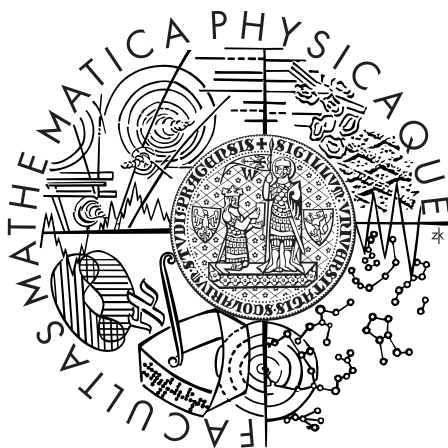


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

Diplomová práce



Marián Grocký

Měření C-13 NMR relaxací karbonylových skupin v proteinech

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

Děkuji školiteli RNDr. Janu Langovi Ph.D. za příkladné vedení diplomové práce, Mgr. Pavlu Srbovi za čas a trpělivost mi věnovanou při pomoci s programovým vybavením, Janu Prchalovi za přípravu vzorků proteinu a RNDr. Zdeňkovi Tošnerovi Ph.D. za možnost využití jeho programu pro fitování parametrů Lipari-Szabóova modelu. Dále také Jiřímu Vlachovi a Janu Lipovovi za pomoc při práci s přiřazovacími experimenty a přiřazením. Zároveň děkuji své rodině za podporu nejen při sepisování této práce.

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

V Praze dne 28. dubna 2007

Marián Grocký

Abstrakt

Název práce: *Měření ^{13}C NMR relaxací karbonylových skupin v proteinech*

Autor: *Marián Grocký*

Katedra (ústav): *Katedra fyziky nízkých teplot*

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Jan Lang, Ph.D.*

e-mail vedoucího: *Jan.Lang@mff.cuni.cz*

Abstrakt: V práci je zkoumána metodika měření karbonylových ^{13}C NMR relaxací T_1 a T_2 v peptidovém řetězci dvojitě (^{15}N ^{13}C) značeného proteinu. Výsledky jsou použity ke stanovení dynamických vlastností proteinu pomocí Lipari-Szabóova modelu. Ten je porovnán s dynamickým modelem určeným na základě T_1 , T_2 a NOE relaxačních experimentů změřených na dusících ^{15}N v páteři uniformně ^{15}N značeného proteinu. Uvedené relaxační experimenty jsou změřeny na příslušně izotopově obohaceném matrixovém proteinu Mason-Pfizerova opičího retroviru a jeho mutované formě R55F. Forma R55F, resp. její úsek označovaný CTRS, má za následek skládání virové kapsidy v blízkosti buněčné membrány, stejně jako je tomu u viru HIV. Mason-Pfizeruv opičí virus proto představuje vhodný studijní model zkoumání životního cyklu retrovirů. Hodnoty dusíkových dynamických parametrů LS modelu u obou forem proteinu potvrdily větší dynamiku CTRS sekvence u matrixového proteinu R55F. Dále byla nalezena dobrá shoda hodnot dynamických parametrů karbonylů a dusíků.

Klíčová slova: Nukleární magnetická rezonance, Dynamika, Protein, Mason-Pfizerův opičí virus.

Abstract

Title: *Measurement of ^{13}C NMR relaxation of carbonyl groups in proteins*

Author: *Marián Grocký*

Department: *Department of low temperature physics*

Supervisor: *RNDr. Jan Lang, Ph.D.*

Supervisor's e-mail address: *Jan.Lang@mff.cuni.cz*

Abstract: V práci je zkoumána metodika měření karbonylových ^{13}C NMR relaxací T_1 a T_2 v peptidovém řetězci dvojitě (^{15}N ^{13}C) značeného proteinu. Výsledky jsou použity ke stanovení dynamických vlastností proteinu pomocí Lipari-Szabóova modelu. Ten je porovnán s dynamickým modelem určeným na základě T_1 , T_2 a NOE relaxačních experimentů změřených na dusících ^{15}N v páteři uniformně ^{15}N značeného proteinu. Uvedené relaxační experimenty jsou změřeny na příslušně izotopově obohaceném matrixovém proteinu Mason-Pfizerova opičího retroviru a jeho mutované formě R55F. Forma R55F, resp. její úsek označovaný CTRS, má za následek skládání virové kapsidy v blízkosti buněčné membrány, stejně jako je tomu u viru HIV. Mason-Pfizeruv opičí virus proto představuje vhodný studijní model zkoumání životního cyklu retrovirů. Hodnoty dusíkových dynamických parametrů LS modelu u obou forem proteinu potvrdily větší dynamiku CTRS sekvence u matrixového proteinu R55F. Dále byla nalezena dobrá shoda hodnot dynamických parametrů karbonylů a dusíků.

Keywords: Nukleární magnetická rezonance, Dynamika, Protein, Mason-Pfizerův opičí virus.

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	3
2.1	Úvod do NMR	3
2.1.1	Spektroskopie NMR vysokého rozlišení	3
2.1.2	Larmorova precese	3
2.1.3	Matice hustoty	4
2.1.4	Liouvilleova–von Neumannova rovnice	5
2.2	Interakce v NMR	6
2.2.1	Externí pole B_0	6
2.2.2	Pulzy	6
2.2.3	Chemický posun	6
2.2.4	Přímá dipól-dipólová interakce	7
2.2.5	J interakce	8
2.3	Relaxace v NMR	9
2.3.1	Blochovy rovnice	9
2.3.2	Relaxační mechanismy	9
2.3.3	Závislost korelačního času na relaxačních dobách	10
2.3.4	Spektrální hustota korelační funkce	11
2.3.5	Vztahy pro R_1 a R_2	11
2.3.6	Nukleární Overhauserův efekt (NOE)	13
2.3.7	Lipari-Szabóův přístup	14
2.4	Pulzní sekvence pro studium dynamiky makromolekul	15
2.4.1	Pulzní sekvence pro měření dusíkových relaxací ^{15}N značených vzorků	15
2.4.2	Měření T_1	17
2.4.3	Měření T_2	18
2.4.4	Měření NOE	19
2.5	Proteiny	21

2.5.1	Role a funkce proteinů	21
2.5.2	Popis struktury proteinu	21
2.6	Mason-Pfizerův opičí virus	21
2.6.1	Genom retrovirů	22
2.6.2	Morfologie retroviru	22
2.6.3	Životní cyklus retroviru	22
2.7	Matrixový protein	24
2.7.1	Přirozená forma M-PMV MA	24
2.7.2	R55F Mutant M-PMV	25
2.7.3	Srovnání matrixových proteinů	25
3	Experimentální část	27
3.1	Materiál a metody	27
3.1.1	Vzorky proteinů	27
3.1.2	Spektrometr NMR	27
3.1.3	Parametry pulzních sekvencí pro měření dusíkových re- laxací v ^{15}N značených proteinech	28
3.1.4	Optimalizovaná pulzní sekvence pro měření ^{13}C karbo- nylových relaxací ^{15}N , ^{13}C značených vzorků	29
3.1.5	Analýza spekter	32
3.1.6	Určení T_1 , T_2 a NOE ze změřených spekter	34
3.1.7	Analýza dynamiky proteinů pomocí Lipari-Szabóova přístupu	34
3.2	Výsledky a diskuze	35
3.2.1	^{15}N relaxace na přirozené formě matrixového proteinu M-PMV	35
3.2.2	^{15}N relaxace na mutované formě matrixového proteinu M-PMV	38
3.2.3	Karboonylové relaxace matrixového WT proteinu značeného ^{15}N , ^{13}C	42

3.2.4	Karbonylové relaxace matrixového proteinu R55F značeného ^{15}N , ^{13}C	45
3.2.5	Porovnání ^1H , ^{13}C korelovaných spekter obou proteinů	47
3.2.6	Dynamika dusíků ^{15}N přirozené formy matrixového proteinu M-PMV	50
3.2.7	Dynamika dusíků ^{15}N mutované formy matrixového proteinu M-PMV	52
3.2.8	Srovnání dusíkem značených proteinů	54
3.2.9	Dynamika karbonylů matrixového proteinu WT značeného ^{15}N , ^{13}C	55
3.2.10	Dynamika karbonylů matrixového proteinu R55F značeného ^{15}N , ^{13}C	57
3.2.11	Srovnání dynamiky ^{13}C karbonylů a ^{15}N dusíků u přirozené formy matrixového proteinu	58
3.2.12	Diskuze aspektů a přínosů měření ^{15}N relaxací	60
3.2.13	Diskuze aspektů a přínosů měření ^{13}C relaxací	60
4	Závěr	62
	Literatura	63

1 Úvod

Studium strukturních a dynamických vlastností biomolekul představuje aktuální téma na poli molekulární a strukturní biologie, biochemie a biofyziky a to především z důvodu aplikace v medicíně a farmacii. V této práci se zabýváme studiem proteinů metodami nukleární magnetické rezonance (NMR). Tato metoda je společně s rentgenovou krystalografií a výpočetními metodami využívána při analýze 3D proteinových struktur a zkoumání jejich dalších vlastností. Rentgenová krystalografie je velmi silným nástrojem, který je však ale omezen krystalizačními schopnostmi proteinů. Zároveň neumožňuje zkoumat dynamické vlastnosti proteinu nebo jeho chování v přirozeném prostředí. Výpočetní metody představují důležitý komplement k experimentálním metodám, ale určení struktury proteinu, založené výhradně na výpočtu, není dostatečně důvěryhodné. Pokud chceme získat současně informace o struktuře a dynamice proteinu, je NMR asi nejvhodnější metodou. Omezujícími faktory jsou nezbytná poměrně vysoká koncentrace vzorku (řádově 1mM), nutnost izotopového obohacení (^{13}C , ^{15}N , ^2H) a dle t06 maximální velikost studovaných molekul pohybující se v současné době kolem 100 kDa.

V této práci jsme se zaměřili na studium specifických proteinů Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV), který patří do skupiny retrovirů. Biologickou a medicínskou motivací studia retrovirů je především celá řada nemocí, které způsobují. Asi nejznámějším příkladem je AIDS, jejímž původcem je virus HIV. Právě M-PMV představuje vhodný studijní model pro pochopení některých aspektů životního cyklu retrovirů.

Hlavním cílem této práce je zvládnout problematiku měření relaxací karbonylových uhlíků ^{13}C v páteři proteinu a pokusit se rozšířit znalosti o dynamice peptidové roviny dosud známé z dřívějších dusíkových dat. Dalším úkolem je pokusit se měřením na nových vzorcích získat přesnější o relaxaci amidických skupin ^{15}N v páteři proteinu. Uvedená měření byla prováděna jednak na přirozené formě matrixového proteinu M-PMV, jednak na jeho muto-

vané formě R55F, ve které je zaměněn arginin za fenylalanil. Tato mutace vede k zásadní změně struktury proteinu a cílem je prozkoumat též její vliv na jeho lokální flexibilitu páteře.

Práce obsahuje teoretickou část, ve které jsou shrnuty základy teorie NMR. Funkce matrixového proteinu je zasazena do popisu jeho životního cyklu, včetně fenotypických projevů mutace tohoto proteinu. V experimentální části jsou detailně popsány nově implementované a zoptimalizované pulzní sekvence pro měření ^{13}C relaxací karbonylových uhlíků a nastavení všech provedených experimentů. Jsou prezentovány získané relaxační parametry pro amidické dusíky ^{15}N i karbonylové uhlíky ^{13}C , které jsou interpretovány s ohledem na dynamiku proteinu pomocí Lipari-Szabóova přístupu. V závěru jsou srovnány výsledky ^{15}N a ^{13}C měření a dynamiky pro přirozenou i mutovanou formu matrixového proteinu M-PMV.

2 Teoretická část

2.1 Úvod do NMR

2.1.1 Spektroskopie NMR vysokého rozlišení

Jaderná magnetická rezonance se zabývá studiem spinů atomových jader v silném magnetickém poli a jejich interakcí s okolím. Pro popis těchto objektů a dějů s nimi spjatých je třeba použít kvantovou teorii. V této kapitole jsme čerpali především z knih [1] a [2].

Metodami NMR lze zkoumat jádra všech atomů v přírodě kromě jader se sudým protonovým i nukleonovým číslem. Taková jádra mají nenulový jaderný spin \mathbf{I} . Jeho popis je v kvantové teorii reprezentován spinovým operátorem $\hat{\mathbf{I}}$, jehož vlastní čísla I nabývají pouze celočíselných či poločíselných hodnot. Pro velikost spinu \mathbf{I} při hodnotě spinového kvantového čísla I platí

$$|\mathbf{I}| = \hbar\sqrt{I(I+1)}. \quad (1)$$

s Průmět jaderného spinu do osy z může nabývat $2n+1$ hodnot

$$\mathbf{I}_z = \hbar m_I, \quad (2)$$

kde magnetické kvantové číslo $m_I = I, I-1, \dots, -I+1, -I$ a \hbar je Plankova konstanta $h/2\pi$.

S jaderným spinem je spjat magnetický moment μ vztahem

$$\mu = \gamma\mathbf{I}, \quad (3)$$

kde γ je gyromagnetická konstanta charakteristická pro každé jádro. Analogický vztah platí i pro příslušné kvantové operátory $\hat{\mathbf{I}}$ a $\hat{\mu}$.

2.1.2 Larmorova precese

Po vložení částice s magnetickým momentem μ do homogenního statického magnetického pole \mathbf{B} dojde k jejich vzájemné interakci, kterou lze popsat po-

mocí interakčního Hamiltoniánu:

$$\hat{H} = -\hat{\mu} \cdot \mathbf{B}. \quad (4)$$

Pakliže ztotožníme osu magnetického pole \mathbf{B} se z-ovou osou laboratorní soustavy, zjednoduší se nám rovnice (4) na tvar

$$\hat{H} = -\hat{\mu}_z \cdot B_0, \quad (5)$$

kde B_0 je velikost přiloženého pole. Příným důsledkem aplikací vztahů (2) a (4) na (5) je štěpení energetického spektra Hamiltoniánu v tzv. Zeemanův multiplet $2I + 1$ ekvidistantních energetických hladin, jejichž vzdálenost je

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0. \quad (6)$$

Časovou evoluci spinu v magnetickém poli získáme řešením Schrödingerovy rovnice

$$i\hbar \frac{\partial}{\partial t} \psi = \gamma \hat{I}_z B_0 \psi \quad (7)$$

a s přihlédnutím ke komutačním relacím momentu hybnosti. Řešením je precesní pohyb magnetického momentu jádra kolem osy z s úhlovou frekvencí velikosti

$$\omega_L = \gamma B_0. \quad (8)$$

Tato frekvence se je označována jako Larmorova.

2.1.3 Matice hustoty

Každý vzorek sestává z ohromného množství spinů a proto se při popisu tak velkého souboru musíme opřít o statistiku fyziku. Vlnová funkce celého souboru je totiž příliš komplikovaná a pro analytické účely se nedá použít. Proto se nejprve vychází ze znalosti vlnové funkce Ψ jedné částice, tzv. čistý stav, a pravděpodobnosti jejího výskytu ve vzorku $P(\Psi)$. Celková vlnová funkce systému je dána superpozicí jednotlivých Ψ s váhou $P(\Psi)$, tzv. smíšený stav. Každá z vlnových funkcí Ψ může být rozložena do systému vlastních stavů

$$|\Psi\rangle = \sum_{n=1}^N c_n |n\rangle \quad (9)$$

Střední hodnotu libovolné měřitelné veličiny A popsané hermitovským operátorem \hat{A} lze potom vyjádřit jako

$$\langle \Psi | \hat{A} | \Psi \rangle = \sum_{n,m} c_n c_m^* \langle m | \hat{A} | n \rangle. \quad (10)$$

Vystředováním přes celý statistický soubor (značeno pruhem) potom získáme

$$\overline{\langle A \rangle} = \sum_{n,m} \overline{c_n c_m^*} \langle m | A | n \rangle. \quad (11)$$

Koeficienty sumy představují matici:

$$\overline{c_n c_m^*} = \langle n | \rho | m \rangle = \rho_{mn} \quad (12)$$

Matice ρ_{mn} je hermitovská a nazývá se *matice hustoty*.

Diagonální komponenty představují populace jednotlivých energetických hladin odpovídajících stavům $|n\rangle$. Nediagonální členy se nazývají koherence. Fyzikálně je lze interpretovat jako vazbu mezi stavy $|n\rangle$ a $|m\rangle$, přesněji jako četnost zastoupení stavu $|m\rangle$ v přítomnosti stavu $|n\rangle$.

2.1.4 Liouvilleova–von Neumannova rovnice

K popisu časového vývoje souboru spinů lze ze Schrödingerovy rovnice odvodit Liouvilleovu–von Neumannovu rovnici pro evoluci matice hustoty:

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = i [\rho(t), \hat{H}] \quad (13)$$

Pokud je \hat{H} v rovnici (13) časově nezávislý, řešení má tvar

$$\rho(t) = \exp(-i\hat{H}t) \rho(0) \exp(i\hat{H}t) \quad (14)$$

Faktor $\exp(i\hat{H}t)$ ze vztahu (14) se nazývá propagátor. Znalostí propagátorů v jednotlivých fázích experimentu lze v dobrém přiblížení odvodit kompletní vývoj matice hustoty a tudíž efekt použité pulzní sekvence. V případě působení pulzů lze Hamiltonián transformovat do soustavy souřadné souhlasně rotující s časově závislým radiofrekvenčním polem. V této souřadné soustavě je transformovaný Hamiltonián \hat{H}_e časově nezávislý a rovnice (13) v ní získá stejný tvar řešení 14.

2.2 Interakce v NMR

Interakce působící na spinový systém lze rozdělit na externí (vnější pole B_0 , pulzy radiofrekvenčního pole) a interní (vliv okolních spinů a nábojů).

