oblasti absorpce aromatických aminokyselin. Po přidavku chloridu je z grafu vidět pokles absorbance maxima a jeho červený posun. Ze spekter ovšem nelze rozlišit příspěvky aromatických aminokyselin.

Lepší možnost získat informace o jednotlivých aromatických aminokyselinách poskytují křivky druhé derivace (obr. 7.2 na následující straně). Jejich průběh v oblasti absorpce fenylalaninu (250-270 nm) je podobný, dochází pouze k jemnému posunu k nižším vlnovým délkám se snižující se koncentrací sole. Při vlnové délce 283 nm je zřetelné minimum pro všechny koncentrace, jehož intenzita i poloha se liší. Další výrazné maximum se nachází při ~290 nm a jeho poloha je ustálená. V tab. 7.1 jsou zapsané minima z grafu druhých derivací pro dvě koncentrace chloridu sodného.

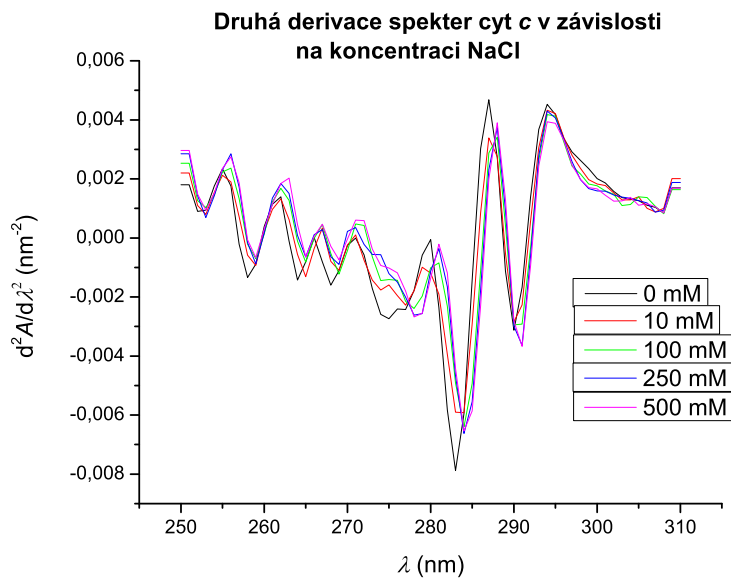
Dále jsem pokračoval v experimentu s chloristanem sodným. Na obrázku 7.3 jsou

Tabulka 7.1: Minima nacházející se v obr. 7.2 na následující straně

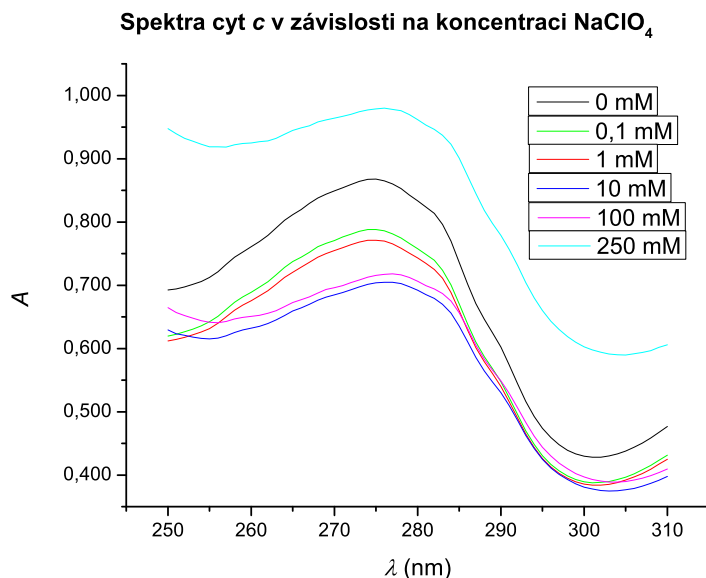
koncentrace NaCl (M)	poloha minim (nm)							
	Phe				Tyr			Trp
0	253	258	264	268	275	277	283	290
500	253	259	265	269	274	278	284	291



Obrázek 7.1: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro NaCl (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).



Obrázek 7.2: Druhá derivace absorpčních spekter cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro NaCl (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).



Obrázek 7.3: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro NaClO₄ (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).

Tabulka 7.2: Minima nacházející se v obr. 7.4 na následující straně

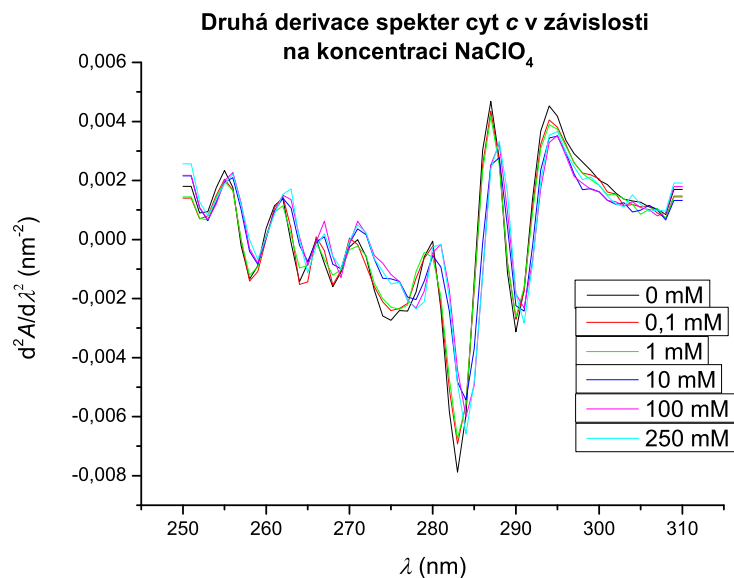
koncentrace NaClO ₄ (M)	poloha minim (nm)							
	Phe				Tyr			Trp
0	252	258	264	268	275	277	283	290
250	253	259	265	269	275	278	284	291

v grafu znázorněna absorpční spektra cyt *c* v oblasti absorpce aromatických aminokyselin, na obr. 7.4 na následující straně pak druhé derivace spekter. Podobně, jako tomu bylo u roztoků s přídavkem NaCl, také s chloristanem sodným pozorujeme hypsochromní a červený posun.

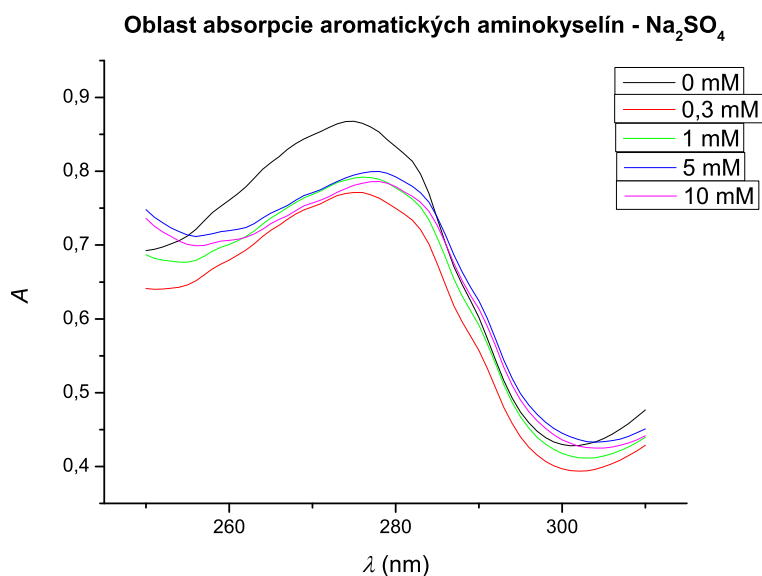
Průběh druhých derivací je kvalitativně podobný, dochází pouze k jejich jemnému posunu k nižším vlnovým délkám se snižující se koncentrací sole. V oblasti 275-285 nm je tento posun již znát poměrně výrazně. Minima z grafu druhých derivací spekter jsou v tab. 7.2.

Třetí použitá sůl byl síran sodný. Na obrázku 7.5 na následující straně jsou v grafu znázorněna absorpční spektra cyt *c* v oblasti absorpce aromatických aminokyselin. Obrázek je z důvodu vertikálních posunů spekter špatně interpretovatelný.

Proto i zde je výhodné na rozlišení příspěvků jednotlivých aromatických aminokyselin využít výnos druhých derivací spekter (obr. 7.6 na straně 51). Jejich průběh je podobný jako v předchozích případech. Výpis minim je v tabulce 7.3.



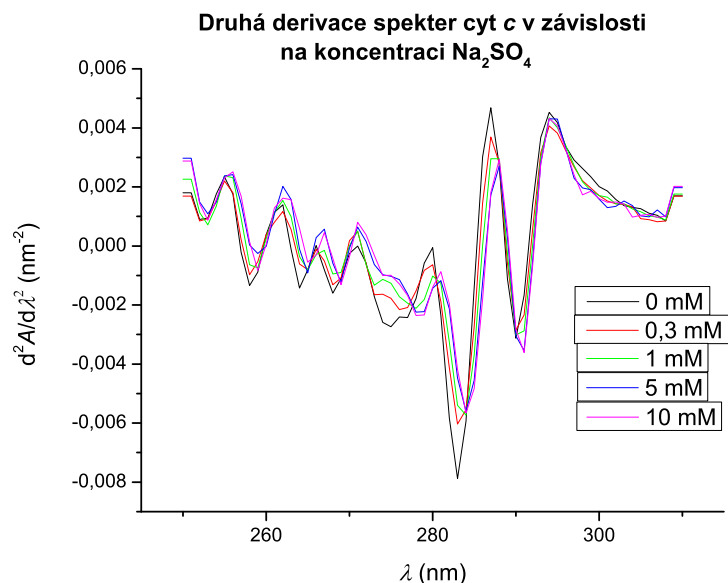
Obrázek 7.4: Druhá derivace absorpčních spekter cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro NaClO₄ (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).



