

Univerzita Karlova v Praze  
Matematicko-fyzikální fakulta

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**



Martina Pultarová

### **Modelování komplexních křivek dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence proteinů**

Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Studijní program: fyzika

Studijní obor: obecná fyzika

Praha 2016

## Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce, Doc. RNDr. Jaroslavu Večeřovi, CSc., za jeho vstřícnost, ochotu a trpělivost při vedení mé práce.

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

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

V Praze dne 26. 5. 2016

Martina Pultarová

Název práce: Modelování komplexních křivek dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence proteinů

Autor: Martina Pultarová

Katedra: Fyzikální ústav Univerzity Karlovy

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Abstrakt: Tato práce se zabývá simulací křivek dohasínání anizotropie tryptofanové fluorescence modelového systému proteinů, v němž protein  $P_1$  s jedním tryptofanem interaguje s regulačním proteinem  $P_2$  bez tryptofanu za vzniku komplexu  $P_1P_2$  při současné změně doby života tryptofanové fluorescence komplexu. Za takových podmínek vykazuje heterogenní směs proteinů  $P_1$  a  $P_1P_2$  v roztoku neexponenciální dohasínání anizotropie fluorescence, jak plyne z rovnic uvedených v práci. Analytické simulace takových křivek jak bez šumu, tak i s Poissonovým šumem představují hlavní výsledky této práce. Výsledky výpočtů potvrzují, že analýza křivek heterogenních systémů se šumem pomocí počítačových programů odvozených pro homogenní systémy poskytuje správné doby života fluorescence, nevede však ke správným parametrům anizotropie fluorescence. Důležitým výsledkem této práce jsou také simulace křivek dohasínání anizotropie fluorescence proteinu  $P_1$  nebo komplexu  $P_1P_2$ . Přes vysoké intenzity nasimulovaných dat jsou v důsledku krátké doby života fluorescence tryptofanu výsledné křivky dohasínání anizotropie silně zašuměné a dají se použít jen v relativně krátkém časovém intervalu.

Klíčová slova: modelování, tryptofan, fluorescence, anizotropie, doba života

Title: Study of associated anisotropy decay curves of tryptophan fluorescence of proteins

Author: Martina Pultarová

Department: Institute of Physics of the Charles University

Supervisor: Doc. RNDr. Jaroslav Večeř, CSc.

Abstract: This work focuses on simulation of anisotropy decay curves of a model system where protein  $P_1$  with one tryptophan interacts with regulating protein  $P_2$  without tryptophan to form a complex  $P_1P_2$  with simultaneous change of tryptophan fluorescence lifetime of the complex. Under these conditions, the heterogeneous solution of proteins  $P_1$  and  $P_1P_2$  exhibits non-exponential fluorescence anisotropy decay which is deduced also from equations presented in this work. Such curves analytically simulated with and without Poisson noise are the main results of this work. The heterogeneous curves were analyzed using computer programs developed earlier for homogeneous systems. As expected such analysis yields correct values of fluorescence lifetimes but does not recover anisotropy parameters used in simulations. Despite of high intensities of simulated data, anisotropy decay curves of homogeneous solutions are very noisy and can be used only on a relatively short time interval of their decay.

Keywords: modelling, tryptophan, fluorescence, anisotropy, lifetime

# Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>1. Základy měření křivek dohasínání fluorescence</b> .....	<b>3</b>
1.1. Dohasínání fluorescence homogenních systémů.....	3
1.2. Anizotropie fluorescence heterogenních systémů .....	5
1.3. Analytické simulace křivek dohasínání fluorescence.....	5
<b>2. Modelování křivek dohasínání fluorescence</b> .....	<b>8</b>
2.1. Volba modelového systému .....	8
2.2. Výsledky a diskuze.....	10
<b>Závěr</b> .....	<b>16</b>
<b>Seznam použité literatury</b> .....	<b>17</b>
<b>Přílohy</b> .....	<b>18</b>

## Úvod

Metody časově rozlišené fluorescenční spektroskopie umožňují měření kinetických charakteristik fluoroforů v nanosekundové časové škále. Jejich pomocí dokážeme určit jak doby života fluoroforů v excitovaném stavu, tak i monitorovat jejich pohyb v roztoku. Bez znalostí zákonitostí emise fluoroforů v roztoku není jednoduché od sebe separovat informaci týkající se rychlostních konstant excitovaných stavů molekul od vlastností souvisejících s jejich pohybem. V důsledku fotoselekce dochází totiž k navození úhlové anizotropie v rozdělení fluorescenčních emisních dipólů a tato anizotropie se obecně projeví v měřených časových závislostech dohasínání fluorescence. K tomu, abychom uvedené jevy od sebe oddělili, je třeba použít speciální geometrii fluorescenčního experimentu.

Obvykle používané schéma měření je znázorněno na obr. 1. V pravoúhlém experimentálním uspořádání s vertikální polarizací excitačního záření je třeba měřit intenzitu fluorescence vzorku polarizovanou shodně s excitací  $i_v(t)$ , označovanou jako vertikální nebo rovnoběžná, a složku kolmou ke směru polarizace excitace  $i_h(t)$  označovanou též jako horizontální.

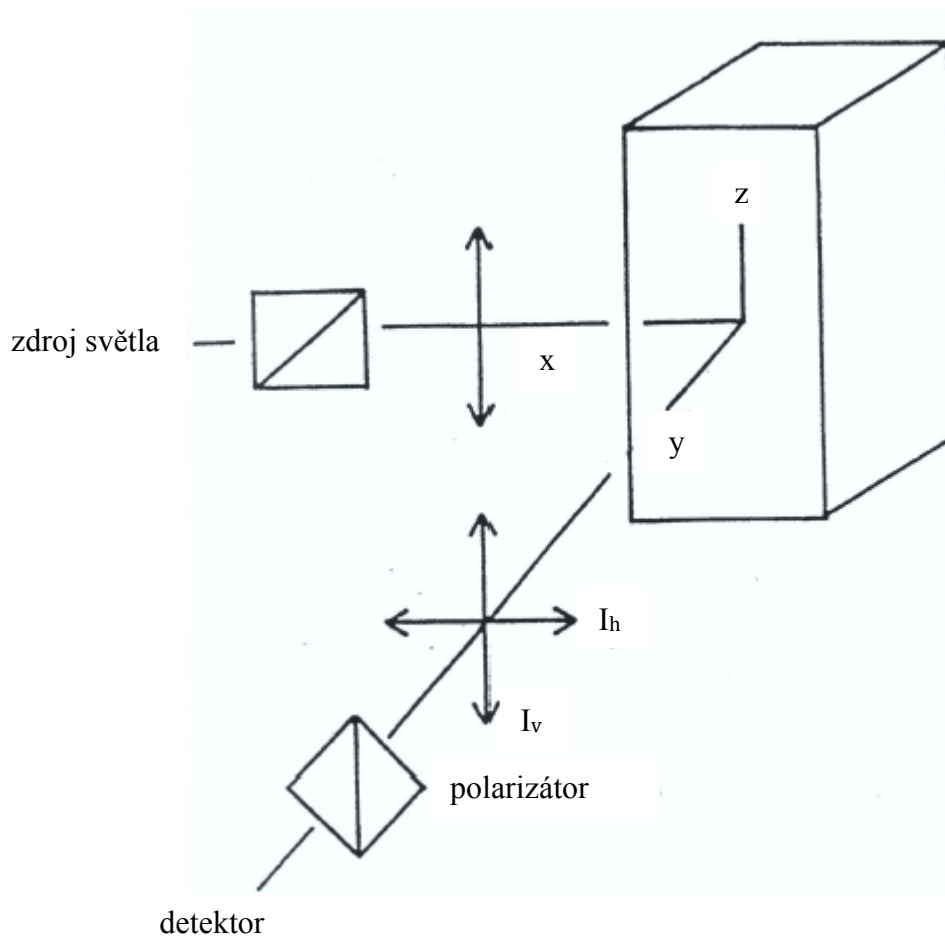
Je možné ukázat, že intenzita  $i(t)$  charakterizující chování excitovaného stavu fluoroforu bez vlivu fotoselekce při excitaci nekonečně krátkým světelným pulsem lze spočítat jako

$$i(t) = i_v(t) + 2i_h(t) \quad (1)$$

Zajímají-li nás pouze doby života excitovaných stavů fluoroforu, můžeme dohasínání intenzity fluorescence vzorku  $i_m(t)$  měřit přímo, nastavíme-li analyzující polarizátor pod tzv. magickým úhlem splňujícím podmínku  $\text{tg}^2\theta_m = 2$ , neboli  $\theta_m = 54.7^\circ$ . V takovém případě jsou totiž kolmá a rovnoběžná složka detekovány v poměru 2:1 a tím je splněna podmínka daná vztahem (1).

Chceme-li naopak v dohasínání fluorescence sledovat pouze pohyby fluoroforů neovlivněné vlastnostmi jejich excitovaného stavu, musíme zkonstruovat tzv. anizotropii fluorescence  $r(t)$  podle vztahu

$$r(t) = \frac{i_v(t) - i_h(t)}{i_v(t) + 2i_h(t)} \quad (2)$$



Obr. 1. Schéma měření anizotropie fluorescence

# 1. Základy měření křivek dohasínání fluorescence

## 1.1. Dohasínání fluorescence homogenních systémů

Ze vztahů (1) a (2) je možno vyjádřit složky  $i_h(t)$  a  $i_v(t)$  pomocí veličin  $i(t)$  a  $r(t)$  jako

$$i_v(t) = \frac{1}{3}i(t)[1 + 2r(t)], \quad i_h(t) = \frac{1}{3}i(t)[1 - r(t)] \quad (3)$$

Časové dohasínání intenzity fluorescence  $i(t)$  homogenních systémů je potom možno fitovat exponenciální sadou s dobami života  $\tau_i$  a předexponenciálními faktory  $\alpha_i$ ,  $i = 1, 2, \dots, n$

$$i(t) = \sum_{i=1}^n \alpha_i \exp(-t/\tau_i) \quad (4)$$

a dohasínání anizotropie fluorescence exponenciální sadou s rotačně korelačními časy  $\theta_j$  a koeficienty  $\beta_j$ ,  $j = 1, 2, \dots, m$

$$r(t) = \sum_{j=1}^m \beta_j \exp(-t/\theta_j) \quad (5)$$

Vztahy (1) - (3) jsou platné pouze tehdy, je-li vzorek excitován v nekonečně krátkém časovém okamžiku. V reálném experimentu mají všechny excitační světelné pulsy konečnou šířku a experiment je navíc ovlivněn použitou detekční elektronikou - mluvíme o tzv. přístrojové funkci  $g(t)$ . V takovém případě má experimentálně naměřené dohasínání intenzity fluorescence tvar daný konvolucí funkcí  $g(t)$  a  $i(t)$

$$f(t) = g(t) * i(t) = \int_0^t g(x) i(t-x) dx \quad (6)$$

Ve fluorescenčním experimentu získáváme informaci o křivce dohasínání intenzity fluorescence  $f(t)$  a tvaru přístrojové funkce  $g(t)$  a úkolem analýzy dat je nalézt odezvu vzorku na  $\delta$ -funkci označenou  $i(t)$  s jejími parametry  $\alpha_j$ ,  $\tau_j$ ,  $j = 1, 2, \dots, n$ . Pro



měření fluorescenční odezvy vzorku  $f(t)$  a přístrojové funkce  $g(t)$  se téměř výhradně používá metoda časově korelovaného čítání fotonů. Interval časové osy, na němž fluorescenci po excitaci světelným impulsem sledujeme, se rozdělí na zvolený počet intervalů šířky  $h$  (typicky  $N_D = 1024$ , ale často i více) a detekční elektronika registruje časovou statistiku vyletujících fluorescenčních fotonů po opakované pulzní excitaci tak, že zaznamenává ve zvolených intervalech (kanálech) integrální hodnoty počtu fotonů

$$F_i = \int_{(i-1)h}^{ih} f(t) dt, \quad G_i = \int_{(i-1)h}^{ih} g(t) dt \quad \text{pro } i = 1, 2, \dots, N_D \quad (7)$$