2.2.1 Externí pole B_0

Vložení vzorku do externího homogenního magnetického pole dojde k preferenční orientaci spinů, což vede ke vzniku magnetizace (suma magnetických momentů) paralelní s polem. V rovině kolmé k ose pole B_0 se magnetizace středuje k 0 vlivem náhodné fáze při Larmorově precesi.

2.2.2 Pulzy

Makroskopickou magnetizaci lze manipulovat pomocí radiofrekvenčních kruhově polarizovaných pulzů působících v transverzální rovině. Vliv pulzu působícího v rezonanci po dobu t o velikosti pole B_1 na libovolnou složku I_α jaderného spinu v korotující soustavě lze popsat propagátorem

$$\hat{U}(t) = \exp(-i\gamma B_1 \hat{I}_\beta t) \quad (15)$$

a vypočítat užitím vztahu (14), kde $\beta = x, y, z$ je fáze pulzu. Délka t určuje sklápěcí úhel, který se v našich experimentech rovná $90^\circ \sim \frac{\pi}{2}$ a $180^\circ \sim \pi$. Fáze používaných pulzů jsou: $x \sim 0^\circ$, $y \sim 90^\circ$, a $-x \sim 180^\circ$ a $-y \sim 270^\circ$. Například $\frac{\pi}{2}$ pulz s fází x sklopí magnetizaci ze směru z do směru $-y$. Existují tzv. tvrdé pulzy excitující širokou část či celé spektrum, či pulzy selektivní nebo semiselektivní, které excitují jen definované části spektra. Pro tyto pulzy je často vhodnější jiný tvar obálky, než pravoúhlý.

2.2.3 Chemický posun

Molekuly jsou složitými spinovými systémy elektronů a jader. V místě každého jádra j působí v důsledku B_0 také indukované pole B_j^{ind} vzniklé pohybem nábojů v elektronových obalech. Celkové pole ovlivňující daný spin je tedy

dáno vektorovým součtem $\vec{B}_j^{loc} = \vec{B}_0 + \vec{B}_j^{ind}$. Tato odlišnost ve velikosti pole vede k odlišným frekvencím jader v závislosti na jejich chemickém okolí. K popisu závislosti indukovaného pole \mathbf{B}_J^{ind} na externím poli \mathbf{B}_0 se používá tenzor chemického posunu δ^j reprezentovaný maticí 3x3 vztahem:

$$\vec{\mathbf{B}}_j^{ind} = \delta \cdot \mathbf{B}_0. \quad (16)$$

V případě rychlé izotropní rotace v kapalině se δ_{ij} střeďuje pouze na skalární hodnotu

$$\delta = \frac{1}{3}(\delta_{xx} + \delta_{yy} + \delta_{zz}), \quad (17)$$

kde δ_{xx} , δ_{yy} a δ_{zz} jsou velikosti jeho složek v systému hlavních os.

Rezonanční frekvence daného jádra bude v závislosti na lokálním poli dána vztahem:

$$\omega = -\gamma(1 + \delta)B_0. \quad (18)$$

Propagátor chemického posunu má tvar:

$$\hat{U}_{CS} = \exp(-i\Omega_0\tau\hat{I}_z), \quad (19)$$

kde τ je doba vývoje, Ω_0 rezonanční frekvence.

2.2.4 Přímá dipól-dipólová interakce

Každý magnetický moment je zdrojem magnetického pole ve svém okolí. Molekula proteinu koná celé spektrum pohybů, tudíž je zkoumaný spin vystaven časově proměnným polím sousedních spinů. Interakce s těmito poli se nazývá přímá dipól-dipólová interakce nebo dipól-dipólová interakce přes prostor. Její Hamiltonián má tvar:

$$\hat{H}_{jk}^{DD} = DCC_{jk} \left(3(\hat{I}_j \cdot e_{jk})(\hat{I}_k \cdot e_{jk}) - \hat{I}_j \cdot \hat{I}_k \right), \quad (20)$$

kde e_{jk} jsou báze vektory kartézského systému a b_{jk} je dipól-dipólová konstanta úměrná reciproké třetí mocnině vzdálenosti interagujících spinů (viz. vztah (31)). Vzhledem k velké rychlosti pohybů v roztoku je však vliv dipól-dipolární interakce středován na nulu.

2.2.5 J interakce

Kromě přímé dipól-dipólové interakce existuje nepřímá dipól-dipólová interakce, která je přímým experimentálním dokladem existence chemických vazeb. Tato interakce je zprostředkována spiny vazebných elektronů. Propagátor J-interakce mezi spiny I_1 a I_2 je dán vztahem:

$$\hat{U}_J = \exp(-i \pi J_{12} \tau 2 I_{1z} I_{2z}). \quad (21)$$

2.3 Relaxace v NMR

Relaxaci nazýváme proces návratu systému do rovnovážného stavu.

2.3.1 Blochovy rovnice

Návrat makroskopické magnetizace do rovnovážného stavu lze fenomenologicky popsat soustavou diferenciálních rovnic označovaných jako Blochovy rovnice. Rozlišujeme dva relaxační procesy, a sice longitudiální relaxaci, při které dochází k návratu z-ové složky magnetizace do rovnovážného stavu, a transverzální relaxaci, neboli návrat příčné složky magnetizace na nulovou hodnotu. Řešením Blochových rovnic je v obou případech exponenciální pokles charakterizovaný časovou konstantou T_1 pro longitudiální a časovou konstantou T_2 pro transverzální relaxaci. Časový vývoj složek magnetizace má tvar

$$M_L(t) = M_z(0)(1 - 2 \exp(-t/T_1)) \quad (22)$$

$$M_T(t) = M_T(0) \exp(-t/T_2) \quad (23)$$

Popis pomocí Blochových rovnic bohužel neumožňuje zahrnout všechny spin-spinové interakce, proto je nutno použít kvantově mechanického přístupu s využitím formalismu produktových operátorů a Redfieldovy teorie. Ta je však velmi obsáhlá, a proto zde uvedeme pouze její výsledky.

2.3.2 Relaxační mechanismy

Relaxace spinu přímo souvisí s pohyby molekuly a jejích částí, které mají za následek, že je spin vystaven přítomnosti časově fluktujících polí. Na jádro se spinem $1/2$ působí dva základní relaxační mechanismy. Jedná se o přímou dipól-dipólovou interakci se všemi okolními magnetickými momenty a o anizotropii chemického posunu (chemical shift anizotropy, CSA). U dipól-dipólové interakce pole v příčné rovině indukuje přechody mezi energetickými hladinami podobně jako je tomu v případě působení pulzů. Proměnlivost lokálních elektronových proudů v důsledku polí způsobených např. rotací molekuly má za

následek anizotropie chemického posunu. Oba tyto mechanismy se uplatňují v podobě časově proměnného pole $B_f(t)$ následujících vlastností:

- časová střední hodnota je $\langle B_f(t) \rangle = 0$
- střední kvadratická hodnota je $\langle B_f^2(t) \rangle \neq 0$
- míra rychlosti fluktuací je dána korelační funkcí:

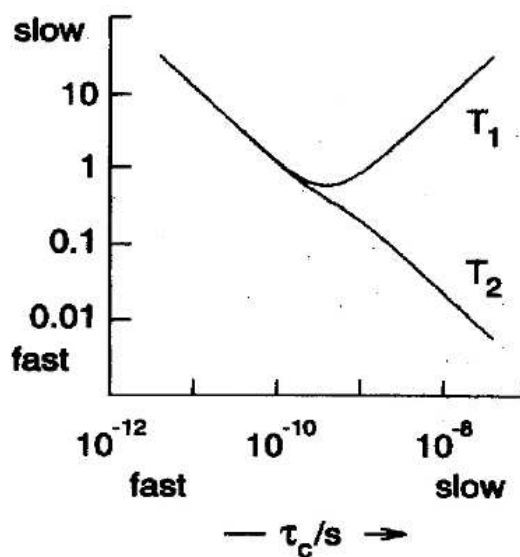
$$G(\tau) = \langle B_f(t) B_f(t + \tau) \rangle \neq 0. \quad (24)$$

Vidíme, že pro dostatečně malá $\tau \approx 0$ je hodnota korelační funkce $G(\tau) \approx \langle B_f^2(t) \rangle$, zatímco pro velká τ se blíží 0. Na základě těchto úvah byl navržen model exponenciálního poklesu:

$$G(\tau) = \langle B_f^2(t) \rangle \exp(-\tau/\tau_c), \quad (25)$$

kde τ_c je korelační čas.

2.3.3 Závislost korelačního času na relaxačních dobách



Obr. 1: Obecná závislost relaxačních dob T_1 a T_2 na korelačním čase τ_c . Obrázek z publikace [6]

Obecná závislost relaxačních dob na korelačním čase vlivem dipól-dipolární interakce je uvedena na Obr. 1 [6]. Pro T_1 není tato funkce prostá a má minimum pro $\tau_C \sim 1 \text{ ns}$. Měříme-li relaxační časy experimentálně, je pro nás důležitá doba T_2 , jejíž závislost na korelačním čase je monotónní. Podle hodnoty T_2 rozhodneme, ve které části křivky se nacházíme. Z Obr. 1 je vidět, že rezidua s relativně dlouhou T_1 a dlouhou T_2 mají krátké korelační časy a tudíž jsou pohyblivá.

2.3.4 Spektrální hustota korelační funkce

Spektrální hustota korelační funkce je zavedena jako Fourierova transformace korelační funkce (24) vztahem:

$$J(\omega) = 2 \int_0^{\infty} G(\tau) \exp(-i\omega t) \quad (26)$$

2.3.5 Vztahy pro R_1 a R_2

Relaxační rychlosti R_1 a R_2 jsou zavedeny jako převrácené hodnoty konstant T_1 a T_2 , které získáme provedením experimentů blíže popsanych v části 2.4. O takto získaných R_1 a R_2 víme, že se skládají z příspěvků dipól-dipolové interakce s okolními jádry a anizotropie chemického stínění zkoumaného jádra podle vztahu

$$R_1 = \sum_i R_1^{DD} + R_1^{CSA} \quad (27)$$

$$R_2 = \sum_i R_2^{DD} + R_2^{CSA}, \quad (28)$$

kde index i v našem případě probíhá přes všechna jádra v relevantním okolí. Relevance okolí je dána faktorem $1/r^6$ vystupujícím R_1^{DD} resp. R_2^{DD} .

V případě relaxace dusíku ^{15}N ve vzorku s přirozeným zastoupením uhlíku ^{12}C se jedná jen o dipól-dipolovou interakci s přímo vázaným vodíkem.

V případě měření relaxací karbonylové skupiny jsme zahrnuli do příspěvků dipól-dipolové interakce ^{13}C s přímo vázaným dusíkem ^{15}N , amidickým

vodíkem H^N , uhlíkem C_α a na něj vázaným vodíkem H_α , uhlíkem C_β a dále ještě jádru C_α a H_α od vedlejšího rezidua.

Ve výpočtech byly použity následující parametry charakterizující vzorek; pokud není uvedeno jinak, hodnota převzata z článku [15]:

- anizotropie chemického posunu ^{15}N 165 ppm [13]
- anizotropie chemického posunu ^{13}C 137 ppm, získána jako průměrná hodnota dat uvedených v [14]
- délka vazby N-H: 0,102 nm [2]
- délka vazby C'-N: 0,132 nm [13]
- délka vazby C'- C_α : 0,151 nm
- délka vazby C'- H^N : 0,205 nm
- délka vazby C'- H_α : 0,212 nm
- délka vazby C' a C_α vedlejšího rezidua: 0,243 nm
- délka vazby C' a H_α vedlejšího rezidua: 0,276 nm, získáno jako průměrná hodnota délky této vazby v celém WT matrixovém proteinu M-PMV dle strukturního souboru z PDB [22]
- délka vazby C'- C_β : 0,249 nm.

Výsledkem Redfieldovy teorie jsou následující rovnice popisující závislosti relaxačních rychlostí na spektrální hustotě korelační funkce. Tyto vztahy se dále používají při fitování spektrálních hustot korelační funkce pomocí Lipari-Szabóova modelu (viz. 2.3.7). Uvedeme nyní jejich explicitní tvary pro oba relaxační mechanismy:

$$R_1^{DD} = \frac{1}{4}(DCC)^2 [J(\omega_X - \omega_C) + 3J(\omega_C) + 6J(\omega_X + \omega_C)] \quad (29)$$

$$R_2^{DD} = \frac{1}{4}(DCC)^2 [2J(0) + \frac{1}{2}J(\omega_X - \omega_C) + \frac{3}{2}J(\omega_C) + 3J(\omega_X) + 3J(\omega_X + \omega_C)] \quad (30)$$

$$DCC = \frac{\mu_0 \gamma_X \gamma_C \hbar}{8 \pi^2 r_{CX}^3} \quad (31)$$

DCC znamená *dipolar coupling constant* pro jádra ^{13}C a X, kde jádro X uvažujeme z blízkého okolí do 3 Å, která závisí na vzdálenosti r_{CX} interagujících jader, a univerzálních konstantách: μ_0 je permeabilita vakua, γ_X, γ_C jsou gyromagnetické poměry jader uhlíku ^{13}C a jádra X, h je Planckova konstanta. Vliv CSA na relaxaci lze odvodit ve tvaru:

$$R_1^{CSA} = \frac{1}{3}(\gamma_C B_0)^2 CSA_{eff}^2 J(\omega_C) \quad (32)$$

$$R_2^{CSA} = \frac{1}{3}(\gamma_C B_0)^2 CSA_{eff}^2 \left[\frac{2}{3}J(0) + \frac{1}{2}J(\omega_C) \right] \quad (33)$$

$$CSA_{eff} = |\Delta\delta| \sqrt{1 + \frac{\eta_{CSA}^2}{3}} \quad (34)$$

$$|\Delta\delta| = \delta_{zz} - \frac{\delta_{xx} + \delta_{yy}}{2} \quad (35)$$

$$\eta_{CSA} = \frac{3}{2} \frac{\delta_{xx} - \delta_{yy}}{\Delta\delta}, \quad (36)$$

kde B_0 je magnetická indukce, $\Delta\delta$ je anizotropie chemického posunu (CSA), η_{CSA} je asymetrie tenzoru chemického posunu.

V principu může docházet k interferenci jednotlivých relaxačních mechanismů, každá z rovnic (27), (28) by pak obsahovala ještě interferenční člen. V našich měřeních na ^{15}N značených vzorcích jsme interferenčním jevům zamezili v případě podélné relaxace vodíkovým decouplingem a případě příčné relaxace dostatečně častým invertováním vodíkové magnetizace pomocí 180° pulzů, které slouží jako efektivní decoupling [5].

2.3.6 Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

Pro jednoduchost uvažujme dvouspinový IS systém. Aplikujeme-li na jádro I slabé radiofrekvenční pole na Larmorově frekvenci po dostatečně dlouhou dobu, je možné dosáhnout značného navýšení podélné magnetizace spinu S. Pro intenzitu signálu za přítomnosti NOE platí vztah:

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_C}{\gamma_H} \right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_1^{DD} + R_1^{CSA}}. \quad (37)$$

Z teorie plyne, že výsledná NOE pro jádra dusíku ^{15}N při ozařování jader vodíku ^1H leží v intervalu $\langle -3,93; 0,783 \rangle$ [1].

2.3.7 Lipari-Szabóův přístup

V predešlých částech byly uvedeny vztahy mezi experimentálně naměřenými hodnotami T_1 a T_2 resp. relaxačními rychlostmi R_1 a R_2 a hustotu spektrální korelační funkce $J(\omega)$. Posledním krokem je předpis, který svazuje právě $J(\omega)$ s hledanými dynamickými parametry. Tento předpis nám poskytne Lipari-Szabó přístup [3]. Vychází se v něm z předpokladu, že je relaxace modulována jednak pohybem globálním izotropním a dále lokálním anizotropním. Tyto dva pohyby jsou považovány za statisticky nezávislé. Pohyb v tomto modelu charakterizujeme pomocí parametrů:

- τ_M korelační čas globálního pohybu
- τ_e korelační čas lokálního pohybu
- S^2 parametr uspořádanosti,

kde parametr uspořádanosti $0 < S^2 < 1$ nabývá hodnot 0 v případě neomezené fluktuace polohy a hodnot 1 v případě rigidní polohy zkoumaného spinu.