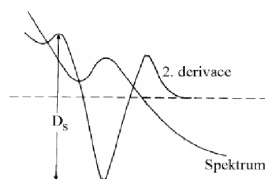
Obrázek 7.5: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro Na₂SO₄ (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).

Tabulka 7.3: Minima nacházející se v obr. 7.6 na následující straně

koncentrace Na ₂ SO ₄ (M)	poloha minim (nm)							
	Phe				Tyr			Trp
0	252	258	264	268	275	277	283	290
250	253	259	265	269	274	278	284	291



Obrázek 7.6: Druhá derivace absorpčních spekter cyt *c* v oblasti vlnových délek 250-310 nm pro Na₂SO₄ (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml).



Obrázek 7.7: Kvantitativní vyhodnocení derivačního záznamu

Z výnosů druhých derivací spekter jsem si určil pomocné parametry D_S , který jsem vynesl do grafu jako funkci koncentrace solí. Význam parametru D_S je naznačen na obr. 7.7.

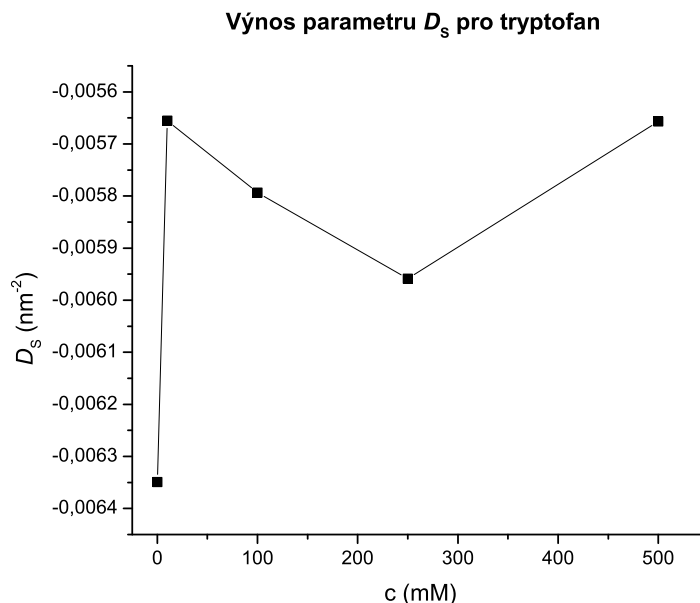
Vypočítal jsem si tři sady těchto parametrů dle vzorců:

$$D_S = \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{290 \text{ nm}} - \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{287 \text{ nm}} \quad (7.1)$$

$$D_S = \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{287 \text{ nm}} - \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{283 \text{ nm}} \quad (7.2)$$

$$D_S = \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{258 \text{ nm}} - \left(\frac{d^2A}{d\lambda^2} \right)_{255 \text{ nm}} \quad (7.3)$$

kde v závorkách jsou hodnoty druhých derivací spekter dle λ při konkrétní vlnové délce. Z obrázků 7.8 na následující straně, 7.9 na straně 53, 7.10, 7.11, 7.12, 7.13 je patrné, že obecně zvyšováním koncentrace soli dochází k změně průběhu závislosti parametru



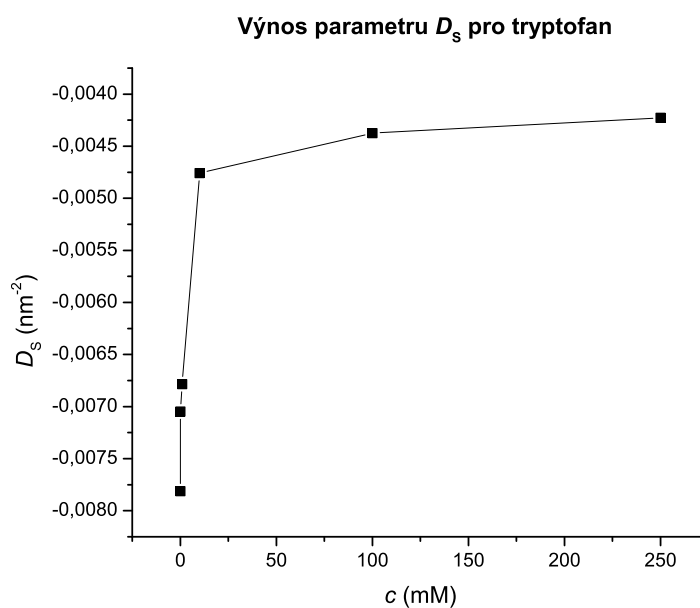
Obrázek 7.8: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 290 nm maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaCl. (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).

D_s na koncentraci.

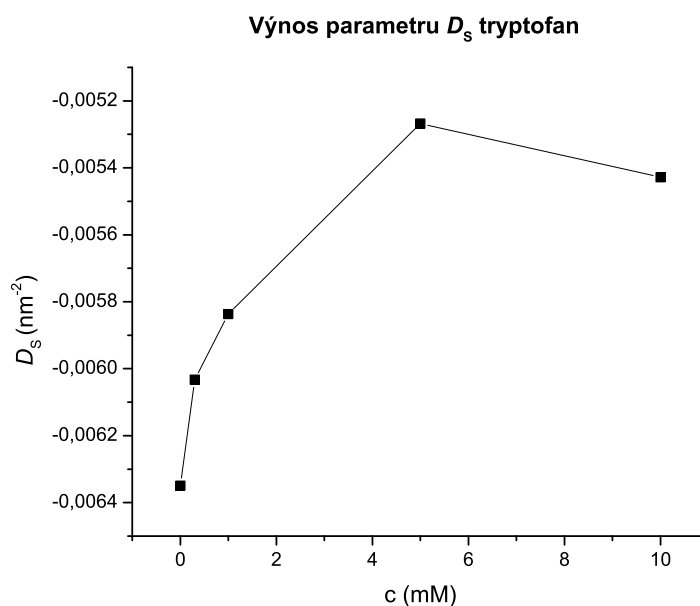
7.1.2 Soretův pás (B pás)

Další studovanou oblastí je oblast Soretova pásu v oblasti kolem 400 nm (obr. 7.17 na straně 57). Se stoupající koncentrací NaCl můžeme pozorovat jemný červený posun maxima Soretova pásu od 395 nm (pro 0 mM) k 401 nm (pro 500 mM) a zároveň zmenšení intenzity absorpce. V křivkách druhých derivací, přes značný podíl šumu, lze vidět příspěvek dvou extrémů při 395 a 401 nm. Zvyšováním koncentrace sole minimum při 395 nm zanikne a objeví se nové minimum při 400/401 nm pro koncentrace 100, 250 a 500 mM (obr. 7.18 na straně 57).

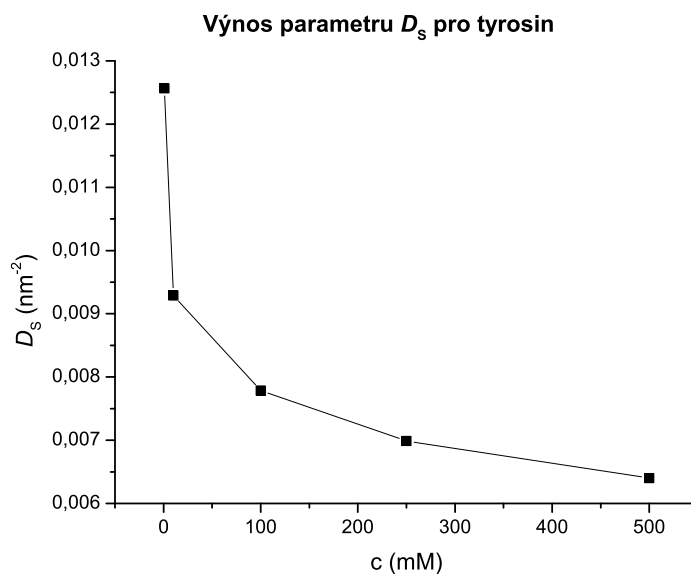
S přidavkem NaClO_4 (viz 7.19) můžeme pozorovat opět červený a hypsochromní posun maxima Soretova pásu od 395 nm (pro 0 mM) k 410 nm (pro 250 mM). V křivkách druhých derivací, které nám informace pomohli v dané oblasti B pásu zvýraznit, lze opět vidět příspěvek dvou extrémů při 395 a ~ 400 nm. Zvyšováním koncentrace sole se posune poloha minima od 395 nm k 400 nm. Toto chování spekter se nejvíc patrné mezi koncentracemi 1 mM a 10 mM NaClO_4 (obr. 7.20 na straně 59). I v druhé derivaci je jasně patrné snižování intenzity absorpce, tj. pravděpodobnosti elektronových