Pro analýzu dat jsou tedy k dispozici dvě sady diskretních hodnot  $\{F_i\}$  a  $\{G_i\}$  o dimenzi  $N_D$  a spojitá funkce  $i(t)$ , jejíž parametry  $\alpha_j, \tau_j, j = 1, 2, \dots, n$  hledáme. Sada hodnot  $F$  odpovídá intenzitám  $I_m, I_v$ , nebo  $I_h$ , podle toho, použijeme-li v konvolučním integrálu (6) příslušné odezvy na excitaci  $\delta$ -funkcí  $i_m(t), i_v(t)$  nebo  $i_h(t)$  podle rovnic (3), (4). Problém je obvykle řešen fitováním experimentálních dat pomocí minimalizace nejmenších čtverců tzv. Marquardtovou metodou. Abychom určili odezvu našeho systému na  $\delta$ -funkci, je třeba z integrálních hodnot  $\{G_i\}$  určit funkci  $g(t)$  [1] a podle vztahu (6) provést její konvoluci s očekávaným tvarem funkce  $i(t)$ . Získáme tak funkci  $f_c(t)$ , pro niž musíme spočítat její integrály na zvolených časových intervalech  $\{F_{ci}\}$  a po minimalizaci získané hodnoty  $\chi^2$  porovnat se sadou změřených diskretních hodnot  $\{F_i\}$ . Jestliže po minimalizaci  $\chi^2$  není kvalita fitu dostatečně dobrá, je přidána další exponenta až po dosažení vyhovujícího fitu. Ten je potom hledaným řešením pro  $i(t)$ . Kritériem statistické shody souborů  $\{F_i\}$  a  $\{F_{ci}\}$  je hodnota tzv.  $\chi^2$  definovaného vztahem

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{N_D} (F_{ci} - F_i)^2 / \sigma_i^2 \quad (8)$$

kde  $\sigma_i$  je standardní odchylka měřených dat,  $\sigma_i^2 = F_i$ . Pro správný fit platí  $\chi^2 \approx N_D$  a tzv. redukovaný  $\chi^2$  (*red  $\chi^2$* ) je blízký jedné [2].

## 1.2. Anizotropie fluorescence heterogenních systémů

Obsahuje-li měřený vzorek  $n$  fluoroforů, platí pro každý z nich vztahy

$$i_v^{(n)}(t) = \frac{1}{3}i_n(t)(1 + 2r_n(t)), \quad i_h^{(n)}(t) = \frac{1}{3}i_n(t)(1 - r_n(t)) \quad (9)$$

a výsledné intenzity  $i_v(t)$  a  $i_h(t)$  se určí jako jejich součet

$$i_v(t) = \frac{1}{3}\sum_n i_n(t)(1 + 2r_n(t)), \quad i_h(t) = \frac{1}{3}\sum_n i_n(t)(1 - r_n(t)) \quad (10)$$

Pro křivku dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému tak získáme vztah

$$r(t) = \frac{i_v(t) - i_h(t)}{i_v(t) + 2i_h(t)} = \frac{\sum_n i_n(t)r_n(t)}{\sum_n i_n(t)} = \sum_n \frac{i_n(t)}{i(t)} r_n(t) \quad (11)$$

Ze vztahu (11) je zřejmé, že výsledné dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému  $r(t)$  s  $n$  exponenciálními dohasínáními  $r_n(t)$ , přestává být exponenciální, pokud alespoň pro jeden fluorofor platí, že podíl  $i_n(t)/i(t)$  není konstantní funkce v čase. Tento typ dohasínání anizotropie fluorescence je diskutován v [3] a experimentálně byl pozorován např. v pracích [3], [4].

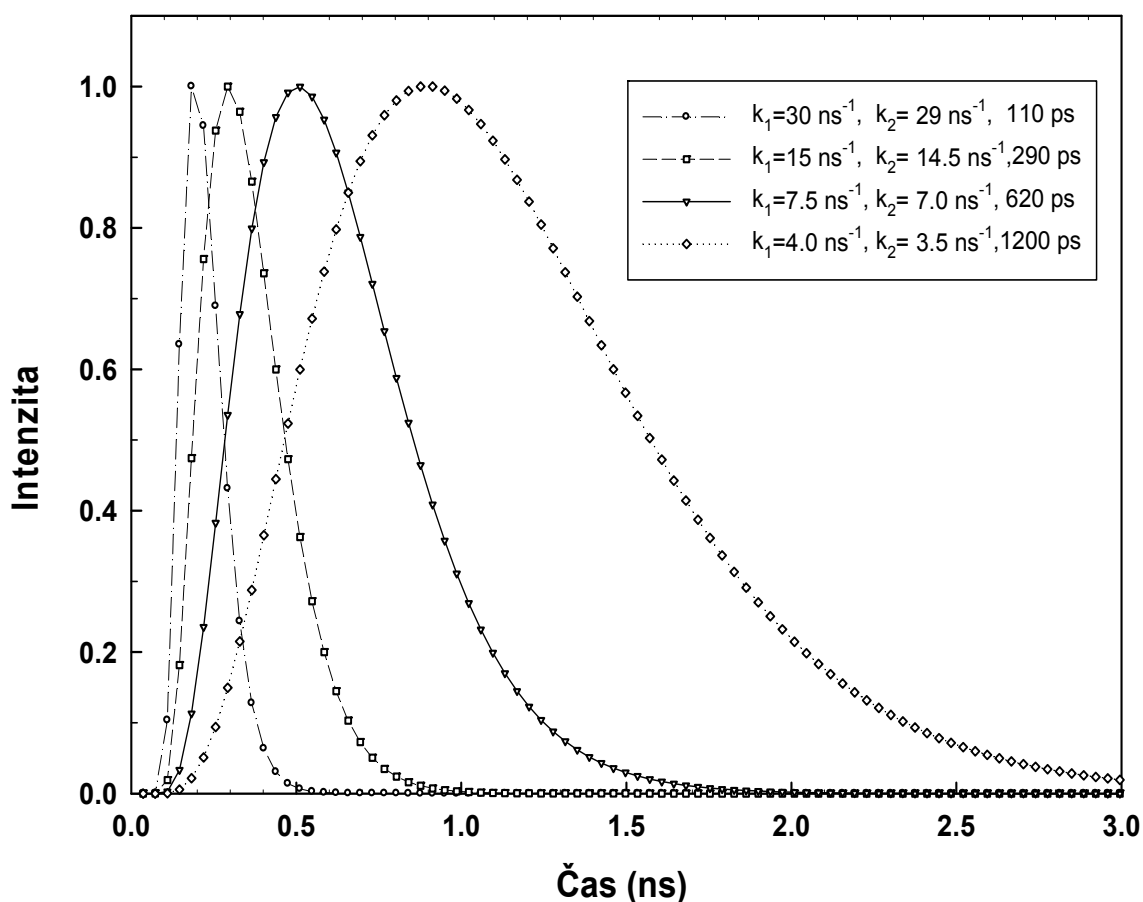
## 1.3. Analytické simulace křivek dohasínání fluorescence

Základem úspěšné simulace křivek dohasínání intenzity fluorescence je nalezení vhodné funkce, která se tvarem podobá experimentální přístrojové funkci daného zařízení a je pro ni možno spočítat její konvoluci s funkcí exponenciální. Musí se jednat o hladkou funkci, která má vhodnou časovou pološířku a též obvykle velmi rychlou náběžnou hranu v čase. V experimentu jsou tyto vlastnosti dány výběrem excitačního zdroje světla a použitou detekcí. Je-li excitačním zdrojem světla pikosekundový laser, potom limitujícím prvkem je obvykle rychlost použitého fotonásobiče. Při detekci klasickým fotonásobičem je dosahováno pološířky 0.5 - 1.0 ns, s mikrokanálovým fotonásobičem až 0.1 - 0.2 ns. Uvedené vlastnosti splňuje velmi dobře funkce  $g(t)$  ve tvaru

$$g(t) = Ct^2[\exp(-k_2t) - \exp(-k_1t)] \quad (12)$$

kde rychlostní konstanty  $k_1 > k_2$  v jednotkách  $\text{ns}^{-1}$  je možno zvolit tak, že uvedená funkce má požadovanou časovou pološířku a konstanta normuje intenzitu simulovaných křivek.

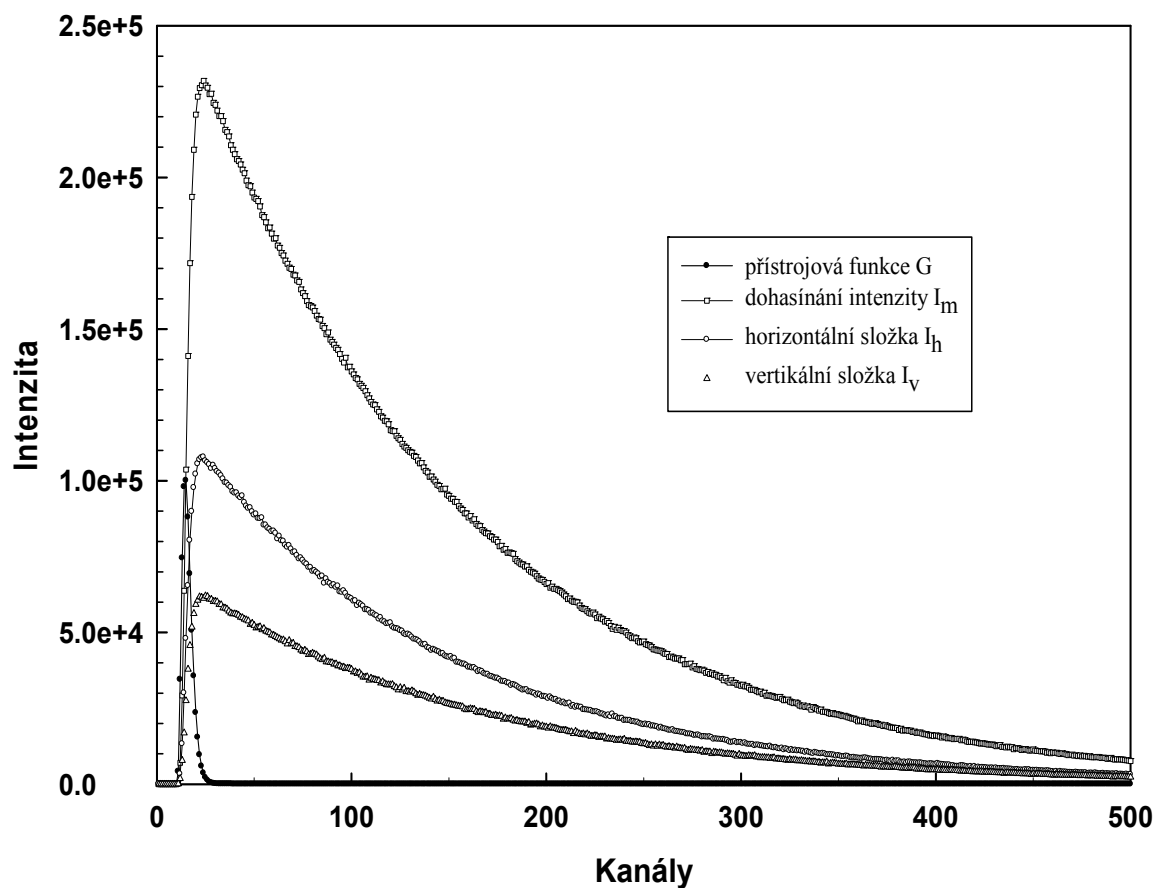
Program pro simulaci křivek dohasínání fluorescence v časové škále generuje přístrojovou funkci  $g(t)$  podle rovnice (12) a počítá její konvoluce s  $\delta(t)$ -odezvou systému vyjádřenou složkami  $i_v(t)$  a  $i_h(t)$  podle rovnic (3), kde funkce  $i(t)$  a  $r(t)$  jsou definovány vztahy (4) a (5). Funkce  $g(t)$  a spočtené konvoluce  $f_v(t)$  a  $f_h(t)$  jsou potom integrovány přes časové intervaly pokrývající sledovaný úsek dohasínání fluorescence, čímž získáme jejich integrální hodnoty v souborech  $\{G_{ci}\}$ ,  $\{F_{vci}\}$  a  $\{F_{hci}\}$ ,  $i = 1, 2, \dots, N_D$ . Využit je možno soubory s hodnotami takto přesně analyticky spočtenými anebo je možno do uvedených souborů implementovat Poissonův šum.



Obr. 2. Normované funkce odezvy simulované podle vztahu (12) a následně integrované přes kanály bez šumu. V legendě jsou uvedeny konstanty  $k_1$  a  $k_2$  použité při simulaci jednotlivých funkcí s výslednou pološířkou. Data byla generována pro hodnotu 36.53 ps/kanál.

Pro generaci funkce  $g(t)$  volíme konstanty  $k_1$  a  $k_2$  tak, aby pološířka simulované přístrojové funkce odpovídala našim požadavkům. Pro snadnější volbu parametrů  $k_1$

a  $k_2$  je na obr. 2 znázorněno několik příkladů simulovaných přístrojových funkcí  $\{G_{ci}\}$ ,  $i = 1, 2, \dots, N_D$  s pološířkami v oblasti 100 - 1200 ps. Pro simulace byla v práci použita přístrojová funkce o pološířce 290 ps.



Obr. 3. Soubor se simulovanými daty obsahuje čtyři křivky: přístrojovou funkci  $G$ , dohasínání intenzity fluorescence pod magickým úhlem  $I_m$ , vertikální a horizontální složky dohasínání  $I_v$  a  $I_h$ , definovány výše.

## 2. Modelování křivek dohasínání fluorescence

### 2.1. Volba modelového systému

Pro tuto práci jsme zvolili modelový biologický systém, v němž obecně aktivita proteinu  $P_1$  je regulována interakcí s proteinem  $P_2$  při současné tvorbě komplexu  $P_1P_2$ . Zatímco volný protein  $P_1$  je plně funkční, komplex  $P_1P_2$  je nefunkční. Interakci obou proteinů můžeme znázornit rovnicí



Rovnici (13) je též možno znázornit následujícím schématem

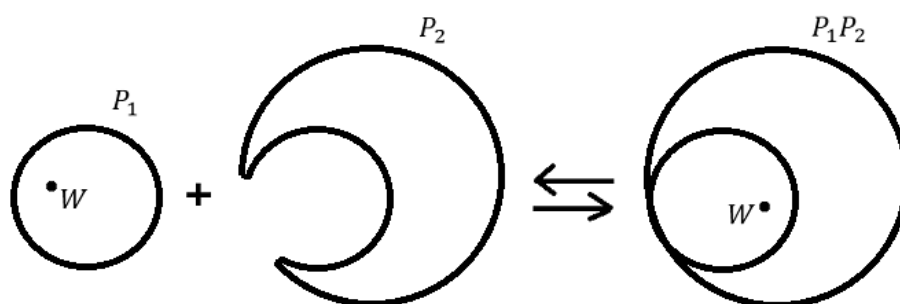


Schéma 1. Znázornění vazby proteinu  $P_1$  na protein  $P_2$ . Tryptofan označený jako  $W$  obsahuje pouze protein  $P_1$  a po navázání také komplex  $P_1P_2$ .

Vzorky proteinů připravených ve vodných roztocích za fyziologických podmínek je možno velmi dobře sledovat fluorescenčními metodami. Řetězce proteinů jsou tvořeny 20-ti různými aminokyselinami (AK), z nichž pouze tři tzv. aromatické AK vykazují fluorescenci v roztocích za pokojové teploty a pouze jedinou z nich je možno excitovat samostatně. Tou je aminokyselina tryptofan označovaná Trp nebo také  $W$ . Trp má absorpční spektrum v UV oblasti spektra a k jeho excitaci se využívá světlo o vlnové délce spadající do intervalu 295 - 300 nm s fluorescencí ležící převážně v oblasti 300 - 400 nm. Další výhodou je skutečnost, že se Trp v proteinech vyskytuje poměrně vzácně. Např. ve známém lidském proteinu HSA tvořeným 585 aminokyselinami se nachází pouze jediný na pozici 214 [6].

V průběhu posledních 12-ti let se studiem procesu regulace aktivity vybraných proteinů pomocí regulačního proteinu označeného jako 14-3-3 zabývala řada článků, které vznikly ve spolupráci s Oddělením fyzikální a makromolekulární chemie

PřF UK, Biofyzikálním oddělením Fyzikálního ústavu MFF UK a Fyziologickým ústavem AV [7]-[12]. Řada poznatků, které v nich byly získány, byla využita také v této práci.

Aby bylo možno využít fluorescence tryptofanu pro sledování procesů podle rovnice (13), je třeba provést na proteinech  $P_1$  a  $P_2$  řadu modifikací. Obvykle se metodami molekulární biologie ponechá v  $P_1$  pouze jeden Trp a pokud existují další, je potřeba je odstranit. Současně je třeba zajistit, aby  $P_2$  neobsahoval žádný Trp. V obou případech musí být tyto odstraněné tryptofany nahrazeny jinou aminokyselinou, přičemž biochemickými metodami musí být prokázáno, že oba upravené proteiny neztratily aktivitu, kterou vykazovaly před touto úpravou.

Chceme-li nalézt vazebné místo, kterým  $P_1$  interaguje s regulačním proteinem, je třeba připravit řadu tzv. mutantů s tryptofanem na různých místech aminokyselinového řetězce  $P_1$ . Interakci s vazebným místem regulačního proteinu pak indikuje změna doby života fluorescence  $P_1$ .

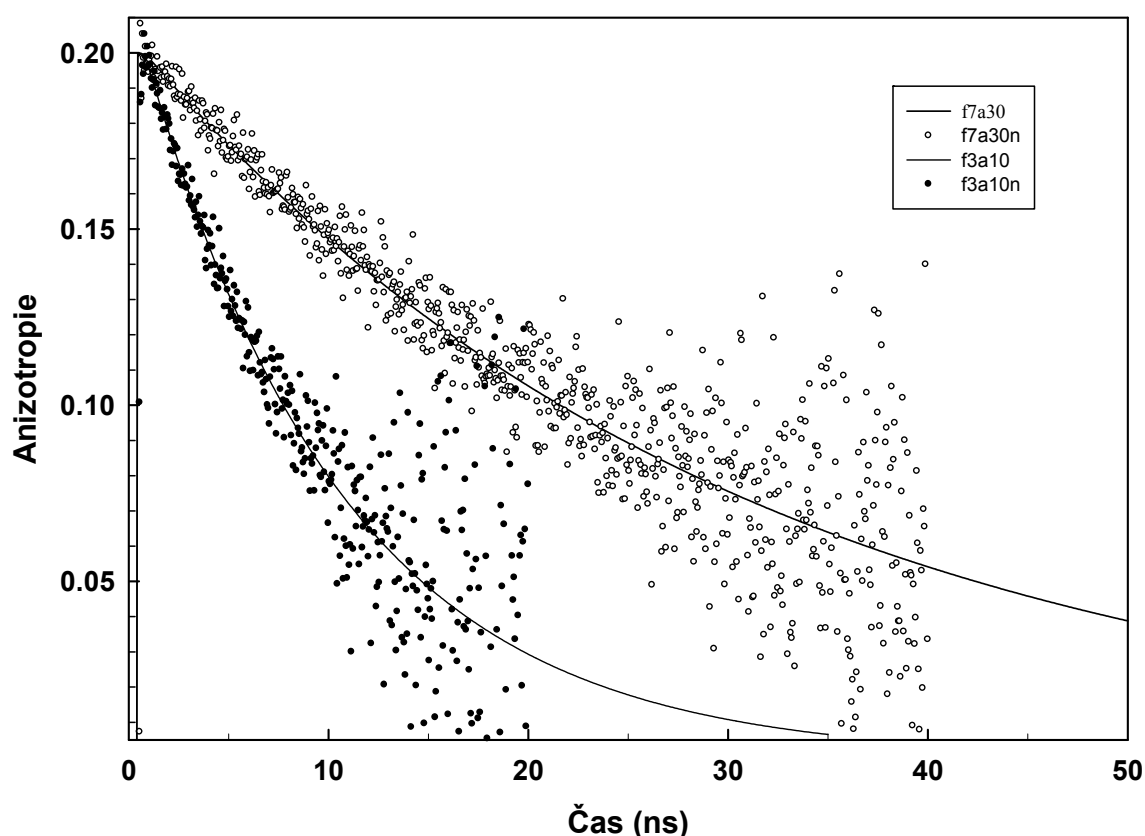
Název souboru	Protein	$\alpha$	$\tau$ (ns)	$\beta$	$\theta$ (ns)
F3A10	$P_1$	8.0	3.0	0.2	10
F7A30	$P_1P_2$	8.0	7.0	0.2	30
F37A1030	$P_1 + P_1P_2$	$\alpha/2$	$\tau$	$\beta$	$\theta$
F3A10n	$P_1$	8.0	3.0	0.2	10
F7A30n	$P_1P_2$	8.0	7.0	0.2	30
F37A1030n	$P_1 + P_1P_2$	$\alpha/2$	$\tau$	$\beta$	$\theta$
F3A10	$P_1$	8.0	3.0	0.2	10
F5A30	$P_1P_2$	8.0	5.0	0.2	30
F35A1030	$P_1 + P_1P_2$	$\alpha/2$	$\tau$	$\beta$	$\theta$
F3A10n	$P_1$	8.0	3.0	0.2	10
F5A30n	$P_1P_2$	8.0	5.0	0.2	30
F355A1030n	$P_1 + P_1P_2$	$\alpha/2$	$\tau$	$\beta$	$\theta$

Tab. 1. Přehled dat použitých pro simulace: Horní polovina tabulky obsahuje soubory Modelu 1, který při tvorbě komplexu  $P_1P_2$  předpokládá změnu doby života fluorescence proteinu  $P_1$  z hodnoty  $\tau = 3$  ns na  $\tau = 7$  ns, dolní polovina odpovídá Modelu 2 pro analogickou změnu doby života z hodnoty  $\tau = 3$  ns na  $\tau = 5$  ns. Každý z uvedených souborů obsahuje 3 simulované křivky dohasínání intenzity fluorescence  $I_m$ ,  $I_v$ ,  $I_h$  a přístrojovou funkci normovanou na  $10^5$  countů před implementací šumu. Křivky jsou spočtené v tisíci bodech při rozlišení 0.05 ns/kanál. K datům označeným na konci názvu písmenem n byl implementován Poissonův šum, data bez označení jsou analyticky spočtené křivky bez šumu. Parametry  $\alpha$ ,  $\tau$  a  $\beta$ ,  $\theta$  uvedené v popisu tabulky jsou definovány rovnicemi (4) a (5). Pro simulaci heterogenních systémů  $P_1 + P_1P_2$  byly použity křivky příslušných homogenních systémů s polovičním předexponenciálním faktorem  $\alpha = 4.0$ .

Parametry modelových systémů zvolených pro testování v této práci jsou shrnuty v tab. 1. Zvolené parametry odpovídají jak dobám života experimentálně pozorovaným u Trp, tak také rotačně korelačním časům anizotropie fluorescence makromolekul proteinů [13].

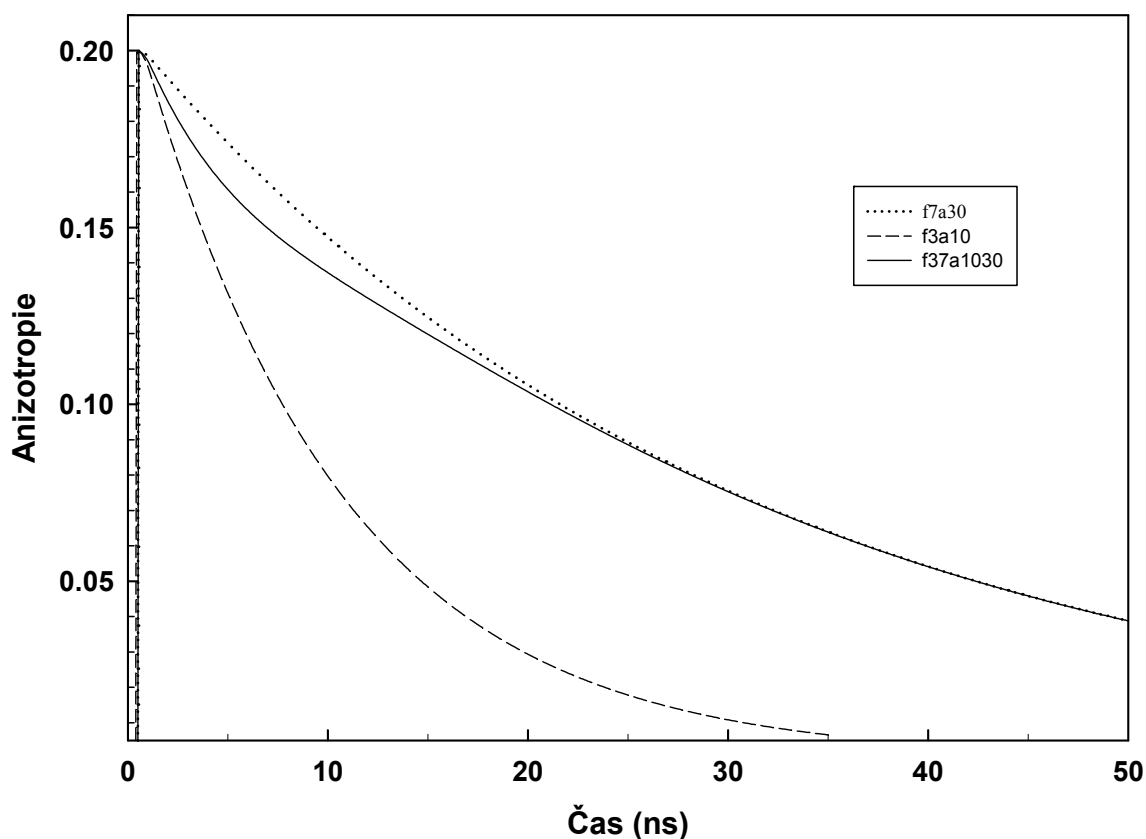
## 2.2. Výsledky a diskuze

Model 1 předpokládá, že interakce  $P_1$  s  $P_2$  vede k velké změně doby života tryptofanové fluorescence komplexu  $P_1P_2$  z hodnoty  $\tau = 3$  ns na  $\tau = 7$  ns. Dohasínání anizotropie fluorescence komplexu  $P_1P_2$  za těchto podmínek je porovnáno s křivkou dohasínání anizotropie  $P_1$  na obr. 4, kde jsou znázorněna jak data bez šumu tak i data zašuměná. Úroveň Poissonova šumu v datech imitujících experiment odpovídá intenzitě vertikální komponenty dohasínání fluorescence  $I_v$  v maximu asi  $10^5$  countů. Je zřejmé, že křivky dohasínání anizotropie fluorescence je možno počítat pouze



Obr. 4. Srovnání křivek dohasínání anizotropie fluorescence souborů F7A30n ( $\alpha = 8.0$ ,  $\tau = 7.0$  ns,  $\beta = 0.2$ ,  $\theta = 30$  ns) a F3A10n ( $\alpha = 8.0$ ,  $\tau = 3.0$  ns,  $\beta = 0.2$ ,  $\theta = 10$  ns). Křivky byly nasimulovány se šumem, který odpovídá experimentálním podmínkám definovaným výše v textu. Plné čáry jsou identická dohasínání souborů F7A30 a F3A10 před implementací šumu a představují tak dokonalý fit křivek se šumem.

v časovém intervalu, kdy je fluorescence fluoroforu dostatečně intenzivní. Obvykle je to doba nepřesahující deset dob života po excitaci ( $10\tau$ ), pro zašuměná experimentální data často i méně, jak je zřejmé z obr. 4. Vzorky obou proteinů  $P_1$  a také  $P_1P_2$  při velkém přebytku  $P_2$  jsou homogenní systémy, které vykazují exponenciální dohasínání jak intenzity fluorescence, tak i anizotropie. Analýzou těchto souborů můžeme nalézt parametry použité k simulaci. Jestliže však jeden vzorek obsahuje směs obou proteinů  $P_1$  a  $P_1P_2$ , jedná se o heterogenní systém, který má sice také exponenciální dohasínání intenzity fluorescence, ale dohasínání jeho anizotropie je neexponenciální, jak plyne z rovnic (9) - (11). Jeho tvar je znázorněn na obr. 5. Jaké výsledky získáme, pokud je heterogenní systém analyzován jako homogenní, demonstrují přílohy 1 - 5. Výsledky analýzy pro soubor F37A1030n jsou shrnuty v tab. 2.



Obr. 5. Dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního vzorku F37A1030 bez šumu s parametry podle tab. 1. (plná čára). Data se šumem F37A1030n jsou uvedena v příloze P3.

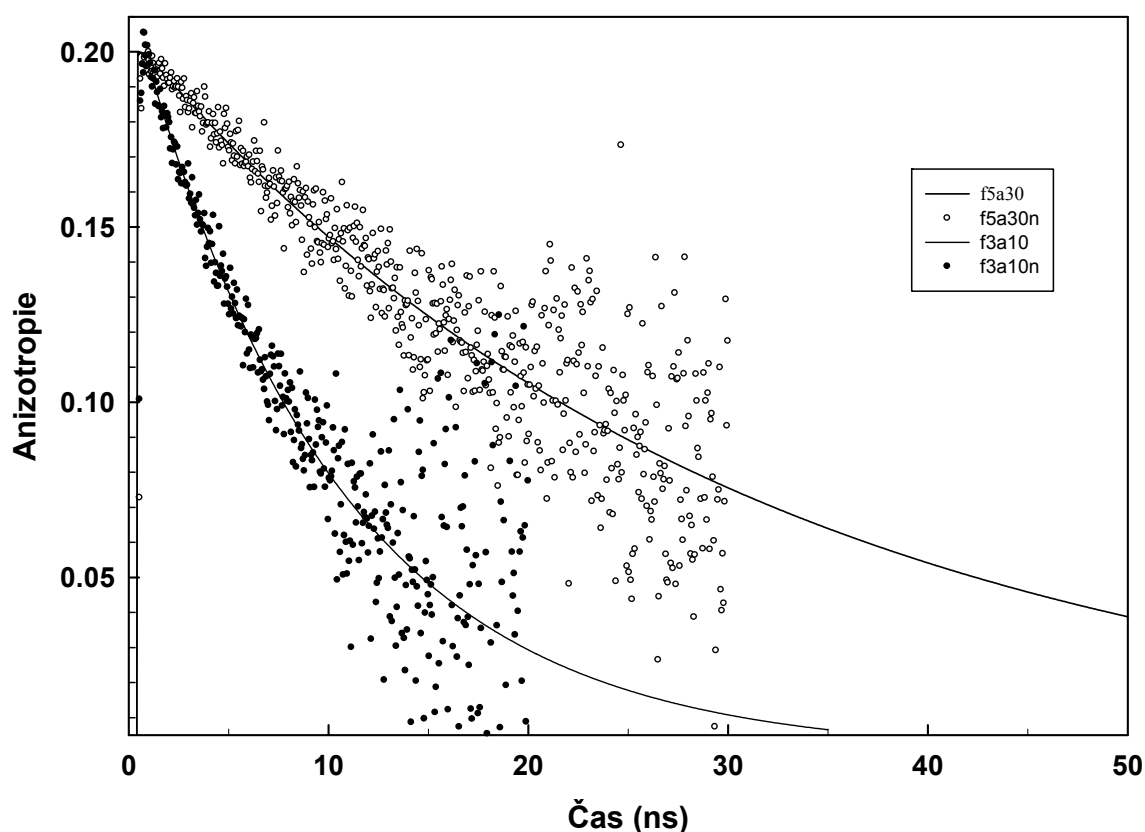
Je vidět, že analyzující program nalézá správné parametry křivky dohasínání intenzity fluorescence, parametry křivky dohasínání anizotropie fluorescence jsou



podle očekávání určeny nesprávně. V tomto případě tomu nasvědčuje i mírně zvýšená hodnota  $red\ \chi^2$ , která je větší než 1.05.

F37A1030n					
Intenzita fl.	$\alpha_1$	$\tau_1(\text{ns})$	$\alpha_2$	$\tau_2(\text{ns})$	$red\chi^2$
	4.00	3.00	4.00	7.00	1.018
Anizotropie fl.					
	$\beta_1$	$\theta_1(\text{ns})$	$\beta_2$	$\theta_2(\text{ns})$	$red\chi^2$
	0.02	2.5	0.18	35.8	1.093

Tab. 2. Analýza dohasínání fluorescence heterogenní směsi proteinů  $P_1 + P_1P_2$  pro Model 1.



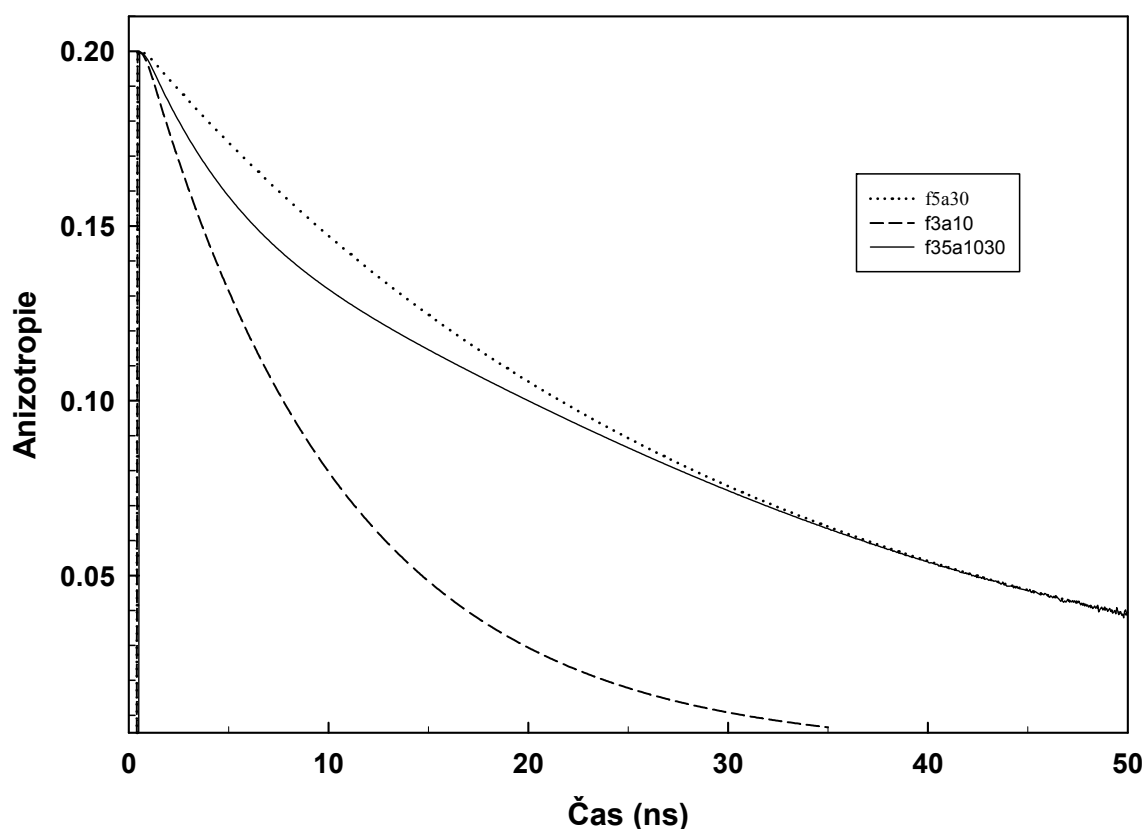
Obr. 6. Srovnání křivek dohasínání anizotropie fluorescence souborů F5A30n ( $\alpha = 8.0$ ,  $\tau = 5.0$  ns,  $\beta = 0.2$ ,  $\theta = 30$  ns) a F3A10n ( $\alpha = 8.0$ ,  $\tau = 3.0$  ns,  $\beta = 0.2$ ,  $\theta = 10$  ns). Křivky byly nasimulovány se šumem, který odpovídá experimentálním podmínkám definovaným výše v textu. Plné čáry jsou identická dohasínání souborů F5A30 a F3A10 před implementací šumu a představují tak dokonalý fit křivek se šumem.

U Modelu 2 se předpokládá, že interakce  $P_1$  s  $P_2$  vede tentokrát k menší změně doby života tryptofanové fluorescence komplexu  $P_1P_2$  z hodnoty  $\tau = 3$  ns na  $\tau = 5$  ns. Dohasínání anizotropie fluorescence komplexu  $P_1P_2$  za těchto podmínek je porovnáváno

s křivkou dohasínání anizotropie  $P_1$  na obr. 6. Výsledky analýzy křivek souboru F35A1030n programem určeným na analýzu homogenních systémů jsou znázorněny v přílohách P6 - P10, nalezené parametry jsou shrnuty v tab. 3.

F35A1030n					
Intenzita fl.	$\alpha_1$	$\tau_1(\text{ns})$	$\alpha_2$	$\tau_2(\text{ns})$	$\text{red}\chi^2$
	3.87	2.96	4.14	4.97	0.993
Anizotropie fl.	$\beta_1$	$\theta_1(\text{ns})$	$\beta_2$	$\theta_2(\text{ns})$	$\text{red}\chi^2$
	0.04	3.6	0.16	38.3	1.157

Tab. 3. Analýza dohasínání fluorescence heterogenní směsi proteinů  $P_1 + P_1P_2$  pro Model 2.

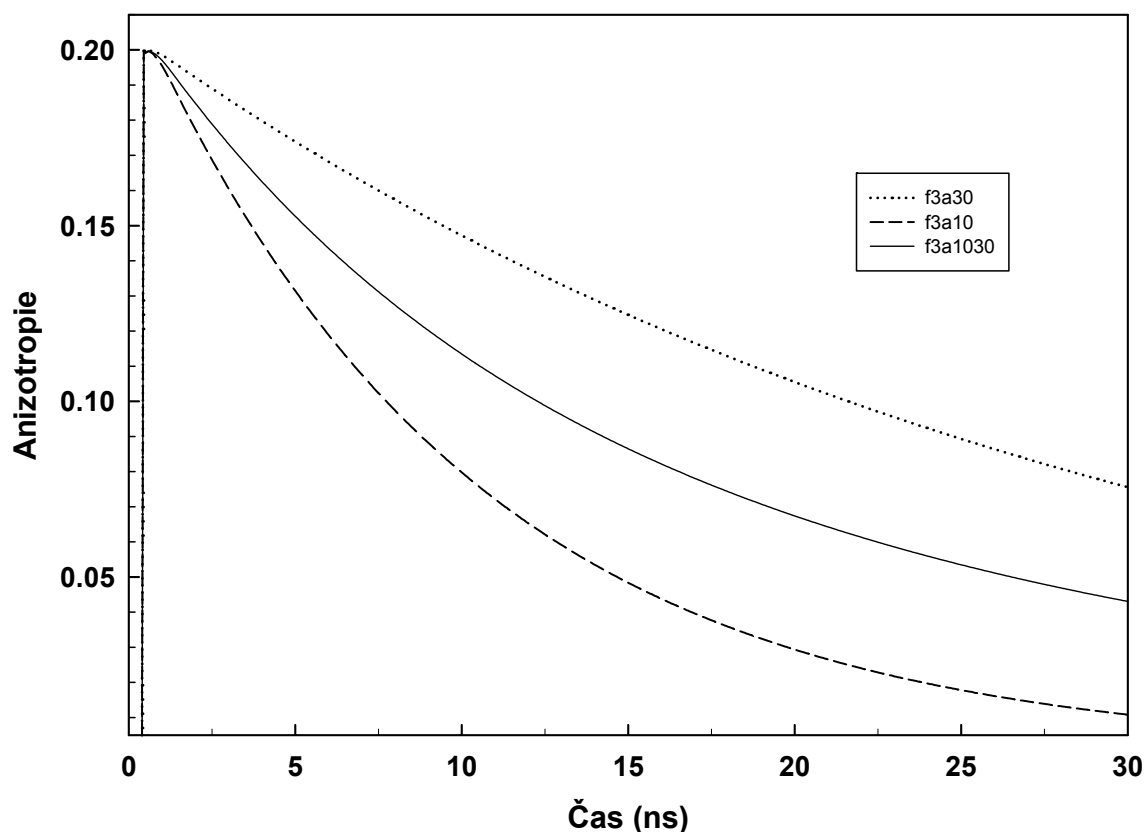


Obr. 7. Dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního vzorku F35A1030 bez šumu s parametry podle tab. 1. (plná čára). Data se šumem F35A1030n jsou uvedena v příloze P8.

Stejně jako v předchozím případě jsou parametry dohasínání intenzity fluorescence určeny správně a parametry křivek anizotropie chybně. V tomto případě při menší změně doby života vyhovuje i velikost  $\text{red}\chi^2$ . Protože program na analýzu křivek dohasínání anizotropie fluorescence heterogenních systémů neexistuje, je třeba

při měření dbát na to, abychom se heterogenním systémům vyhnuli, tj. abychom zajistili velký přebytek proteinu  $P_2$ .

Jak vyplývá z obr. 5 a 7, křivky dohasínání anizotropie fluorescence obou heterogenních systémů mají společné vlastnosti. Mají v počátku správnou velikost  $r_0 = 0.2$ , monotónně klesají a po vyhasnutí fluorescence  $P_1$  o době života 3 ns sledují křivku déle žijící fluorescence komplexu  $P_1P_2$ , což je 7 nebo 5 ns.



Obr. 8. Dohasínání anizotropie fluorescence systému, u něhož nedochází po navázání  $P_1$  na  $P_2$  ke změně doby života fluorescence. V takovém případě má volný protein  $P_1$  i komplex  $P_1P_2$  dobu života fluorescence  $\tau = 3$  ns, přičemž rotačně korelační čas  $P_1$  je  $\theta = 10$  ns a rotačně korelační čas komplexu  $P_1P_2$  je  $\theta = 30$  ns. Pro přehlednost jsou znázorněna pouze nasimulovaná data bez šumu.

Zbývá ještě poslední případ, kdy se vznikem komplexu se doba života jeho tryptofanu nemění. Při stejné době života  $\tau = 3$  ns pak anizotropie obou proteinů obsažených ve vzorku dohasíná exponenciálně s parametry  $\beta_1 = 0.1$  a  $\theta_1 = 10$  ns pro  $P_1$  a  $\beta_2 = 0.1$  a  $\theta_2 = 30$  ns pro  $P_1P_2$ . Analýza dat tohoto vzorku dává správné parametry zadané při simulaci. Křivka dohasínání anizotropie fluorescence je znázorněna na obr. 8.

## Závěr

Byly shrnuty základní poznatky o časově rozlišené fluorescence fluoroforů v roztocích, objasňující metody měření jejich kinetických parametrů, jako jsou doby života fluorescence nebo charakteristiky křivek dohasínání anizotropie fluorescence jak v homogenních, tak i heterogenních vzorcích. Současně byly popsány a zvládnuty metody umožňující analytické simulace křivek dohasínání fluorescence fluoroforů a také analýzu nasimulovaných nebo experimentálně naměřených křivek homogenních systémů tzv. parametrickou metodou.

Pro testování experimentálních dat byl navržen modelový systém, který popisuje interakci proteinu  $P_1$  s jedním tryptofanem ve své struktuře s regulačním proteinem  $P_2$ , který tryptofan neobsahuje, za vzniku komplexu  $P_1P_2$ . Protein  $P_1$  je charakterizován dobou života tryptofanové fluorescence  $\tau = 3$  ns a rotačně korelačním časem dohasínání anizotropie fluorescence  $\theta = 10$  ns, komplex  $P_1P_2$  parametrem  $\theta = 30$  ns a změněnou dobou života tryptofanové fluorescence pro dva testované případy s hodnotami  $\tau = 7$  ns (model 1) nebo  $\tau = 5$  ns (model 2).

Křivky monoexponenciálního dohasínání anizotropie fluorescence proteinu  $P_1$  a komplexu  $P_1P_2$  v obr. 4 až 8 definují výše, ve které se nacházejí křivky dohasínání anizotropie pro libovolnou heterogenní směs těchto proteinů. Rotačně korelační časy obou křivek sice nezávisí na době života fluorescence příslušného tryptofanu, jejich šum je však na době života silně závislý. Z tohoto důvodu mají křivky dohasínání anizotropie fluorescence „přijatelný šum“ u proteinu  $P_1$  ( $\tau = 3$  ns) prvních 20 ns po excitaci a u  $P_1P_2$  30 ns pro  $\tau = 5$  ns nebo 40 ns pro  $\tau = 7$  ns.

Pro oba modely uvedené výše byly nasimulovány soubory dat představující heterogenní vzorky, které obsahují proteiny  $P_1$  a  $P_1P_2$  o poměru předexponenciálních faktorů 1:1 v dohasínání, a pro tyto vzorky byly spočteny křivky dohasínání anizotropie fluorescence znázorněné na obr. 5 a 7.

Křivky dohasínání fluorescence heterogenních vzorků s implementovaným šumem pro oba modely byly analyzovány a výsledky analýzy jsou shrnuty v Přílohách 1 - 10. Protože při měření pod magickým úhlem je eliminován vliv pohybu fluoroforů, je možno získat správné parametry exponenciálního dohasínání intenzity fluorescence jak homogenních tak i heterogenních vzorků. Potvrzují to jak analýzou nalezené parametry, které se shodují s parametry použitými pro simulaci z tab. 1, tak i kvalitou obou fitů, vše dokumentováno v přílohách P1, P2, P6 a P7.

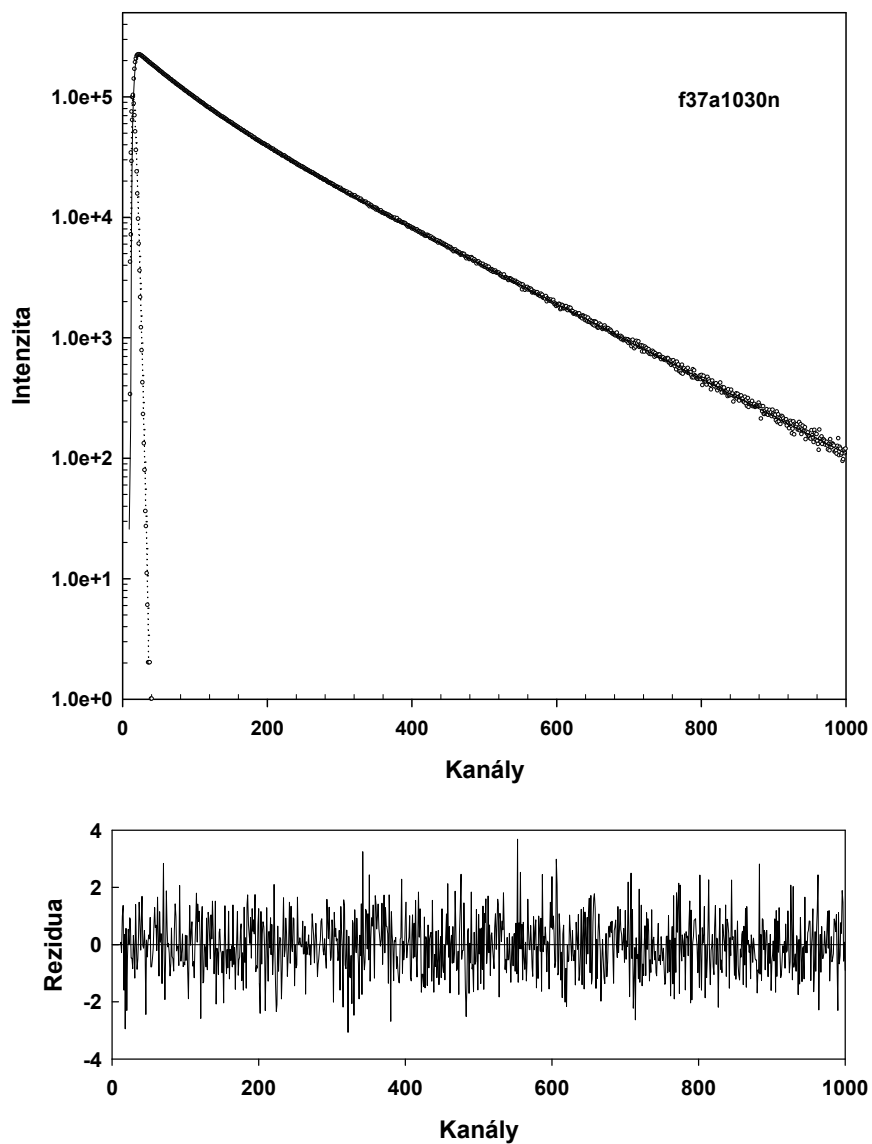
Obvykle dostupné programy není možno použít na analýzu dohasínání křivek anizotropie fluorescence heterogenních systémů, neboť toto dohasínání je neexponenciální, jak vyplývá z rovnice (11). Pro malé změny dob života proteinů  $P_1$  a  $P_1P_2$  v heterogenním vzorku, jak tomu je u našich modelů, je přesto kvalita exponenciálního fitu relativně dobrá, ale nalezeny jsou zcela chybné hodnoty parametrů dohasínání anizotropie fluorescence (viz přílohy P3 - P5 a P8 - P10), které se výrazně liší od parametrů použitých v simulaci podle tab. 1.

## Seznam použité literatury

- [1] VECER, J., KOWALCZYK, A. A. a DALE, R. E. (1993). Improved recursive convolution integral for the analysis of fluorescence decay data: Local approximation of the apparatus response function by a general polynomial. *Rev. Sci. Instrum.* **64**, 3403-3412
- [2] BEVINGTON, P. R. (1969). Data reduction and Error Analysis for the Physical Sciences, McGraw-Hill, New York.
- [3] LAKOWICZ, J. R. (2006). Principles of Fluorescence Spectroscopy, Cluver Academic, Plenum Publishing Corp., New York.
- [4] MATEO, C. R., BROCHON, J. C., LILLO, M. P. a ACUNA, U. (1993). Lipid Clustering in Bilayers Detected by the Fluorescence Kinetics and Anisotropy of *trans*-Parinaric Acid, *Biophysical Journal* **65**, 2237-47.
- [5] VEČEŘ, J., VESELA, P., MALINSKY, J. a HERMAN, P. (2015). Sphingolipid Levels Crucially Modulate Lateral Microdomain Organization of Plasma Membrane in Living Yeast, *FEBS Lett.* **588**, 443-449.
- [6] MELOUN, B., MORAVEK, L. a KOSTKA, V. (1975). Complete Amino Acid Sequence of Human Serum Albumin, *FEBS Lett.* **58**, 134-137.
- [7] OBSILOVA, V., HERMAN, P., VECER, J., SULC, M., TEISINGER, J. a OBSIL, T. (2004). 14-3-3 $\zeta$  C-terminal stretch changes its conformation upon ligand binding and phosphorylation at Thr<sup>232</sup>, *J.Biol.Chem.* **279**, 4531 – 4540
- [8] SILHAN, J., OBSILOVA, V., VECER, J., HERMAN, P., SULC, M., TEISINGER, J. a OBSIL, T. (2004). 14-3-3 protein C-terminal stretch occupies ligand binding groove and is displaced by phosphopeptide binding, *J.Biol.Chem.* **279**, 49113-49119
- [9] OBSILOVA, V., VECER, J., HERMAN, P., PABIANOVA, A., SULC, M., TEISINGER, J., BOURA, E. a OBSIL, T. (2005). 14-3-3 Protein Interacts with Nuclear Localization Sequence of Forkhead Transcription Factor FoxO4, *Biochemistry* **44**, 11608-11617
- [10] OBSILOVA, V., NEDBALKOVÁ, E., SILHAN, J., BOURA, E., HERMAN, P., VECER, J., ŠULC, M., TEISINGER, J., DYDA, F., OBSIL, T. (2008). 14-3-3 Protein Affects Conformation of Regulatory Domain of Human Tyrosine Hydroxylase, *Biochemistry*, **47(6)**, 1768-1777
- [11] REZABKOVA, L., BOURA, E., HERMAN, P., VEČEŘ, J., BOUROVA, L., SULC, M., SVOBODA, P., OBSILOVA, V. a OBSIL, T. (2010). 14-3-3 Protein Interacts with and Affects the Structure of RGS Domain of Regulator of G Protein Signaling 3 (RGS3) Function, *J. Struct. Biol.* **170(3)**, 451-461
- [12] VEISOVA, D., REZABKOVA, L., STEPANEK, M., HERMAN, P., VECER, J., OBSIL, T. a OBSILOVA, V. (2010). The C-terminal Segment of Yeast BMH Proteins Exhibits Different Structure Compared to Other 14-3-3 Protein Isoforms, *Biochemistry* **49(18)**, 3853-3861
- [13] EFTINK, M. F. (2000). Intrinsic Fluorescence of Proteins in Topics in Fluorescence Spectroscopy, vol. 6, Protein Fluorescence, Ed. by J. R. Lakowicz, Kluwer Academic Plenum Publisher, New York, p. 1-1cv

## Přílohy

Příloha P1. Výsledek analýzy dohasínání intenzity fluorescence heterogenního systému F37A1030n. Intenzita je vyjádřena počtem detekovaných fotonů (angl. counts), rezidua udávají rozdíl mezi analyzovanými daty a jejich fitem normovaný na standardní odchylku Poissonova šumu v daném kanálu. Stejný popis os grafů je použit také v dalších přílohách.



Příloha P2. Výstupní protokol analýzy křivky dohasínání intenzity fluorescence  $I_m(t)$  heterogenního systému F37A1030n.

f37a1030n_resp.txt	Response function
f37a1030n_m.txt	Fluorescence decay
f37a1030n_m.txt	Weight of the fluorescence decay
1024	Total number of experimental points
0.05	Calib const (ns/channel)
0	Special weight file: 1-YES 0-NO
0.0	Response function shift i channels
0	Time reversion of data: 1-YES 0-NO
0	Response fn calculation
1,10	Background channels
12,1000	Channels for analysis

\*\*\*\*\*

Date: 17. 3.2016

Time: 13h 59min 10s

\*\*\*\*\*

Analyzed data: f37a1030n\_resp.txt f37a1030n\_m.txt

Analyzed decay interval: 12-1000

Number of components: 2

Input:Alpha(1),tau(1),alpha(2),tau(2), .... :

5.00 5.00 10.00 10.00

Reduced CHISQ( 10)= 1.018119

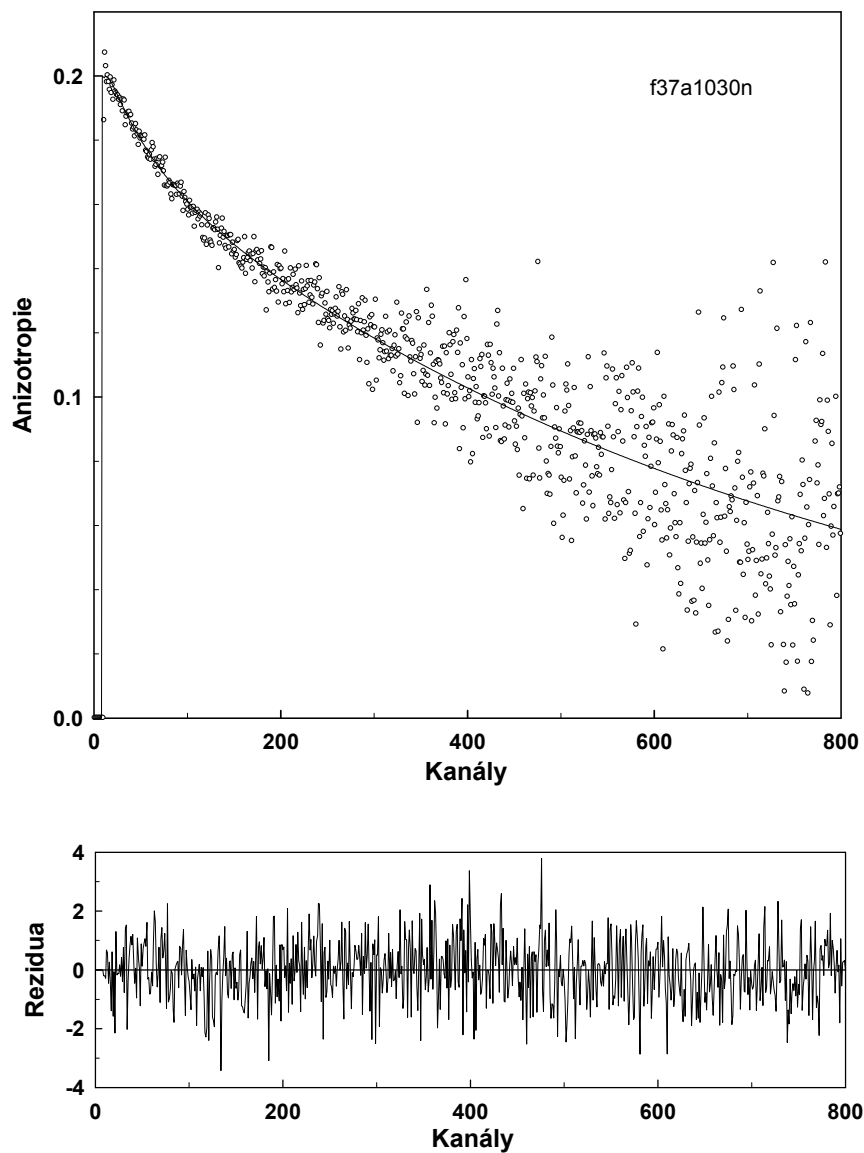
Results: alpha,tau

ALPHA: 4.00365 4.00264

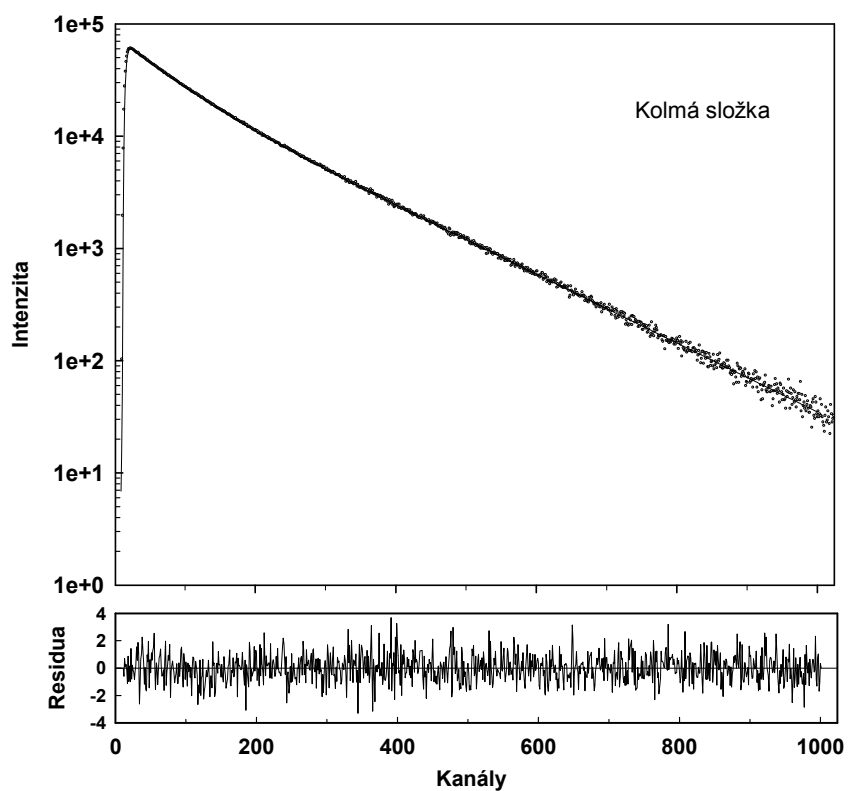
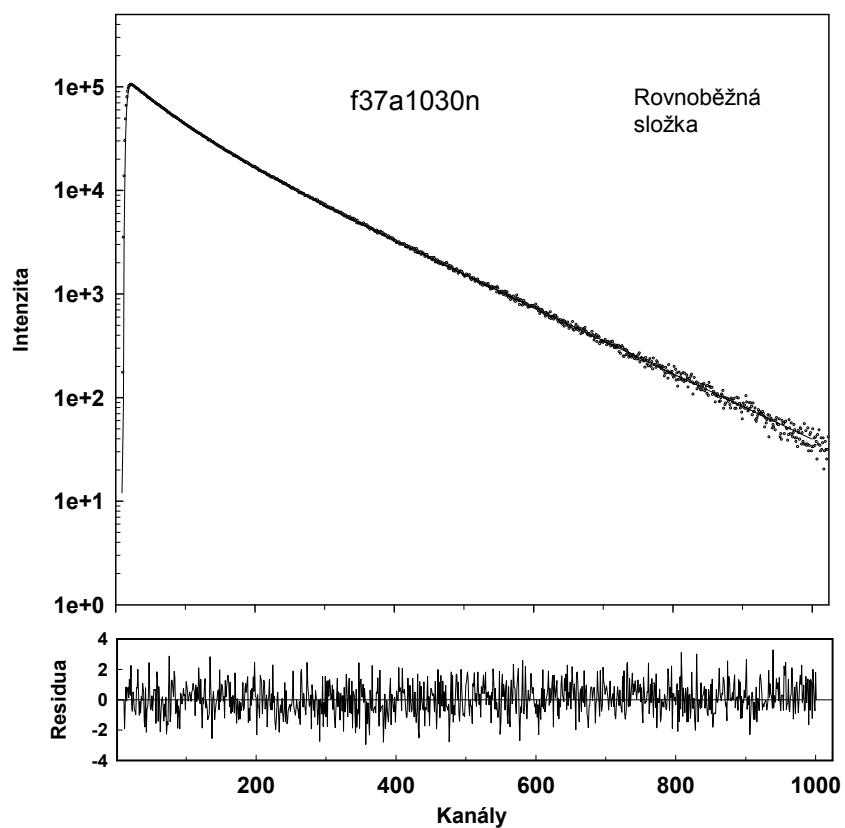
TAU: 3.00230 6.99591



Příloha P3. Výsledný fit křivky dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému F37A1030n byl spočítaný pomocí křivek zobrazených v příloze P4.



Příloha P4. Kvalita fitu rovnoběžné a kolmé složky dohasínání intenzity fluorescence  $I_v(t)$  a  $I_h(t)$  heterogenního systému F37A1030n nalezeného za předpokladu dvouexponenciálního dohasínání anizotropie fluorescence.



Příloha P5. Výstupní protokol analýzy dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému F37A1030n. Výsledky analýzy podle protokolů P2 a P5 jsou shrnuty v tab. 2.

f37a1030n_resp.txt	Excitation profile
f37a1030n_v.txt	Parallel fluorescence decay file
f37a1030n_h.txt	Perpendicular fluorescence decay file
NA_v.txt	Parallel weight file
NA_h.txt	Perpendicular weight file
1024	Total number of experimental points
0.05	Channel width (ns/channel)
0	Weight from files: 1-YES 0-NO
0	Time reversion: 1-YES 0-NO
0.0	Resp. funct.shift in channels
1,10	Background channels
12,1000	Channels for analysis

\*\*\*\*\*

Date: 17. 3.2016  
Time: 14h 15min 13s

\*\*\*\*\*

Analyzed data: f37a1030n\_resp.txt f37a1030n\_v.txt f37a1030n\_h.txt

INITIAL GUESS:

Number of decay components: 2

Alpha: 4.00 4.00  
Tau: 3.00 7.00

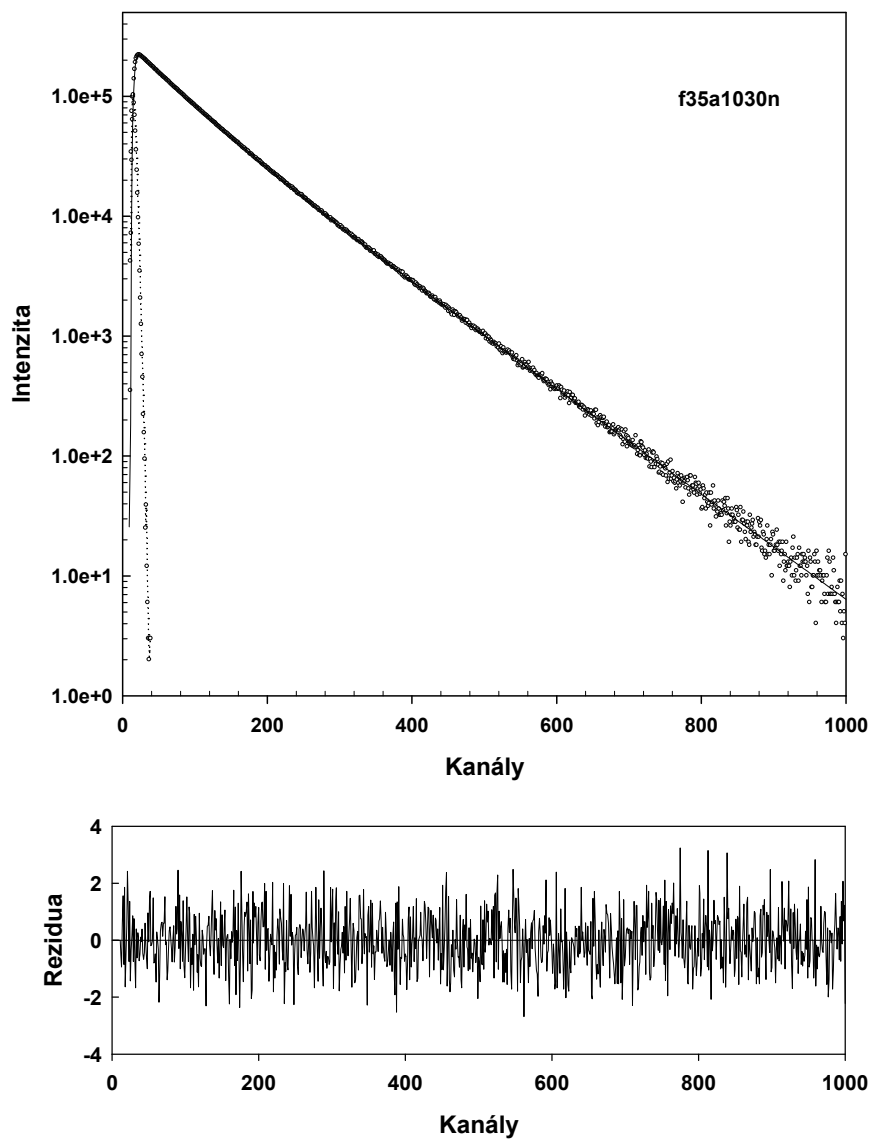
Number of anisotropy components: 2

Beta: 0.10 0.10  
Phi: 10.00 30.00

RESULTS:

CHISQR( 8): 1.09250  
ALPHA= 4.00156 4.00279  
TAU= 3.0000 7.0000  
BETA= 0.02450 0.17597  
THETA= 2.4811 35.7588

Příloha P6. Kvalita fitu křivky dohasínání intenzity fluorescence  $I_m(t)$  heterogenního systému F35A1030n.



Příloha P7. Výstupní protokol analýzy křivky dohasínání intenzity fluorescence  $I_m(t)$  heterogenního systému F35A1030n.

resp_n.txt	Response function
f35a1030n_m.txt	Fluorescence decay
f35a1030n_m.txt	Weight of the fluorescence decay
1024	Total number of experimental points
0.05	Calib const (ns/channel)
0	Special weight file: 1-YES 0-NO
0.0	Response function shift i channels
0	Time reversion of data: 1-YES 0-NO
0	Response fn calculation
1,10	Background channels
12,1000	Channels for analysis

\*\*\*\*\*

Date: 15. 3.2016

Time: 10h 36min 9s

\*\*\*\*\*

Analyzed data: resp\_n.txt f35a1030n\_m.txt

Analyzed decay interval: 12-1000

Number of components: 2

Input:Alpha(1),tau(1),alpha(2),tau(2), .... :

2.00 2.00 8.00 8.00

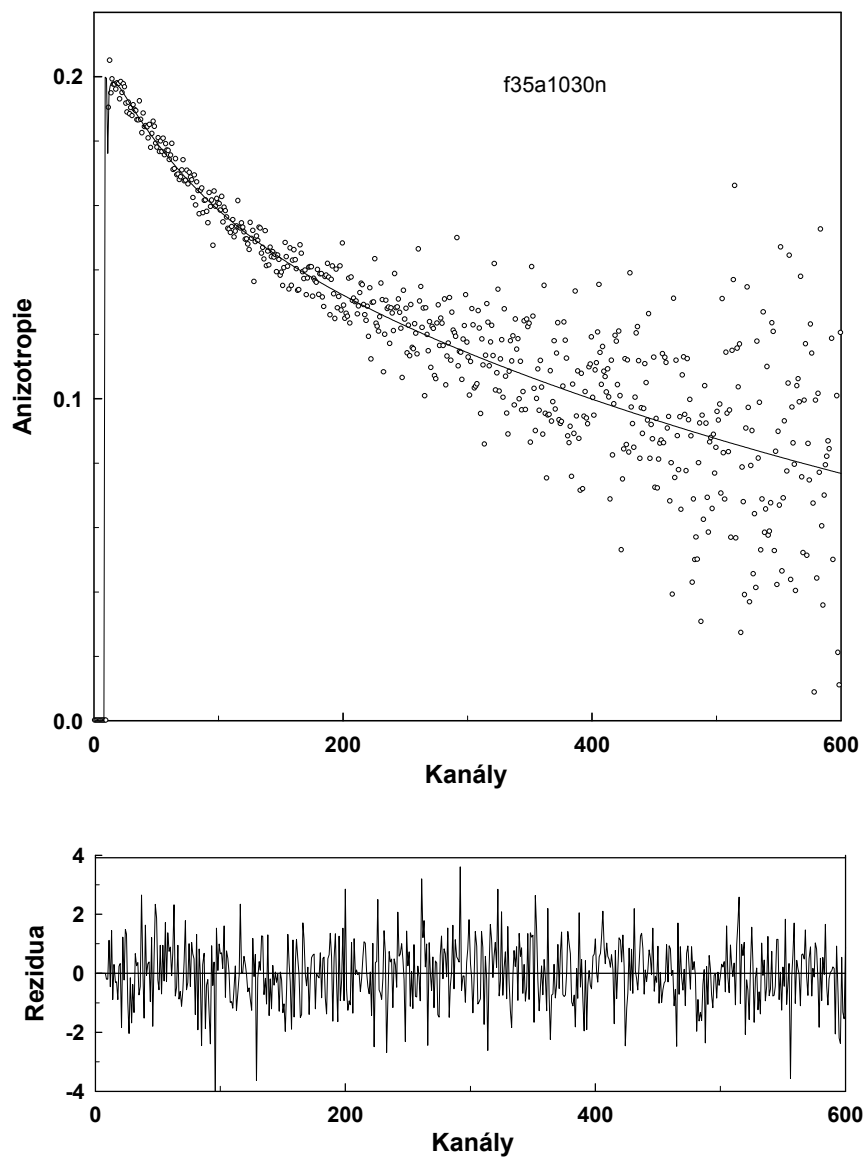
Reduced CHISQ( 20)= 0.992980

Results: alpha,tau

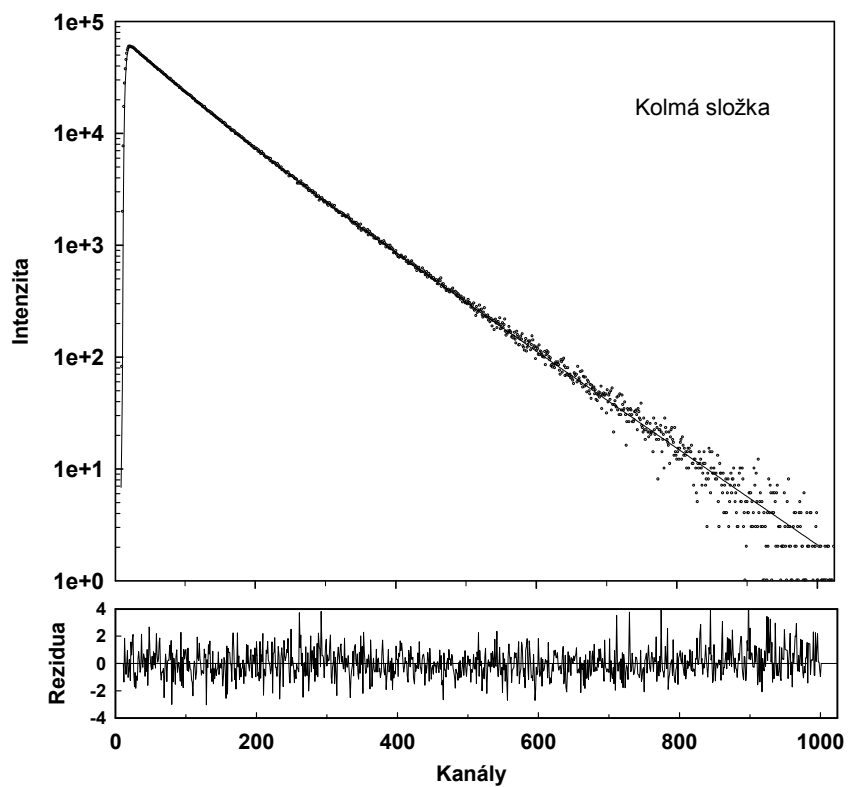
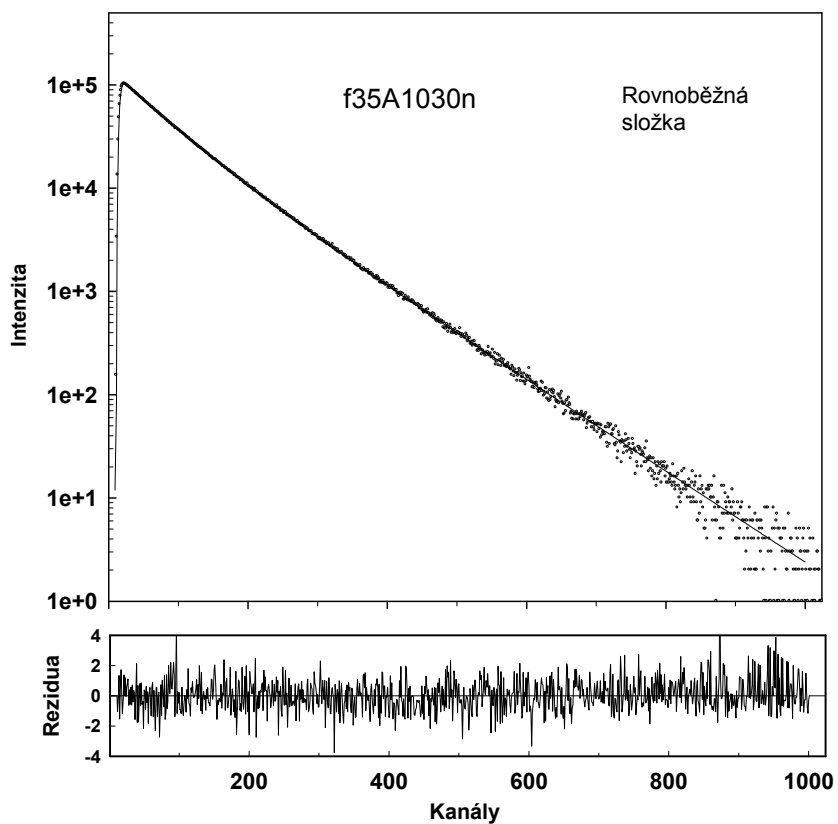
ALPHA: 3.87196 4.13903

TAU: 2.96240 4.96708

Příloha P8. Výsledný fit dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému F35A1030n byl spočítán pomocí křivek zobrazených v příloze P9.



Příloha P9. Kvalita fitu rovnoběžné a kolmé složky dohasínání intenzity fluorescence  $I_v(t)$  a  $I_h(t)$  heterogenního systému F37A1030n nalezeného za předpokladu dvouexponenciálního dohasínání anizotropie fluorescence.



Příloha P10. Výstupní protokol analýzy dohasínání anizotropie fluorescence heterogenního systému F35A1030n. Výsledky analýzy podle protokolů P7 a P10 jsou shrnuty v tab. 3.

resp_n.txt	Excitation profile
f35a1030n_v.txt	Parallel fluorescence decay file
f35a1030n_h.txt	Perpendicular fluorescence decay file
NA_v.txt	Parallel weight file
NA_h.txt	Perpendicular weight file
1024	Total number of experimental points
0.05	Channel width (ns/channel)
0	Weight from files: 1-YES 0-NO
0	Time reversion: 1-YES 0-NO
0.0	Resp. funct.shift in channels
1,10	Background channels
12,1000	Channels for analysis

\*\*\*\*\*

Date: 16. 3.2016

Time: 10h 53min 16s

\*\*\*\*\*

Analyzed data: resp\_n.txt      f35a1030n\_v.txt      f35a1030n\_h.txt

INITIAL GUESS:

Number of decay components: 2

Alpha: 4.00 4.00

Tau: 3.00 5.00

Number of anisotropy components: 2

Beta: 0.20 0.20

Theta: 15.00 40.00

RESULTS:

CHISQR( 8): 1.15747

ALPHA= 4.01454 3.99737

TAU= 3.0000 5.0000

BETA= 0.03564 0.16460

THETA= 3.5921 38.3096