Za těchto předpokladů je potom tvar $J(\omega)$ dán součtem dvou Lorentzových křivek:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right] \quad (38)$$

$$\tau^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_e^{-1}. \quad (39)$$

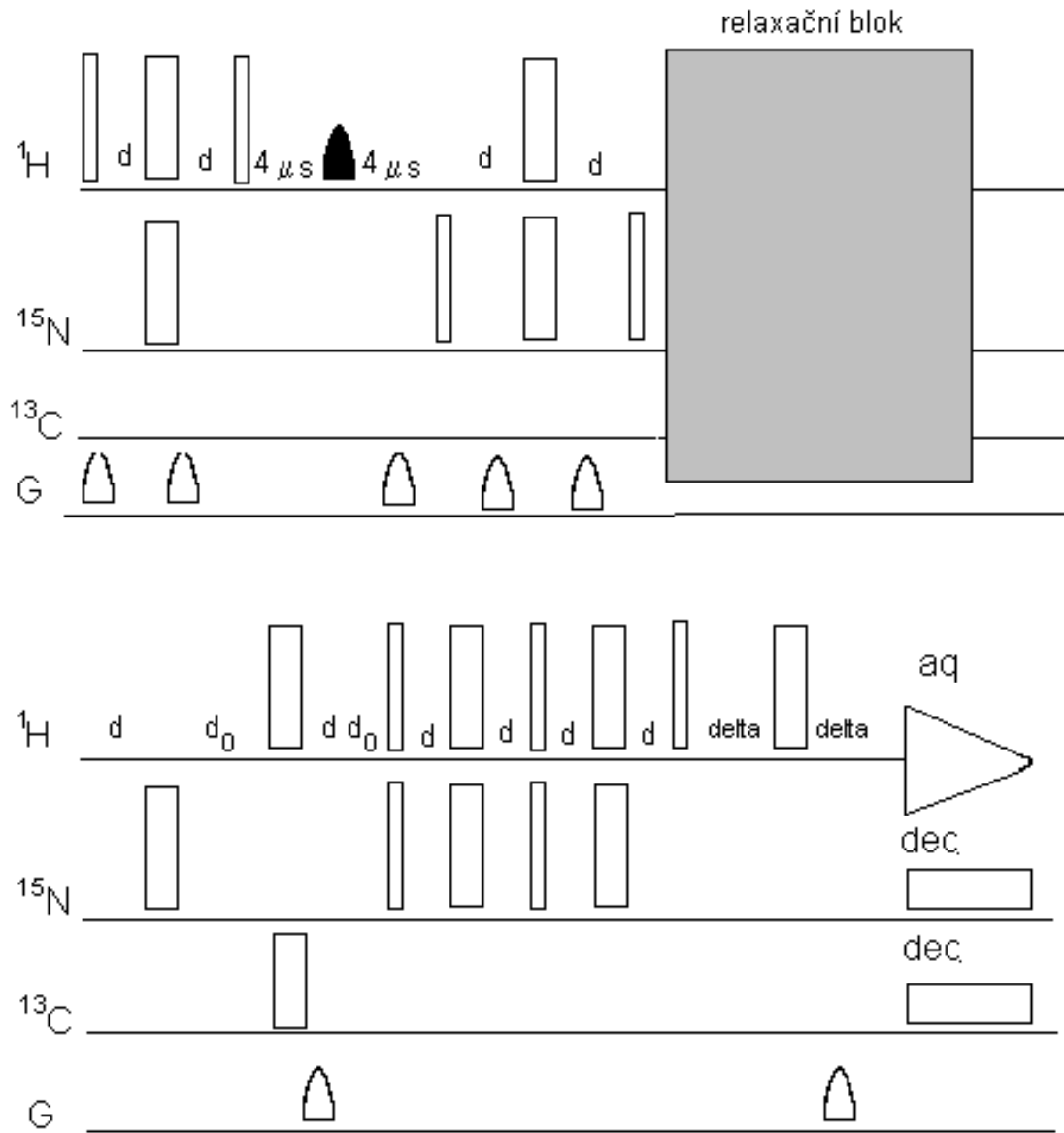
Existuje řada dalších pohybových modelů. Lipari-Szabóův model byl zvolen jako druhý nejjednodušší (po modelu izotropní reorientace koule), neboť umožňuje vypočítat vlastnosti lokálního a globálního pohybu pomocí malého počtu experimentálních parametrů. V našem případě to budou parametry T_1 , T_2 , NOE.

2.4 Pulzní sekvence pro studium dynamiky makromolekul

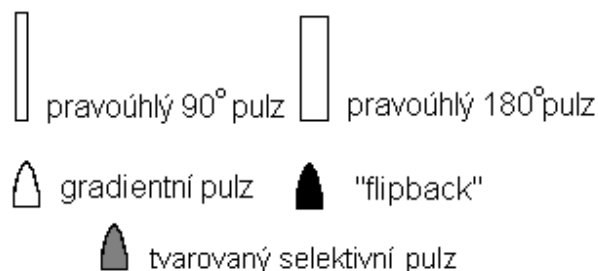
V této práci studujeme relaxaci T_1 a T_2 karbonylových ^{13}C i dusíku ^{15}N v peptidové rovině. Metodika měření dusíkových relaxací je v naší laboratoři dobře zvládnuta, proto zde jen stručně uvedeme základní popis sekvencí použitých na jejich měření. Optimalizovanou sekvenci pro měření karbonylů s jejím detailním popisem a diskuzí klíčových aspektů potom uvedeme v části (3.1.4).

2.4.1 Pulzní sekvence pro měření dusíkových relaxací ^{15}N značených vzorků

Z důvodu malé citlivost jader ^{15}N se měří heteronukleárně korelované experimenty s dvěma přenosy magnetizace. Nejprve jsme excitovali jádra vodíku, ze kterých jsme přenesli magnetizaci pomocí sekvence INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) na jádra dusíku, kde proběhl příslušný relaxační experiment. Na jeho konci následoval stejným způsobem zpětný přenos magnetizace na jádra ^1H , na kterých proběhla detekce. Tímto způsobem dojde v ideálním případě k zhruba desetinásobnému navýšení citlivosti experimentu oproti měření relaxací přímo na ^{15}N . Schéma sekvence je uvedeno v Obr. 2. Legenda ke schématu – viz. Obr. 3. Pulzní sekvence pro studium relaxačních dob T_1 a T_2 se liší pouze relaxačními bloky (viz. Obr. 4 a 5).



Obr. 2: Sekvence pro přenos magnetizace. $d = \frac{1}{4\pi J_{HN}}$, d_0 je vývojová perioda.



Obr. 3: obr Legenda

2.4.2 Měření T_1

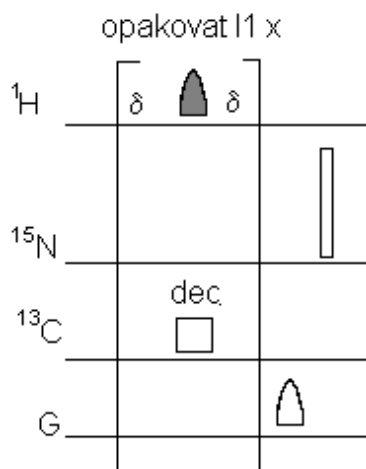
K měření podélné relaxace se využívá metoda Inversion Recovery. První 180° pulz s libovolnou fází překlopí magnetizaci $M(z)$ na $-M(z)$. Ta se nechá relaxovat po dobu t_r (směšovací čas), která je vstupním parametrem experimentu. Po jejím uplynutí následuje 90° pulz, který překlopí magnetizaci do příčné roviny, aby mohlo dojít k následné detekci.

V našich měřeních používáme modifikovanou sekvenci, ve které používáme dvou průchodů sekvencí. Při prvním průchodu je magnetizace na své maximální hodnotě ve směru $-z$, při druhém pak ve směru $+z$. Po odečtení (první - druhý) pozorujeme exponenciální pokles intenzity signálů, který začíná z dvojnásobné maximální intenzity. Změříme-li sadu spekter s různými směšovacími časy t_r , můžeme pak určit relaxační dobu T_1 fitováním vztahu:

$$I(t) = 2 I(0) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right), \quad (40)$$

kde $I(t)$ je intenzita signálu v čase t a $I(0)$ je intenzita signálu v prvním spektru. Schéma použitého relaxačního bloku je uvedeno na Obr. 4.

Směšovací čas používáme v poněkud zobecněném významu. Jedná se o proměnný čas v pulzní sekvenci během něhož dochází k vývoji a přenosu magnetizace, který se tímto měřením snažíme charakterizovat. V případě v průběhu směšovacího času dochází k relaxaci. Pokoušíme se tak obejít terminologickou podobnost pojmy jako relaxační čas, relaxační doba, relaxační perioda a pod.

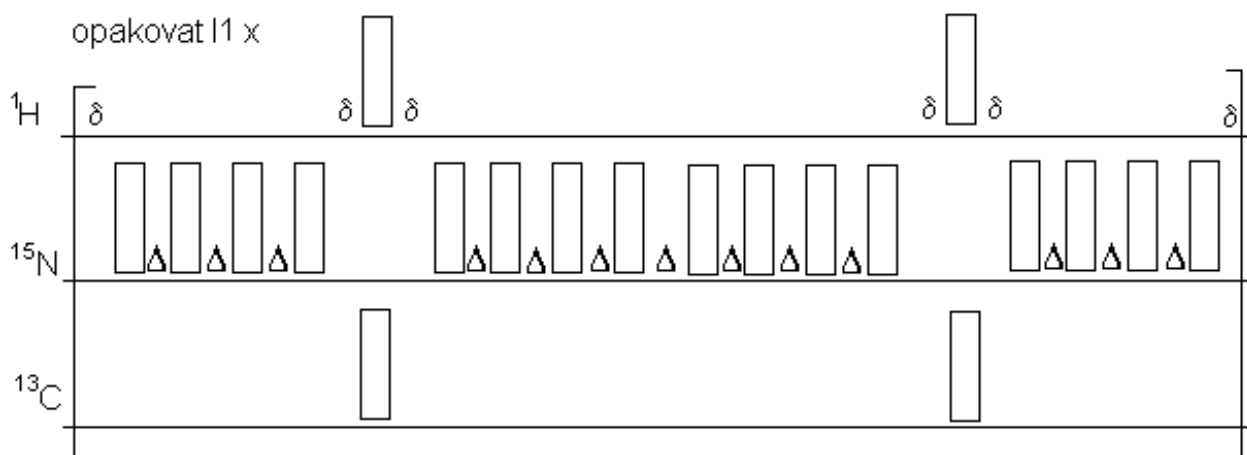
Obr. 4: obr Relaxační blok pro T₁. $\delta = 2\text{ ms}$

2.4.3 Měření T₂

Klíčovou roli v měření podélné relaxace hraje metoda spinového echa. Po sklopení magnetizace 90° pulzem do příčné roviny začne její vektor precedovat a rozfázovávat se důsledkem nehomogenit magnetického pole. Po uplynutí časového intervalu t_{echo} aplikujeme 180° pulz, který má za následek překlopení všech rozfázovaných spinů do opačné poloroviny (podle dělicí přímky procházející fází pulzu) a jejich následnou refokusaci po uplynutí t_{echo} . Takto se odstraní vliv nehomogenit pole, který představuje artefakt při měření T₂. K měření příčné relaxační doby se používá sekvence CPMG (Carr, Purcell, Meiboom, Gill - podle autorů sekvence), což je mnohonásobné spinové echo s konstantním echočasem t_{echo} [2] a proměnným počtem cyklů n , který určuje dobu, po kterou příčná magnetizace relaxuje. V našem případě jsme použili lehce modifikovanou CPMG sekvenci, ve které jsou protonové a uhlíkové 180° -pulzy zajišťují odstranění interference relaxačních mechanismů DD a CSA. Schéma relaxačního bloku je zobrazeno na Obr. 5. Pro určení T₂ je nutno

fitovat intenzitu signálu v závislosti na směřovacím čase t_r vztahem:

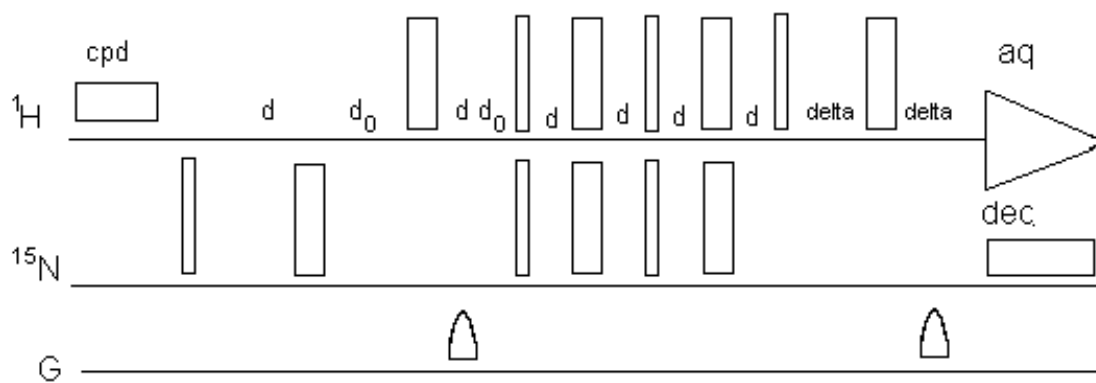
$$I(t) = I(0) \exp\left(-\frac{t}{T_2}\right). \quad (41)$$



Obr. 5: obr Relaxační blok pro T_2 . $\delta = 0.45 \text{ ms}$, $\Delta = 2 * \delta$. Převzato podle [5].

2.4.4 Měření NOE

K měření NOE jsme použili jednak sekvenci uvedenou na Obr.6 a jednak její modifikaci, která místo ozařovací periody *cpd* obsahovala stejně dlouhou prodlevu. Podíl takto získaných intenzit byl pak vynesena do grafu jako NOE navýšení a použit pro fitování v rámci Lipari-Szabóova modelu.



Obr. 6: obr Sekvence pro studium NOE. delta je 1,108 ms

2.5 Proteiny

2.5.1 Role a funkce proteinů

Proteiny jsou biomakromolekuly s klíčovou rolí pro existenci života. V organismech mají jednak strukturní, jednak pracovní funkci, jako například katalyzují chemické reakce (enzymy), podílejí se na membránovém a vnitrobuněčném transportu, energetickém metabolismu buňky, řídí průběh buněčných cyklů a procesů, dále mají funkci zásobní, imunitní a mnoho dalších.

2.5.2 Popis struktury proteinu

Základními stavebními kameny proteinů jsou aminokyseliny. Spojením dvou aminokyselin na karboxylovém konci jedné a amino konci druhé za současného odštěpení H_2O vznikne peptidová vazba. Navázáním velkého množství aminokyselin vznikne polypeptid neboli protein. Páteří proteinu chápeme po sobě následující peptidové vazby.

K popisu struktury proteinů se využívají čtyři následující úrovně popisu :

1. Primární - pořadí jednotlivých aminokyselin.
2. Sekundární - popis lokálních strukturních motivů. Rozlišujeme pravidelné motivy jako α helix, paralelní či antiparalelní β list, části ohybové a části nepravidelné. U pravidelných struktur se při jejich stabilizaci uplatňují především vodíkové můstky.
3. Terciální - globální uspořádání. Celková konformace polypeptidového řetězce.
4. Kvarterní - interakce a uspořádání polypeptidových řetězců.

2.6 Mason-Pfizerův opičí virus

Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) je retrovirus patřící do skupiny lenti-virů. Jeho genetická informace je uchována ve formě RNA, která musí být

z hlediska virové reprodukce přepsána do DNA. Z tohoto důvodu patří M-PMV do rodiny retrovirů. Poprvé byl izolován z nádoru samice makaka, nejeví však překvapivě známky onkogenity, infikovaní makakové trpí silným selháním imunitního systému [4].

2.6.1 Genom retrovirů

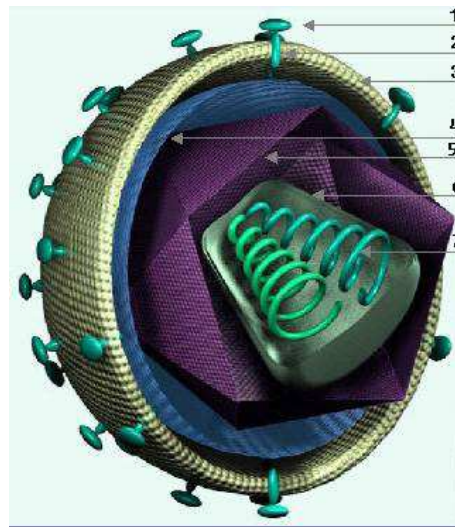
Genom retrovirů se obecně skládá ze tří částí nazývaných *gag*, *env* a *pol*, kódujících proteiny pro jeho správnou funkci. Část *gag* kóduje polyprotein Gag velikosti 78 kDa, který je prekurzorem strukturálních komponent virového jádra (proteiny p10, pp16–18, p12, p27 a p4). Protein p10 je podle analogické pozice v ostatních retrovirových genomech a podle toho, že je myristoylován, nazýván matrixový protein [9]. Gen *pol* obsahuje proteiny klíčové pro průběh replikace a *env* kóduje usnadňující navázání viru na stěnu napadené buňky.

2.6.2 Morfologie retroviru

Obal retroviru je kulového tvaru velikosti cca 100 nm a je tvořen fosfolipidovou jednovrstevnou membránou, která pochází z hostitelské buňky. V ní jsou zakotveny dva druhy transmembránových proteinů (povrchový a transmembránový glykoprotein). Uvnitř virové částice se dále vyskytuje matrixový protein, který chrání obsah jádra, a kapsidový protein, který tvoří jádro virální kapsidy. Uvnitř kapsidy se nachází nukleokapsidový protein v komplexu s RNA a virálními enzymy (např. reverzní transkriptázou a virovou integrázou), viz. Obr. 7, [11].

2.6.3 Životní cyklus retroviru

Na začátku se virová částice přiblíží k povrchu buňky. Infekce začne ve chvíli, kdy se transmembránové proteiny na povrchu viru specificky naváží na receptory na hostitelské buňce. Následuje splynutí virové a buněčné membrány,



Obr. 7: Morfologie retrovirové částice. 1 – povrchový glykoprotein, 2 – transmembránový glykoprotein, 3 – obálka viru, 4 – matrixový protein, 5 – kapsidový protein, 6 – nukleokapsidový protein, 7 – genom a enzymy uvnitř kapsidy.

což má za následek inzerci vnitřku kapsidy, tj RNA a virálních proteinů, jako reverzní transkriptáza, do cytoplasmatického prostoru. Následuje přepis RNA do formy jednovláknové a posléze dvouvláknové DNA, která je přenesena do buněčného jádra, kde je sledem několika reakcí katalyzovaných virovou integrázou integrována do genomu hostitelské buňky. Genom viru se tak stává plnohodnotnou součástí genetické informace hostitelské buňky. K transkripci dochází pomocí standartních buněčných mechanismů. Transkribovaná RNA potom slouží jednak jako mRNA kódující virové proteiny, a jednak jako genomová RNA pro další generaci virových částic. Translace polyproteinu kódovaného částí *gag* probíhá na ribozomech volně umístěných v cytoplazmě. Nasyntetizované části virové kapsidy se pak skládají podle typu retroviru buď na membráně hostitelské buňky (typ C), nebo již v cytoplazmě (typ D). M-PMV ve své přirozené formě patří k typu D.