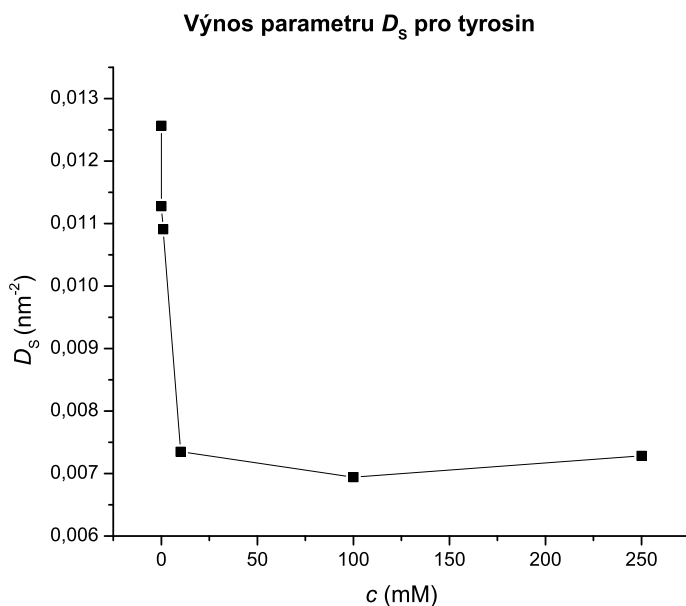
Obrázek 7.9: Hodnoty parametrů D_S zjištěných z minima při 290 nm a maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaClO_4 . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



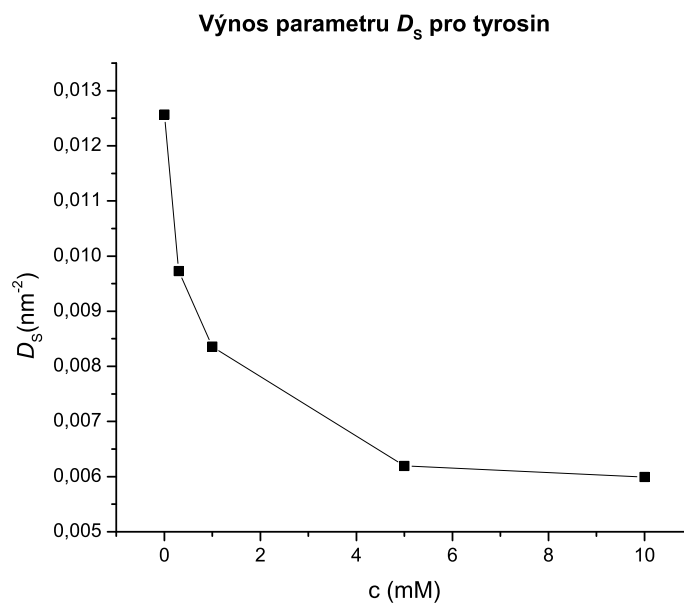
Obrázek 7.10: Hodnoty parametrů D_S zjištěných z minima při 290 nm a maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace Na_2SO_4 . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



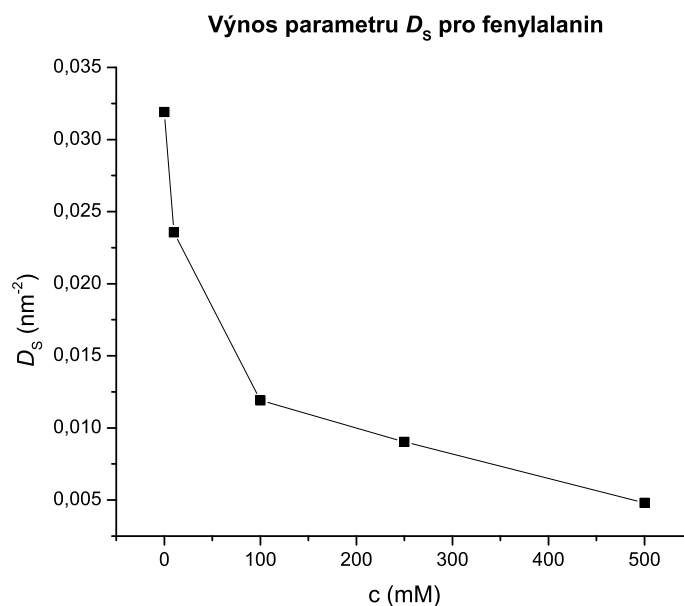
Obrázek 7.11: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 283 nm a maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaCl. (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



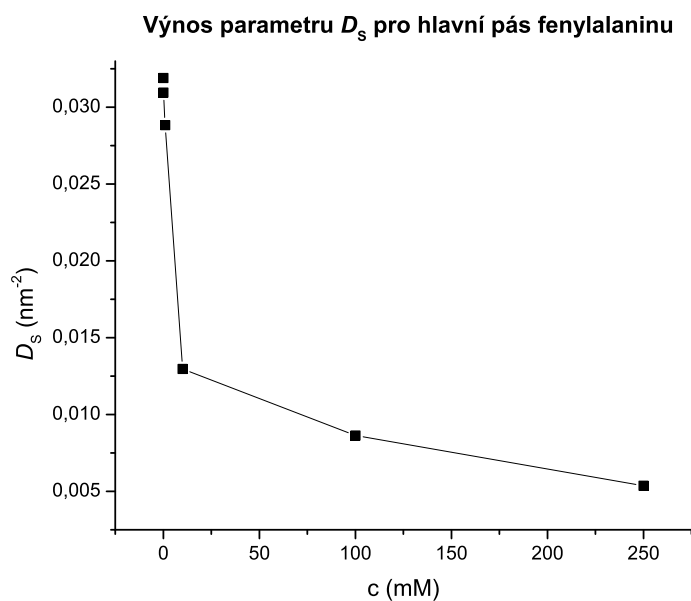
Obrázek 7.12: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 283 nm a maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaClO₄. (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



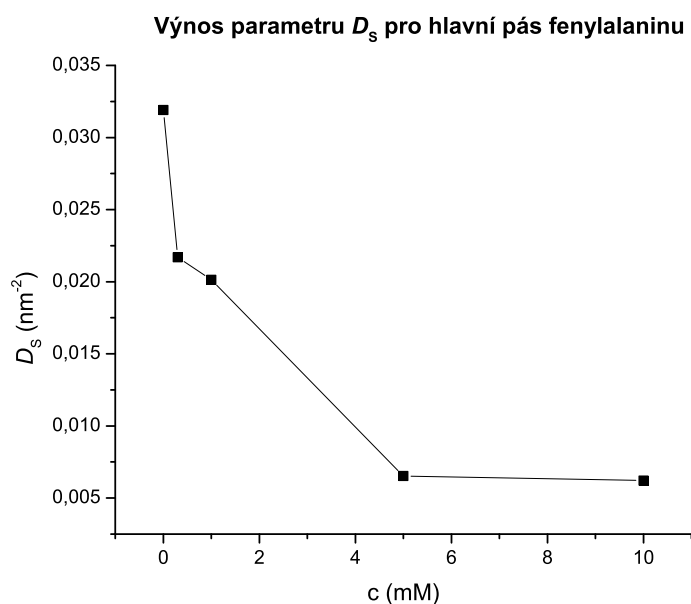
Obrázek 7.13: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 283 nm a maxima při 287 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace Na_2SO_4 . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



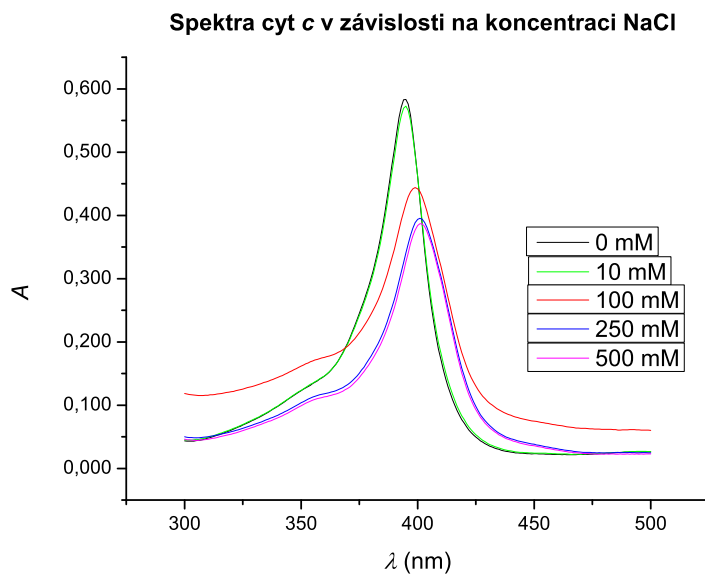
Obrázek 7.14: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 258 nm a maxima při 255 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaCl . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



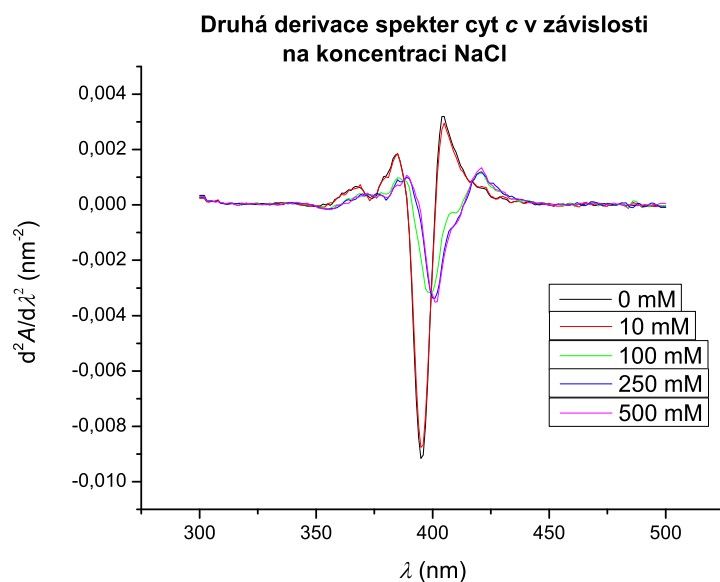
Obrázek 7.15: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 258 nm a maxima při 255 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace NaClO_4 . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



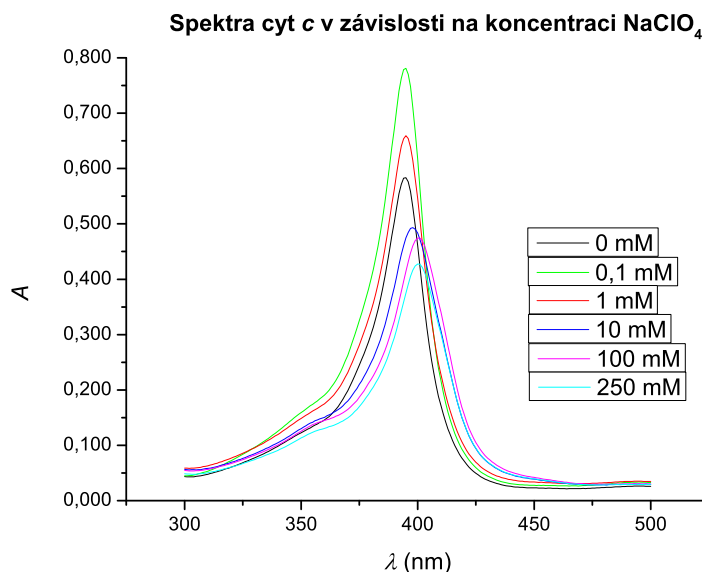
Obrázek 7.16: Hodnoty parametrů D_s zjištěných z minima při 258 nm a maxima při 255 nm z výnosů druhých derivací pro jednotlivé koncentrace Na_2SO_4 . (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,5$ mg/ml).



Obrázek 7.17: Absorpční spektra cyt c v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace NaCl - Soretův pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,05$ mg/ml)



Obrázek 7.18: Druhá derivace absorpčních spekter cyt c v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace NaCl – Soretův pás (10 mM fosfát pH 2,10, koncentrace cyt $c = 0,05$ mg/ml).



Obrázek 7.19: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace NaClO₄ - Soretův pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,05 mg/ml)

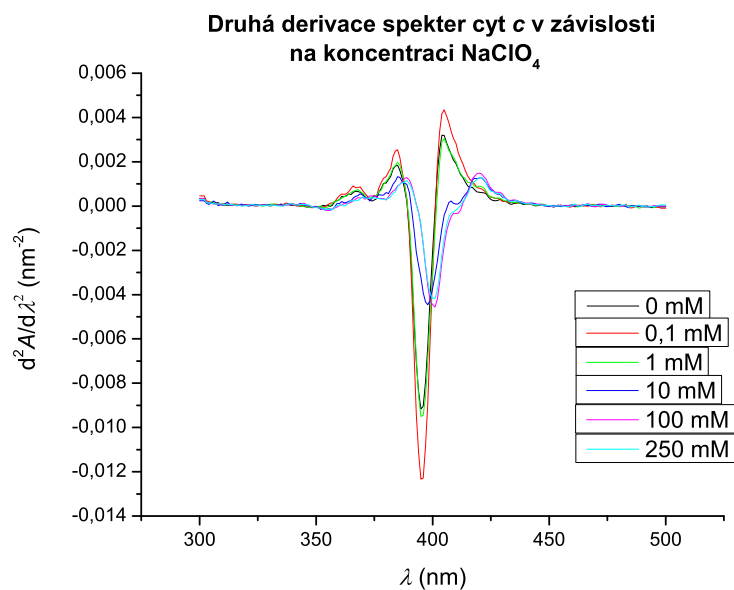
přechodů do excitovaných singletních stavů (viz podsekcce 3.5 na straně 27).

Třetí studovanou solí byl síran sodný (obr. 7.21). Podobně jako jsme to pozorovali v případě NaCl a NaClO₄ i tomhle případě můžeme pozorovat červený a hypsochromní posun maxima Soretova pásu od 395 nm (pro 0 mM) k 406 nm (pro 10 mM). Rozdílné chování druhých derivací spekter je nejvíc patrné mezi koncentracemi 1 mM a 5 mM Na₂SO₄ (obr. 7.22 na straně 60).

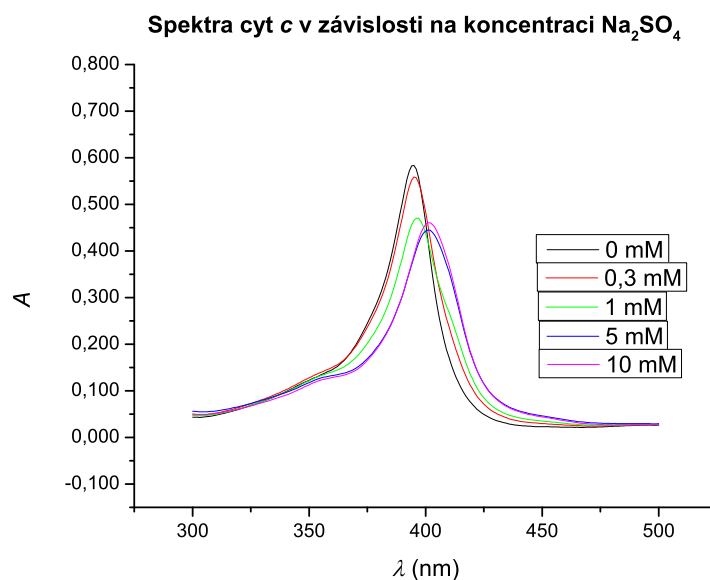
7.1.3 Q pás

Další studovanou oblastí je Q pás ležící mezi 500 až 650 nm. I Q pás je podobně jako Soretův nositelem informace o hemové skupině. Na obr. 7.23 na straně 60 můžeme se stoupající koncentrací NaCl pozorovat snížení intensity maxima v Q pásu při ~ 490 nm a zároveň vznik nového maxima při 525 nm. Při ~ 560 nm je malé ramínko charakteristické pro redukovanou formu cyt *c* [76]. Charakter spekter pro koncentrace 0 a 10 M je odlišný od spekter pro ostatní koncentrace. Maximum při 625 nm jemně mění polohu k vyšším λ u vzorků s přídatkem 250 a 500 nm.

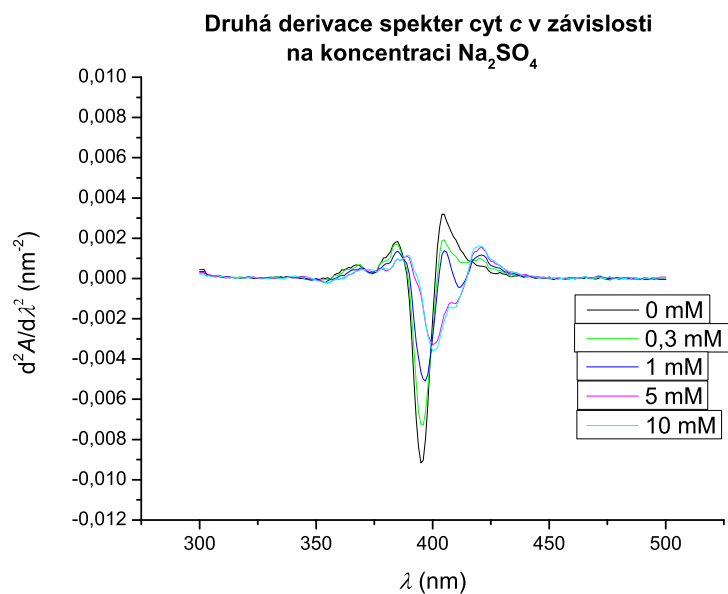
Na obr. 7.24 na straně 61 pozorujeme zánik maxima v Q pásu při ~ 490 nm a zároveň vznik nového maxima při 525 nm. Je to patrné zejména pro koncentrace 0, 0,1



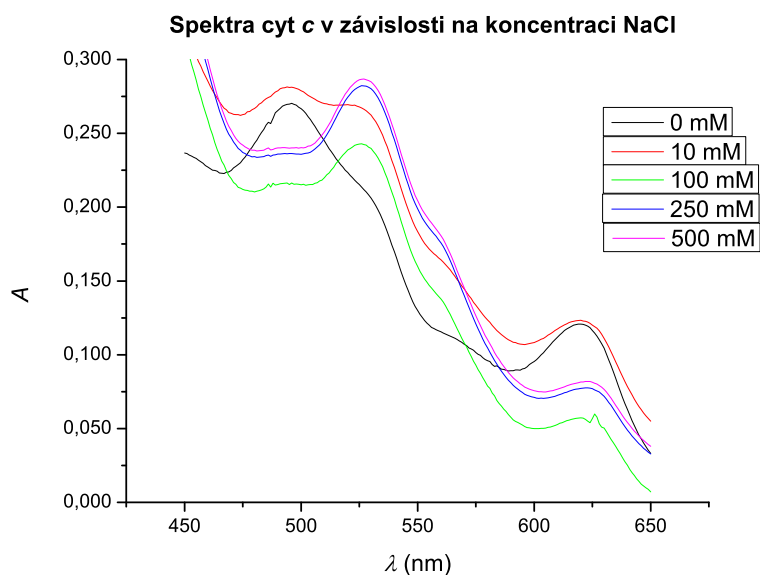
Obrázek 7.20: Druhá derivace absorpčních spekter cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace NaClO₄ – Soretův pás (10 mM fosfát pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,05 mg/ml).