2.7 Matrixový protein

Matrixový protein (MA) se nachází těsně pod virovou obálkou, k níž se může pevně vázat (viz. dále). Role matrixového proteinu při formování virové kapsidy je trojí (viz. [9]):

- správné sbalení proteinů kódovaných genem *gag*
- transport zformované kapsidy k plazmatické membráně
- asociace kapsidy s membránou a protržení plazmatické membrány během pučení nové virové částice

MA je posttranslačně upravován přidáním kyseliny myristové k N-konci. Právě myristoylace je jeden z klíčových parametrů ovlivňujících průběh životního cyklu. Odstranění myristoylové skupiny z N konce má u M-PMV velmi závažný důsledek: dochází sice ke správnému sbalení virových kapsid v cytoplazmě, ty však nejsou schopny správného transportu k buněčné membráně. Kapsidy se kumulují v cytoplazmě a nebyly pozorovány žádné viriony, které by opustily hostitelskou buňku.

Oblastí našeho zájmu je úsek mezi 40.-50. reziduem, o kterém se předpokládá, že je na něm sekvence CTRS (cytoplasmatic tagrating retention signal) odpovědná za vazbu na molekulární motor. Předpokládá se, že se vlivem mutace změní dynamika sekvence a ta stane nepřístupnou vazbě na molekulární motor.

2.7.1 Přirozená forma M-PMV MA

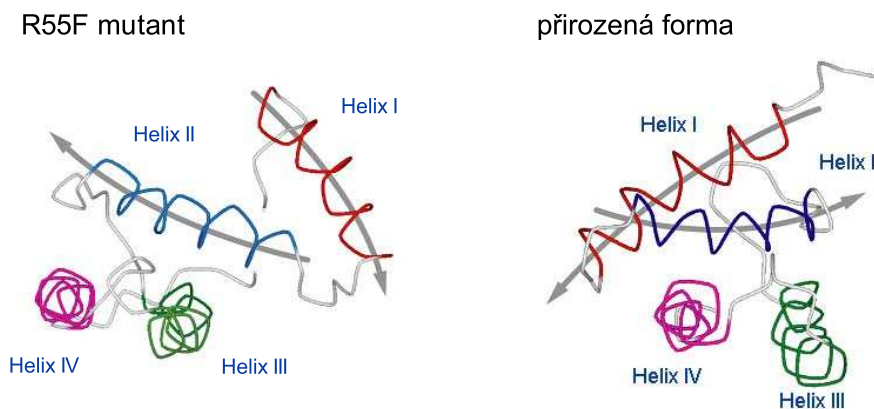
Struktura přirozené formy M-PMV MA (wild type, WT) je helikální, jak bylo určeno pomocí NMR spektroskopie. První helix sahá od residua 6 ke 23, druhý 29–42, třetí od 53–69 a čtvrtý od 77–94.

2.7.2 R55F Mutant M-PMV

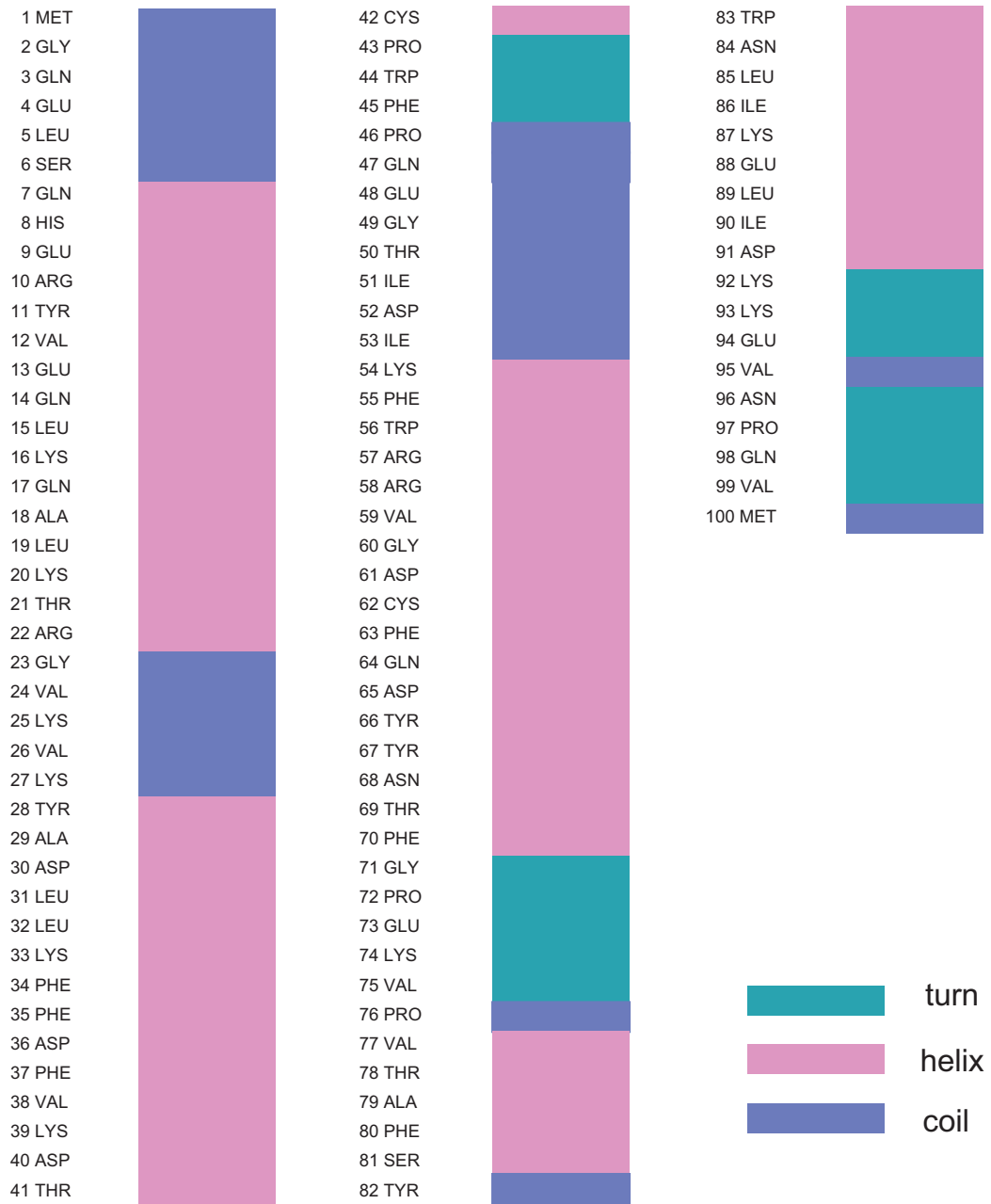
Bylo prokázáno, že jediná substituce, na pozici 55 matrixového proteinu, v podobě výměny argininu za fenylalanin, vede ke změně typu skládání kapsidy z typu C na typ D. Stejného efektu lze dosáhnout i výměnou za tryptofan [12] nicméně dle [10] za jistých okolností umí R55W skládat v cytoplasmě. Schéma sekundární struktury je zobrazeno na Obr. 9.

2.7.3 Srovnání matrixových proteinů

U obou proteinů byla objasněna jejich terciální struktura, která je vyobrazena na Obr. 8. Jednotlivé helikální domény jsou barevně odlišeny. Vidíme, že bodová mutace způsobila především překlopení oblastí Helix I a Helix II do opačného směru.



Obr. 8: Srovnání terciální struktury MA WT a R55F



Obr. 9: Pořadí aminokyselin a sekundární struktura MA R55F M-PMV

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Vzorky proteinů

Za účelem srovnání dynamických vlastností přirozené a mutované formy matrixového M-PMV proteinu byly metodami molekulární biologie exprimovány proteiny uniformě značené ^{15}N a dvojitě ^{15}N , ^{13}C .

Gen polyproteinu *Gag* byl vnesen do komerčně dostupného vektoru pGEMEX a následně exprimován v bakteriích *E. coli*. K vlastnímu genomu byl přidán úsek kódující šest histidinů (tzv. histidinová kotva), který je pak použit při metaloafinitní chromatografii při čištění fúzního proteinu. Vlastní MA byl pak získán z fúzního proteinu specifickým štěpením M-PMV proteázou. Protein byl dále čištěn a zakoncentrován na výslednou koncentraci asi 1 mM, která je dostatečná pro NMR měření. Příprava vzorku byla provedena Janem Prchalem na oddělení Biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Oba proteiny mají shodnou hmotnost 10 kDa.

Optimalizace obou pulzních sekvencí uvedených v části (2.4) proběhla na vzorku ubiquitinu o 8 mM koncentraci. Tento vzorek byl dvojitě značen uhlíkem ^{13}C a dusíkem ^{15}N . Molekulární hmotnost ubiquitinu je 8 kDa.

3.1.2 Spektrometr NMR

Experimenty byly prováděny na spektrometru Avance 500 firmy Bruker. Pro měření proteinových vzorků byla použita sonda TBI s možností ozařovat ^1H , ^{15}N a ^{13}C optimalizovaná pro detekci ^1H . Pracovní frekvence spektrometru

byla 500,132 MHz pro jádra ^1H , 125,765 MHz pro ^{13}C a 50,684 MHz pro ^{15}N . Měření proběhla za pokojové teploty 298 K.

3.1.3 Parametry pulzních sekvencí pro měření dusíkových relaxací v ^{15}N značených proteinech

Parametry pulzních sekvencí pro měření dusíkových relaxací jsou uvedeny v následujícím seznamu:

- vodíkový 90° pulz: $9,8 \mu\text{s}$; výkon 6 dB
- dusíkový 90° pulz: $17,6 \mu\text{s}$; výkon -2 dB
- tvarovaný selektivní vodíkový pulz: 1,5 ms, výkon 28 dB, gaussovský tvar
- “flipback” na magnetizaci vody 5,4 ms, útlum 42 dB, tvar iburp
- gradientní pulz: 0,8 ms, výkon 18 dB
- spektrální šířka: 7003 Hz (F2), 1520 Hz (F1)
- délka akvizice: 0,146 s
- počet scanů: 64
- digitalizace: 2048 bodů (F2), 200 bodů (F1)
- doba d: 2,747 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91 \text{ Hz}$
- doba delta: 1,108 ms
- doba δ : 2 ms
- délka měření série 8 T_1 spekter s proměnným l_1 byla asi 2 dny 16 hodin
- délka měření série 7 T_2 spekter s proměnným l_1 byla asi 2 dny 5 hodin
- délka ozařovací periody cpd: 8 s (NOE experiment)
- délka měření dvou spekter s NOE a bez NOE byla asi 2 dny

V následující tabulce jsou uvedeny délky směřovacích časů v relaxačních experimentech výše uvedených sekvencí.

experiment	1	2	3	4	5	6	7	8
t_r pro T_1 [ms]	12,1	23,1	45,1	89,1	177,1	353,1	705,1	1409,1
t_r pro T_2 [ms]	14,44	28,88	43,32	86,65	115,69	177,30	288,84	

Tab. 1: Délky směřovacích časů t_r pro T_1 a T_2 experimenty

3.1.4 Optimalizovaná pulzní sekvence pro měření ^{13}C karbonylových relaxací ^{15}N , ^{13}C značených vzorků

Pro měření karbonylových relaxací jsme použili sekvenci zobrazenou na Obr. 10, konkrétně je zobrazen případ měření T_1 . Její prototyp nám poskytla Luisa Poggi z Univerzity ve Florencii, která čerpala z [7] a [8]. Jedná se HSQC (heteronukleární přenos jednokvantové koherence) typ sekvence [1]. V preparační fázi se přenáší magnetizace z protonů přes amidické dusíky na karbonyly pomocí dvou INEPT bloků [1]. Následuje relaxační blok a blok vývoje chemického posunu. Poté je zrelaxovaná a ^{13}C frekvenčně značená magnetizace přenesena přes dusíky zpět k protonům, kde proběhne akvizice dat.

V případě měření T_1 relaxace je před relaxačním blokem cca 30 ms refokusační blok (v důsledku $J_{CH} = 15$ Hz), během kterého se vzniká $-C_x$ z antifázového členu $2N_zC_y$. Potom následuje 90° pulz, který sklopí magnetizaci paralelně s polem a připraví ji na relaxační experiment. Doba setrvání magnetizace v příčné rovině je pro některá rezidua srovnatelná s T_2 , což má negativní důsledky na intenzitu signálu a rozlišení spekter. Schéma relaxačního bloku je stejné jako u dusíkových měření. Používáme dva průchody relaxačním blokem, v prvním je na začátku magnetizace ve stavu C_z , v druhém ve stavu $-C_z$ a nechá se v obou případech dobu směšovacího času t_r . Po odečtení experimentů (první - druhý) získáme exponenciální pokles daný (40).

V Tab. 2 jsou uvedeny délky relaxačních dob pro T_1 experimenty.

experiment	1	2	3	4	5	6	7	8
t_r [ms]	2	4	8	20	50	100	250	600

Tab. 2: Délka směšovacího času t_r pro měření T_1 relaxací

U měření T_2 je situace komplikovanější. Na konci druhého INEPTu je magnetizace ve stavu $-2N_zC_y$. Abychom ušetřili čas potřebný na refokusaci, budeme měřit relaxaci právě této antifázové magnetizace. Relaxaci členu C_y

potom dopočteme pomocí rovnice (42)

$$R_{C_y} = R_{2N_z C_y} - R_{N_z}, \quad (42)$$

kde R_{N_z} použijeme z měření podélných relaxačních dob, resp. rychlostí na ^{15}N značených proteinech. Relaxační blok je realizován pomocí pulzní série CPMG s $t_{echo} = 450\mu\text{s}$. Roli 180° pulzu hraje speciální tvarovaný pulz **reburp**, který selektivně působí jen na CO. Oproti sekvenci použité na měření dusíkových příčných relaxací zde nejsou přítomny pulzy na potlačení kroskorelačních efektů. V případě vodíku se to dá ospravedlnit jeho vzdáleností od C'. Naopak při použití pulzu na uhlík C_α hrozí nebezpečí, že by mohlo dojít k ovlivnění C' (tzv. Bloch-Siegortovy posuny).

V Tab. 3 jsou uvedeny délky směšovacíh časů pro T_2 experimenty.

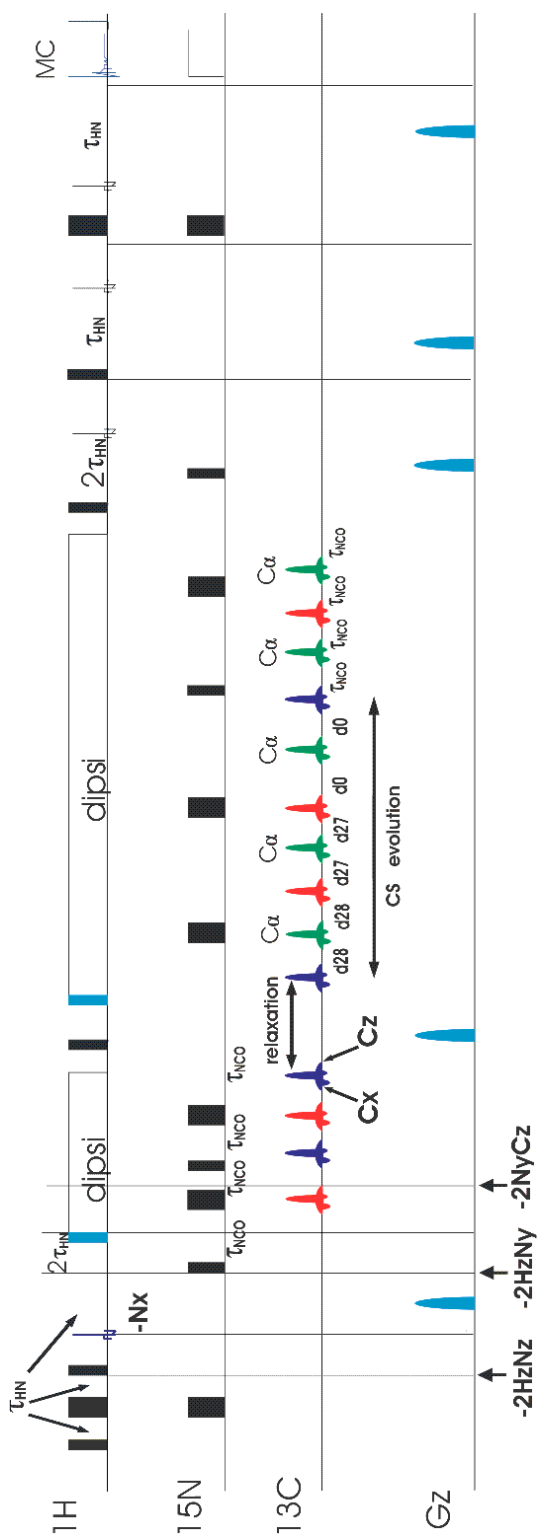
experiment	1	2	3	4	5	6	7	8	9
počet smyček	1	2	4	8	12	16	32	64	128
t_r [ms]	0,9	1,8	3,6	7,2	10,8	14,4	28,8	57,6	115,2

Tab. 3: Délka směšovacíh časů t_r pro T_2 relaxační experimenty

Blok vývoje chemického posunu je z důvodu zvýšení rozlišení uhlíkové domény realizován pomocí semi-constant timu. Potom je magnetizace přenesena dvěma INEPT bloky a následuje blok Watergate [2] pro potlačení signálu vody a akvizice na vodíkovém kanále. Během ní běží na dusíkovém kanále decoupling.