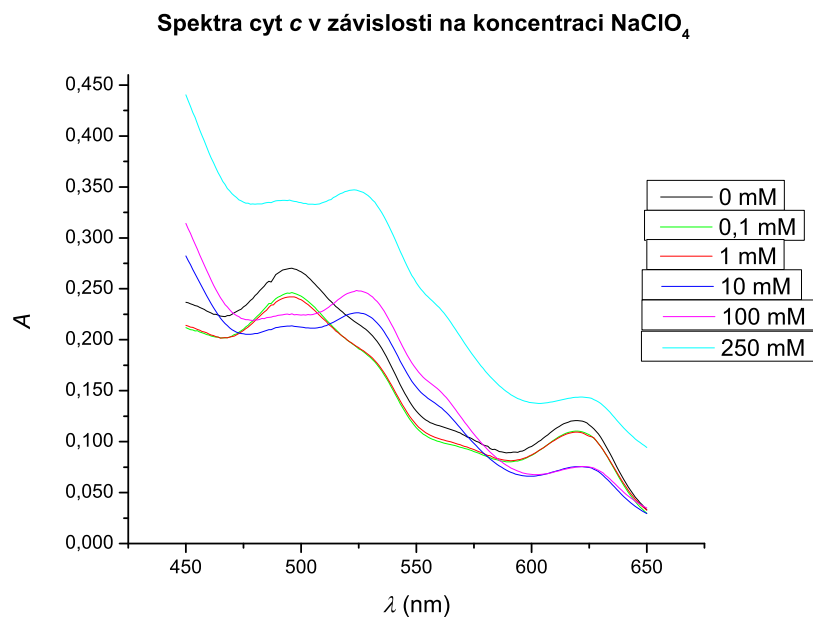
Obrázek 7.21: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace Na₂SO₄ - Soretův pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,05 mg/ml)



Obrázek 7.22: Druhá derivace absorpčních spekter cyt *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé koncentrace Na₂SO₄ – Soretův pás (10 mM fosfát pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,05 mg/ml).



Obrázek 7.23: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 450-650 nm pro jednotlivé koncentrace NaCl – Q pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)



Obrázek 7.24: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 450-650 nm pro jednotlivé koncentrace NaClO₄ – Q pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)

a 1 mM NaClO₄, jinak je kvalitativně průbeh spekter podobný jako v případě NaCl.

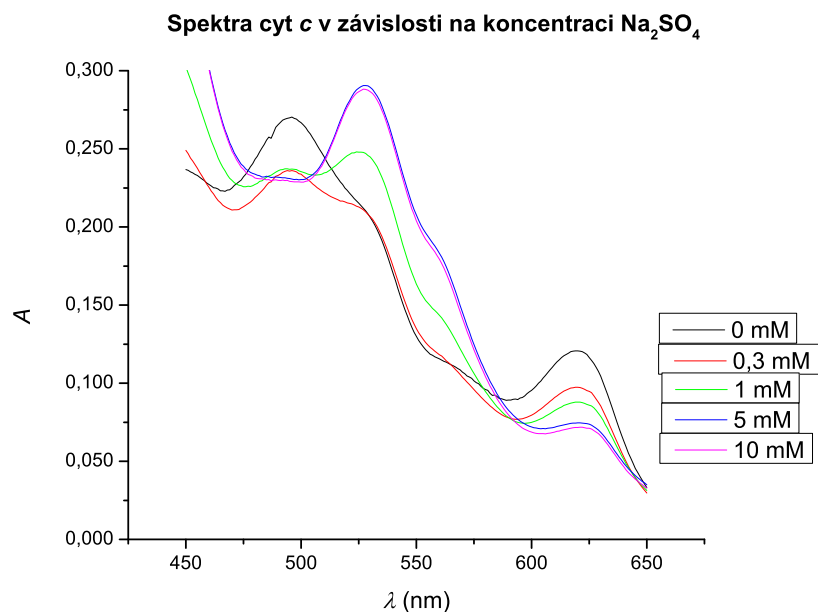
Na obr. 7.25 na následující straně můžeme se stoupající koncentrací Na₂SO₄ opět pozorovat zánik maxima v Q pásu při ~ 490 nm a zároveň vznik nového maxima při 525 nm. Lokální maximum při 625 nm jen klesá na intenzitě.

7.1.4 CT pás

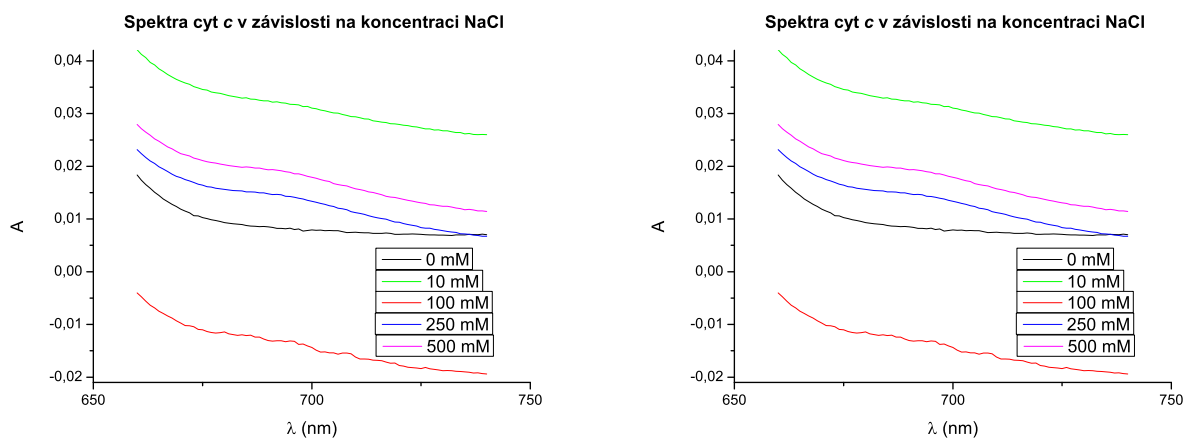
Poslední studovanou oblastí je oblast, kde absorbuje cyt *c*, je poměrně slabě absorbující pík při 695 nm. Jeho původ je vysvětlen v sekci 3.5. Je poměrně selektivní k Met-80 jako k axiálnímu ligandu. Pokud dojde k disociaci jeho koordinační vazby na centrální kationt železa, tento slabý pík ze spektra vymizí. Na obr. vlevo 7.26 na následující straně můžeme s přidavkem NaCl pozorovat růst intensity maxima při ~ 695 nm. Spektra jsou vertikálně posunuta, takže ke zvýraznění informace bylo nutno použít postupu normalizaci spekter (obr. vpravo 7.26 na následující straně).

Obnovení pásu přidavkem chloristanu sodného je patrné z obr. vpravo 7.27 na straně 63. Výrazněji je tento jev zřejmý z normalizovaných spekter. Růst intensity pro tři nejnižší koncentrace není patrný, až dalším zvýšením dojde k obnovení pásu.

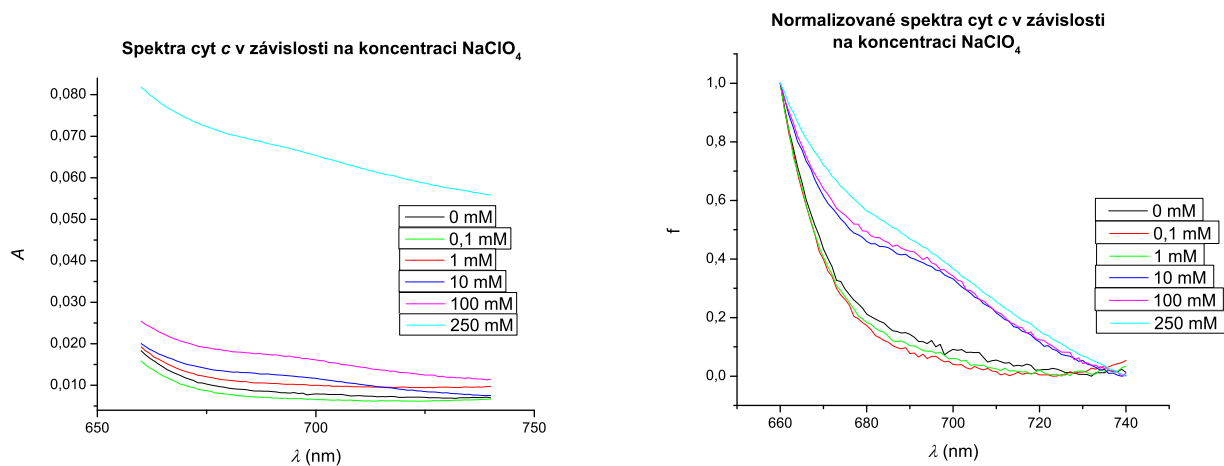
Po přidavku síranu sodného dojde k pozvolnému růstu intensity pásu (viz obr. 7.28),



Obrázek 7.25: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 450-650 nm pro jednotlivé koncentrace Na₂SO₄ – Q pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)

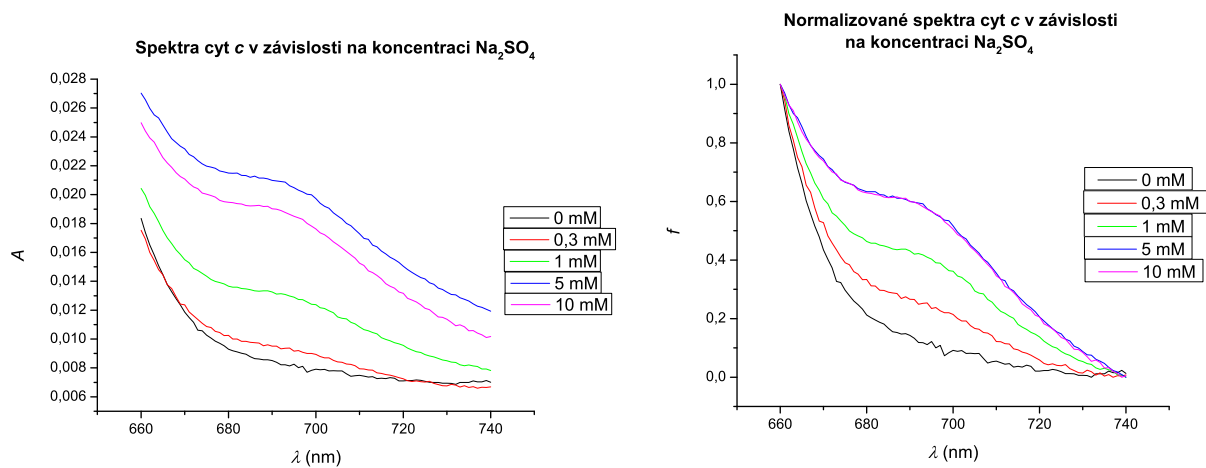


Obrázek 7.26: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 650-750 nm pro jednotlivé koncentrace NaCl – CT pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)



Obrázek 7.27: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 650-750 nm pro jednotlivé koncentrace NaClO₄ – CT pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)

kde jsou vidět původní i normalizovaná spektra ve zkoumané oblasti.



Obrázek 7.28: Absorpční spektra cyt *c* v oblasti vlnových délek 650-750 nm pro jednotlivé koncentrace Na₂SO₄ – CT pás (10 mM fosfátový pufr pH 2,10, koncentrace cyt *c* = 0,5 mg/ml)

Kapitola 8

Diskuse

Pro cyt *c* ve své nativní konformaci se železitým iontem v nízkospinové konfiguraci t_{2g}^5 je charakteristické maximum intensity absorpce pro Soretův pás při 408 nm. V oblasti Q pásu se nachází výrazné maximum při 527 nm (β -pás) a někdy i nevýrazné bočné ramínko kolem 550-560 nm (α -pás) odpovídající přítomnosti malého množství redukované formy cyt *c* [49]. Soretův i Q pás vznikají elektronovými přechody mezi trojicí hraničních orbitalů [61]. Dle literatury se snížením pH pod hodnotu 2,50 indukují konformační změny v cytochromu *c*. Informace, které jsou známy jsou zatím malého rozlišení, ale má se za to, že se jedná o denaturaci – i když efekt silných anorganických kyselin je poněkud jiný než denaturace močovinou nebo GdmCl [50]. Pod pH 2,50 dochází k disociaci vazeb axiálních ligandů cyt *c* a nahrazují je jiné ligandy a roste podíl centrálního kovu ve vysokospinové konfiguraci $t_{2g}^3 e_g^2$ [49]. V UV-VIS dojde k modrému posunu Soretova pásu k hodnotě 395 nm a β -pásu k hodnotě 500 nm. V oblasti Q pásu se objeví nové maximum při 625 nm [77, 49]. Moje měření ve fosfátovém pufru pH 2,10 bez přídavku anorganických solí s literaturou souhlasí – Soretův pás má maximum při 395 nm a v oblasti Q pásu jsou dvě maxima. Postupné zvyšování koncentrace anorganických solí vede k červenému posunu Soretova pásu k hodnotě 401 nm. V derivačních spektrech lze vidět nárůst intensity bočního ramínka při 410 nm (vysokospinová konfigurace) a pokles intensity píku při 395-397 nm (nízkospinová konfigurace).

Koordinace železitého kationtu pěti silnými (dusík) a jedním slabým ligandem (síra) ze spektrochemické řady, tvoří v nativním stavu nízkospinový komplex. Z grafů cho-

vání CT pásů (obr. 7.26 na straně 62, 7.27 na straně 63 a 7.28 na straně 64), který je specifický pro koordinaci Met-80, lze vyčíst absenci koordinace tohoto ligandu při pH 2,10 a 0 M koncentraci kterékoliv ze solí. Zvýšení jejich koncentrace vede k obnovení koordinace Met-80 na železitý kationt v cyt *c*. Logicky by sme mohli vyvodit, že Met-80 má zásadní efekt na spinovou konfiguraci centrálního kovu. Problém v této zdánlivě snadné úvaze tkví v tom, že methionin je jen slabý ligand a nelze čekat, že jeho nahrazení jiným slabým ligandem (vodou nebo OH^-) výrazně změní štěpení *d* orbitalů centrálního kovu. Pokud budeme uvažovat o disociaci koordinační vazby His-18 a jeho nahrazení slabším ligandem, pak dva slabé a jen čtyři silné ligandy nemusí štěpit krystalové pole dostatečně Fe^{III} přejde do vysokospinového uspořádání, s charakteristickým maximem při 395 nm. Literatura se neshoduje jaký jiný ligand nahradí axiální His-18 a Met-80 – dvě molekuly vody, vznik pentakoordinovaných vysokospinových komplexů s jednou molekulou vody nebo hydroxydovým aniontem na místě Met-80, nebo jiný zbytek His. To je pravděpodobné ligandové okolí železitého kationtu při pH 2,10 [49]. Jiné alternativní vysvětlení je možné za předpokladu, že místo axiálního ligandu uvolněné disociací Met-80 zůstane neobsazeno. Naznačené možnosti nelze z mých experimentů rozlišit a je pravděpodobné, že na vysokospinové konfiguraci se podílí několik různě koordinovaných komplexů Fe^{III} .

Absorpční spektrum aromatických aminokyselin obsahuje množství informací, které se ale překrývají v jeden široký absorpční pás. Analýza tohto pásu a malých změn v lokálním prostředí chromoforů bez pomocných technik je obtížná, ne-li nemožná. Pro zvýraznění informací jsem proto použil techniku druhých derivací spekter. Zajímají nás v nich lokální minima, které ve spektrech odpovídají elektronovým přechodům.

V oblasti 250-265 nm najdeme píky fenylalaninu, v oblasti 270 až 295 nm absorbují tryptofan a tyrosin. Koňský cyt *c* obsahuje jeden tryptofan a čtyři fenylalaniny a tyrosiny. Trp-59 se nachází uvnitř kapsy s prosthetickou skupinou a tvoří vodíkovou vazbu s propionátovou skupinou hemu. V literatuře lze najít informaci, že absorpční pás ležící při 289-290 nm patří Trp-59 [78]. V derivačních spektrech, které jsem naměřil, můžu tryptofanu přisoudit minimum při 290 nm. Jeho poloha se jemně posune k 291 nm, a to u všech solí (viz tab. 7.1 na straně 47, 7.2 na straně 49 a 7.3 na straně 50). Větší změny jsou patrné v intenzitě absorpce (viz výnos parametru D_S na obr. 7.8 na straně 52, 7.9 na straně 53 a 7.10 na straně 53). Autoři další studie zjistili, že u volného tryptofanu

snížení polaroty prostředí (dielektrické konstanty rozpouštědla) vede k zvýšení hodnoty D_S . Tento jev pozoruju i já po přidavku sole a můžu konstatovat, že to vede ke změně v okolí Trp-59 – jeho zanoření do nepolárního prostředí.

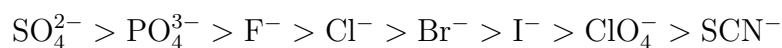
Tyrosin se projevuje absorpčními píky, při 282-287 nm a 274-279 nm. Dle studie nejen parametr D_S , ale i maximum absorpce (na rozdíl od tryptofanu) silně koreluje s vlastnostmi prostředí. Svoji roli hrá jak polarita, tak vodíkové vazby s rozpouštědlem. Modrý posun se pozoruje, když je hydroxylová skupina Tyr akceptorem vodíkové vazby. Naopak, červený posun značí donaci vodíkové vazby [79]. Snížení polaroty rozpouštědla vede ke snížení hodnoty D_S [80]. Z grafů 7.11 na straně 54, 7.12 na straně 54 a 7.13 na straně 55 vyplývá, že zvýšení koncentrace všech solí vede ke snížení průměrné polaroty prostředí v bezprostředním okolí tyrosinů.