Parametry pulzních sekvencí pro měření karbonylových relaxací jsou uvedeny v následujícím seznamu

- spektrální šířka: 7003 Hz (F2)
- spektrální šířka: 1887 Hz (F1)
- délka akvizice: 0.146 s
- akviziční mód: States-TPPI
- digitalizace: 2048 bodů (F2), 180 bodů (F1)
- počet scanů: 128



Obr. 10: Ukázka použité pulzní sekvence pro měření karbonylových relaxačních konstant T_1 , červený pulz je 90° na C' , tmavě modrý pulz je 180° na C' , zelený pulz je 90° na C_α , vysoký světle modrý pulz je gradientní, černé obdelníkové pulzy jsou 90° nebo 180° dle šířky, modrý čárový pulz je flipback, bílé dlouhé obdelníkové pulzy jsou decouplingy

- vodíkový tvrdý pulz 90° : $11,6 \mu\text{s}$, výkon 6 dB
- vodíkový tvrdý pulz 180° : $20 \mu\text{s}$, výkon 6 dB
- C_α 90° selektivní pulz: tvar G3.256, $268 \mu\text{s}$, výkon 2,9 dB
- CO selektivní 90° pulz: tvar G3.256, $268 \mu\text{s}$, výkon 2,9 dB
- CO selektivní 180° pulz: tvar G4.256, $400 \mu\text{s}$, výkon 4,1 dB
- dusíkový tvrdý pulz 90° : $27 \mu\text{s}$, výkon -2 dB
- dusíkový tvrdý pulz 180° : $54 \mu\text{s}$, výkon -2 dB
- flipback na vodu: tvar Sinc1.1000; $1000 \mu\text{s}$, výkon 41,2 dB
- gradientní pulz: $1000 \mu\text{s}$
- doba odpovídající J_{NH} : $d=2.747 \text{ ms}$
- doba odpovídající J_{NCO} : $d=16.5 \text{ ms}$
- decoupling vodíků: dipsi, pulzy 90° : $100 \mu\text{s}$, výkon 24,2 dB
- decoupling dusíků: garp, pulzy 90° : $180 \mu\text{s}$, výkon 14,6 dB
- reburb pulz v relaxačním bloku pro měření T_2 : $480 \mu\text{s}$, výkon 3,1 dB
- delay v relaxačním bloku T_2 $450 \mu\text{s}$

3.1.5 Analýza spekter

Spektra byla změřena pomocí ovládacího programu Topspin 1.3 [16], k jejich analýze však bylo použito dalších programů. Ke zpracování spekter byl použit program NMRPipe [17] s následujícím nastavením pro dusíkové i karbonylové experimenty:

- Fourierova transformace obou domén
- apodizace: cosine-bell
- doplnění 1024 nulami v nepřímé doméně
- automatické doplnění nulami v přímé doméně
- korekce baseline: polynom 4. řádu
- lineární predikce 6. řádu v přímé doméně.

Spektra byla následně manuálně zpracována v programu NMRDraw [20]. V posledním kroku byla spektra přiřazena a integrována v programu NMRView [18]. Pro integraci byla zvolená oblast tvaru elipsy.

K přiřazení ^{15}N , ^1H korelovaných spekter obou proteinů byly použity soubory chemických posunů z PDB (Protein Data Bank) [22]. V některých případech se na pozicích daných strukturním souborem však nevyskytoval žádný signál, proto zůstala některá rezidua nepřirážena. Počty ve spektrech nalezených reziduí shrnuje Tab. 4.

protein	T_1	T_2	NOE
WT ^{15}N	90	91	87
R55F ^{15}N	90	89	83

Tab. 4: Počet nalezených reziduí dusíkových signálů u ^{15}N značených vzorků.

K přiřazení karbonylových rezonancí u ^{13}C , ^1H korelovaných spekter případě dvojité značených proteinů bylo možno využít souboru chemických posunů pouze u vzorku WT. Pro R55F totiž v jeho souboru nejsou frekvence karbonylů. Z tohoto důvodu jsme změřili 3D HNC(O) experiment [2]. Pulzní sekvence takového experimentu je podobná sekvenci na Obr. 10. Obsahuje navíc blok s vývojem chemického posunu pro dusíková jádra a postrádá relaxační blok. Toto 3D spektrum bylo použito pro přiřazení ^{13}C rezonancí, které jsme provedli ve spolupráci s Ing. Jiřím Vlachem z Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Celkem se nám podařilo doplnit soubor chemických posunů o 82 karbonylových ^{13}C signálů. Počty nalezených reziduí jsou uvedeny v Tab. 5.

protein	T_1	T_2
WT ^{15}N , ^{13}C	70	73
R55F ^{15}N , ^{13}C	53	56

Tab. 5: Počet přiřazených karbonylových signálů u ^{15}N , ^{13}C značených vzorků.

3.1.6 Určení T_1 , T_2 a NOE ze změřených spekter

Hodnoty T_1 a T_2 jsme fitovali vztahy 40, 41 v prostředí programu NMRView ze závislosti hodnot integrálních intenzit peaků na směšovacím čase. Pro dynamický model jsme museli vyřadit některá rezidua z následujících důvodů:

- pokles intenzity se výrazně lišil od exponenciálního
- fitované hodnoty či jejich chyby nabývaly nefyzikálních hodnot

Počty určených T_1 , T_2 a NOE jsou shrnuty v Tab. 6.

protein	T_1	T_2	NOE	protein	T_1	T_2
WT ^{15}N	89	89	87	WT ^{15}N , ^{13}C	55	62
R55F ^{15}N	89	88	83	R55F ^{15}N , ^{13}C	45	46

Tab. 6: Počty určených dusíkových a karbonylových T_1 , T_2 a NOE v obou typech proteinů.

3.1.7 Analýza dynamiky proteinů pomocí Lipari-Szabóova přístupu

Analýza dynamiky proteinů byla provedena s využitím programu LS Anals [21]. Vstupními daty byly T_1 , T_2 a NOE, ze kterých program vypočetl parametry Lipari-Szabóova modelu. Hodnoty T_1 , T_2 , NOE byly na vstupu ohodnoceny váhovými koeficienty s ohledem na kvalitu příslušného experimentu. Pro některá rezidua nebyly zadány všechny vstupní hodnoty. Výstupem programu je potom globální korelační čas τ_M molekuly a hodnoty parametrů uspořádanosti S^2 a lokální korelační čas τ_e jednotlivých reziduí. Chyba těchto parametrů je určena Monte-Carlo simulacemi v rámci směrodatné odchylky dané experimentálními daty.

Pro přehlednost jsou všechny hodnoty S^2 od ^{13}C karbonylů jsou číslovány stejným číslem, jaké má dusík ^{15}N , který se na ně váže.

3.2 Výsledky a diskuze

Analýzou spekter byly nalezeny hodnoty relaxačních konstant T_1 , T_2 a navýšení NOE pro zkoumané proteiny. Při zkoumání relaxací a dynamiky je vhodné přejít k popisu pomocí relaxačních rychlostí R_1 , R_2 . V následujících částech bude kvalitativně diskutována korelace relaxačních dat se strukturou. V části 3.1.7 bude popsána kvantitativní analýza s využitím Lipari-Szabóova pohybového modelu.

Za účelem lepší orientace ve výsledcích zavedeme značení oblastí proteinu, které budeme zkoumat. Jedná se o protein jako celek (**protein**), helikální oblast 1-4 (**H1-H4**), nepravidelné struktury jako turn, coil (**neprav. str.**) a konce proteinových řetězců (**okraj**).

Pro přehlednost jsou všechny hodnoty R_1 , R_2 ^{13}C karbonylů jsou číslovány stejným číslem, jaké má dusík ^{15}N , který se na ně váže.

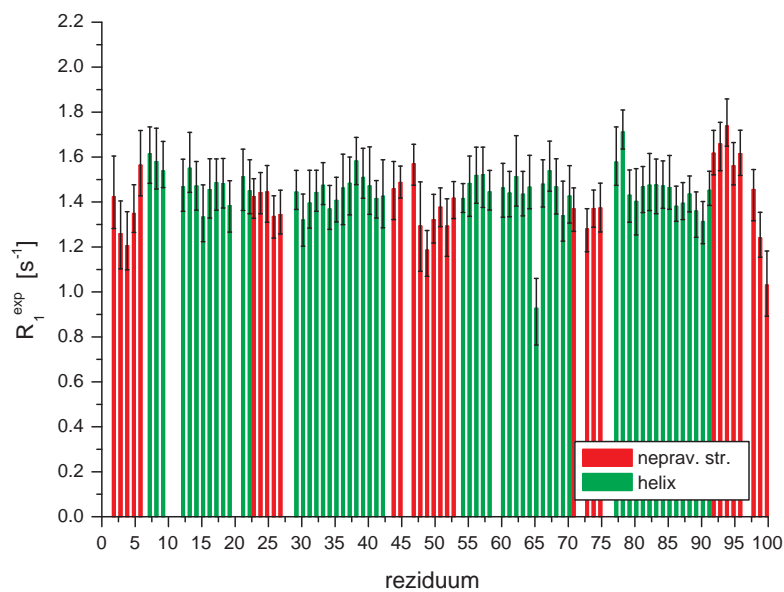
3.2.1 ^{15}N relaxace na přirozené formě matrixového proteinu M-PMV

Výsledky analýzy z části (3.1.5) pro přirozenou formu dusíkem ^{15}N značeného matrixového proteinu M-PMV viru jsou uvedeny v grafech na Obr. 11, 12 a 13.

Většina hodnot podélných rychlostí, viz. graf na Obr. 11, se pohybuje v rozmezí $\pm 25\%$ od průměrné hodnoty $R_1 = 1,43$. V helikálních oblastech jsou rychlosti nejvyšší, což odpovídá představě o rigiditě helikální struktury [2]. Zajímavé je reziduum 65 uprostřed třetího helixu, jehož hodnota $R_1 = 0,92$ je nejnižší v celém proteinu. V oblasti našeho zájmu, tj. mezi 40. a 50. reziduem, sledujeme uniformní chování hodnot R_1 . Začátek a konec proteinového řetězce se hodnotami příliš neliší od jiných částí proteinu. Velikost relaxačních rychlostí pro různé části proteinu je uvedena v Tab. 7.

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
\overline{R}_1 [s^{-1}]	1.43	1.49	1.44	1.43	1.45	1.40	1.43

Tab. 7: Průměrné hodnoty ^{15}N dusíkových podélných relaxačních rychlostí \overline{R}_1 v různých částech proteinu WT.

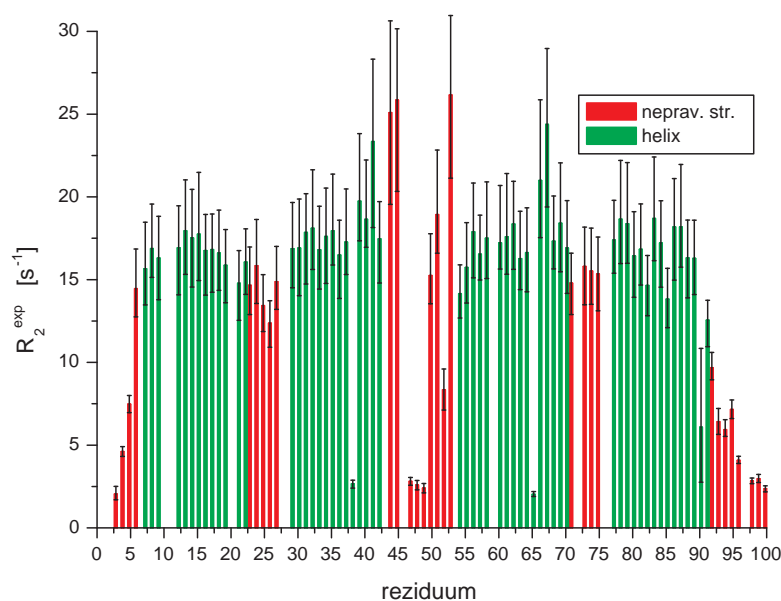


Obr. 11: Hodnoty dusíkových rychlostních konstant R_1 v ^{15}N značeném proteinu WT.

Příčné relaxační rychlosti R_2 vykazují mnohem větší rozptyl hodnot od 2 do 25 s^{-1} . Oba konce proteinového řetězce jsou velice pohyblivé, srovnatelné pohyblivosti dosahuje také oblast kolem rezidua 47. Naopak kolem této oblasti se i neuspořádané části sekundární struktury jeví značně rigidní v podobné míře jako helixy. Průměrné hodnoty $\overline{R_2}$ [s^{-1}] jsou uvedeny v následující Tab. 8.

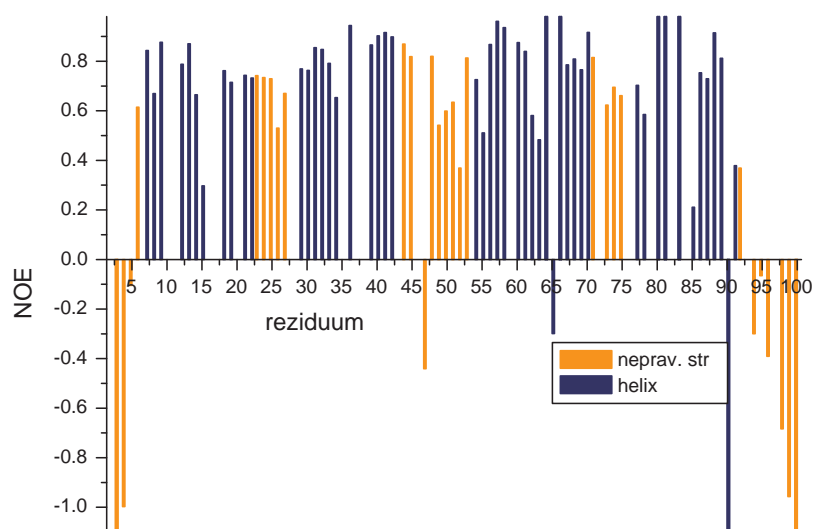
oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str	okraj
$\overline{R_2}$ [s^{-1}]	14,7	16,6	17,0	16,7	16,0	11,0	6,9

Tab. 8: Průměrné hodnoty ^{15}N příčných relaxačních rychlostí $\overline{R_2}$ v různých částech MA WT.



Obr. 12: Hodnoty dusíkových rychlostních konstant R_2 v ^{15}N značeném proteinu WT.

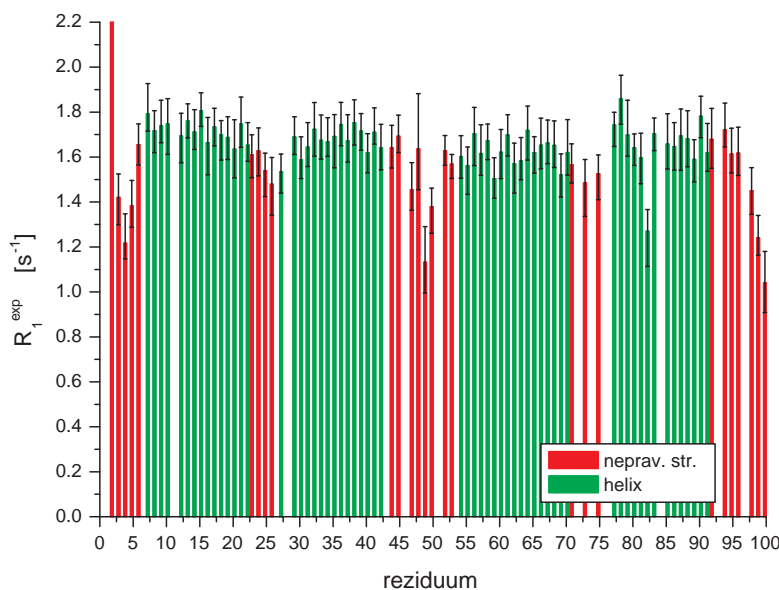
Spektra NOE mají špatný poměr signál/šum. Teoretické hodnoty, kterých může NOE nabývat, jsou v intervalu $\langle -3, 93; 0, 783 \rangle$, nicméně z grafu na Obr. 13 je vidět, že zhruba v polovině případů hodnoty překračují horní mez teoretického intervalu, což dává představu o jejich vypovídací hodnotě a velikosti experimentální chyby $\sigma_{NOE} = \pm 0,1$.



Obr. 13: Hodnoty navýšení NOE mezi H^N a ^{15}N v proteinu WT M-PMV.

3.2.2 ^{15}N relaxace na mutované formě matrixového proteinu M-PMV

Stejnou analýzu jsme provedli pro mutovanou formu dusíkem ^{15}N značeného matrixového proteinu M-PMV viru, výsledky jsou uvedeny v grafech na Obr. 14, 15 a 16.



Obr. 14: Hodnoty dusíkových rychlostních konstant R_1 v ^{15}N značeném R55F proteinu.

Hodnoty podélných relaxačních rychlostí jsou u mutované formy proteinu menší o cca $0,2 \text{ s}^{-1}$, než hodnoty u formy přirozené nicméně jejich chování jeví téměř totožné rysy. Orientační srovnání průměrných hodnot \bar{R}_1 v různých částech proteinu je shrnuto v Tab. 9 společně s hodnotami WT formy.

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
$\bar{R}_1^{R55F} [\text{s}^{-1}]$	1,61	1,72	1,67	1,62	1,66	1,50	1,45
$\bar{R}_1^{WT} [\text{s}^{-1}]$	1.43	1.49	1.44	1.43	1.45	1.40	1.43

Tab. 9: Průměrné hodnoty ^{15}N dusíkových podélných relaxačních rychlostí \bar{R}_1 v různých částech proteinu R55F a WT.

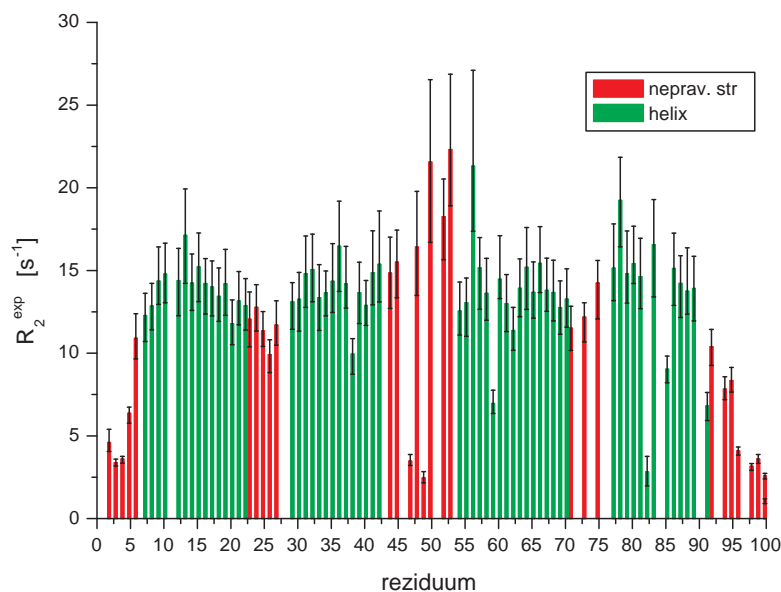
Helikální struktury jsou rigidnější a hodnoty \bar{R}_1 na nich jsou vyšší než

na nepravidelných strukturách či okrajích. Jedinou výjimkou je reziduum 65, které se u přirozené formy výrazně odlišuje od okolních hodnot ve třetím helixu, zatímco u formy mutované se nijak výrazně neliší.

Hodnoty příčných relaxačních rychlostí v mutovaném proteinu, viz Obr. 15, vykazují stále značnou podobnost s hodnotami přirozené formy, nicméně je zde již mnohem více odlišností než u rychlostí podélných. Příkladem je zhruba šestinásobné zvýšení relaxační rychlosti rezidua 47. Výrazný nárůst hodnot R_2 je patrný také u rezidua 37 a 65. Naopak pokles hodnot R_2 je vidět u rezidua 82. Orientační srovnání hodnot \bar{R}_2 je uvedeno v Tab. 10. Srovnáním v Tab. 10 je vidět, že průměrná hodnota \bar{R}_2 v celém proteinu i jeho jednotlivých částech je vyšší u přirozené formy, nejvýrazněji se změna projevila v helikálních oblastech.

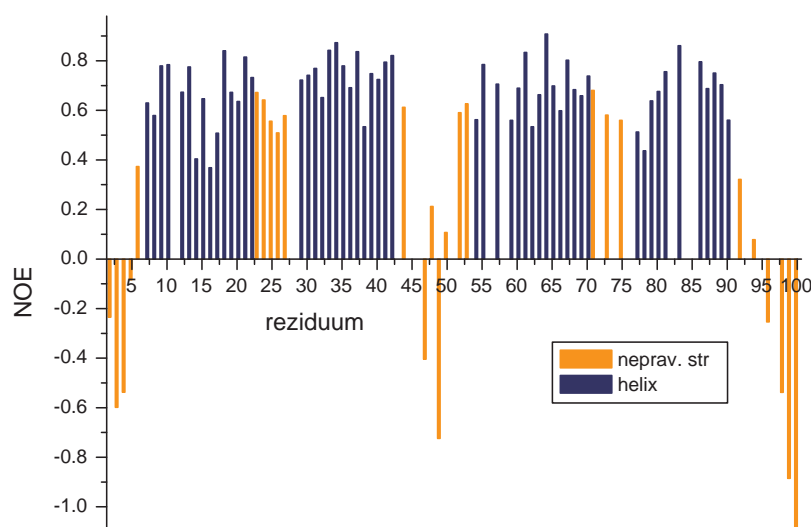
oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
$\bar{R}_2^{R55F} [s^{-1}]$	12,5	13,9	13,9	13,7	13,2	10,0	5,7
$\bar{R}_2^{WT} [s^{-1}]$	14,7	16,6	17,0	16,7	16,0	11,0	6,9

Tab. 10: Průměrné hodnoty ^{15}N dusíkových příčných relaxačních rychlostí \bar{R}_2 v různých částech proteinu WT a R55F.



Obr. 15: Hodnoty dusíkových rychlostních konstant R_2 v ^{15}N značeném proteinu R55F M-PMV.

Také NOE spektra mutovaného proteinu mají špatný poměr signál/šum a opět zhruba v polovině případů hodnoty překračují horní mez teoretického intervalu. Jejich chyba je podobná jako u přirozené formy proteinu. V porovnání s ní formy vidíme výraznou změnu NOE především v oblasti kolem rezidua 47.



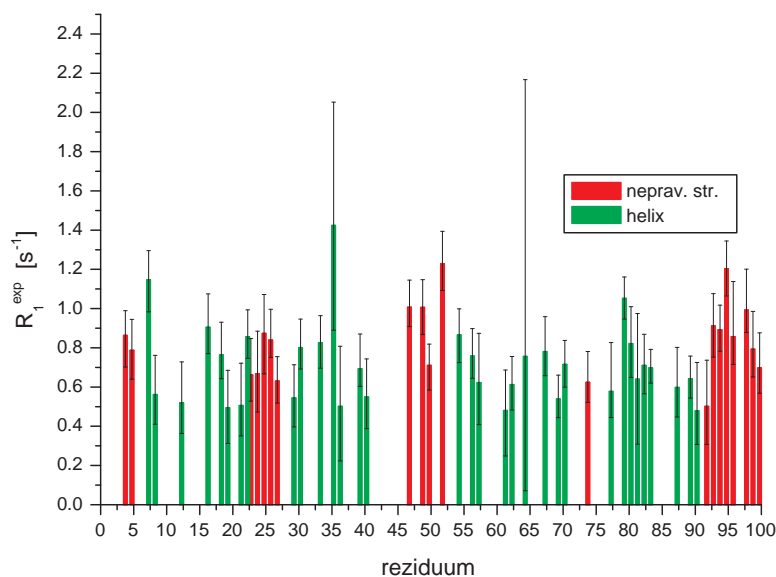
Obr. 16: Hodnoty navýšení NOE v ^{15}N značeném proteinu R55F M-PMV.

3.2.3 Karbonylové relaxace matrixového WT proteinu značeného ^{15}N , ^{13}C

Hodnoty podélných karbonylových relaxačních rychlostí jsou zobrazeny v grafu na Obr. 17, ze kterého je vidět, že hodnoty R_1 prakticky vůbec nekorrespondují se sekundární strukturou, viz Obr. 9.

V helikálních oblastech jejich hodnota zjevně náhodným způsobem fluktuuje o 20-35%. Statistické shrnutí velikostí R_1 je v Tab. 11. Vidíme, že helikální oblasti dosahují nižších hodnot \overline{R}_1 nežli oblasti neuspořádané, což je v rozporu s výsledky relaxačního experimentu na ^{15}N značeném proteinu. Z těchto dvou důvodů jsme se rozhodli hodnoty R_1 do finální verze výpočtu pohybového modelu nezahrnout.

Hodnoty příčných relaxačních rychlostí karbonylů jsou zobrazeny v grafu na Obr. 18.



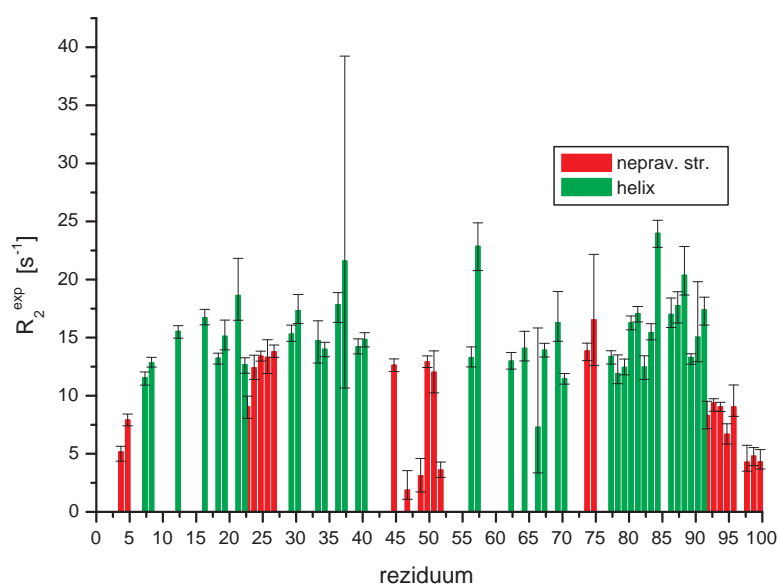
Obr. 17: Experimentální hodnoty karbonylových R_1 pro MA WT ^{15}N , ^{13}C vzorek.

Vidíme zde mnohem výraznější shodu se sekundární strukturou, menší rozptyly hodnot a v průběhu analýzy jsme zaznamenali i vyšší kvalitu fitu. Statistické shrnutí průměrné velikosti R_2 pro různé části proteinu je v Tab. 12. Pro srovnání jsou v ní uvedeny také výsledky z uniformně ^{15}N značeného proteinu WT. Vidíme překvapivou shodu velikosti průměrných hodnot rychlostí příčných relaxací i přes to, že jsou oba relaxační mechanismy odlišné.

Také průběh hodnot R_2 má velice podobnou charakteristiku s ^{15}N značeným vzorkem, viz. graf na Obr. 12. Na počátku a konci proteinového řetězce dochází k rychlým pohybům, které se postupně tlumí a struktura se chová rigidněji směrem k navazujícím helikálním oblastem. Také rezidua 47, 49 a 53 mají hodnoty R_2 srovnatelné s okraji proteinového řetězce, opět stejně jako u vzorku značeného ^{15}N .

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
\bar{R}_1 [s^{-1}]	0,77	0,71	0,76	0,68	0,69	0,83	0,84

Tab. 11: Průměrné hodnoty karbonylových ^{13}C podélných relačních rychlostí v různých částech WT proteinu.



Obr. 18: Experimentální hodnoty karbonylových R_2 pro MA WT ^{15}N , ^{13}C vzorek.

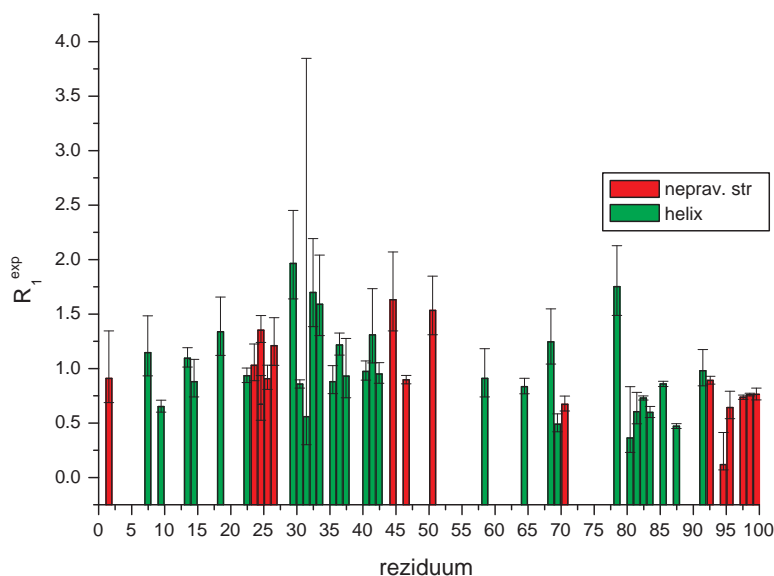
oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
\bar{R}_2^C [s^{-1}]	12,2	14,5	16,2	14,0	16,0	9,0	6,7
\bar{R}_2^N [s^{-1}]	11,8	13,9	13,9	13,7	13,2	10,0	5,7

Tab. 12: Srovnání průměrných ^{15}N dusíkových a ^{13}C karbonylových hodnot příčných relaxačních rychlostí \bar{R}_2 v různých částech WT proteinu.

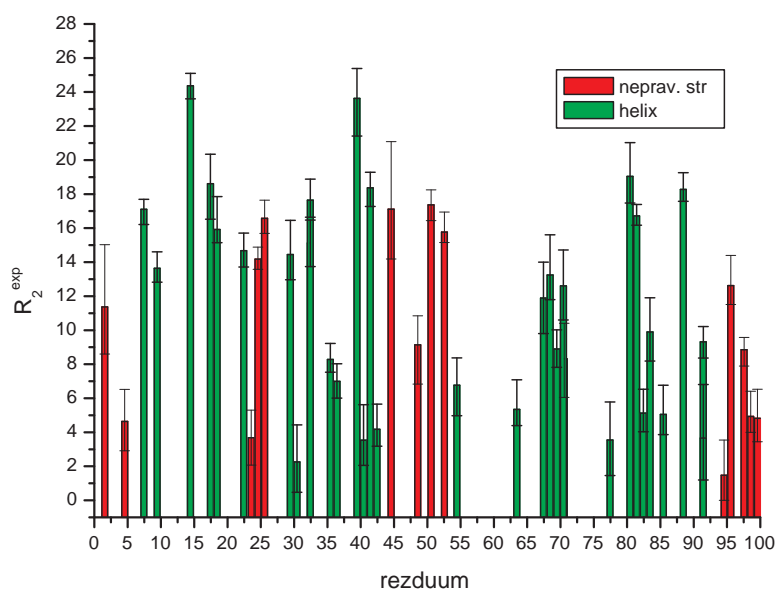
3.2.4 Karbonylové relaxace matrixového proteinu R55F značeného ^{15}N , ^{13}C

V případě hodnot R_1 z grafu na Obr. 19 vidíme značný rozptyl naměřených hodnot i v rámci helikálních oblastí. Celkově je zde malá korelace mezi hodnotami R_1 a sekundární strukturou.

Bohužel stejnou skutečnost musíme konstatovat i v případě R_2 v grafu na Obr. 20. Není zde žádná korelace s výsledky dusíkových relaxací mutované formy matrixového proteinu M-PMV ani podobnost s karbonylovými relaxacemi přirozené formy. Možné vysvětlení kvality dat je objasněno v následující kapitole 3.2.5.



Obr. 19: Experimentální hodnoty karbonylových R_1 pro MA R55F ^{15}N , ^{13}C vzorek.



Obr. 20: Experimentální hodnoty karbonylových R_2 pro MA R55F ^{15}N , ^{13}C vzorek.

3.2.5 Porovnání ^1H , ^{13}C korelovaných spekter obou proteinů

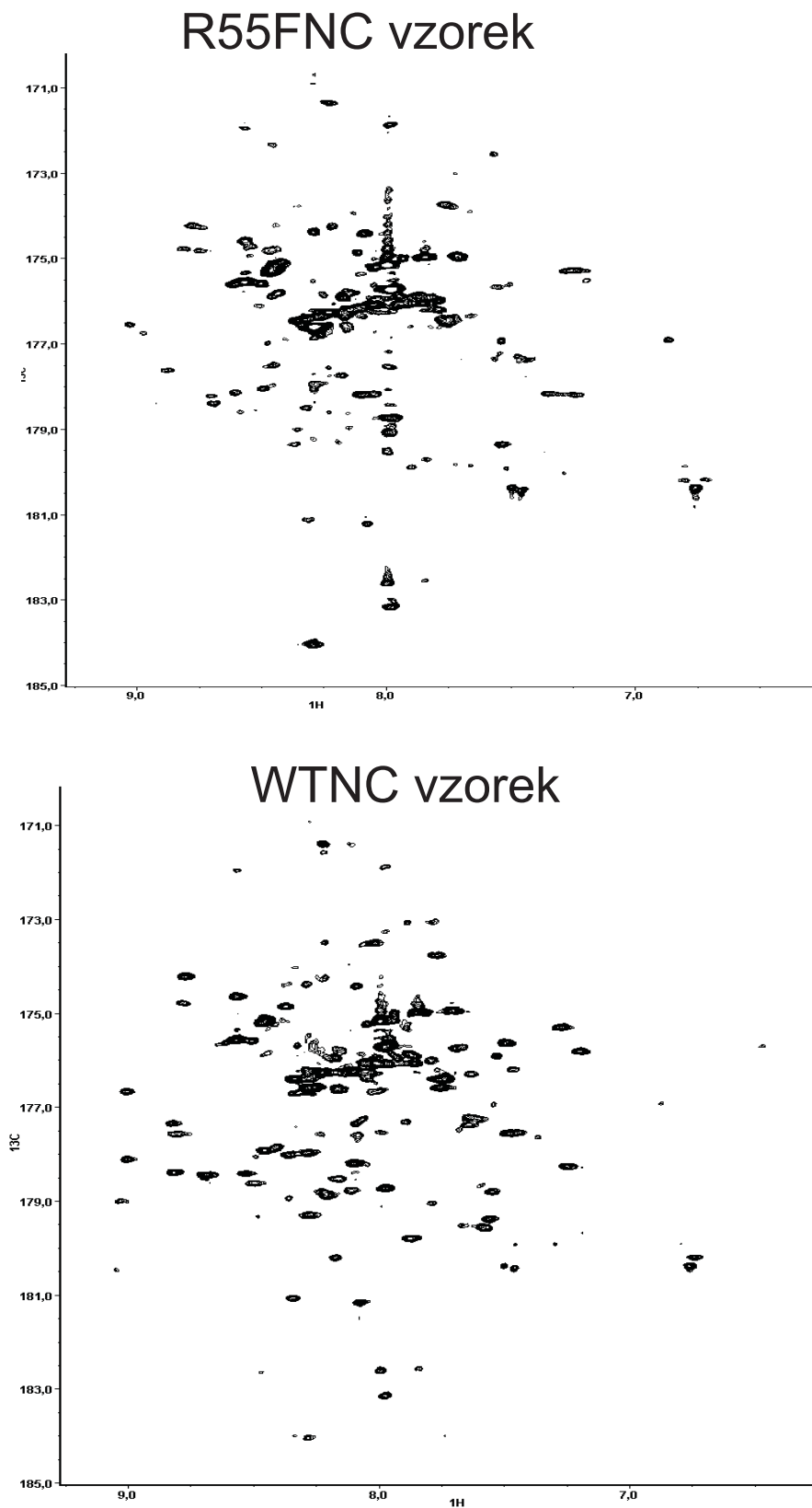
Porovnání vzorku začneme porovnáním příslušných odpovídajících si spekter obou proteinů. Pro názornost jsou vybrána spektra s nejkratšími relaxačními bloky, tj. s největším množstvím signálu, viz. grafy na Obr. 21 a (22).

Při prvním srovnání T_1 na Obr. 21 je vidět, že se v obou spektrech se vyskytuje celá řada peaků, které jsou v totožných pozicích. Při pozornějším prozkoumání si všimneme, že některé jsou v případě vzorku R55F deformovány a jejich tvar neodpovídá očekávanému tvaru peaku odpovídajícímu zpracování Statesovou procedurou. V důsledku deformace tvaru se blízké peaky začínají překrývat, což komplikuje celou řadu kroků zpracování a analýzy. Toto je patrně hlavně ve střední části spektra.

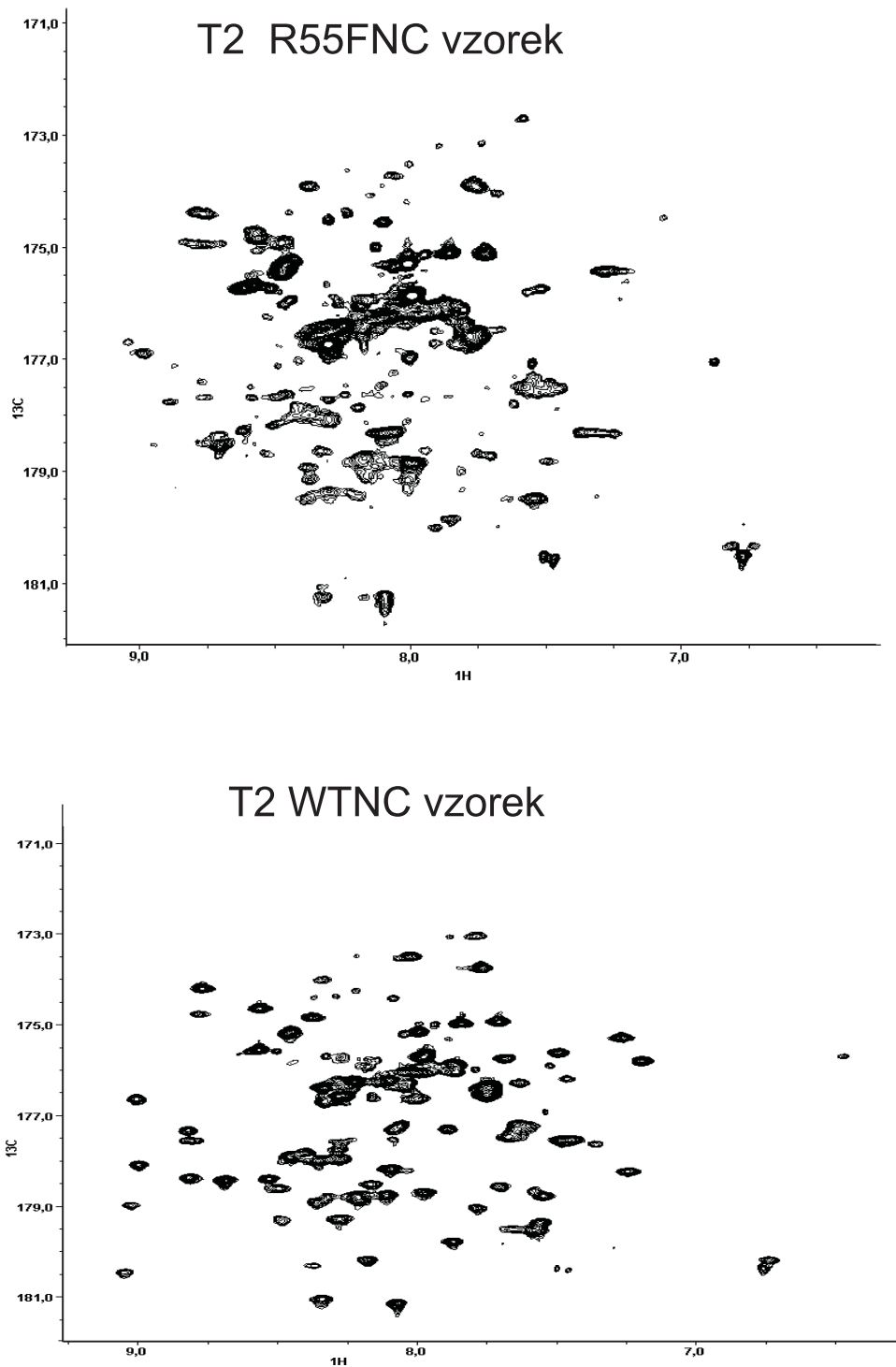
U spekter T_2 je situace podobná. Peaků ve vzorku WT jsou užší a lépe rozlišitelné. Přirozená forma jeví více signálu, podařilo se nám u ní přiřadit více reziduí. Intenzita signálu u R55F je nižší, což zhoršuje poměr signál/šum s negativními důsledky na přiřazování a integraci. To lze interpretovat jako důsledek konformačních změn v důsledku bodové mutace. S ohledem na proces zrání proteinu a stáří vzorku během měření je ale možné, že došlo k degradaci vzorku. Této skutečnosti by odpovídala i kvalita naměřených dat. Zároveň je možné, že se mutovaná forma proteinu po čase začne vyskytovat v několika konformacích, ze kterých pochází sobě si blízké signály.

Společným rysem obou spekter u obou proteinů je velké množství neznámého signálu.

V průběhu zpracování spekter se vždy lépe pracovalo se spektry T_2 , bylo méně pochybností v přiřazeních, kvalita fitu byla až na několik málo výjimek vyšší než v případě T_1 .



Obr. 21: Srovnání spekter T_1 forem WT a R55F matrixového proteinu M-PMV



Obr. 22: Srovnání spekter T_2 forem WT a R55F matrixového proteinu M-PMV

3.2.6 Dynamika dusíků ^{15}N přirozené formy matrixového proteinu M-PMV

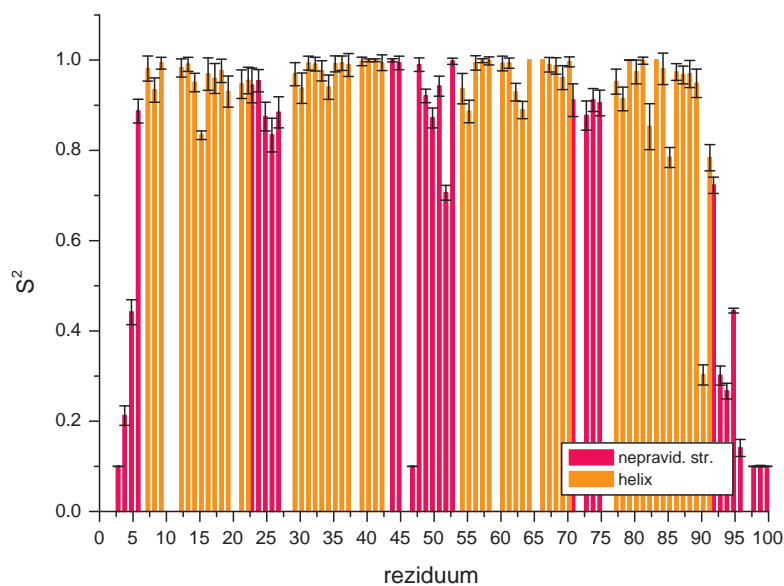
Vstupními daty při výpočtech parametrů Lipari-Szabóova modelu byly hodnoty T_1 , T_2 , NOE s váhami 1, 1/2, 1/4.

Program vypočetl globální korelační čas $\tau_M = 12,5 \pm 0,1$ ns a hodnoty parametrů uspořádanosti S^2 a lokálních korelačních časů τ_e .

Parametry uspořádanosti S^2 jsou uvedeny v grafu na Obr. (23), Je z něj vidět, že se jejich hodnoty v mimookrajových částech příliš nemění a dosahují hodnot blízkých 0,9. Jedinou výjimkou jsou rezidua 47 a 91 jejichž hodnota S^2 je srovnatelná s konci proteinového řetězce. Srovnání pro jednotlivé oblasti proteinu je uvedeno v následující Tab. 13. Průběh S^2 je zobrazen v grafu na Obr. 23.

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
$\overline{S^2}$	0,80	0,95	0,98	0,97	0,89	0,64	0,34

Tab. 13: Průměrné hodnoty parametru uspořádanosti dusíku ^{15}N v matrixovém WT proteinu



Obr. 23: Hodnoty parametru uspořádanosti dusíku ^{15}N v matrixovém WT proteinu

K výsledným hodnotám lokálních korelačních časů τ_e je nutno přihlídnout s jistou opatrností. Z rovnice (38) plyne, že pro $S^2 \rightarrow 1$ je τ_e velice špatně určeno a program jej využívá ke kompenzaci chyby experimentálních dat či nedostatečnosti Lipari-Szabóova modelu. Proto lze uvést jenom lokální korelační časy pro rezidua s $S^2 \leq 0,7$. Takto určené τ_e jsou uvedeny v Tab. 14.

reziduum	S ²	τ_e	σ_{τ_e}	reziduum	S ²	τ_e [s ⁻¹]	σ_{τ_e} [s ⁻¹]
3	0.10	577	45	94	0.26	980	39
4	0.21	625	48	95	0.44	999	45
5	0.44	963	37	96	0.14	996	37
47	0.12	975	26	98	0.11	849	34
52	0.70	998	30	99	0.10	709	42
90	0.30	336	55	100	0.13	514	51
93	0.30	696	78				

Tab. 14: Hodnoty ¹⁵N dusíkových lokálních korelačních časů τ_e pro $S^2 \leq 0,7$ v WT matrixovém proteinu M-PMV. Chyba určení σ_{τ_e} je $\sigma_{\tau_e} s^{-1}$

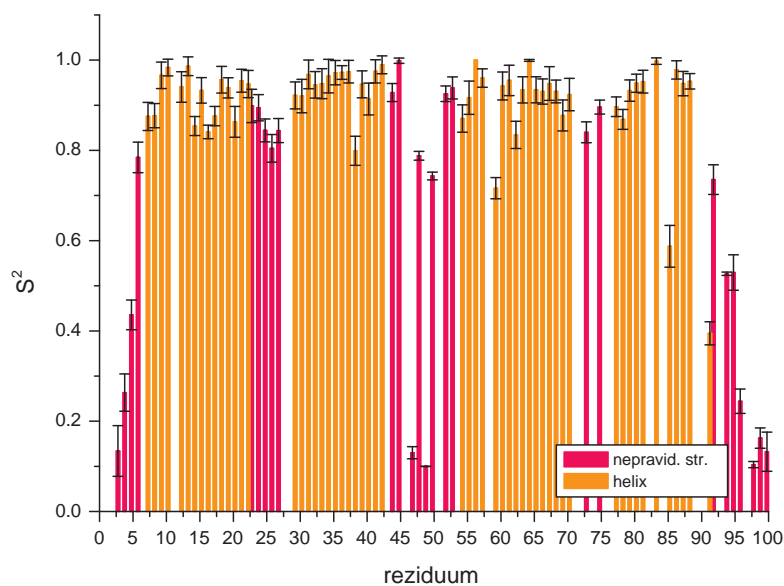
3.2.7 Dynamika dusíků ¹⁵N mutované formy matrixového proteinu M-PMV

Pomocí programu LS Analys jsme našli hodnotu globálního korelačního času $\tau_M = 10,0 \pm 0,1$ ns. Vstupní dusíková data T_1 , T_2 a NOE měla váhy 1, 1/2, 1/4.

Velikosti vypočtených parametrů uspořádanosti S^2 jsou uvedeny v Tab. 15 a grafu na Obr. 24. Z grafu je vidět, že se struktura směrem od okrajů řetězce stává rigidnější, výjimkou je centrální oblast kolem rezidua 47, která vykazuje podobnou uspořádanost jako okrajové části. Mutovaná forma proteinu i její části se jeví oproti formě přirozené jako živější, průměrné hodnoty $\overline{S^2}$ jsou nižší o zhruba 0,04. Pro srovnání jsou v této tabulce uvedena i data z WT.

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
$\overline{S^2}$	0,76	0,92	0,94	0,92	0,86	0,6	0,37
$\overline{S^2}$	0,80	0,95	0,98	0,97	0,89	0,64	0,34

Tab. 15: Průměrné hodnoty parametrů uspořádanosti $\overline{S^2}$ dusíků ¹⁵N v různých částech proteinu R55F.



Obr. 24: Hodnoty parametru uspořádanosti dusíku ^{15}N v matrixovém proteinu R55F

K vyhodnocení výsledků lokálních korelačních časů musíme opět brát v potaz pouze rezidua s $S_2 \leq 0,7$, která jsou uvedena v Tab. 16. V posledním sloupci je uveden rozdíl $\tau_e^{WT} - \tau_e^{R55F}$ u reziduí přiřazených u obou forem proteinu. Chyba $\sigma_{\tau_e^{WT}}$ je uvedena v Tab. 14, nicméně nikdy u zmíněných reziduí nepřesahuje 55 ps. Uvedeného srovnání prokazuje nepřítomnost korelace hodnot τ_e mezi proteiny, což je důsledkem konformačních odlišností proteinů.

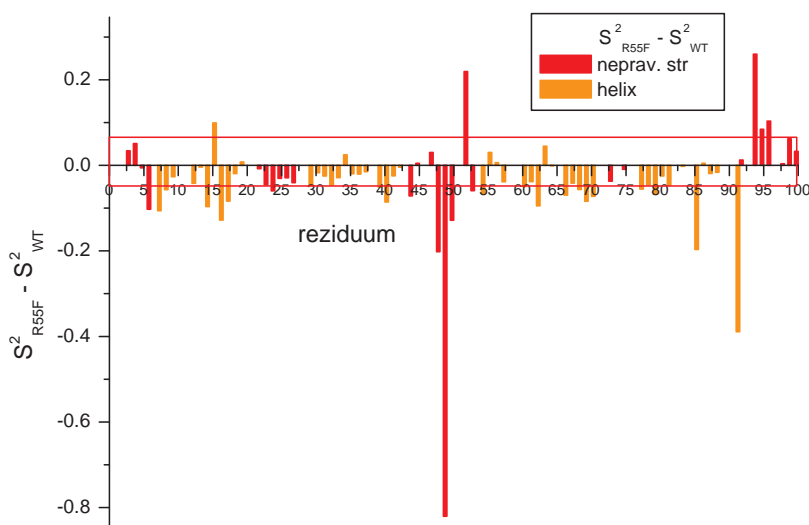
reziduum	S ²	τ_e	σ_{τ_e}	$\tau_e^{WT} - \tau_e^{R55F}$
3	0.13	805	256	-228
4	0.26	176	299	450
5	0.44	957	44	7
47	0.13	995	10	-20
49	0.10	796	45	
59	0.72	996	38	
85	0.59	657	198	
91	0.39	573	151	336
94	0.53	999	42	-19
95	0.53	524	129	497
96	0.24	1000	41	-3
98	0.10	933	32	-84
99	0.16	685	38	25
100	0.13	427	274	88

Tab. 16: Hodnoty ¹⁵N dusíkových τ_e pro $S^2 \leq 0,7$ v R55F matrixovém proteinu M-PMV.

3.2.8 Srovnání dusíkem značených proteinů

Mutovaná forma proteinu se jeví jako globálně dynamičtější s globálním korelačním časem $\tau_M = 10$ ns o 2,5 ns kratším než u formy přirozené. Hodnoty parametrů uspořádanosti jsou nižší pro mutovanou formu proteinu.

V grafu na Obr. 25 je vynesena rozdíl parametrů uspořádanosti. Vidíme v něm o kolik poklesly hodnoty S^2 u mutované formy proti formě přirozené. Oblast rámečku představuje oblast chyby. Prokazatelně došlo ke značným změnám ve střední části proteinového řetězce, kolem rezidua 47 k znatelnému poklesu uspořádanosti, naopak ke zvýšení uspořádanosti v oblasti kolem rezidua 100.



Obr. 25: Rozdíl hodnot parametru uspořádanosti dusíku ^{15}N u matrixových proteinů WT M-PMV.

3.2.9 Dynamika karbonylů matrixového proteinu WT značeného ^{15}N , ^{13}C

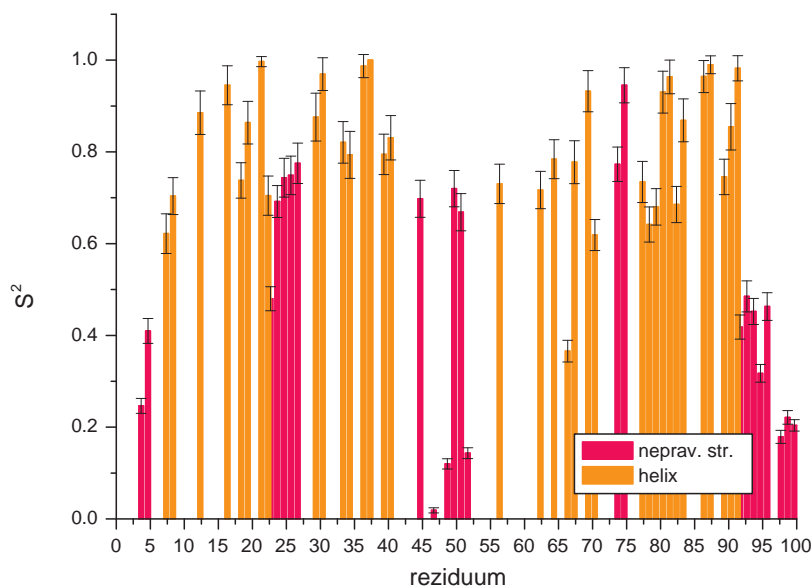
Pro výpočet parametrů Lipari-Szabóva modelu byla do vstupu programu LS Analys použita následující data

- globální korelační čas $\tau_m = 12,5$ ns
- hodnoty karbonylových T_2 proteinu WT ^{15}N , ^{13}C
- hodnoty dusíkových T_1 proteinu WT ^{15}N

Důvodem použití dusíkových hodnot T_1 je skutečnost, že v pulzní sekvenci (10) měříme relaxaci termu $2N_zC_y$. Relaxace R_{C_y} je potom určena vztahem (42), viz. kapitola 3.1.4.

Na vstupu programu se oproti dusíkovým výpočtům používá o jednu sérii parametrů méně, chybí T_1 z důvodu jejich špatné kvality. Obecně nelze určit $2N$ nezávislých hodnot zadáním N parametrů a proto jsme museli použít tzv.

truncated ("zkrácený") LS model, ve kterém je vynechán druhý člen v rovnici spektrální hustoty (38), viz Teoretická část. Takto jsem se zbavil závislosti hustoty korelační funkce $J(\omega)$ na τ_e a získáme pouze parametr uspořádanosti S^2 . Jeho hodnota je zobrazena v grafu na Obr. 26.



Obr. 26: Hodnoty ^{13}C karbonylových parametrů uspořádanosti ve WT proteinu

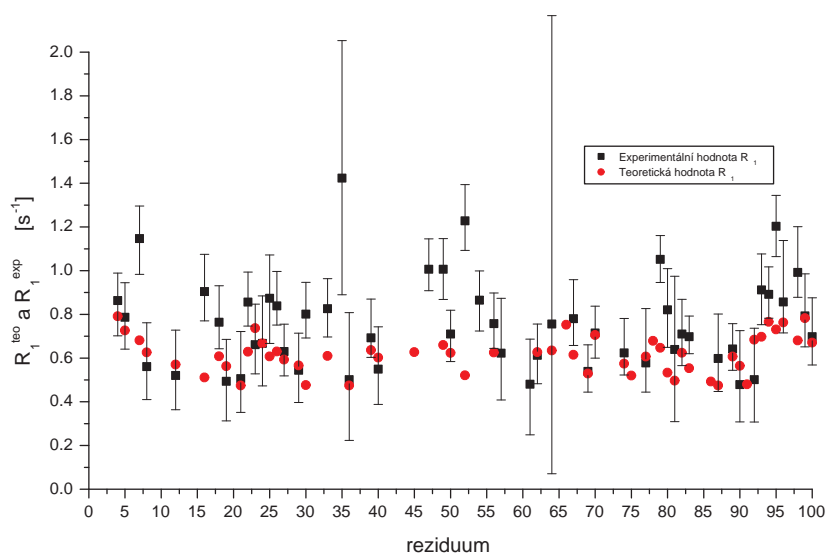
Průměrné hodnoty S^2 karbonylů i dusíků (pro názorné srovnání) v jednotlivých oblastech proteinu jsou uvedeny v Tab. 17.

Data z měření podélných relaxačních rychlostí se v pohybovém modelu neuplatnila, nicméně je zajímavé srovnat je s teoreticky vypočtenými hodnotami (Lipari-Szabóův model), jak ukazuje graf na Obr. 27. Vidíme, že zhruba v 1/3 případů nedochází ke shodě ani v rámci chyby dané fitováním. Tato skutečnost

oblast	protein	H1	H2	H3	H4	neprav. str.	okraj
$\overline{S^2}_C$	0,68	0,81	0,88	0,70	0,84	0,49	0,34
$\overline{S^2}_N$	0,80	0,95	0,98	0,97	0,89	0,64	0,34

Tab. 17: Průměrné hodnoty parametrů uspořádanosti $\overline{S^2}$ ^{13}C karbonylů a ^{15}N dusíků v různých částech WT proteinu.

pravděpodobně zatěžovala zkušební výpočty a znemožňovala dosažení reprezentativních výsledků.



Obr. 27: obr Srovnání teoretických a experimentálních hodnot karbonylových R_1 v matrixovém proteinu M-PMV

3.2.10 Dynamika karbonylů matrixového proteinu R55F značeného ^{15}N , ^{13}C

Při zkušebních propočtech Lipari-Szabóova modelu jsme se jako vstup do programu pokusili použít alespoň hodnoty T_2 . Přitom jsme nechali model nalézt

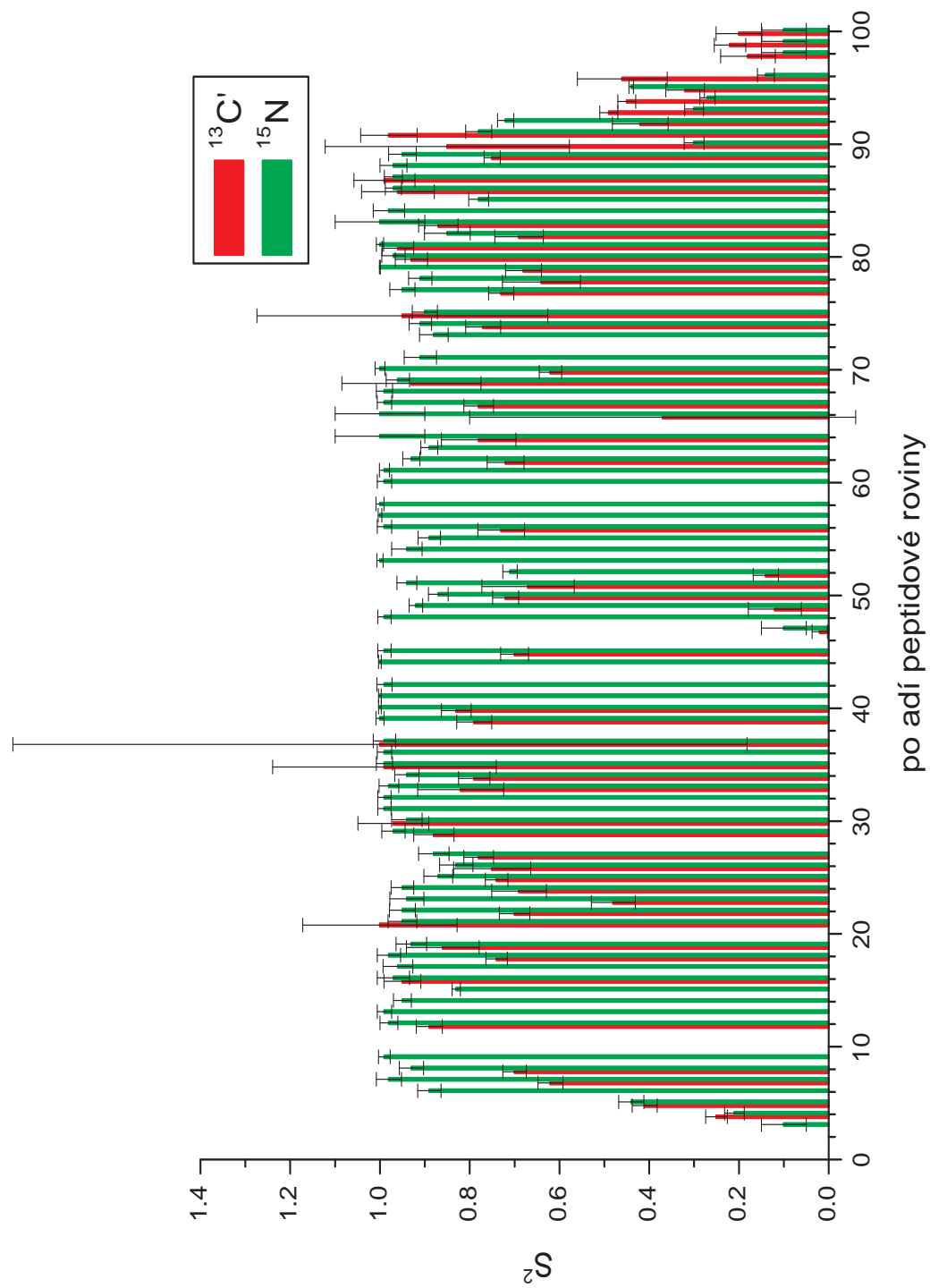
T_1 , S^2 , τ_e a globální korelační čas τ_M . Právě τ_M však konvergoval k hodnotám kolem 22 ns, což je skoro trojnásobek očekávané hodnoty. Podobně špatných výsledků bylo dosaženo zařazením T_1 do vstupu programu. Při fixaci $\tau_M = 10$ ns (odhadnuto na základě relaxačních měření na dusících, viz. dále) došlo k hrubé neshodě experimentálních a teoretických hodnot T_1 resp. T_2 . S ohledem na nízkou kvalitu dat a nemožnost rozumné shody s pohybovým modelem jsme upustili od dalšího zkoumání těchto dat.

3.2.11 Srovnání dynamiky ^{13}C karbonylů a ^{15}N dusíků u přirozené formy matrixového proteinu

Srovnání parametrů uspořádanosti ^{13}C karbonylů a ^{15}N dusíků u přirozené formy matrixového proteinu je uvedeno na Obr. 28. Jelikož je v peptidové rovině dusík N-tého rezidua a uhlík C' z (N-1)ho rezidua, přejdeme v tomto konkrétním srovnání k číslování všech parametrů uspořádanosti pomocí peptidových rovin, ve kterých se nacházejí. Peptidové roviny mají stejné pořadí jako dusíky ^{15}N .

Z grafu na Obr.28 je vidět, že dochází k dobré kvalitativní shodě obou hodnot S^2 . Je třeba uvážít, že parametr S^2 má poněkud jiný význam pro amidické dusíky a uhlíky karbonylů s ohledem na symetrie pohybů, které reprezentují. Nejvýznamnější vlastní osa tenzoru CSA karbonylů je obecně kolmá k vektoru N-H, který je směrodatný pro N-H dipól-dipólovou interakci. Dále je relaxace ^{13}C a ^{15}N modulována spektrálními hustotami při odlišných frekvencích. V důsledku toho nelze očekávat, že parametry uspořádanosti získané pro karbonyly a amidický dusík ležící ve stejné peptidové rovině musejí být totožné. K rozdílům dále mohou přispívat nepřesnosti v hodnotách interakčních amplitud, tj. velikostech DCC a efektivních CSA. Tento vliv odhadujeme zhruba na 10%.

V předpokládané oblasti kolem sekvence CTRS (mezi 40. a 50. reziduem) nesledujeme výraznou shodu hodnot S^2 .



Obr. 28: Srovnání parametrů uspořádanosti dusíků a karbonylů v peptidové rovině WT proteinu

3.2.12 Diskuze aspektů a přínosů měření ^{15}N relaxací

Měření ^{15}N relaxací přispělo k rozšíření našich dosavadních znalostí o dusíkové dynamice obou proteinů o cca 35 parametrů uspořádanosti u WT matrixového proteinu a o 3 parametry uspořádanosti u matrixového proteinu R55F. Byla potvrzena zvýšená pohyblivost CTRS sekvence u mutované formy proteinu, stejně jako jeho nižší globální korelační čas oproti formě přirozené.

Hodnoty ^{15}N podélných relaxačních konstant sehrálo důležitou roli s ohledem na možnost určení karbonylových příčných relaxačních konstant T_2 pomocí měření relaxace antifázové magnetizace N_zC_y v pulzní sekvenci 10.

Dusíkové relaxační experimenty s ohledem na dobrou kvalitu jak experimentálních dat, tak i vypočtených výsledků, představují klíčový krok při analýze dynamiky proteinu.

3.2.13 Diskuze aspektů a přínosů měření ^{13}C relaxací

Dvojitý přenos magnetizace v použité pulzní sekvenci na Obr. ?? vyžaduje dvojitě izotopově obohacený vzorek (^{15}N , ^{13}C). Obecně s rostoucím počtem přenosů magnetizace roste i chyba měření, což se promítlo do kvality experimentálních dat. Měření T_2 se ukázalo jako velmi užitečné a na byly na jeho základě určeny parametry uspořádanosti karbonylů v páteři WT proteinu. Oproti tomu se měření T_1 ukázalo jako velmi problematické, především kvůli špatnému poměru signál/šum. Důvodem je dlouhá refokusační perioda před relaxačním blokem.

Výsledky ^{13}C karbonylových relaxačních experimentů nám poskytly další sadu parametrů popisující pohyby v peptidové rovině. V případě WT proteinu došlo k dobré kvalitativní shodě v určení odpovídajících si dusíkových a karbonylových parametrů uspořádanosti.

K určení pohybových parametrů dle Lipari-Szabóva přístupu je nezbytné použít globální korelační čas získaný na základě dusíkových experimentů.

Měření karbonylových relaxací podstatným způsobem rozšiřuje informaci o dynamice proteinů, nicméně musí být z výše uvedených důvodů doprovázeno analogickými dusíkovými experimenty.

Karbonylová i dusíková relaxační měření kladou vysoké nároky na kvalitu vzorku.

4 Závěr

- Změřili jsme podélné a příčné relaxační doby T_1 , T_2 a heteronukleární $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N NOE pro ^{15}N značenou přirozenou i mutovanou formu matrixového proteinu M-PMV.
- Pro tyto proteiny jsme pomocí Lipari-Szabóova modelu našli pohybové parametry a vzájemně je porovnali.
- Zoptimalizovali jsme pulzní sekvence pro měření T_1 , T_2 karbonylových ^{13}C skupin v peptidovém řetězci.
- Pomocí těchto sekvencí jsme proměřili relaxační experimenty na dvojitě (^{15}N , ^{13}C) značeném matrixovém proteinu Mason-Pfizerova opičího viru i jeho mutované formě R55F.
- Hodnoty dob T_2 přirozené formy jsme použili ke stanovení dynamiky pomocí Lipari-Szabóva modelu.
- Měření T_1 se neukázala jako vhodná pro určování dynamických parametrů s ohledem na jejich špatný poměr signál/šum. Tato skutečnost je způsobena velice dlouhou refokusační periodou během které dojde k značnému úbytku signálu v důsledku příčné relaxace.
- Měření T_2 poskytla kvalitní experimentální data.

$$N_z C_y \rightarrow C_x.$$

Literatura

- [1] Levitt, H., *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and sons, LTD, **2001**, 538–542.
- [2] Cavanah, J. et. al , *Protein NMR spectroscopy: Principles and Practice*, Academic Press Inc., **1996**, 270–280.
- [3] Lipari, G., Szabó, A., *Model free approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules 1. Theory and range of validity*, *J.Am.Chem.Soc.* *104*, **1982**, 4546–4559.
- [4] Yasuda, J., Hunter, E., *Role of Matrix Protein in The Type D Retrovirus Replication Cycle, Importance of the Arginine Residue at Position 55*, *Virology* *268*, **2000**, 533–538.
- [5] Kay, J .E. et al., , *J.Magn. Reson.* *97*, **1992**, 359.
- [6] Hore, P. J., *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, **1995**, .
- [7] Gresiek, S., Bax A., , *J.Magn. Reson.* *96*, **1992**, 432-440.
- [8] Schleucher, J., Sattler, M., Griesinger, C. , , *Angew. Chem. Int. Ed.* *32*, **1993**, 1489-1491.
- [9] Rhee, S.S., *Amino acid substitutions within the matrix protein of type D retroviruses affect assembly, transport and membrane association of a capsid*, *The EMBO journal* vol. *10* no. *3*, **1991**, 535–546.
- [10] Sakalian, M., Hunter, E., *Separate assembly and Transport domains within the Gag Precursor of Mason-Pfizer monkey virus* , *Journal of virology* Vol. *73*, No. *10*, **1999**, 8073–8082.
- [11] Kliková, M., Ruml, T., *Retrovirý a jejich životní cyklus*, *Chem. listy* *88*, **1994**, 660–668.
- [12] Rhee, S.S. and Hunter, E., *A single Amino acid Substitution within the Matrix Protein of a type D Retrovirus converts its Morphogenesis to That of type C Retrovirus*, *Cell*, Vol. *63*, , **1990**, 77–86.

- [13] Korzhnev, D. M. et al., *NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins*, *Progress in Nuclear magnetic resonance spectroscopy* 38, **2001**, 197–266.
- [14] Loth C., Pelupessy, P., Bodenhausen, G., *Chemical shift anisotropy tensor of carbonyl, nitrogen, and amide proton in proteins through cross-correlated relaxation in NMR spectroscopy, supporting materials*, *J.Am.Chem.Soc.* 127, **2005**, 6062–6068.
- [15] Twaku Dayie, T., Wagner, G., *Carbonyl Carbon Probe of Local Mobility in ^{13}C , ^{15}N Enriched Proteins Using High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, *J.Am.Chem.Soc.* 119, **1997**, 7797–7806.
- [16] Bruker, *Topspin 1.3- NMR data acquisition and processing Software*, <http://www.bruker-biospin.com/topspin.html>, , .
- [17] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX Pipes.*, *J.Biomol. NMR* 6, **1995**, 277–293.
- [18] Johnson, B.A., Blevins, R.A., *NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data.*, *J.Biomol. NMR* 4, **1994**, 603–614.
- [19] The MathWorks, *Matlab® 6.0* , www.mathworks.com, , .
- [20] NMRDraw, *NMRDraw is the companion graphical interface for NMRPipe and its processing tools*, <http://spin.niddk.nih.gov/NMRPipe/>, , .
- [21] RNDr. Zdeněk Tošner, Ph.D., *LS Analys* , *Nepublikované výsledky* , , .
- [22] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB), *Protein Data Bank, databáze proteinů* , www.dpb.org, , .