Další aminokyselina výrazně absorbující ve spektrech je fenylalanin. Ve spektrech volného Phe, i vázaného v bílkovině, lze najít až 6 absorpčních pásů. Avšak dva pásy fenylalaninu vázaného v bílkovině v oblasti mezi 260-270 nm již začínají interferovat s píkem pro tyrosin. Významné je zvýšení intensity pásů v nepolárních rozpouštědlech a červeným posunem [79]. Výsledky, které jsem získal analýzou mojich dat si protiřecí. Dle grafů je vidět jemný červený posun, ale také snížení hodnoty parametru D_S . Je nutno podotknout (a to platí obecně), že rozlišení přístroje (1 nm) mi neumožňuje změřit posuny přesněji. Omezím se zde proto jen na konstatování, že jisté změny nastávají i v okolí fenylalaninů. Vzhledem k tomu, že cyt c obsahuje víc jak jeden zbytek Phe a Tyr, se příspěvky jednotlivých aminokyselin stejného typu rozlišit nedají.

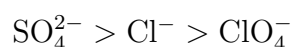
Kvalitativní efekt anorganických solí je na cyt c stejný, liší se zejména efektivní koncentrací nutné k dosažení konformačních změn. K pochopení problému si je potřeba uvědomit, že při tak nízkém pH (2,10) jsou všechny disociovatelné postranní skupiny aminokyselin protonizovány. Za předpokladu, že elektrostatické repulze kladných nábojů postranních skupin jsou hlavní důvod vedoucí k destabilizaci struktury molekuly, dle Gota anionty mohou mít anionty stabilizující účinek pomocí [50]:

1. Debye-Hückelovho stínícího efektu;
2. tvorby iontových párů s kladně nabitými postrannými řetězci aminokyselin;
3. ovlivňování struktury vody a tím nepřímo i interakce vody s proteinem.

Debye-Hückelův stínění přispívá dle studie zanedbatelně, protože pak by měli mít anionty stejný efekt nezávisle na jejich povaze – záviselo by to pak hlavně na iontové síle roztoku. Stabilizační efekt aniontů na proteiny v neutrálních pH podmínkách kopíruje Hofmeisterovu řadu:



Anionty vlevo od chloridového mají poměrně velkou povrchovou hustotu náboje a nazývají se kosmotropní. Na proteiny mají stabilizační účinek. Vpravo od chloridu jsou chaotropní anionty s destabilizačním účinkem. Přesný mechanismus působení není jasný, ale anionty jako také silně interagují s molekulami vody a ovlivňují její strukturu. Svoji roli sehrává i velikost náboje (narozdíl od kationtů) [50]. Pokud by byl hlavním důvodem mnou pozorovaných změn – zanoření Tyr a Trp do nepolárního prostředí, vznik koordinační vazby Fe^{III} -Met-80, změna do nativní spinové konfigurace Fe^{III} – výše zmíněné ovlivnění struktury vody, efekt aniontů by se měl být v souladu s touto řadou [50]:



Dle Gota jsou ale hlavním efektem Coulombické interakce mezi anionty a kladně nabitými skupiny důvodem stabilizačního efektu na cyt *c* v kyselém prostředí [50]. Větší efekt má divalentní síranový aniont než monovalentní chloridový a chloristanový. V případě aniontů se stejným nábojem pak rozhoduje nižší hydratační poloměr a ten mají menší chaotropní ionty:



S touto řadou se stotožňují i některé moje výsledky. Například největší změny v oblasti Soretova pásu lze pozorovat (viz sekce 7.1.2 na straně 52):

- pro NaCl mezi koncentracemi 10 a 100 mM;
- pro NaClO₄ mezi koncentracemi 1 a 10 mM;
- pro Na₂SO₄ mezi koncentracemi 1 a 5 mM.

Kapitola 9

Souhrn

1. V této práci jsem změřil absorpční spektra cyt *c* z mitochondrií koňského srdečního svalu v rozmezí vlnových délek 190 až 1100 nm v roztocích s přísávkem NaCl, NaClO₄ a Na₂SO₄. Sole pro experiment i pufráční roztok byly vybrány tak, aby obsahovali společný kationt;
2. Zkoumal jsem chování spekter v oblasti absorpce aromatických aminokyselin (250-300 nm), Soretova pásu (kolem 400 nm), Q pásu (480-640 nm) a CT pásu (slabý pík při 695 nm);
3. Pro lepší rozpoznání detailů jsem použil techniku druhé derivace spektra nebo normalizaci spekter (jen u slabého CT pásu);
4. Hyperchromní posun maxima Soretova pásu od 395 nm k 401 nm, změny v Q pásu a obnovení CT píku naznačují jisté konformační změny cyt *c*.
5. Vzhledem ke zvoleným koncentracím je patrné, že efekt solí není stejný a stoupá přibližně v pořadí:



Literatura

- [1] Baldwin, R. L. (2005) *Protein folding handbook.*, ed. J. Buchner, T. K. (Wiley-VCH), pp. 1–21.
- [2] Anson, M. L & Mirsky, A. E. (1925) On some general properties of proteins. *J. Gen. Physiol.* **9**, 169–179.
- [3] Wu, H. (1931) Studies on denaturation of proteins. xiii. a theory of denaturation. *Chin. J. Physiol.* **5**, 321–344.
- [4] Pauling, L & Corey, R. B. (1951) The pleated sheet, a new layer configuration of polypeptide chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37**, 251–256.
- [5] Pauling, L, Corey, R. B, & Branson, H. R. (1951) The structure of proteins; two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **37**, 205–211.
- [6] Kendrew, J. C, Bodo, G, Dintzis, H. M, Parrish, R. G, Wyckoff, H, & Phillips, D. C. (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature (London, U. K.)* **181**, 662–666.
- [7] Perutz, M. F, Rossmann, M. G, Cullis, A. F, Muirhead, H, Will, G, & North, A. C. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional fourier synthesis at 5.5- \AA resolution, obtained by x-ray analysis. *Nature (London, U. K.)* **185**, 416–422.
- [8] Dill, K. A. (1999) Polymer principles and protein folding. *Protein Sci.* **8**, 1166–1180.

- [9] Anfinsen, C. B, Haber, E, Sela, M, & White, Jr, F. H. (1961) The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **47**, 1309–1314.
- [10] Anfinsen, C. B. (1973) Principles that govern the folding of protein chains. *Science (Washington, DC, U. S.)* **181**, 223–230.
- [11] Harrington, W. F & Schellman, J. A. (1956) Evidence for the instability of hydrogen-bonded peptide structures in water, based on studies of ribonuclease and oxidized ribonuclease. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg, Ser. Chim.* **30**, 21–43.
- [12] Brandts, J. F. (1965) The nature of the complexities in the ribonuclease conformational transition and the implications regarding clathrating. *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 2759–2760.
- [13] Tanford, C. (1968) *Advances in Protein Chemistry*, eds. Anfinsen, C, Anson, M, Edsall, J. T, & Richards, F. M. (Elsevier) Vol. 23, pp. 121–282.
- [14] Levinthal, C. (1968) Are there pathways for protein folding? *Extrait du Journal de Chimie Physique* **65**, 44–45.
- [15] Zwanzig, R, Szabo, A, & Bagchi, B. (1992) Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 20–22.
- [16] Sohl, J. L, Jaswal, S. S, & Agard, D. A. (1998) Unfolded conformations of alpha-lytic protease are more stable than its native state. *Nature (London, U. K.)* **395**, 817–819.
- [17] Karplus, M & Weaver, D. L. (1976) Protein-folding dynamics. *Nature (London, U. K.)* **260**, 404–406.
- [18] Ptitsyn, O. B & Rashin, A. A. (1975) A model of myoglobin self-organization. *Biophys. Chem.* **3**, 1–20.
- [19] Wetlaufer, D. B. (1973) Nucleation, rapid folding, and globular intrachain regions in proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 697–701.

- [20] Zimm, B. H & Bragg, J. (1959) Theory of the phase transition between helix and random coil in polypeptide chains. *J. Chem. Phys.* **31**, 526.
- [21] Daggett, V & Fersht, A. R. (2003) Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem Sci* **28**, 18–25.
- [22] Ikai, A & Tanford, C. (1971) Kinetic evidence for incorrectly folded intermediate states in the refolding of denatured proteins. *Nature (London, U. K.)* **230**, 100–102.
- [23] Tsong, T. Y, Baldwin, R. L, & Elson, E. L. (1971) The sequential unfolding of ribonuclease a: detection of a fast initial phase in the kinetics of unfolding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 2712–2715.
- [24] Hagerman, P. J & Baldwin, R. L. (1976) A quantitative treatment of the kinetics of the folding transition of ribonuclease a. *Biochemistry* **15**, 1462–1473.
- [25] Garel, J. R & Baldwin, R. L. (1973) Both the fast and slow refolding reactions of ribonuclease a yield native enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3347–3351.
- [26] Brandts, J. F, Halvorson, H. R, & Brennan, M. (1975) Consideration of the possibility that the slow step in protein denaturation reactions is due to cis-trans isomerism of proline residues. *Biochemistry* **14**, 4953–4963.
- [27] Dolgikh, D. A, Gilmanshin, R. I, Brazhnikov, E. V, Bychkova, V. E, Semisotnov, G. V, Venyaminov SYu, & Ptitsyn, O. B. (1981) Alpha-lactalbumin: compact state with fluctuating tertiary structure? *FEBS Lett.* **136**, 311–315.
- [28] Ohgushi, M & Wada, A. (1983) Molten-globule state: a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* **164**, 21–24.
- [29] Švec, M & Vondrášek, J. (2004) Sbalování proteinů: Stav problematiky na konci tisíciletí. *Chem. Listy* **94**, 494–500.
- [30] Prusiner, S. B. (1982) Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (Washington, DC, U. S.)* **216**, 136–144.

- [31] Cohen, F. E, Pan, K. M, Huang, Z, Baldwin, M, Fletterick, R. J, & Prusiner, S. B. (1994) Structural clues to prion replication. *Science (Washington, DC, U. S.)* **264**, 530–531.
- [32] Ellis, J. (1987) Proteins as molecular chaperones. *Nature (London, U. K.)* **328**, 378–379.
- [33] Ellis, R. J. (1996) Discovery of molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones* **1**, 155–160.
- [34] Pauwels, K, Van Molle, I, Tommassen, J, & Van Gelder, P. (2007) Chaperoning anfinen: the steric foldases. *Mol. Microbiol.* **64**, 917–922.
- [35] Kimchi-Sarfaty, C, Oh, J. M, Kim, I.-W, Sauna, Z. E, Calcagno, A. M, Ambudkar, S. V, & Gottesman, M. M. (2007) A "silent" polymorphism in the *mdr1* gene changes substrate specificity. *Science (Washington, DC, U. S.)* **315**, 525–528.
- [36] Newman, S. A & Bhat, R. (2007) Genes and proteins: dogmas in decline. *J. Biosci. (New Delhi, India)* **32**, 1041–1043.
- [37] Bertini, I, Cavallaro, G, & Rosato, A. (2006) Cytochrome c: occurrence and functions. *Chem. Rev. (Washington, DC, U. S.)* **106**, 90–115.
- [38] Ambler, R. P. (1991) Sequence variability in bacterial cytochromes c. *Biochim. Biophys. Acta* **1058**, 42–47.
- [39] Lo Conte, L, Ailey, B, Hubbard, T. J, Brenner, S. E, Murzin, A. G, & Chothia, C. (2000) Scop: a structural classification of proteins database. *Nucleic Acids Res.* **28**, 257–259.
- [40] Bushnell, G. W, Louie, G. V, & Brayer, G. D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* **214**, 585–595.
- [41] Jori, G, Gennari, G, Galiazzo, G, & Scoffone, E. (1970) Photo-oxidation of horse heart cytochrome c. evidence for methionine-80 as a heme ligand. *FEBS Lett.* **6**, 267–269.

- [42] Margoliash, E. (1963) Primary structure and evolution of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **50**, 672–679.
- [43] Ptitsyn, O. B. (1998) Protein folding and protein evolution: common folding nucleus in different subfamilies of c-type cytochromes? *J. Mol. Biol.* **278**, 655–666.
- [44] Liu, X, Kim, C. N, Yang, J, Jemmerson, R, & Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for datp and cytochrome c. *Cell* **86**, 147–157.
- [45] Skulachev, V. P. (1998) Cytochrome c in the apoptotic and antioxidant cascades. *FEBS Lett.* **423**, 275–280.
- [46] Volkov, A. N, Nicholls, P, & Worrall, J. A. R. (2011) The complex of cytochrome c and cytochrome c peroxidase: the end of the road? *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1482–1503.
- [47] Berg, J. M, Tymoczko, J. L, & Stryer, L. (2007) *Biochemistry*. (W.H. Freeman), 6. edition, p. 520.
- [48] Theorell, H & Åkesson, Å. (1941) Studies on cytochrome c. ii. the optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives. *Journal of the American Chemical Society* **63**, 1812–1818.
- [49] Stupák, M, Bágel'ová, J, Fedunová, D, & Antalík, M. (2006) Conformational transitions of ferricytochrome c in strong inorganic acids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **71**, 1627–1641.
- [50] Goto, Y, Takahashi, N, & Fink, A. L. (1990) Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **29**, 3480–3488.
- [51] Jordan, T, Eads, J. C, & Spiro, T. G. (1995) Secondary and tertiary structure of the a-state of cytochrome c from resonance raman spectroscopy. *Protein Sci.* **4**, 716–728.

- [52] Jeng, M. F, Englander, S. W, Elöve, G. A, Wand, A. J, & Roder, H. (1990) Structural description of acid-denatured cytochrome c by hydrogen exchange and 2d nmr. *Biochemistry* **29**, 10433–10437.
- [53] Fisher, W. R, Taniuchi, H, & Anfinsen, C. B. (1973) On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **248**, 3188–3195.
- [54] Hoang, L, Maity, H, Krishna, M. M. G, Lin, Y, & Englander, S. W. (2003) Folding units govern the cytochrome c alkaline transition. *J. Mol. Biol.* **331**, 37–43.
- [55] Belikova, N. A, Vladimirov, Y. A, Osipov, A. N, Kapralov, A. A, Tyurin, V. A, Potapovich, M. V, Basova, L. V, Peterson, J, Kurnikov, I. V, & Kagan, V. E. (2006) Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **45**, 4998–5009.
- [56] Oellerich, S, Wackerbarth, H, & Hildebrandt, P. (2002) Spectroscopic characterization of nonnative conformational states of cytochrome c. *J. Phys. Chem. B* **106**, 6566–6580.
- [57] Sinibaldi, F, Mei, G, Polticelli, F, Piro, M. C, Howes, B. D, Smulevich, G, Santucci, R, Ascoli, F, & Fiorucci, L. (2009) Atp specifically drives refolding of non-native conformations of cytochrome c. *Protein Sci.* **14**, 1049–1058.
- [58] Letellier, L & Shechter, E. (1973) Correlations between structure and spectroscopic properties in membrane model system. fluorescence and circular dichroism of the cytochrome c-cardiolipin system. *Eur. J. Biochem.* **40**, 507–512.
- [59] Tuominen, E. K. J, Wallace, C. J. A, & Kinnunen, P. K. J. (2002) Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J. Biol. Chem.* **277**, 8822–8826.
- [60] Antalík, M, Bágel'ová, J, Gazová, Z, Musatov, A, & Fedunová, D. (2003) Effect of varying polyglutamate chain length on the structure and stability of ferricytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* **1646**, 11–20.
- [61] Gouterman, M. (1961) Spectra of porphyrins. *J. Mol. Spectrosc.* **6**, 138–163.

- [62] Gouterman, M. (1978) *The Porphyrins, Vol.3: Physical Chemistry, Part A*, ed. Dolphin, D. (Academic Press), pp. 1–166.
- [63] Gurinovich, G, Sevchenko, A, & Solov'ev, K. N. (1963) The spectroscopy of the porphyrins. *Phys.-Usp.* **6**, 67–105.
- [64] Pullman, B, Spanjaard, C, & Berthier, G. (1960) Features of the electronic structure of the iron-porphyrin complexes with special reference to the oxidoreductive properties of cytochromes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **46**, 1011–1020.
- [65] McKnight, J, Cheesman, M. R, Thomson, A. J, Miles, J. S, & Munro, A. W. (1993) Identification of charge-transfer transitions in the optical spectrum of low-spin ferric cytochrome p-450 bacillus megaterium. *Eur. J. Biochem.* **213**, 683–687.
- [66] Gadsby, P. M & Thomson, A. J. (1990) Assignment of the axial ligands of ferric ion in low-spin hemoproteins by near-infrared magnetic circular dichroism and electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 5003–5011.
- [67] Feynman, R. P, Leighton, R. B, & Sands, M. (2001) *Feynmanovy přednášky z fyziky s řešenými příklady 2/3*. (Fragment), 1. edition.
- [68] Atkins, P & de Paula, J. (2006) *Physical Chemistry*. (W. H. Freeman), 8. edition.
- [69] van Holde, K. E, Johnson, C, & Ho, P. S. (2005) *Principles of Physical Biochemistry*. (Pearson Education), 2. edition.
- [70] Bureš, M. (1986) *Chemická fyzika*. (SNTL), 1. edition.
- [71] Prosser, V. (1989) *Experimentální metody biofyziky*. (Academia), 1. edition.
- [72] Kodíček, M & Karpenko, V. (2000) *Biofyzikální chemie*. (Academia), 2. edition.
- [73] Donovan, J. W. (1969) *Physical principles and techniques of protein chemistry*, ed. Leach, S. J. (Academic Press), pp. 102–167.
- [74] Brady, D. J. (2009) *Optical Imaging and Spectroscopy*. (John Wiley & Sons), 1. edition.

- [75] Savitzky, A & Golay, M. J. (1964) Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem. (Washington, DC, U. S.)* **36**, 1627–1639.
- [76] Babul, J & Stellwagen, E. (1972) Participation of the protein ligands in the folding of cytochrome c. *Biochemistry* **11**, 1195–1200.
- [77] Goto, Y, Calciano, L. J, & Fink, A. L. (1990) Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 573–577.
- [78] Dunach, M, Sabés, M, & Padrós, E. (1983) Fourth-derivative spectrophotometry analysis of tryptophan environment in proteins. application to melittin, cytochrome c and bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **134**, 123–128.
- [79] Padrós, E, Morros, A, Manosa, J, & Dunach, M. (1982) The state of tyrosine and phenylalanine residues in proteins analyzed by fourth-derivative spectrophotometry. histone h1 and ribonuclease a. *Eur J Biochem* **127**, 117–122.
- [80] Lange, R & Balny, C. (2002) Uv-visible derivative spectroscopy under high pressure. *Biochim. Biophys. Acta* **1595**, 80–93.

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

Jméno a příjmení (s adresou)	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka