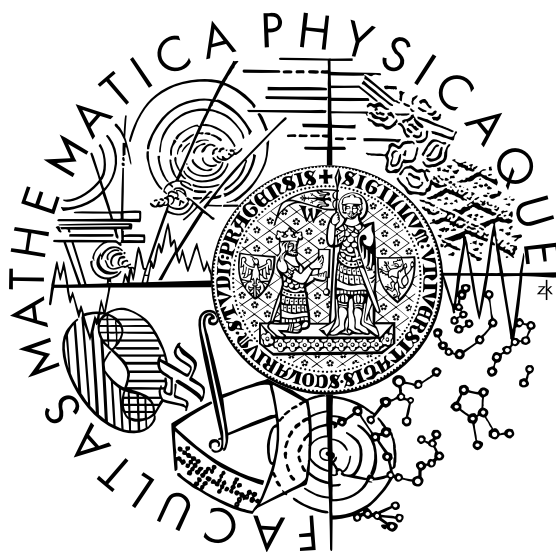


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Martina Říhová

Mikrokalorimetrické stanovení termodynamické stability triplexu RNA

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, Csc.

Studijní program: Fyzika, Fyzika zaměřená na vzdělávání

2008

Ráda bych poděkovala všem, kteří mi pomáhali při psaní této práce. Především bych chtěla poděkovat panu Prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, Csc. za trpělivost, cenné rady a ochotnou pomoc při řešení všech nastalých problémů.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Pavle Ottové, která mě obětavě seznámila s obsluhou mikrokalořimetru a radila mi kdykoli jsem potřebovala. Můj dík patří také Mgr. Martinu Křížovi, který mi pomáhal překonávat všechny technické i jiné obtíže se vznikem práce spojené.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsala samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce a její zveřejňováním.

V Praze dne 6.8.2008

Martina Říhová

Obsah

1. Úvod

2. Struktura a stabilita komplexů nukleových kyselin a jejich sledování pomocí mikrokalorimetrie

- 2.1. Nukleové kyseliny s jejich struktura
 - 2.1.1. Primární struktura nukleových kyselin
 - 2.1.2. Sekundární struktura
 - 2.1.3. Duplex
 - 2.1.4. Triplex
- 2.2. Stabilita komplexů NA
 - 2.2.1. Vliv teploty na stabilitu komplexů
 - 2.2.2. Vliv iontů na stabilitu komplexu
 - 2.2.3. Termodynamický model stability duplexu a triplexu
- 2.3. Mikrokalorimetrie
 - 2.3.1. Vývoj diferenční skenovací mikrokalorimetrie
 - 2.3.2. Současná diferenční skenovací mikrokalorimetrie
 - 2.3.3. Průběh měření

3. Cíle práce

4. Příprava a provedení experiment, zpracování dat

- 4.1. Použité vzorky
- 4.2. DSC měření
- 4.3. Postup zpracování dat
 - 4.3.1. Příprava dat
 - 4.3.2. Zpracování dat

5. Výsledky měření

- 5.1. Průběhy scanů po základním zpracování
- 5.2. Průběhy scanů po odečtení pozadí
- 5.3. Termodynamické parametry v jednotlivých scanech
- 5.4. Diskuse výsledků
 - 5.4.1. Změny DSC křivek při opakovaných scanech
 - 5.4.2. Stabilita duplexů a triplexů, vliv hořčíku

6. Závěr

Literatura

Název práce: Mikrokolorimetrické stanovení termodynamické stability triplexu RNA
Autor: Martina Říhová
Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK
Vedoucí bakalářské práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, Csc.
e-mail vedoucího: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: Práce je zaměřena na určování termodynamických charakteristik duplexu a triplexu ribonukleové kyseliny. Rozpad a vznik komplexů byl sledován na diferenčním skenovacím mikrokolorimetru. Jako vzorky byly použity směsné roztoky synteticky připravených homopolymerů RNA, polyA a polyU, o různých stechiometrických poměrech. Z naměřených dat byly určeny termodynamické parametry komplexů, tedy odpovídající změny entalpie ΔH a entropie ΔS a teplota tání komplexů. Výsledky ukázaly, že při těchto měřeních dochází k systematické změně naměřených charakteristik při opakovaných scanech. Tento jev patrně souvisí s interakcí RNA s povrchem měřící kyvety a je tedy závažný z hlediska aplikovatelnosti scanovací mikrokolorimetrie pro přesná kvantitativní termodynamická studia ribonukleové kyseliny. Změny teploty tání způsobené přidáním hořčíku do roztoku ukázaly, že jeho účinkem se při připojení třetího vlákna k duplexu RNA komplex stabilizuje.

Klíčová slova: triplex RNA, duplex RNA, mikrokolorimetrie, termodynamické charakteristiky, teplota tání.

Title: Microcalorimetric determination of RNA triplex thermodynamic stability
Author: Martina Říhová
Department: Institute of Physics, Charles University
Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, Csc.
Supervisor's e-mail address: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: The work is devoted to thermodynamic characterization of ribonucleic acid duplexes and triplexes. The complex formation and dissociation was investigated by using a differential scanning microcalorimeter. Mixed solutions of synthetic RNA homopolymers, polyA and polyU, in various stoichiometric ratios were used as the samples. From the data collected, corresponding enthalpy ΔH and entropy ΔS changes, and a melting temperature were determined. The results showed that in the case of our measurements the obtained characteristics were systematically shifted in the course of repeated scans. This phenomenon seems to be related to RNA interaction with the measuring cell surface, and is thus considerable from the viewpoint of the scanning microcalorimetry applicability to quantitative thermodynamic studies of RNA. The melting temperature changes induced by magnesium addition revealed that its effect causes increased complex stabilization when the third chain is bound to the duplex.

Key words: RNA triplex, RNA duplex, microcalorimetry, Thermodynamic characteristics, melting temperature.

1. Úvod

Ribonukleová kyselina (RNA) je jedna z nejdůležitějších molekul aktivních při přenosech informací v biologických systémech. S její pomocí dochází k expresi genů uchovávaných v deoxyribonukleové kyselině (DNA) v jádře eukaryontní buňky. DNA sama jádro buňky neopouští. Aby se informace v ní obsažená mohla dostat ven z jádra, je třeba ji přepsat do RNA, která jádro opouštět může. RNA s touto funkcí se nazývá messenger RNA (mRNA), její množství a její aktivita rozhodují o tvorbě proteinů v buňce. Dalšími funkčními molekulami RNA jsou ribosomální RNA (rRNA) a transferová RNA (tRNA). rRNA je hlavní stavební a zároveň funkční jednotkou ribosomů, tRNA se váže na aminokyseliny a dopravuje je na ribosom, kde mohou být díky tRNA rozpoznány a připojeny do polypeptidového řetězce. Všechny druhy RNA spolupracují na tvorbě proteinů a život buněčných organismů by bez nich nebyl možný.

RNA vytváří v buňce různé strukturní motivy a prostorová uspořádání podle biologické funkce, kterou zastává. Vyskytuje se často jednovláknová, ve formě náhodného klubka, případně jako duplex. Jedním z možných uspořádání je i triplex RNA, v živých buňkách však zatím nebyl pozorován.

V této bakalářské práci jsme jako nástroj pro studium chování ribonukleové kyseliny zvolili diferenční skenovací mikrokolorimetr. Mikrokolorimetr je určen ke kvantitativnímu popisu termodynamického chování biomolekul za nízkých koncentrací v malém objemu. Úkolem bakalářské práce bylo naměřit data na vybraném modelovém systému RNA a na jejich základě vyhodnotit termodynamické charakteristiky spojené s rozpadem a tvorbou duplexů a triplexů RNA.

Práce je rozdělena do dvou částí, teoretické a praktické. Teoretická část je věnována nukleovým kyselinám, jejich komplexům a stabilitě, a také mikrokolorimetrii. Ve druhé části je popsáno měření, jeho výsledky a určení termodynamických parametrů. Získané údaje jsou diskutovány z hlediska srovnání stability duplexu a triplexu RNA a vlivu hořčíku na tyto parametry. S ohledem na změny výsledků měření v průběhu opakovaných cyklů jsou rozebírané i možné interakce RNA molekul s povrchem měřicí kyvety.

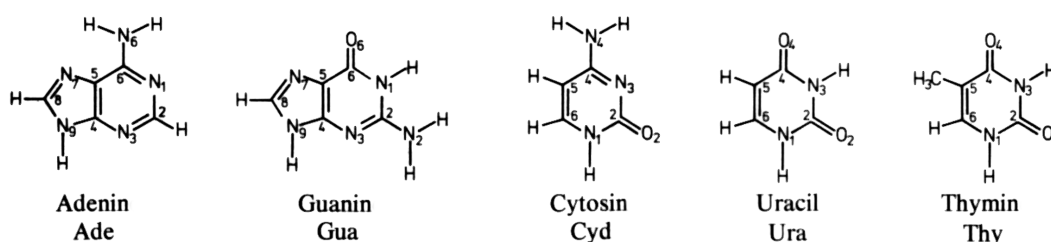
2. Struktura a stabilita komplexů nukleových kyselin a jejich sledování pomocí mikrokolorimetrie

2.1 Nukleové kyseliny a jejich struktura

Veškerá genetická informace všech živých organismů je uložena v nukleových kyselinách. Struktura první z nich (2'-deoxyribonukleová kyselina, DNA) byla objevena v roce 1953 Watsonem a Crickem. Druhou důležitou nukleovou kyselinou je RNA (ribonukleová kyselina), která se od DNA mírně liší a má v buňkách jinou funkci. Obě nukleové kyseliny nejsou chemicky příliš složité, jejich molekuly však mohou být velmi dlouhé a mohou vytvářet složité prostorové motivy. Proto je vhodné popisovat jejich strukturu na několika úrovních. Tomu se budeme zevrubně věnovat v následujícím textu této kapitoly. Podrobnější popis struktury nukleových kyselin lze nalézt například v monografii [Saenger, 1984].

2.1.1 Primární struktura nukleových kyselin

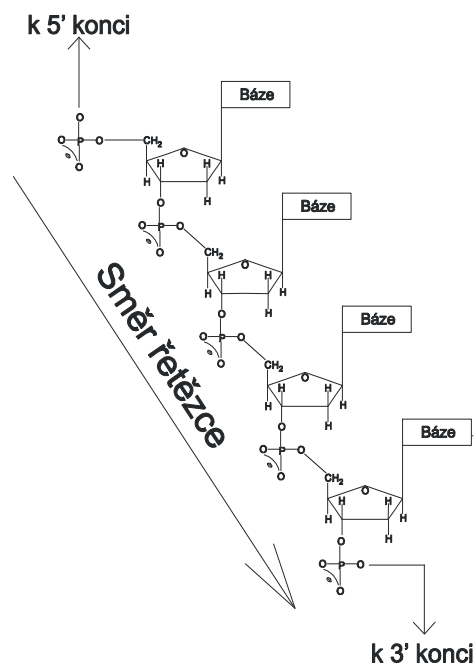
Základními stavebními kameny nukleových kyselin (NA) jsou nukleotidy. Nukleotidy se skládají ze tří jednodušších složek: báze, sacharidu a fosfátu. Báze jsou heterocyklické molekuly obsahující dusík. Mohou být jednocyklické, odvozené od molekuly pyrimidinu, nebo dvoucyklické, odvozené od molekuly purinu. Nejčastější pyrimidinové báze jsou uracil, cytosin a thymin. Uracil se nachází pouze v RNA. V DNA je zase téměř výhradně thymin, což je methylovaná forma uracilu a je funkčně ekvivalentní. Nejčastější purinové báze jsou adenin a guanin. Chemické vzorce jednotlivých bází jsou na obr. 2.1.



Obr. 2.1: Chemické vzorce dusíkatých bází nukleových kyselin [Saenger, 1984]

Sacharidy jsou v nukleotidech ve formě furanos, čili pětičlenných cyklů. V RNA je sacharidem β -ribofuranosa a v DNA β -2-deoxyribofuranosa. Atomy pentózového cyklu jsou číslovány po řadě od báze; čísla se čárkují, abychom je odlišili od atomů bází, kde se používá číslování bez čárek. Sacharidy spolu s bázemi tvoří nukleosidy. Báze jsou na sacharidy připojeny N-glykosidickou vazbou na uhlíku C1'. Na této vazbě dochází k torzi a vznikají tím dvě možné konformace syn a anti. K nukleosidům jsou estericky vázané zbytky kyseliny fosforečné. Tyto zbytky spojují C5' a C3' uhlíky dvou nukleotidů fosfodiesterovou vazbou.

Tím může vznikat řetězec nukleotidů. Seřazení nukleotidů za sebou v tomto řetězci určuje primární strukturu nukleové kyseliny. To je schématicky znázorněno na obrázku 2.2. Řetězec má tedy jeden 3' konec a jeden 5' konec a popisujeme ho od 5' konce ke 3' konci. Podle délky řetězce rozlišujeme mono-, oligo- a polynukleotidy.



Obr. 2.2: Primární struktura vlákna DNA [Palacký, 2007]

2.1.2 Sekundární struktura

Pravidelné lokální prostorové uspořádání molekuly NA označujeme sekundární struktura. Závisí jak na silách působících mezi jednotlivými částmi NA tak na interakcích s okolním prostředím. Řetězce nukleových kyselin mohou zůstat samostatné, nebo se mohou splétat. V tomto se přírodní RNA a DNA zásadně liší. DNA nejčastěji tvoří dvojšroubovici, zatímco RNA zůstává v buňce nejčastěji jednovláknová. Může však tvořit lokální vnitromolekulární dvojšroubovici na krátkých úsecích vlákna spojených úsekem nespárovaných bází – tzv. vlásenku (hairpin). Projevem sekundární struktury u nukleových kyselin je tedy nejčastěji tvorba komplexů, jejichž konkrétní podobou se budeme zabývat dále.

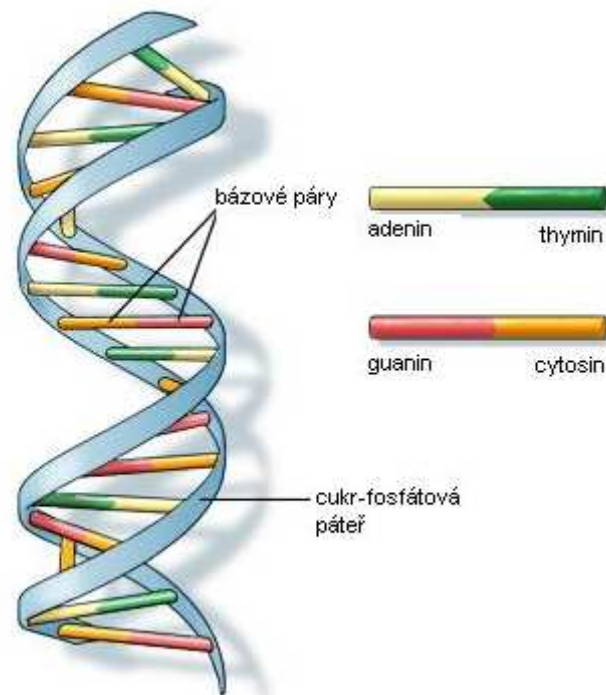
Práce se zaměřuje na pozorování energetických změn při tvorbě duplexů a triplexů RNA, a proto se při dalším popisu budeme věnovat převážně těmto dvěma typům komplexu.

2.1.3 Duplex

Strukturu duplexu DNA odhalili a popsali poprvé Watson a Crick. Zjistili, že poměr adeninu ku thyminu je vždy 1:1 a stejně tak guaninu ku cytosinu v celé dvojšroubovici (Chargaffova pravidla). Usoudili tedy, že polynukleotidové řetězce jsou spojeny komplementárním párováním bází. Adenin se páruje s thyminem (v RNA s uracilem) dvěma vodíkovými můstky a cytosin se páruje s guaninem pomocí tří vodíkových můstků. Řetězce jsou antiparalelní. Osu dvojšroubovice v tomto modelu tvoří vodíkové můstky, báze směřují dovnitř šroubovice a sacharidy spojené přes fosfátové skupiny vyztužují tuto konstrukci zvenku. Molekuly bází jsou rovinné a vodíkové můstky je spojují tak, že jsou obě ve stejné rovině. Ve šroubovici je tato rovina kolmá na osu. Nejzákladnějším typem dvojšroubovice DNA je B forma, ta je také nejpodobnější původnímu Watson-Crickovu modelu a v přirozeném prostředí se vyskytuje nejčastěji. Páry bází následující v této šroubovici po sobě jsou vůči sobě pootočený o 36° a na jednu otočku tedy připadá 10 párů bází. Vznik šroubovice je umožněn geometrií spárovaných bází. Mohou však vznikat i jiné formy. B forma je

pravotočivá šroubovice a zvenku jsou na ní patrné dva žlábký. Oba jsou hluboké, jeden je však široký a druhý úzký. Žlábký umožňují bázím uvnitř šroubovice styk s vnějším prostředím a interakci s okolními molekulami. Kromě B formy jsou dobře známé ještě A forma a Z forma. A forma je také pravotočivá, má jeden žlábek hlubší a užší a druhý mělký a širší. Z forma je levotočivá a jeden ze žlábků má plochý.

RNA ze sterických důvodů nemůže tvořit B formu šroubovice; v přirozeném prostředí existuje pouze v A formě, nebo v A' formě. Tyto formy jsou velmi podobné. A forma je častější a na 1 otočku v ní připadá 11 bázových párů. A' forma není tak častá a na otočku připadá 12 bázových párů. Z forma RNA zatím nebyla přirozeně pozorována. Obě formy A i A' jsou charakterizovány vlastnostmi typickými pro Watson-Crickovo párování bází.

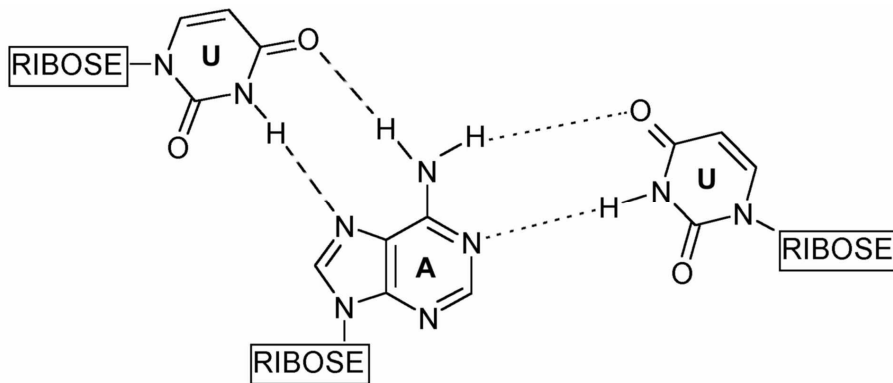


Obr. 2.3: Sekundární struktura DNA (duplex) [U.S. National Library of Medicine]

2.1.4 Triplex

K Watson-Crickovu bázovému páru se může připojit další báze pomocí tzv. Hoogsteenova párování. Tento způsob párování bází umožňuje spojení tří polynukleotidových vláken a tím tvorbu triplexu. Tvorba triplexů byla pozorována pouze u sekvencí s velkým relativním zastoupením jednoho typu bází. Je-li duplex složen ze dvou homopolymerních vláken, doplní se na triplex snadněji. Triplex vzniká pouze pokud jedno vlákno je tvořeno puriny (tedy A nebo G). Dva duplexy poly(A).poly(U) mohou přecházet na poly(U).poly(A).poly(U) triplex a samotné vlákno poly(A), protože heterocyklus adeninu je současně schopen tvořit Watson-Crickovy i Hoogsteenovy bázové páry [Saenger, 1984]. Struktura trojného komplexu se skládá z antiparalelního poly(A).poly(U) duplexu a z dalšího poly(U) vlákna, které se vnořuje do hlubokého žlábků. Přidané poly(U) vlákno tvoří bázový pár Hoogsteenova typu vodíkovým můstkem s N7 a N6-H adeninu řetězce poly(A) [Saenger, 1984].

Všetchna tři vlákna mají téměř stejnou geometrii. Komplexy s Hoogsteenovými vazbami se realizují pouze v A formě, což svědčí o tom, že RNA je konformačně velmi konzervativní.



Obr. 2.3: Bázový triplet U•A*U v RNA triplexu. Tečkovaně je vyznačeno Watson-Crickovo párování, čárkovaně Hoogsteenovo párování. [Hanusš, 2001].

2.2 Stabilita komplexů NA

Duplex i triplex nukleových kyselin jsou uspořádané struktury a jejich vznik je spojen se snížením entropie. Jejich stabilita je zajištěna zejména hydrofobní interakcí (předpokládáme, že NA je ve vodném prostředí). Dalším důležitým stabilizujícím faktorem je takzvané stohování (stacking) a vodíkové můstky. Vodíkové můstky působí horizontálně mezi bázemi, naproti tomu stohování působí vertikálně. Báze, které jsou ve šroubovici nad sebou, se částečně překrývají a π -elektrony aromatických bází na sebe působí přitažlivou Van der Waalsovou interakcí. Síla této interakce závisí na délce řetězce a také na bázevém složení. Nejsilněji se přitahují dvě purinové báze, slaběji jedna purinová a jedna pyrimidinová a nejslaběji dvě pyrimidinové. Díky stohování a hydrofobním interakcím vzniká uvnitř dvojšroubovice hydrofobní prostředí. To umožňuje preferovat tvorbu vodíkových můstků mezi bázemi, přestože jsou NA ve vodném prostředí a nabízí se tedy tvorba vodíkových můstků s molekulami vody. Vodíkové můstky jsou částečně elektrostatické povahy a jsou přibližně 20-krát až 30-krát slabší než kovalentní vazba. V NA jsou důležité pro párování bází, pro stabilitu komplexů jsou již méně významné, avšak jejich vliv je nutné započítávat. Stabilita sekundární struktury NA je také závislá na mnoha dalších faktorech, jako jsou teplota, tlak, délka řetězce, koncentrace jednotlivých iontů nebo bázevé složení.

2.2.1 Vliv teploty na stabilitu komplexů

Pokud se mění teplota roztoku NA, mění se i sekundární struktura NA. Při silném ohřívání dochází k jejímu zhroucení. Tento proces nazýváme denaturace. Dochází při něm k narušení nukleotidových párů, komplementární řetězce se oddělí a struktura se rozpadne. Triplex se rozpadá na duplex a jedno samostatné vlákno (single strand). Duplex se rozpadá na samostatná vlákna. U samostatných vláken může docházet ke změně stohování bází a tím k přechodu helikální struktury na neuspořádané klubko (random coil). Pokud se zhroutl jen část komplexu, destabilizuje se zpravidla celý komplex. Nicméně při všech těchto změnách zůstává primární struktura NA nezměněna. Makroskopicky však můžeme zaznamenat změny fyzikálních vlastností roztoku NA, například klesá jeho viskozita.

Parametrem, který souvisí s těmito změnami a charakterizuje komplexy nukleových kyselin, je teplota tání T_m (melting temperature). Je definována jako teplota, při které je komplex vytvořen s poloviční koncentrací než je maximální teoreticky možná s ohledem na složení roztoku. Teplota tání duplexů a triplexů se zvyšuje s rostoucí délkou šroubovice, s přibýváním iontů v roztoku a při větším zastoupení C-G párů ve šroubovici (větší počet vodíkových můstků stabilizuje komplex).

Pokud roztok s denaturovanými NA rychle ochladíme pod teplotu tání, řetězce se spárují pouze částečně, správné párování nestihne proběhnout. Pokud však roztok ochlazujeme pomalu, jednotlivá vlákna mají dostatek času najít svůj komplementární protějšek a dojde tak k úplné renaturaci komplexu. Denaturace nukleových kyselin je tedy vratný děj.

Denaturace může být sledována mnoha metodami, například pomocí UV absorpce, Ramanova rozptylu nebo mikrokolorimetrie. V této práci jsou použita mikrokolorimetrická měření. Závislost stability na teplotě je určena závislostí změny Gibbsovy energie na teplotě. Při vzniku komplexů NA dochází k poklesu entropie $\Delta S < 0$, který musí být doprovázen dostatečně velkým poklesem entalpie $\Delta H < 0$, takže platí $\Delta G = \Delta H - \Delta S T < 0$. Z naměřených dat můžeme získat informace o změnách termodynamických potenciálů ΔH^0 , ΔS^0 a ΔG^0 při vzniku komplexu (pokud je mechanismus vzniku komplexu známý).

2.2.2 Vliv iontů na stabilitu komplexu

Dalším faktorem ovlivňujícím stabilitu sekundární struktury NA je přítomnost a koncentrace iontů v roztoku. Jednomocné kationty jako K^+ , Na^+ podle experimentů přispívají ke stabilitě šroubovice. Snižují totiž repulzi záporně nabitých fosfátových skupin sacharido-fosfátové kostry. Ještě více však stabilitu podporují některé dvojmocné ionty. Například Mg^{2+} zvyšuje stabilitu komplexu již při velmi malých koncentracích a tento efekt se saturuje okolo koncentrací 10^{-3} až 10^{-2} M [Saenger, 1984]. Naopak některé jiné dvojmocné kationty (Hg^{2+} , Cu^{2+}) stabilitu snižují, protože reagují spíše s bázemi než s fosfátovými skupinami. V RNA mohou ještě destruktivněji působit ionty Zn^{2+} a Pb^{2+} , protože neenzymaticky katalyzují štěpení fosfodiesterové vazby. Velmi patrný je vliv iontů v roztocích se syntetickými homopolymery poly(A) a poly(U), neboť zde může měnit preferenci mezi tvorbou duplexů a triplexů.

Nukleové kyseliny mají několik míst, kam se kovové ionty mohou vázat. Níže stručně zmíníme některá z nich s důrazem na ionty, které jsme použili, tedy sodík a hořčík. Na fosfátových skupinách mohou vznikat solím podobné komplexy mezi pozitivně nabitým kovem a negativně nabitým kyslíkem. Je to možné pro většinu kovových iontů. Hydroxylové skupiny cukrů interagují především s alkalickými kovy a kovy alkalických zemin (mezi něž Na i Mg patří). Dusíky v heterocyklech bází jsou nositeli volného elektronového páru a jsou vhodnými ligandy pro alkalické kovy a kationty kovů alkalických zemin [Saenger, 1984].

Z předchozího je jasné, že tvorba komplexů mezi kovovými ionty a bázemi je specifická. Řečeno stručně, vazebná místa se nacházejí na atomech kyslíku a dusíku a mohou se v nich vázat pouze určité typy kovových iontů (ionty alkalických kovů, kovů alkalických zemin a přechodných kovů). Ve vodném prostředí může však být elektrostatická interakce mezi kationty a negativními náboji fosfátů odstíněna vysoce polárními molekulami vody, takže se (především v případě jednomocných iontů) kationty neváží k nukleové kyselině přímo, ale jsou rozprostřené ve vodní vrstvě obklopující molekulu NA. Dvojmocné kationty zůstávají blízko u řetězce, jednomocné jsou rozprostřeny o něco dál [Misra, 1999].

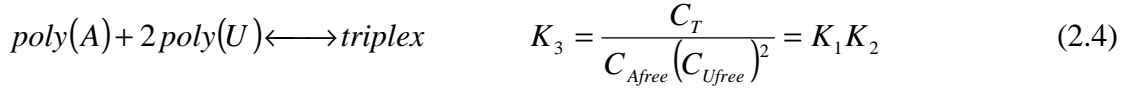
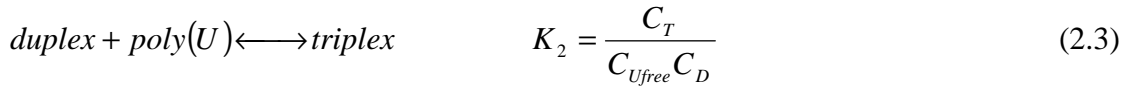
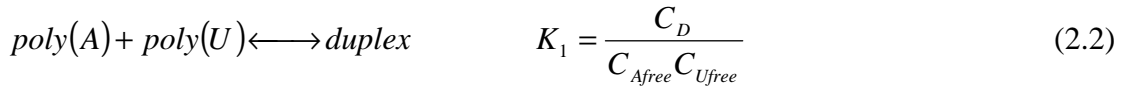
2.2.3 Termodynamický model stability duplexu a triplexu

Pro popis stability duplexu a triplexu budeme používat dvoustavový model, to znamená, že budeme předpokládat, že jednotlivá vlákna NA jsou buď zcela spárována a nebo zcela oddělena. Částečné spárování, ke kterému v roztoku také dochází, neuvažujeme. Předpokládejme, že v roztoku smíchaném z A a U vzniknou dva typy komplexů $A:U$ a $U:A*U$. Naším úkolem je určit koncentraci duplexů a triplexů v roztoku. Délku polymerních řetězců poly(A) a poly(U) však neznáme, nemůžeme tedy určit koncentrace celých duplexů a triplexů v roztoku. Proto budeme koncentraci duplexů C_D a triplexů C_T vyjadřovat jako koncentraci monomerních jednotek (v případě duplexů je monomerní jednotkou bázeový pár a v případě triplexů je to bázeový triplet). Celkovou koncentraci uracilu a adeninu C_U , C_A ve směsi můžeme vyjádřit pomocí vztahu:

$$\begin{aligned} C_U &= C_{Ufree} + C_D + 2C_T \\ C_A &= C_{Afree} + C_D + C_T \end{aligned} \quad (2.1)$$

kde C_{Ufree} , C_{Afree} jsou koncentrace uracilu a adeninu v jednořetězcových polynukleotidech.

Rovnovážné konstanty pro vznik duplexu a triplexu pak vyjadřujeme jako:



[Palacký, 2005]. Koncentrace obou komplexů může být určena z celkové koncentrace obou složek, tedy koncentrace monomerů, a z příslušných rovnovážných konstant K_1 a K_2 . Odtud je také jasné, že celková koncentrace adeninu a uracilu (C_U , C_A) v roztoku rozhoduje o tom, jaká bude výsledná koncentrace duplexů a triplexů.

Dále použijeme Van't Hoffovu rovnici pro entalpii přechodu:

$$\Delta H_{vH} = -RT^2 \left(\frac{d \ln K}{dT} \right) \quad (2.5)$$

Gibbsovu energii počítáme pomocí vztahu:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0 \quad (2.6)$$

Kde „⁰“ označuje rovnovážný stav. Rovnice (2.6) tedy popisuje změnu termodynamických potenciálů při přechodu mezi samostatnými řetězci a komplexy v rovnovážném stavu charakterizovaném teplotou T.

Změnu Gibbsova potenciálu však můžeme také vyjádřit pomocí rovnovážné konstanty:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \quad (2.7)$$

Za použití dvou předchozích vztahů můžeme dojít ke vztahu lineární závislosti převrácené hodnoty teploty tání na $\ln C_K$, kde C_K je celková koncentrace složek komplexů (vláken).

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^0} \ln C_K + \frac{[\Delta S^0 - (n-1)R \ln 2n]}{\Delta H^0} \quad (2.8)$$

Pomocí tohoto vztahu můžeme určit termodynamické parametry spojené s tvorbou a rozpadem n složkového komplexu [Breslauer, 1995]. Dosazením do vztahu (2.8) $n=2$ získáme vzorec pro duplex a pro $n=3$ pro triplex:

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_K + \frac{[\Delta S^0 - R \ln 4]}{\Delta H^0} \quad (2.9)$$

$$\frac{1}{T_m} = \frac{2R}{\Delta H^0} \ln C_K + \frac{[\Delta S^0 - 2R \ln 6]}{\Delta H^0} \quad (2.10)$$

2.3 Mikrokalorimetrie

Kalorimetrie je základním nástrojem pro studium termodynamických vlastností biologicky významných molekul v roztoku. Umožňuje získávat informace o stabilitě molekul v různých teplotních intervalech a také o energetice a kinetice jejich reakcí. Tato bakalářská práce je zaměřena na studium termodynamických změn při vzniku triplexu RNA. Díky tomu, že dnes existují dostatečně citlivé přístroje, je mikrokalorimetrie pro náš účel vhodnou metodou. V následující části je stručně shrnutý vývoj mikrokalorimetrie, předtím ale ještě několik slov o výhodnosti mikrokalorimetrických měření.

Nejdůležitějšími parametry pro pochopení termodynamických vlastností makromolekul jsou tepelná kapacita jako funkce teploty, nebo entalpie (integrál tepelné kapacity podle teploty) jako funkce teploty. Entalpie je základní extenzivní veličina pro popis termodynamického systému a teplota je základní intenzivní veličina v tomto smyslu. Jsou to veličiny konjugované a jejich funkční závislost obsahuje všechnu informaci o termodynamickém stavu makroskopického systému. Pomocí analýzy tepelné kapacity lze získat úplný termodynamický popis nativního i tepelně denaturovaného stavu makromolekul. Proto je studium tepelné kapacity biologicky funkčních makromolekul tak žádané. Její experimentální stanovení se však ukázalo jako nesmírně náročné. Vyžaduje totiž měření nárůstu tepelné kapacity ve velmi zředěných roztocích. V takových podmínkách je tepelná kapacita pozadí (rozpouštědla) často mnohokrát větší než samotná tepelná kapacita molekul, které sledujeme. Reprodukovatelné měření proto vyžaduje extrémně přesné měřicí přístroje. Toho bylo dosaženo vyvinutím vysoce precizních kalorimetrů, které jsou dnes známé jako diferenciální skenovací mikrokalorimetrie.

2.3.1 Vývoj diferenční skenovací mikrokalorimetrie

První diferenční skenovací mikrokalorimetrie byly vyvinuty v polovině šedesátých let minulého století. Jejich přesnost byla třikrát větší než přesnost podobných přístrojů používaných v té době. Této přesnosti bylo dosaženo kombinací několika metod: diferenční měření, vyrovnávání energie, kontinuální ohřev a celková tepelná izolace měřících kyvet. Zásadním krokem při vývoji však bylo radikální zmenšení měřících kyvet. Ve větších objemech roztoku totiž při ohřevu vznikají teplotní gradienty, které zkreslují výsledky měření a odstranit je lze pouze částečně mechanickým mícháním. V dostatečně malých objemech gradienty téměř nevznikají a tím je tento problém vyřešen. U prvních mikrokalorimetrů bylo zahřívání kyvet zajišťováno elektricky konstantním příkonem. Dvojice kyvet byla dobře izolována od okolního prostředí. Systém měl fungovat adiabaticky, čehož bylo dosaženo použitím vysokého vakua a termálních plášťů kyvet, které blízce následovaly teplotu v kyvetách. Takové kalorimetrie mohly měřit pouze při ohřívání roztoku (heating mode). Po každém měření musely být kyvety vyjmuty, vymyty a naplněny novým vzorkem. Bylo však nemožné naplnit kyvety při každém měření přesně stejným objemem roztoku a zajistit stejné podmínky v systému. Referenční průběh pozadí (baseline) byl při takovém měření nepoužitelný, proto byl tento přístroj schopen měřit pouze teplotně výrazné jevy (jako taní NA, proteinů a lipidů), ale ne absolutní hodnotu parciální tepelné kapacity makromolekul v roztoku.

Dalším krokem k vylepšení přístrojů tedy bylo zajištění stejného objemu měřených roztoků. Do měřícího systému byla zabudována kyveta o přesně definovaném objemu, která již nebyla vyjímatelná. Prostor i objem tedy zůstávaly stejné a referenční úroveň už byla dobře reprodukovatelná i po znovunaplnění kyvet. To

umožnilo poprvé určit absolutní hodnotu parciální tepelné kapacity proteinů a NA ve zředěných roztocích při velkém teplotním rozpětí. První kalorimetr tohoto typu byl postaven v 70. letech v ruské Akademii věd.

Ke konci 70. let přišlo další vylepšení v podobě kapilárních kyvet. Kapilární kyvety ještě více omezily teplotní gradienty v roztocích a umožnily snadnější vymývání a plnění bez vzniku vzduchových bublin. Při vysoké přesnosti měření by vzduchové bublinky mohly způsobit závažné chyby měření. Kapilární konstrukce dovoluje také vytvořit v kyvetách přetlak a tím prodloužit rozmezí teplot, ve kterém lze měřit (bez přetlaku vodné roztoky při teplotách kolem 100°C vřou, což znemožňuje měření). Tyto mikrokalorimetry se označují jako mikrokalorimetry třetí generace. Byly velmi oblíbené pro svou snadnou ovladatelnost, velkou citlivost a přesnost. Přesto však měly i své nevýhody. Kapiláry byly vyrobeny z platiny a ta reagovala s některými druhy rozpouštědel, což způsobovalo rozdílnost scanů a nereprodukovatelnost výsledků. Byly snahy nahradit platinu zlatem, narazily však na technické obtíže. Další nepřesnosti způsobovaly organické materiály (použité jako lepidla či tepelná izolace), které byly použity i v předchozích modelech. Malá přesnost předchozích modelů však nedovolovala nevhodnost těchto materiálů odhalit. Také konstantní ohřev není pro tuto přesnost vhodný, protože s rostoucí teplotou roste i tepelná kapacita kyvet a to negativně ovlivňuje experiment.

Tyto nevýhody byly odstraněny ve čtvrté generaci mikrokalorimetrů, která se používá dnes. Mikrokalorimetry této generace jsou navíc schopné se stejnou přesností měřit ohřívání i ochlazování vzorku, ačkoli dřívější modely umožňovaly měření pouze při ohřívání. Další vývoj mikrokalorimetrů je zaměřen na zvyšování jejich citlivosti [Privalov, 1995].

2.3.2 Současná diferenční skenovací mikrokalorimetrie

Největším rozdílem oproti předchozím mikrokalorimetrům je realizace ohřívacího i ochlazovacího procesu se stejnou přesností měření v obou módech. V předchozích kalorimetrech je kyveta zahřívána konstantním příkonem a termální plášť okolo kyvet zabráňuje výměně tepla s okolím. V nových přístrojích hraje termální plášť hlavní roli při ohřívání i ochlazování kyvet. Teplota pláště se mění konstantní rychlostí. To zajišťuje počítač. Dostává data od platinového teploměru umístěného v plášti a porovnává je se svými daty, která odpovídají požadované teplotě, poté odesílá pokyny systému ohřevu a ochlazování. Tím počítač přímo kontroluje změny teploty termálního pláště a udržuje konstantní rychlost ohřevu (ochlazování). Maximální rychlost ohřevu je z praktických důvodů 2K/min, minimální rychlost není principiálně omezena. Rozdíl teplot mezi oběma kyvetami je měřen polovodičovými čidly. Pro jeho vyrovnávání jsou přímo u kyvet umístěny přídatné elektrické ohříváče. Příkon, který je třeba dodat pro vyrovnání teploty mezi kyvetou se vzorkem a referenční kyvetou, je zaznamenáván počítačem jako základní výstupní údaj měření. Je-li třeba dodávat teplo kyvetě se vzorkem, je tento signál brán jako kladný, v opačném případě má znaménko záporné.

Kapiláry kyvet jsou vyrobeny z čistého 24-karátového zlata. Kapiláry jsou zakončeny krátkými platinovými trubičkami, které slouží k plnění (vstup a výstup). Vstup i výstup ústí do manostatu. V uzávěru, který na manostat nasedá, je zabudován tlakovací píst. Jím je možné dosáhnout tlaku okolo 3 atm. V manostatu je tlakový senzor dodávající počítači informace o tlaku. Tlak 3 atm stačí k tomu, abychom měření ve vodných roztocích mohli rozšířit až do 130°C, aniž by docházelo k varu či vzniku plynových bublinek.

Ideálně by referenční a vzorková kyveta měly být naprosto shodné, technicky však není možné zhotovit dvě identické kyvety. Tato nepřesnost se projeví jako rozdíl

mezi baselinami při ohřevu a při ochlazování (obě kyvety naplněné stejným roztokem). Ideálně by se tyto baseliny měly shodovat.

I když na mikrokolorimetru neprobíhá experiment, je přesto nutné, aby byl stále zapnutý, měřicí kyvety musí být naplněné a počítač udržuje jejich teplotu na 25°C. Proto i počítač musí být stále zapnutý. V době mezi měřeními stačí kyvety naplnit deionizovanou vodou [Privalov, 1995].

2.3.3 Průběh měření

Diferenciální skenovací mikrokolorimetr je navržen tak, aby měřil rozdíl tepelných kapacit dvou kapalin, rozpouštědla a roztoku. Provádí to měřením relativního rozdílu tepelných kapacit referenční a vzorkové kyvety v závislosti na teplotě, což jednoduše vyjadřuje vzorec:

$$C = \frac{\partial Q}{\partial T} \quad (2.11)$$

Přesné výsledky však nelze získat během jednoho měření. Aby byla naměřená data reprodukovatelná, je třeba nejdříve provést kalibrační měření. Obě kyvety naplníme rozpouštědlem a měříme v celém teplotním rozsahu, který budeme používat. Výsledná křivka (tzv. baselina) často není lineární, ani téměř nulová, jak by se dalo očekávat. Způsobují to rozdíly mezi oběma kyvetami a nestability při přechodu z režimu s konstantní teplotou do režimu s lineární změnou teploty. Během měření počítač baselinu aproximuje polynomiální funkcí a určuje příkon, o který se baselina liší od nuly. Při dalším měření může být tento rozdíl automaticky odečítán. Pokud do vzorkové kyvety vložíme vzorek, je výsledkem takového měření přímo vyrovnávací příkon (rozdíl příkonu referenční a vzorkové kyvety). Baselinu můžeme odečíst i dodatečně po provedení obou měření. Výstupem měření je křivka, která znázorňuje vyrovnávací příkon v mikrowattech na požadované teplotní škále. Příkon odpovídá rozdílu tepelných kapacit sledovaného vzorku a rozpouštědla [Privalov, 1995].

Přímou integrací pak můžeme z tepelné kapacity přímo určit entropii i entalpii přechodu:

$$\Delta H = \int_{t_2}^{t_1} C_p dT \quad (2.12)$$

$$\Delta S = \int_{t_2}^{t_1} \frac{C_p}{T} dT \quad (2.13)$$

Výpočtu entropie a entalpie v našem případě se budeme podrobněji věnovat v kapitole o zpracování dat.

3. Cíle práce

Jak je již zmíněno výše, moderní mikrokolorimetry jsou přístroje s vysokou citlivostí a malými nároky na množství vzorku, proto představují vhodný nástroj na určování termodynamických parametrů komplexů nukleových kyselin. Přesto je počet původních prací, které by využívaly diferenciální skenovací mikrokolorimetrii poměrně nízký. Rozsáhlejší studie, které by se věnovaly porovnávání výsledků na sérii vzorků o různých koncentračních poměrech, je téměř nemožné v literatuře najít. Stejně je to i se studiiemi systémů, ve kterých se vyskytuje několik různých typů komplexů RNA.

Úkolem předložené práce proto bylo provést sérii experimentů s RNA na DSC přístroji. Použili jsem polynukleotidy polyA a polyU, které představují obvyklý molekulární model pro RNA. Měřené vzorky měly mít různý stechiometrický poměr mezi polyA a polyU, aby se měnila preference vzniku duplexů a triplexů. Dále se měla v rámci práce uskutečnit srovnávací měření vzorků, které obsahují pouze jednomocné kationty a vzorků s přídavkem hořčíku (ionty Mg^{2+}).

Práce měla několik cílů. V první řadě šlo o to, abychom prověřili použitelnost daného přístroje pro kvantitativní analýzu termodynamických vlastností složitějších RNA molekulárních systémů a abychom odhalili případná úskalí nebo omezení spojená s tímto typem aplikace. Druhým cílem bylo získání co nejúplnějších (v závislosti na okolnostech, které byly zjišťovány jako první cíl práce) termodynamických charakteristik duplexu a triplexu řetězců polyA a polyU a kvantifikace vlivu hořčíku na tyto veličiny.

4. Příprava a provedení experimentu, zpracování dat

4.1. Použité vzorky

Pro měření byly použity vzorky synteticky připravené RNA. Konkrétně byl vzorek tvořen RNA polynukleotidy – kyselinou polyadenilovou (PolyA) a kyselinou polyuridylovou (PolyU). Vzorek Poly(A) ve formě draselné soli byl dodán od firmy Fluka – Biochemica a vzorek Poly(U), také ve formě draselné soli, od firmy Sigma-Aldrich. Délka jednotlivých řetězců polynukleotidů v dodaných vzorcích není známa. Koncentrace RNA jsou proto udávány v monomerních jednotkách, které mají molekulovou váhu - bázeový pár (A:U) 711,55 a bázeový triplet (U:A*U) 1055, 81.

Pro přípravu a ředění roztoků byly použity dva typy pufrů, které se od sebe liší iontovým složením. Prvním pufrům byl 20mM fosfátový pufr s přídavkem 100mM NaCl o pH 7,0 (dále označovaný PBNa). Původně jsme zamýšleli použít fosfátový pufr pro všechna měření. To zahrnovalo i měření s ionty Mg^{2+} , ale ukázalo se, že dochází ke srážení pufru PBNa s hořčíkem. Museli jsme proto zvolit jiný pufr, který se s hořčíkem nesráží. Vybraným druhým pufrům byl 20mM kakodylátový pufr se 100mM NaCl a 5mM $MgCl_2$ o pH 6,4 (dále označovaný CacMg).

Vzorky byly míchány ve dvou krocích. Nejprve jsme připravili zásobní roztoky 8mM Poly(A) i Poly(U) rozpuštěných v pufru. Ty jsme dále smíchali tak, aby Poly(A) a Poly(U) byly v určeném poměru. Požadované poměry PolyA:PolyU byly 1:1, 1:2 a 1:1,5. Roztok jsme následně doředili pufrům tak, aby výsledná koncentrace vzorku obsahovala vždy 0,4mM adenosinů. Tento postup jsme použili při přípravě vzorků s PBNa i s CacMg. Celkově jsme měřili 6 různých vzorků.

Při prvních měřeních na polynukleotidech byly zjištěny změny průběhů DSC křivek při opakování scanů. Domnívali jsme se, že to může být způsobeno kontaminací roztoku RNasami, což jsou enzymy štěpící cukr-fosfátovou páteř polymeru. Ke každému vzorku jsme proto ještě přidali inhibitor RNasy od firmy Sigma. Inhibitor musel být do vzorků přidáván až těsně před měřením, jelikož jeho garantovaná životnost je pouze 48 hodin. Přidávali jsme ho v poměru 1:500.

4.2. DSC měření

Před započítáním samotného měření se doporučuje provést takzvaný „předběh“, což spočívá v tom, že obě kyvety naplníme rozpouštědlem (stejným, jaké bylo použito při přípravě vzorků) a necháme proběhnout jeden cyklus (tedy jedno ohřátí a jedno ochlazení) ve stejném teplotním rozmezí, které budeme používat pro měření vzorku. Rychlost změny teploty může být vyšší než při samotném měření. My jsme používali 2K/min. Tento proces slouží k vytvoření stabilní povrchové vrstvy na stěnách kyvet, aby interakce stěn kyvet a roztoků už dále neovlivňovala měření.

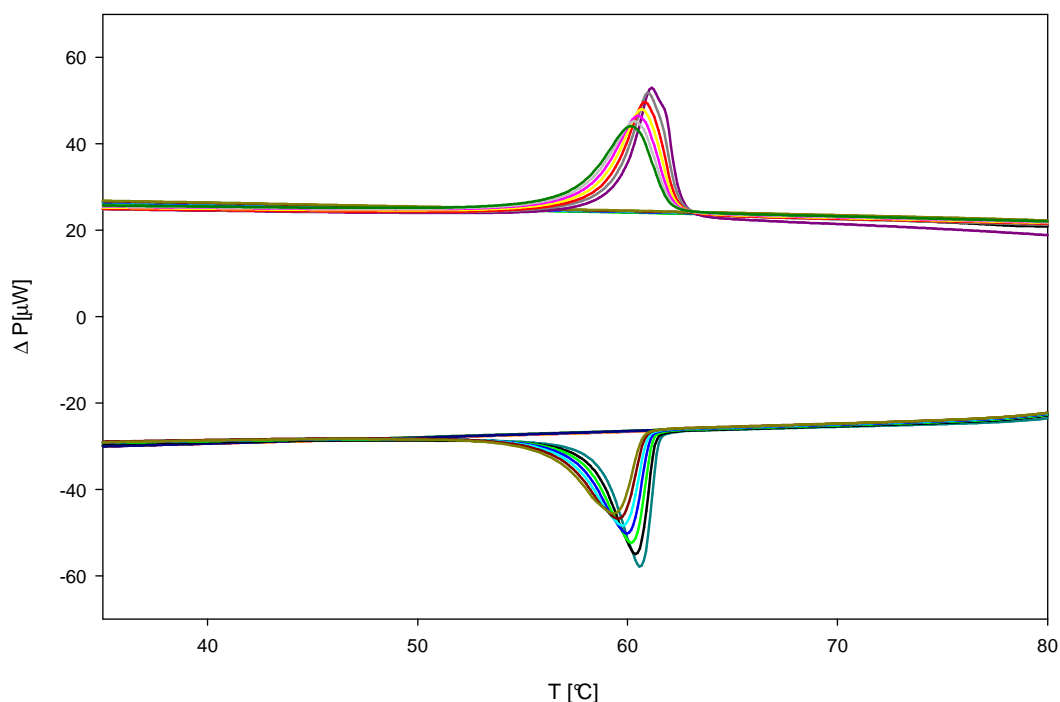
Samotné měření probíhalo ve dvou krocích - nejprve referenční měření, poté měření se vzorkem. Před každým plněním kyvet bylo třeba vzorek (či rozpouštědlo) dobře odvzdušnit, aby v něm při zahřívání nevznikaly vzduchové bublinky, které by mohly znehodnotit celé měření. Odvzdušnění bylo prováděno v exsikatoru ve skleněných nádobkách s magnetickým mícháním při pokojové teplotě a nízkém tlaku.

Měření jsme prováděli v rozmezí 5°C až 90°C. Použitá rychlost ohřevu (ochlazování) byla 1K/min a tlak během měření byl udržován na 3atm. Při referenčním měření byly obě kyvety naplněny rozpouštědlem. Kalorimetr v této části měření zaznamenává referenční úroveň (baseline). Scany při ohřívání a při ochlazování by měly

být symetrické kolem nuly. Přístroj jsme nastavili tak, aby při prvním scanu měřil ohřívání vzorku. Pro referenční měření je třeba nechat proběhnout nejméně 3 cykly (tj. 6 scanů), protože první cyklus bývá většinou pro zpracování nepoužitelný a při posledním cyklu vyměňujeme rozpouštědlo ve vzorkové kyvetě za vzorek.

Vyměněním rozpouštědla za vzorek začíná druhý krok měření, to jest měření se vzorkem. Vzorek plníme do kyvetu tzv. „on the fly“, čili za běhu. Během plnění tedy kalorimetr stále měří. Výměnu provádíme při ochlazování - začneme s ní přibližně u 30°C a měřicí kyvetu musíme vyprázdnit a opět naplnit co nejrychleji, protože je nutné znovu dosáhnout tlaku 3atm dříve než kalorimetr dosáhne 0°C, aby se nenarušil průběh dalšího cyklu. Se vzorkem jsme nechali proběhnout větší počet cyklů, zpravidla 6 až 8.

Po vyměnění pufru za vzorek zůstávají rychlost i rozsah měření stejné jako u referenčního měření.



Obrázek 4.1: Příklad záznamu měření - vzorek RNA (A:U - 1:2), rozpouštědlo PBNa. Na obrázku jsou zachyceny průběhy baselin (téměř lineární) i průběhy měření se vzorkem (obsahují pík), scany s kladnými hodnotami jsou pro ohřívání a se zápornými pro ochlazování. (teplotní interval je zkrácen, aby píky byly lépe vidět)

4.3. Postup při zpracování dat

4.3.1. Příprava dat

Data, která jsou výstupem měření mikrokolorimetru, je nutné na zpracování nejprve připravit (tj. provést základní zpracování). Mikrokolorimetr zaznamenává měřená data (teplotu, vyrovnávací příkon a čas) v pravidelných časových intervalech. Pro naše zpracování je ale přehlednější pracovat pouze se závislostí příkonu na teplotě určené vždy ve stejných teplotních bodech. Proto jsme zvolili novou teplotní stupnici (s intervalem 0,2°C) a prvním krokem přípravy byl přepočtení teplotní závislosti příkonu pro tuto stupnici. Toho jsme dosáhli interpolací. Výpočet usnadňovalo zjištění, že rychlost ohřevu je s vysokou přesností nezávislá na čase, což ukázala analýza závislosti změny teploty ($\frac{\partial T}{\partial t}$) na čase.

Dalším krokem přípravy bylo odečtení referenčních scanů (baseline) od scanů se vzorkem. K tomuto účelu jsme u každého měření vybrali baselinu, jejíž průběh se zdál „nejustálenější“. Pokud pro fázi snižování teploty takto vhodně vypadala až poslední baselina (kdy se při teplotě pod 30°C měnilo rozpouštědlo za vzorek a tedy její nízkoteplotní část byla zdeformovaná), doplnili jsme její průběh v rozmezí od 30°C do 0°C pomocí průběhu předposledního scanu. Odchylku posledního a předposledního scanu jsme aproximovali kvadratickou funkcí a s touto odchylkou jsme předposlední scan přičetli (příklad průběhu baselin je na obrázku 4.2). Baselinu jsme od scanů se vzorkem odečetli přímo.

Vycházíme ze základního vztahu pro naměřený vyrovnávací příkon:

$$\Delta P_{celk} = \left[\left(V^{cell} c^{solute} \frac{C_p^{vz}}{Mr} + (V^{cell} - V^{vz}) \rho C^{rozp} \right) - V^{cell} \rho C^{rozp} \right] \frac{dT}{dt}, \quad (4.1)$$

kde ΔP_{celk} je celkový rozdíl příkonu dodávaný vzorkové kyvetě oproti kyvetě referenční, V^{cell} je objem kyvety, c^{solute} je koncentrace vzorku v roztoku (v g.l⁻¹), C_p^{vz} je molární tepelná kapacita vzorku v roztoku, Mr je molekulová hmotnost rozpouštěné látky, V^{vz} je celkový objem rozpuštěné látky v kyvetě, ρ je hustota rozpouštědla, C^{rozp} je tepelná kapacita na jednotku váhy rozpouštědla. V tomto vzorci předpokládáme, že kyvety jsou ideálně shodné, což by znamenalo, že při referenčním měření rozpouštědlo-rozpouštědlo vyjde rozdíl příkonů obou kyvet nulový (tj. $\Delta P_{rozp}=0$ W, průběh baselin se drží na nule). To však v našem případě nenastává (viz.obr. 4.1), naopak rozdíl příkonů obou kyvet je poměrně velký. Přičítáme to nestejnému objemu vzorkové a referenční kyvety [Privalov, 2005]. Vzorec (4.1) přizpůsobíme této skutečnosti takto:

$$\Delta P_{celk} = \left[\left(V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} + (V_{vz}^{cell} - V^{vz}) \rho C^{rozp} \right) - V_{ref}^{cell} \rho C^{rozp} \right] \frac{dT}{dt}, \quad (4.2)$$

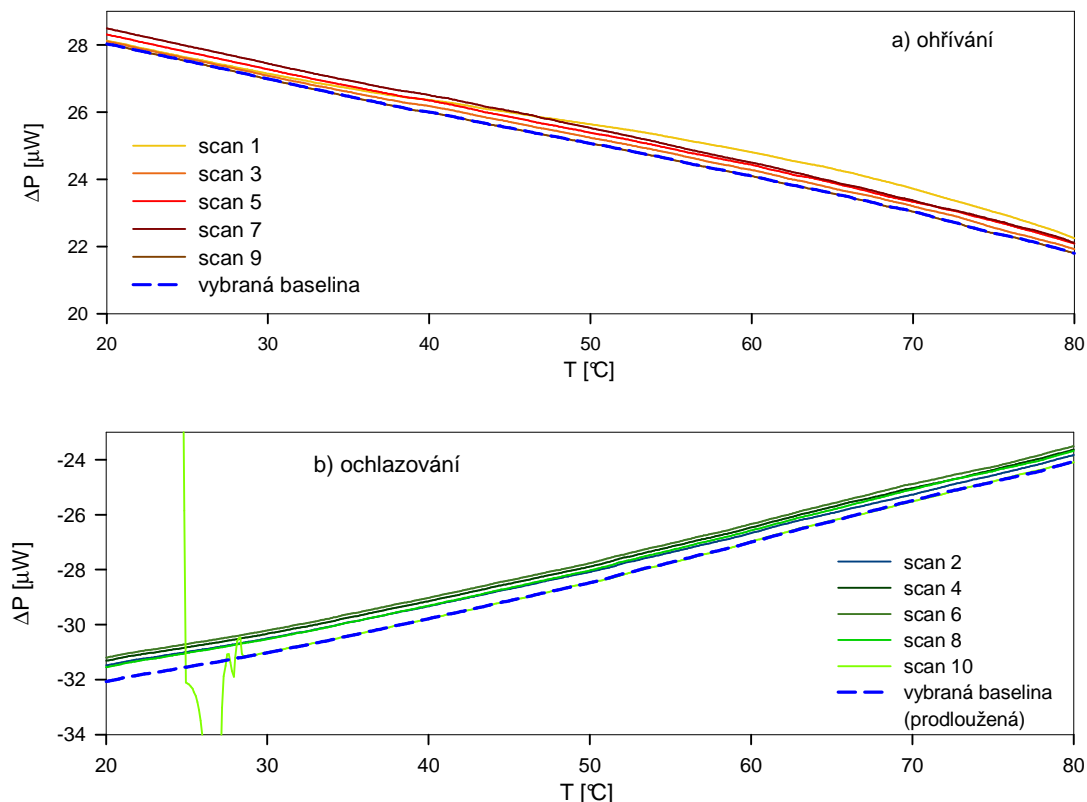
kde V_{vz}^{cell} (V_{ref}^{cell}) je objem vzorkové (referenční) kyvety a c^{vz} je molární koncentrace vzorku. Potom z (4.2) dostaneme při absenci vzorku vzorec pro průběh baseliny ΔP_{rozp} :

$$\Delta P_{rozp} = (V_{vz}^{cell} - V_{ref}^{cell}) \rho C^{rozp} \frac{dT}{dt} \quad (4.3)$$

Požadovaný rozdíl příkonů, který charakterizuje vzorek, tedy dostaneme odečtením referenčního scanu od scanu se vzorkem. Ze vztahů (4.2) a (4.3) dostaneme:

$$\Delta P_{celk} - \Delta P_{rozp} = \left[V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} - V^{vz} \rho C^{rozp} \right] \frac{dT}{dt} \quad (4.4)$$

V tomto výraze člen $V^{vz} \rho C^{rozp}$ bohužel neznáme, ale můžeme předpokládat jeho lineární závislost na teplotě.



Obrázek 4.2: Příklad průběhu scanů rozpouštědlo-rozpouštědlo (v omezeném teplotním intervalu), a baseliny vybrané pro odečet. (Měření PolyA:PolyU 1:1, rozp.PBNa.)

Posledním krokem přípravy dat bylo omezení teplotního intervalu. V koncových částech teplotního intervalu totiž může docházet k odchylkám od předpokládaného průběhu, které zřejmě nesouvisí se změnou chování vzorku při těchto teplotách. Je to způsobeno pravděpodobně tím, že kalorimetr na začátku každého scanu (tj. na začátku ohřívání, či ochlazování) přechází ze stavu o stálé teplotě do stavu, kdy se teplota plynule lineárně mění. Deformace teplotního průběhu signálu by mohly zkreslit měření. Pro další zpracování jsme vybrali interval 20 až 80 $^{\circ}C$ (použit i na obr.4.2). Z důvodů, které budou uvedeny v následující kapitole, nemohlo však být toto rozmezí použito pro všechna měření.

4.3.2. Zpracování dat

Pro zpracování předpřipravených dat jsme použili postup, při kterém jsme pozadí aproximovali polynomem a odečetli. Termodynamické parametry spojené s rozpadem (vznikem) komplexů pak určujeme přímou integrací přebytku signálu („excess heat capacity“).

K aproximaci pozadí jsme použili jednoduchou kubickou funkci. K fitování byla vybrána vhodná část dat ze začátku a z konce teplotního intervalu. Ukázalo se, že rozmezí vhodné pro fitování je třeba vybrat pro každé měření zvlášť. Toto rozmezí nesmí zahrnovat teplotní oblast, kde jsou patrné změny příkonu způsobené vznikem či rozpadem komplexů. U měření s rozpouštědlem PBNa se píky vzniku komplexů zvedají poměrně strmě a díky tomu lze snadno vybrat vhodné teplotní intervaly stejné pro všechny scany jednoho měření. U měření s hořčíkem (rozpouštědlo CaMg) se píky vzniku komplexů začínají zvedat velmi pozvolna a maxima dosahují u vyšších teplot, než v předchozím případě. Z toho důvodu bylo třeba rozšířit interval, který jsme zvolili při předzpracování. Bez rozšíření bychom u vyšších teplot nenašli dostatek dat pro fit. Nový pracovní interval byl zvolen od 20 do 86°C. I přesto ale nebylo snadné nalézt teplotní intervaly vhodné pro fit. V některých případech bylo třeba v rámci jednoho měření použít různé teplotní intervaly pro různé scany.

Aby bylo možné získat termodynamické parametry, je tedy, jak jsme již uvedli, třeba nejprve odečíst pozadí od experimentálních dat. To lze znázornit rovnicí:

$$\Delta P = \Delta P_{celk} - \Delta P_{rozp} - \Delta P_{bas} \quad (4.5)$$

kde ΔP_{bas} je průběh pozadí.

Jakmile známe ΔP , můžeme již termodynamické parametry určit přímou integrací. Závislosti pro změnu entalpie a entropie jsou:

$$\Delta H = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c_{vz}} \frac{dT}{dt} \int \Delta P(T) dT \quad (4.6)$$

$$\Delta S = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c_{vz}} \frac{dT}{dt} \int \frac{\Delta P(T)}{T} dT \quad (4.7)$$

5. Výsledky měření a diskuse

5.1. Průběhy scanů po základním zpracování

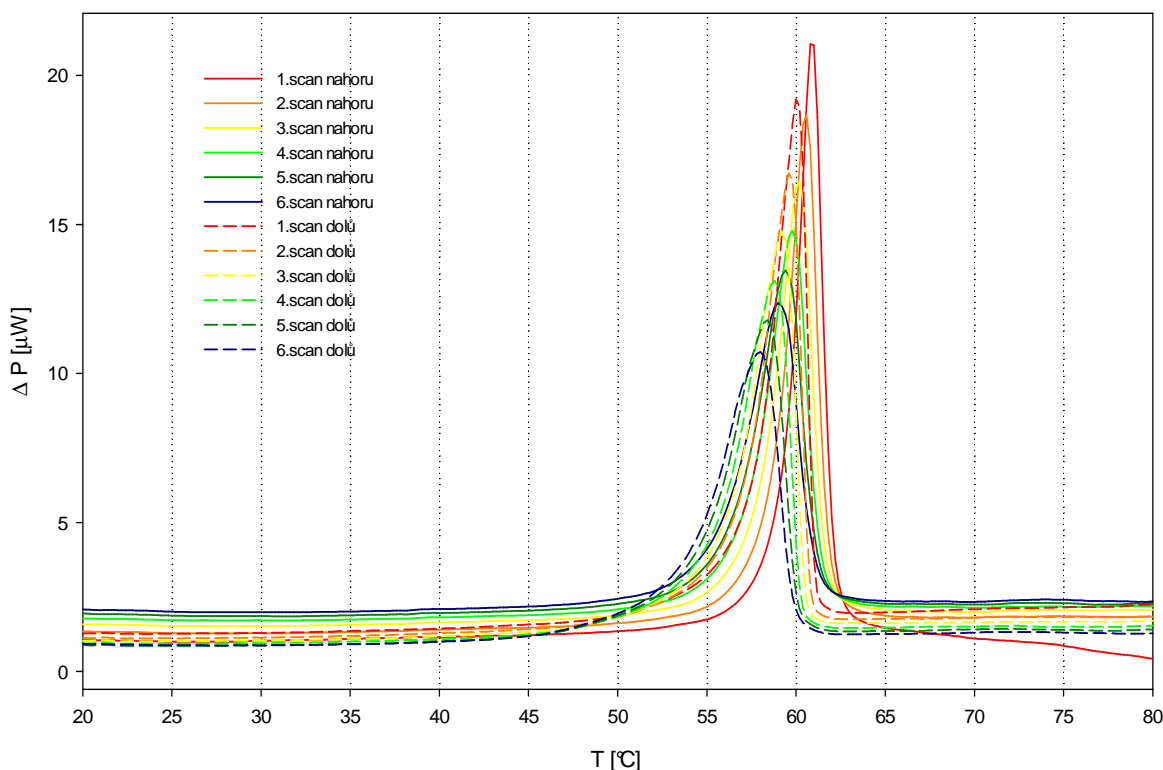
V této kapitole jsou v šesti grafech uvedeny všechny scany naměřené u jednotlivých vzorků. Scany jsou po základním zpracování, tj. byly od nich odečteny baseliny a teplotní interval byl omezen od 20 do 80°C (resp. do 86°C pro měření s CaMg).

V každém grafu jsou uvedeny jak scany pro ohřívání (nahoru), tak scany pro ochlazování (dolů). Data scanů pro ochlazování jsou vynásobena (-1), aby je bylo možné snadněji porovnat se scany pro ohřívání. Scany pro ohřívání jsou ve všech grafech znázorněny plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně. Pro přehlednost má každý cyklus (tj. ohřev a po něm následující ochlazení) svou barvu čáry.

Tyto grafy nám posloužily k tomu, abychom vybrali vhodné teplotní intervaly, které jsme dále použili pro fitování pozadí. Vybrané teplotní intervaly jsou uvedeny v popisu každého grafu.

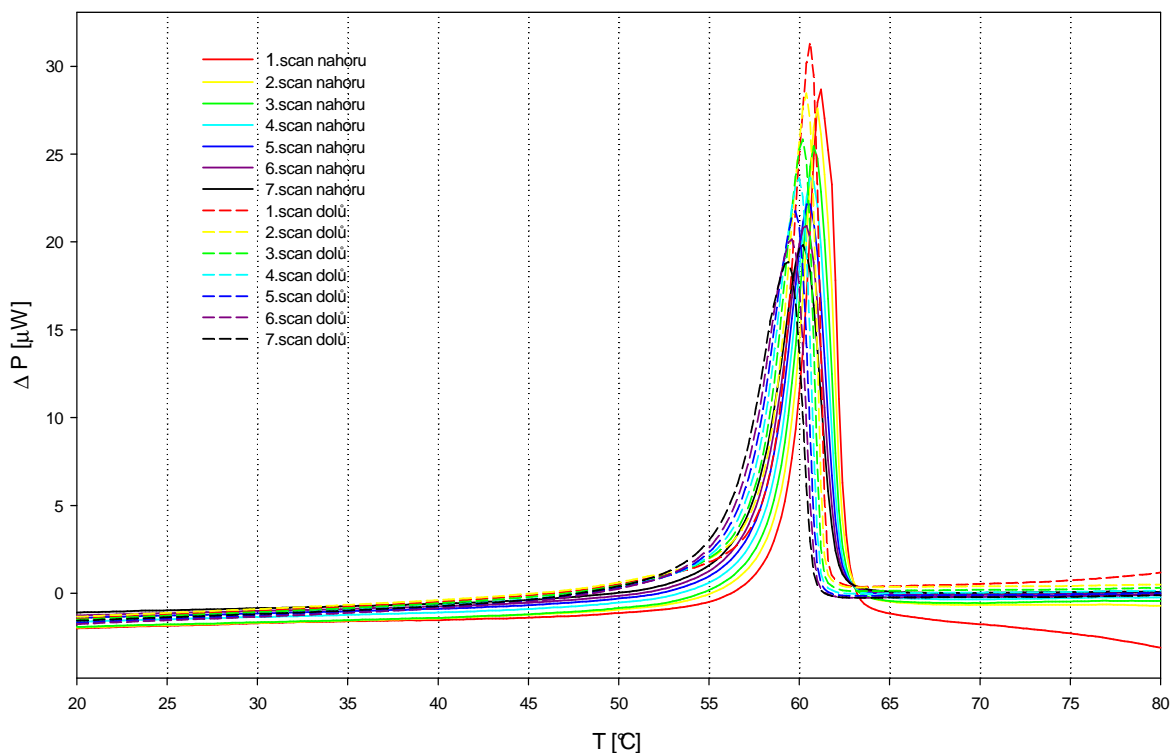
Měření s PBNa:

Získané závislosti ukazují, že u žádného vzorku neměly křivky při opakovaných scanech stejný průběh. Vždy docházelo k postupnému posunu maxima křivky k nižším teplotám a jejímu rozšiřování. Kromě toho je patrný i určitý rozdíl mezi scany měřenými při nárůstu teploty a scany při jejím poklesu. Ten je patrně projevem hystereze systému, která může být dána buď hysterezním chováním samotného mikrok calorimetru nebo tím, že doba potřebná na vytvoření komplexů je srovnatelná s dobou přejezdu kritického teplotního úseku. Protože v obou případech by se měla hystereze zmenšovat při snižování rychlosti scanování, není možné při použití našich vzorků rozhodnout, co je hlavní příčinou tohoto rozdílu.

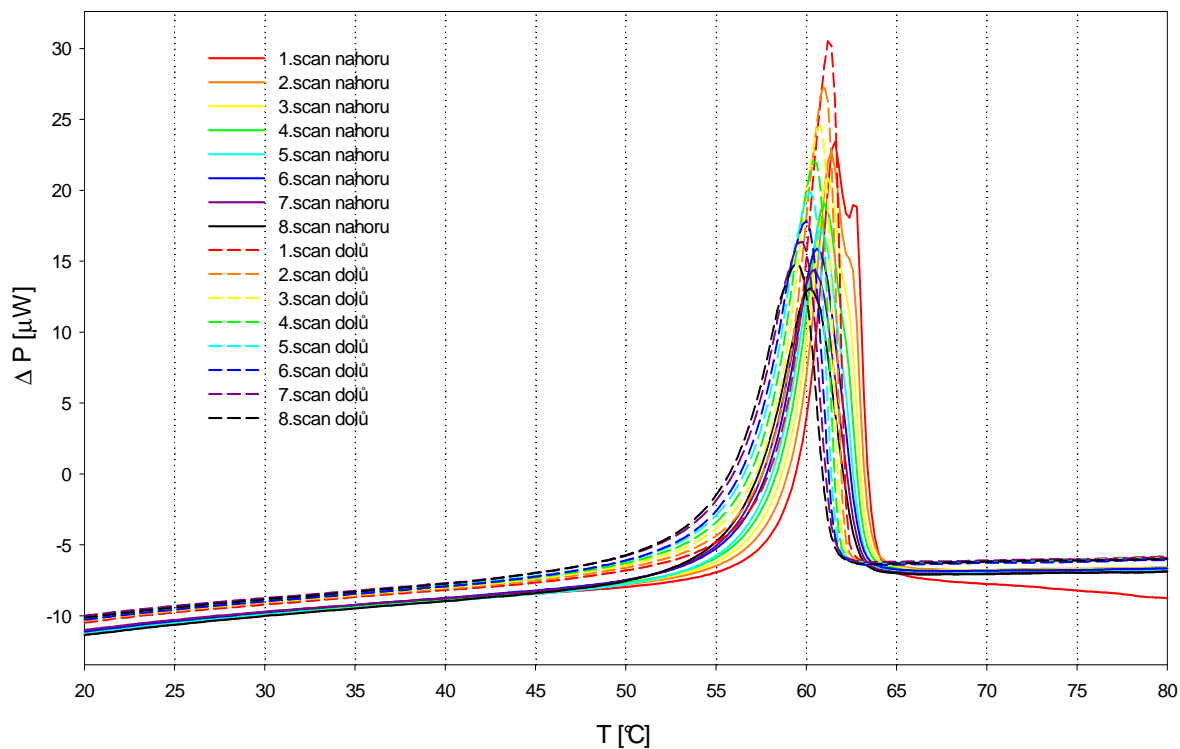


Obrázek 5.1: A:U - 1:1, PBNa, vybrané meze pro pozadí: 20-42°C, 67-75°C

scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)



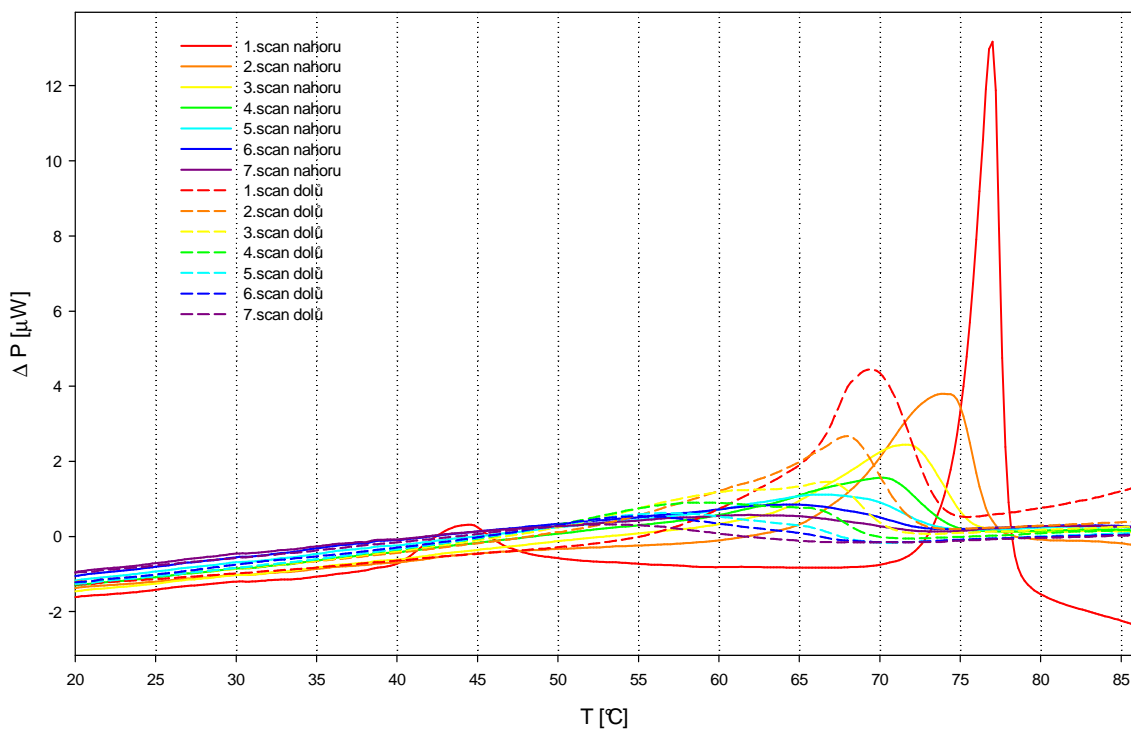
Obrázek 5.2: A:U - 1:2, PBNa, vybrané meze pro pozadí: 20-42°C, 67-75°C
 scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)



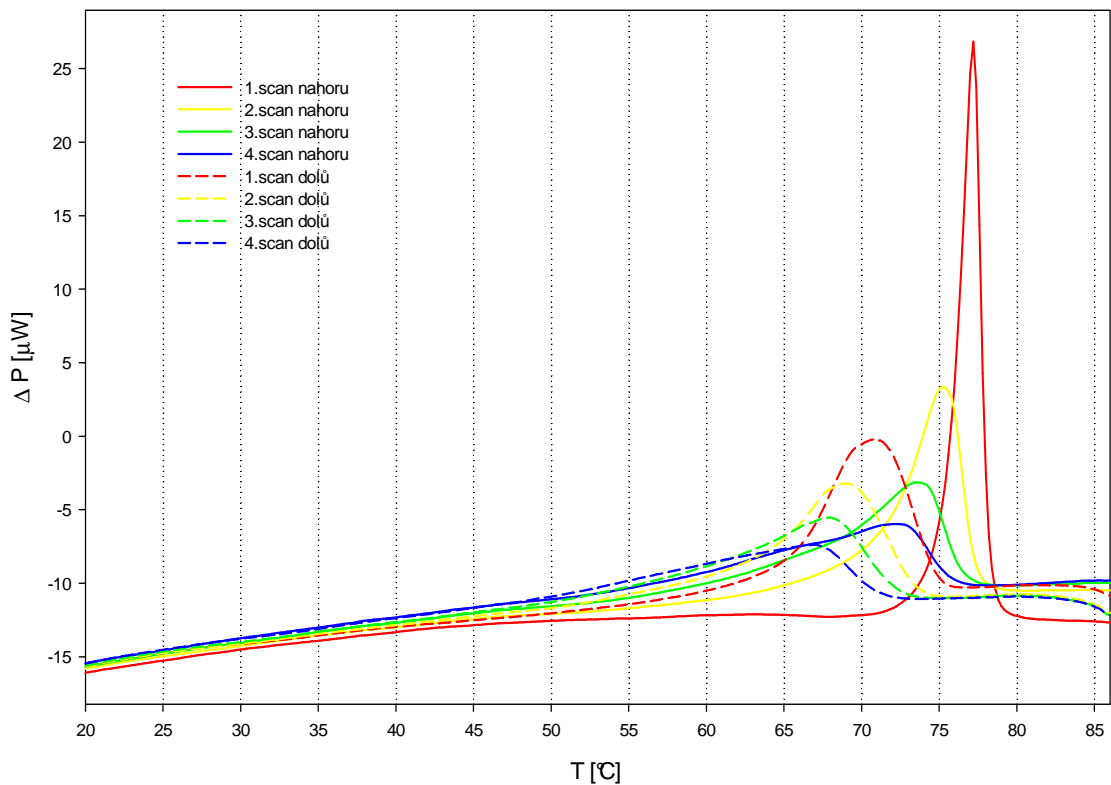
Obrázek 5.3: A:U - 1:1,5, PBNa, vybrané meze pro pozadí: 20-42°C, 67-80°C
 scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

Měření s CacMg:

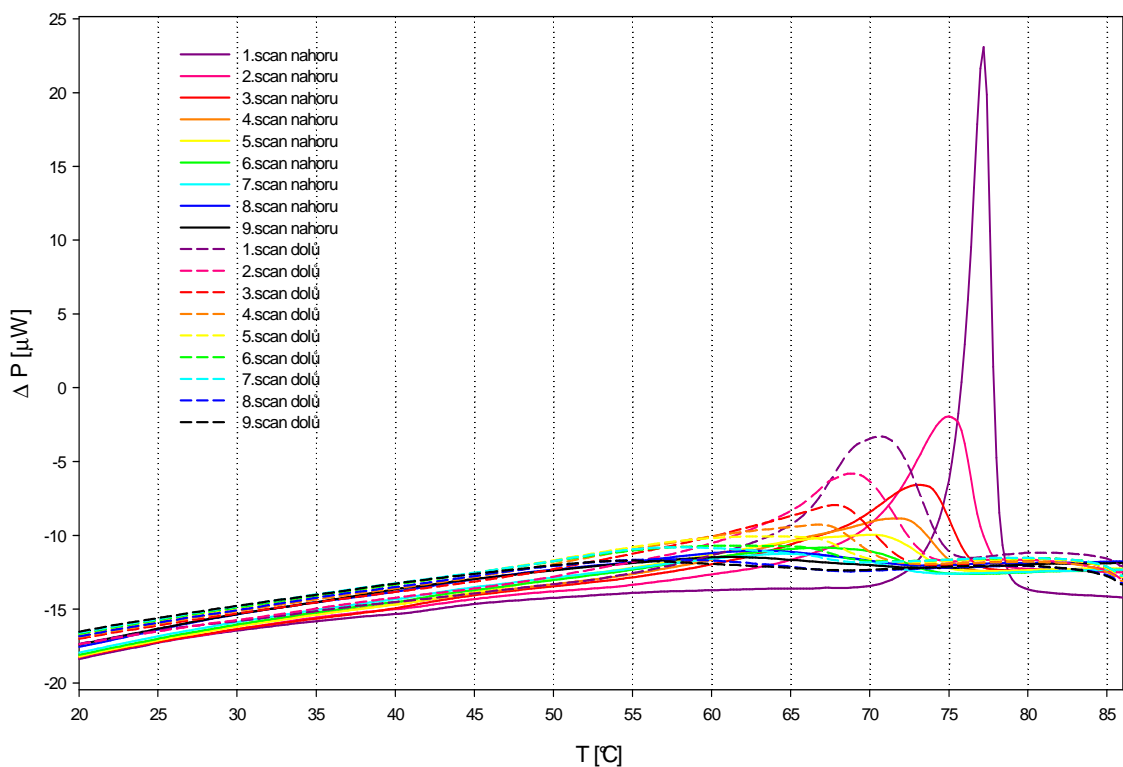
U vzorků obsahujících hořčík se rozdíl v následujících scanech markantně zvětšily, takže na rozdíl od měření bez hořčíku se měnil i celkový charakter naměřených závislostí. Bylo proto i mnohem obtížnější nalézt vhodné teplotní intervaly pro fit. Některé scany jsme z dalšího zpracování museli úplně vypustit, protože by nám neposkytly žádnou užitečnou informaci, a teplotní intervaly jsme pro ně tedy nehledali. I přesto ale nebylo vždy možné najít vhodné teplotní intervaly stejné pro všechny scany jednoho měření. Vybrané teplotní intervaly pro dále zpracovávané scany jsou detailně vypsány v popisech obrázků.



Obrázek 5.4: A:U - 1:1, CacMg, vybrané meze pro pozadí: (vynechán 1.scan nahoru), 2.scan nahoru 20-54°C, 79-84°C; 3. až 5.scan nahoru 25-35°C, 79-84°C; (6. a 7.scan nahoru vynechány) scany dolů 20-30°C, 75-86°C (6. a 7.scan dolů vynechány) scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)



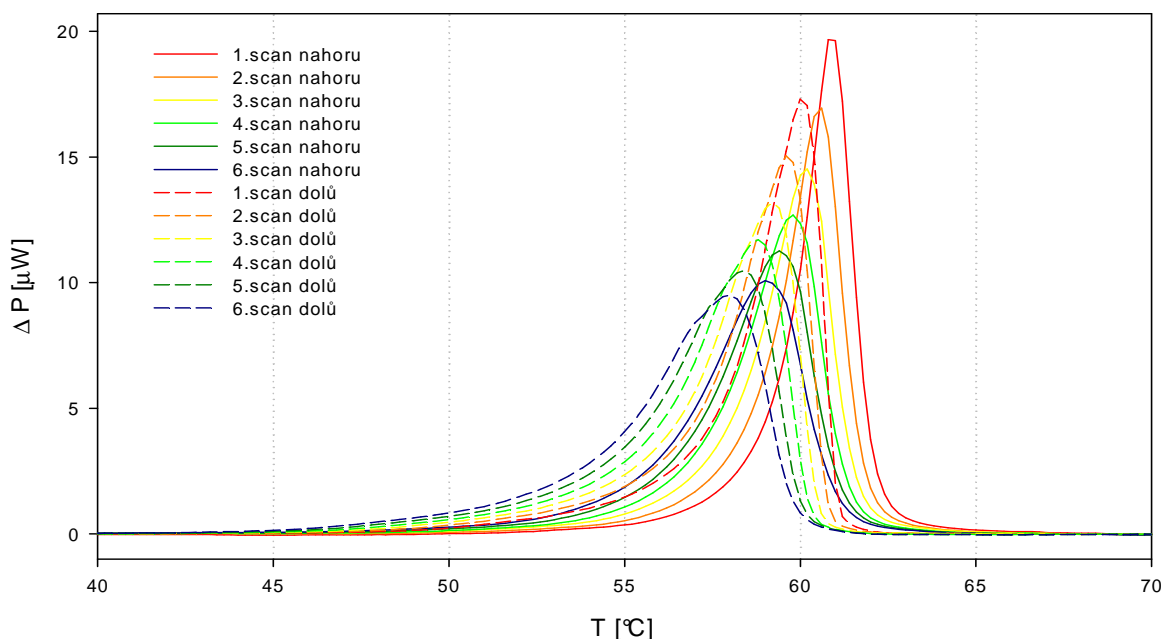
Obrázek 5.5: A:U - 1:2 , CaMg, vybrané meze pro pozadí: 20-51°C, 80-84°C
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)



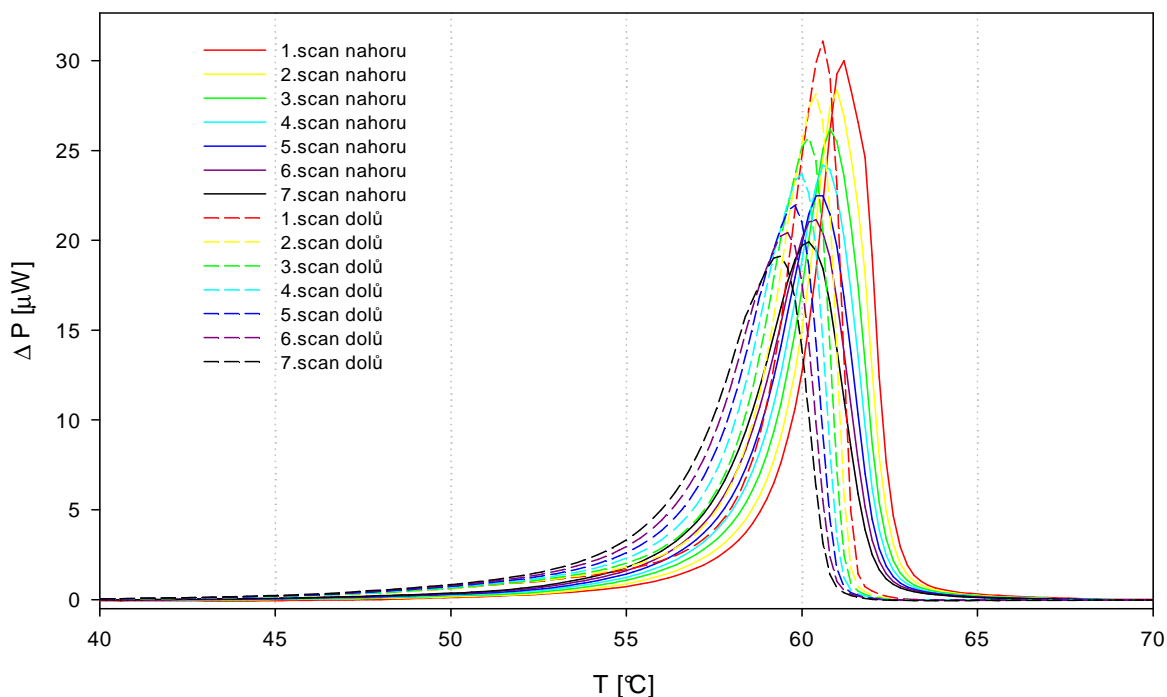
Obrázek 5.6: A:U - 1:1,5, CaMg, vybrané meze pro pozadí: scany nahoru 20-45°C, 80-84°C ,
scany dolů 20-48°C, 77-82°C; počínaje 5.scanem (tedy od 5. scanu dolů i nahoru včetně) již
nebylo možné pozadí uspokojivě odečíst, ponechali jsme tedy pouze 1. až 4.scan (viz obr. 5.12)
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

5.2. Průběhy scanů po odečtení pozadí

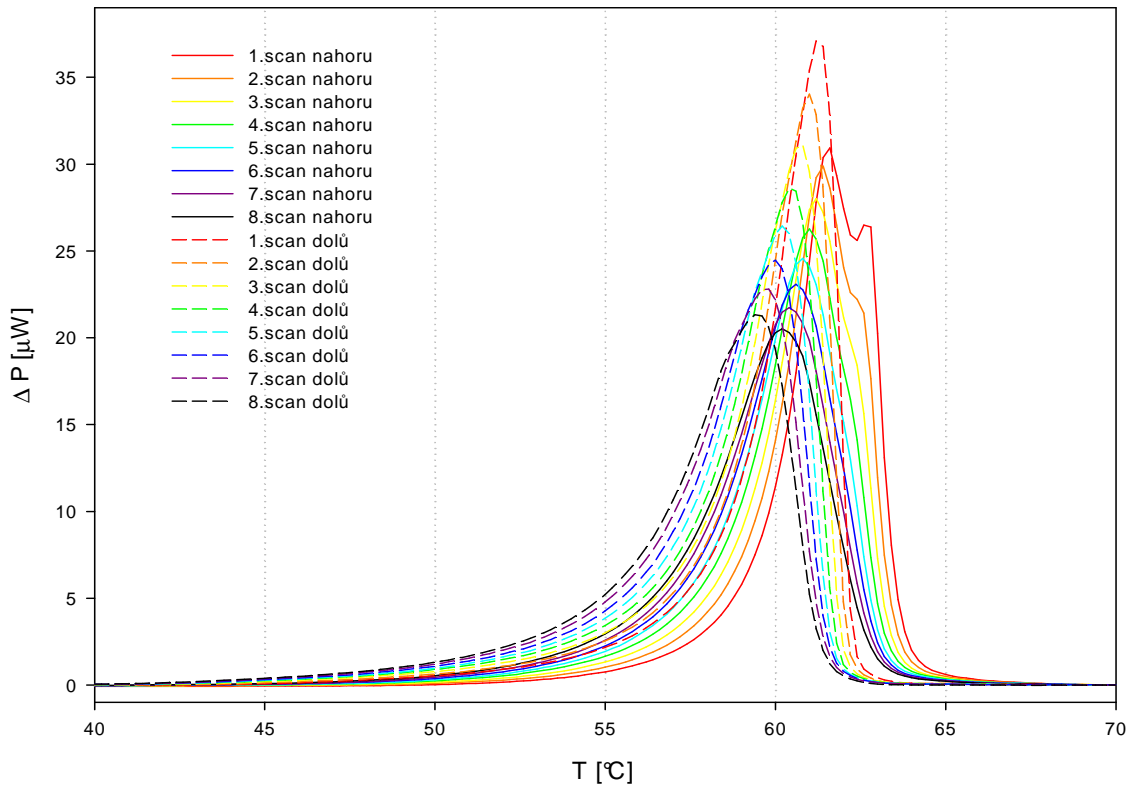
V tomto oddíle jsou prezentovány grafy průběhů scanů po odečtení pozadí. Byly ponechány pouze scany použité při dalším zpracování. Po odečtení pozadí zůstane v grafech již pouze hodnota vyrovnávacího příkonu charakterizující vznik a rozpad komplexů v roztoku. Pokud komplexy nevznikají ani nezanikají, je tento příkon nulový. Proto jsme teplotní intervaly v grafech zkrátily a ponechali jsme pouze rozmezí teplot, ve kterém se nacházejí píky.



Obrázek 5.7: A:U - 1:1, PBNa, po odečtení pozadí
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

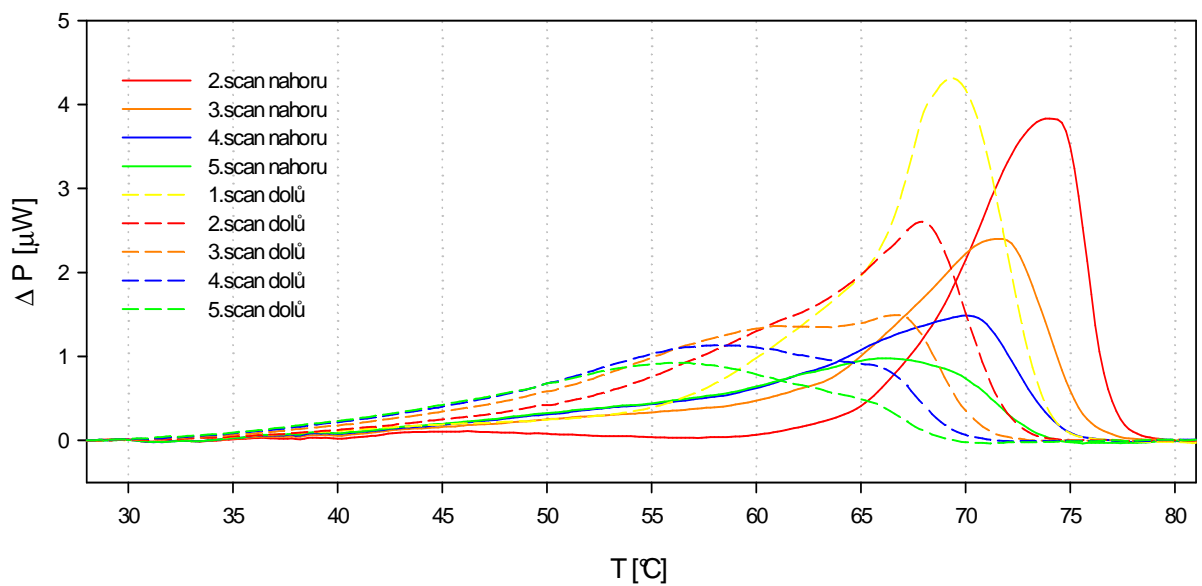


Obrázek 5.8: A:U - 1:2, PBNa, po odečtení pozadí
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

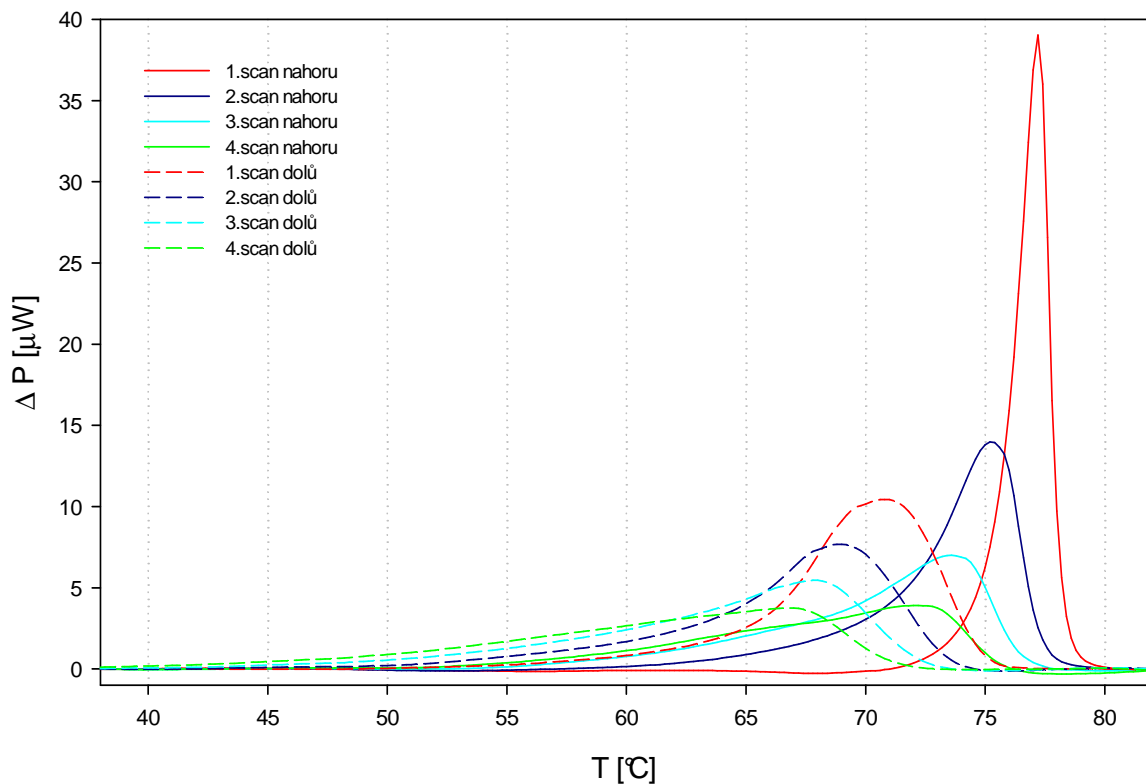


Obrázek 5.9: A:U - 1:1,5 , PBNa, po odečtení pozadí
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

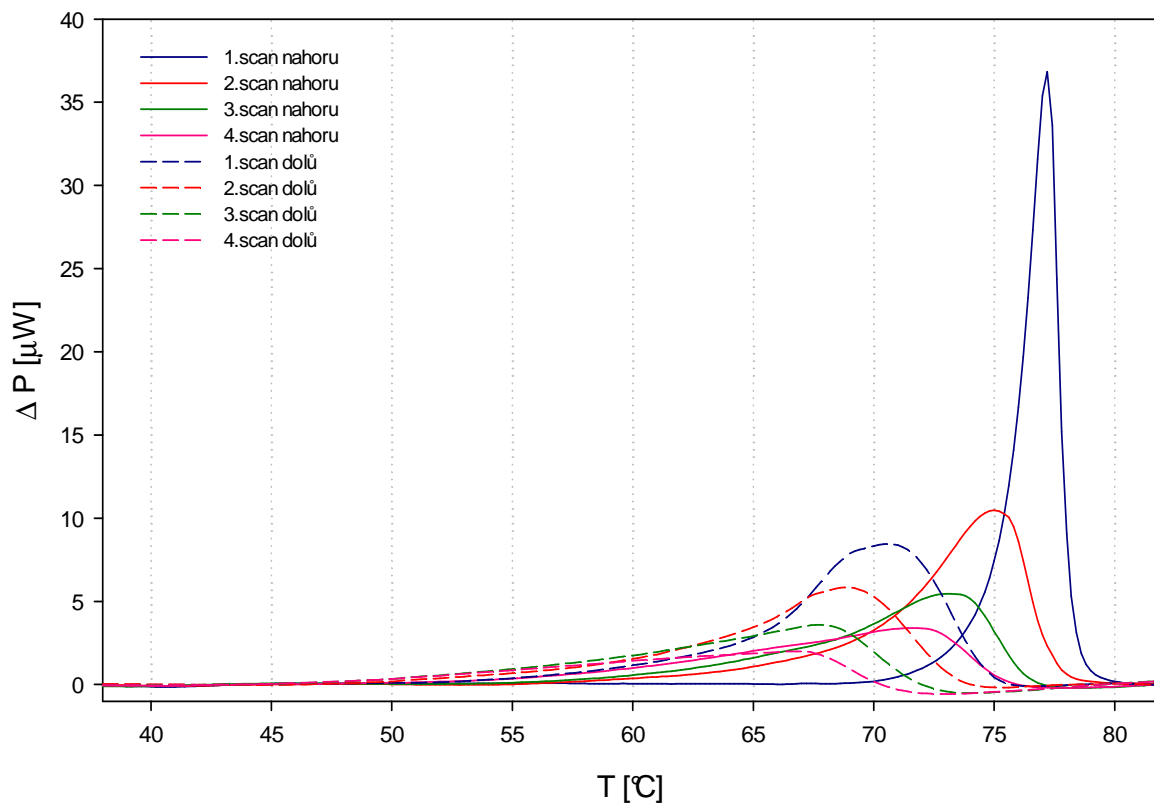
Měření s CacMg:



Obrázek 5.10: A:U - 1:1, CacMg, po odečtení pozadí
scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)



Obrázek 5.11: A:U - 1:2, CaC₂Mg, po odečtení pozadí, scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

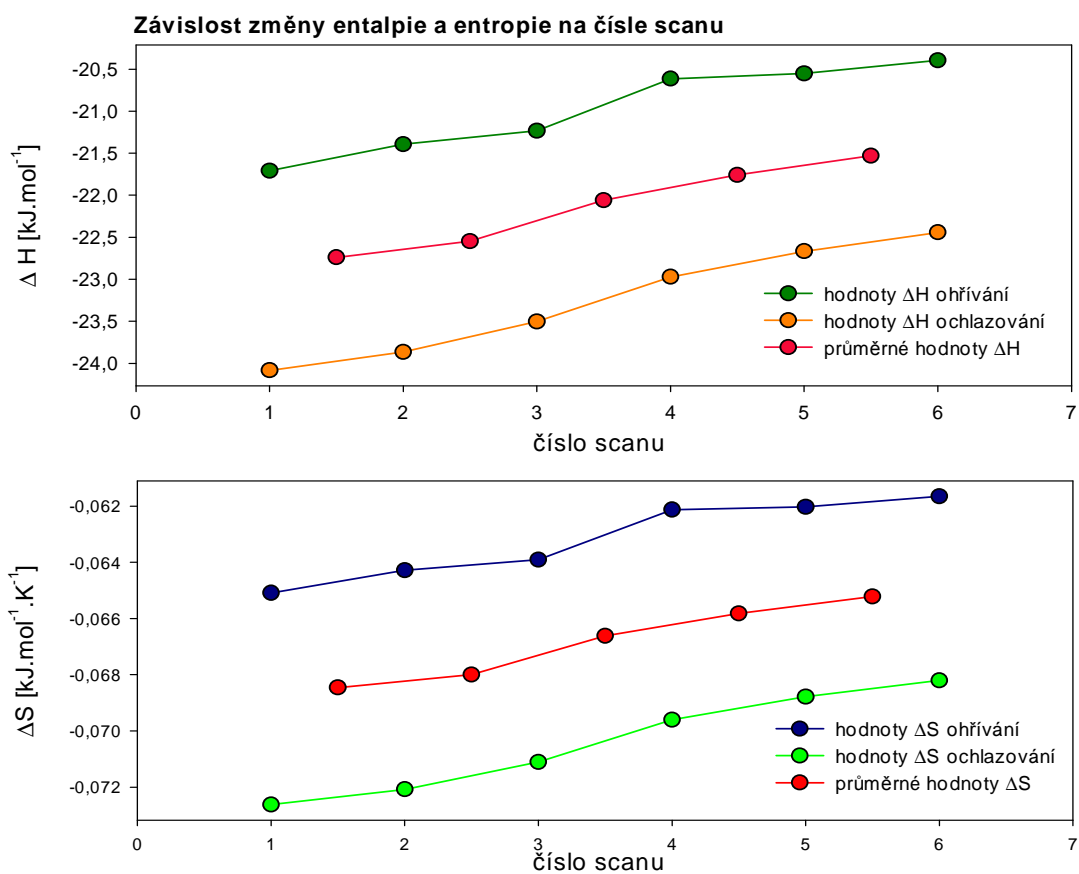


Obrázek 5.12: A:U - 1:1,5, CaC₂Mg, po odečtení pozadí, scany pro ohřívání jsou plnou čarou, scany pro ochlazování jsou čárkovaně (data vynásobena -1)

5.3. Termodynamické parametry v jednotlivých scanech

Posledním krokem zpracování naměřených dat jednotlivých scanů je určení termodynamických parametrů charakterizujících proces tvorby komplexů, tedy ΔH , ΔS a T_m . Začneme určením ΔH a ΔS . Jak již bylo řečeno dříve, tyto parametry získáme přímou integrací podle vzorců (4.6) a (4.7). Hodnoty ΔH a ΔS pro jednotlivé scany jsou vyneseny v následujících grafech. Pro každé měření jsou uvedeny dva grafy, první pro změnu entalpie a druhý pro změnu entropie v závislosti na čísle scanu. Jak ale můžeme vidět, u některých vzorků je zřetelný rozdíl mezi hodnotami získanými při poklesu a při nárůstu teploty. Zároveň však hodnoty při opakování scanů systematicky klesají (v absolutní hodnotě). Při určení celkových termodynamických parametrů pro jednotlivá měření budeme muset zohlednit obě tyto skutečnosti. Například na obr. 5.4 je zřejmé, že všechny hodnoty získané při scanu směrem dolů (ochlazování) jsou si nejspodnější s hodnotami při následujícím scanu nahoru (ohřívání). Proto byly jako základ pro další vyhodnocení použity průměrné hodnoty těchto dvojic scanů (rovněž jsou vyneseny v grafech).

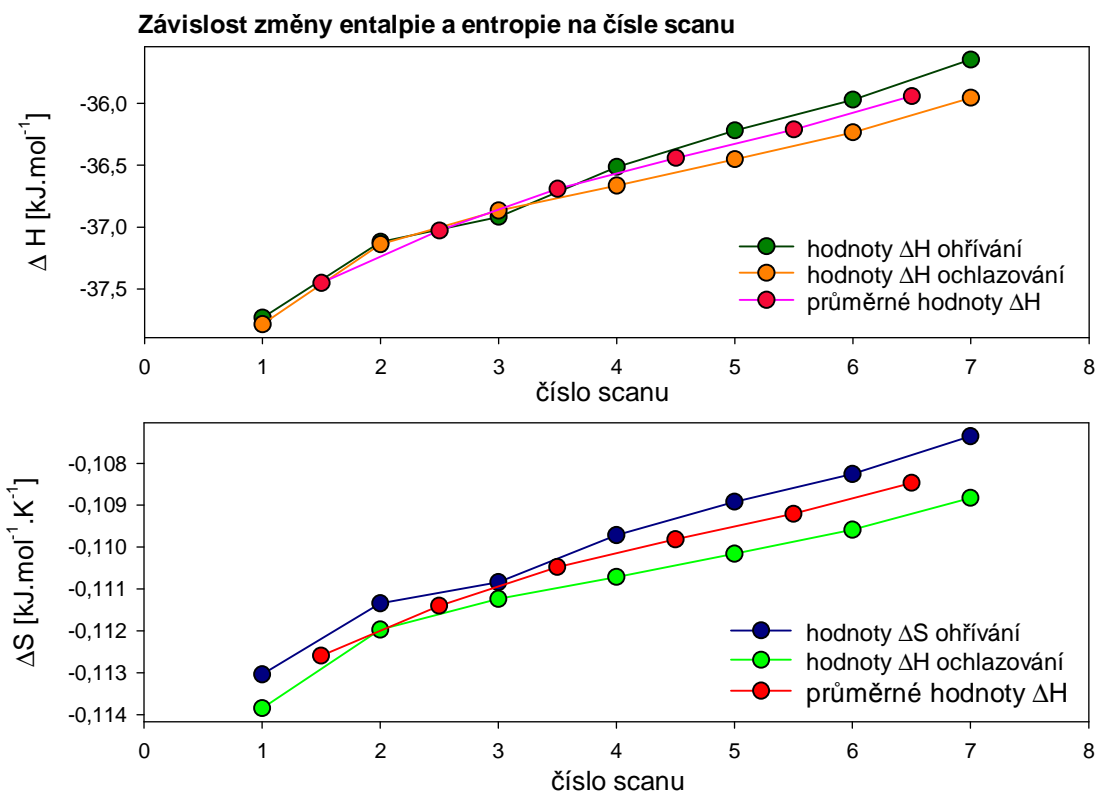
Měření s PBNa:



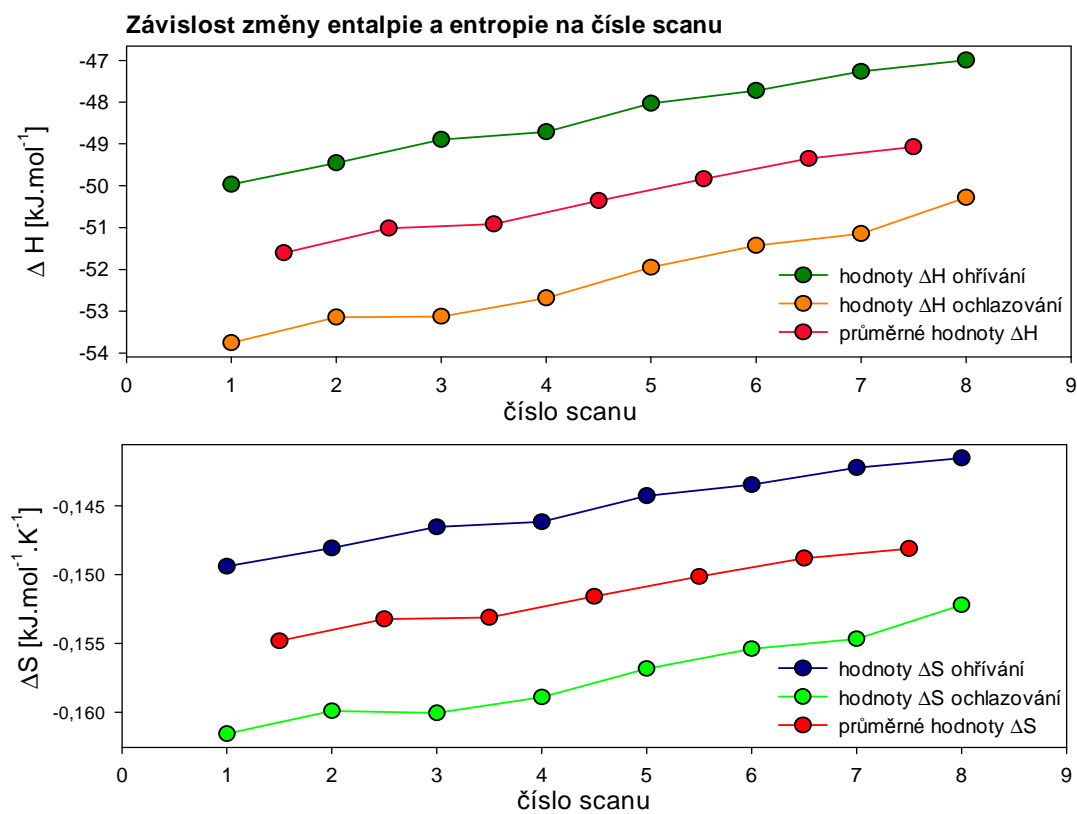
Obrázek 5.13: A:U - 1:1, PBNa, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu

horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu

dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

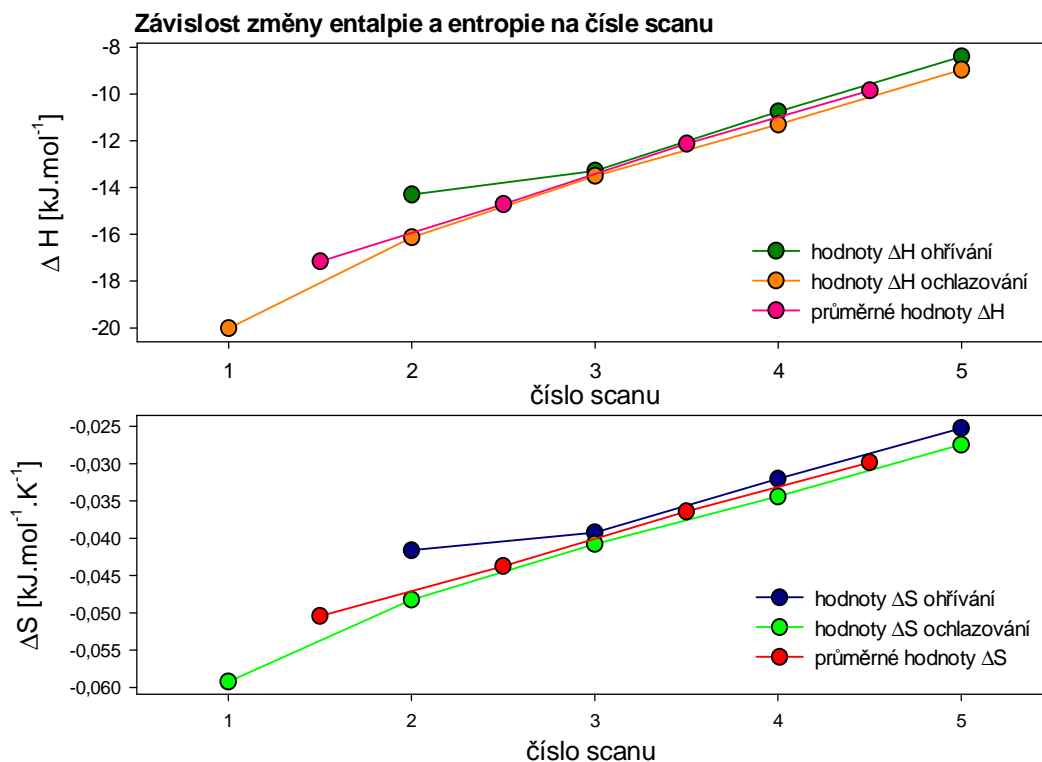


Obrázek 5.14: A:U - 1:2 , PBNa, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu
horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu
dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

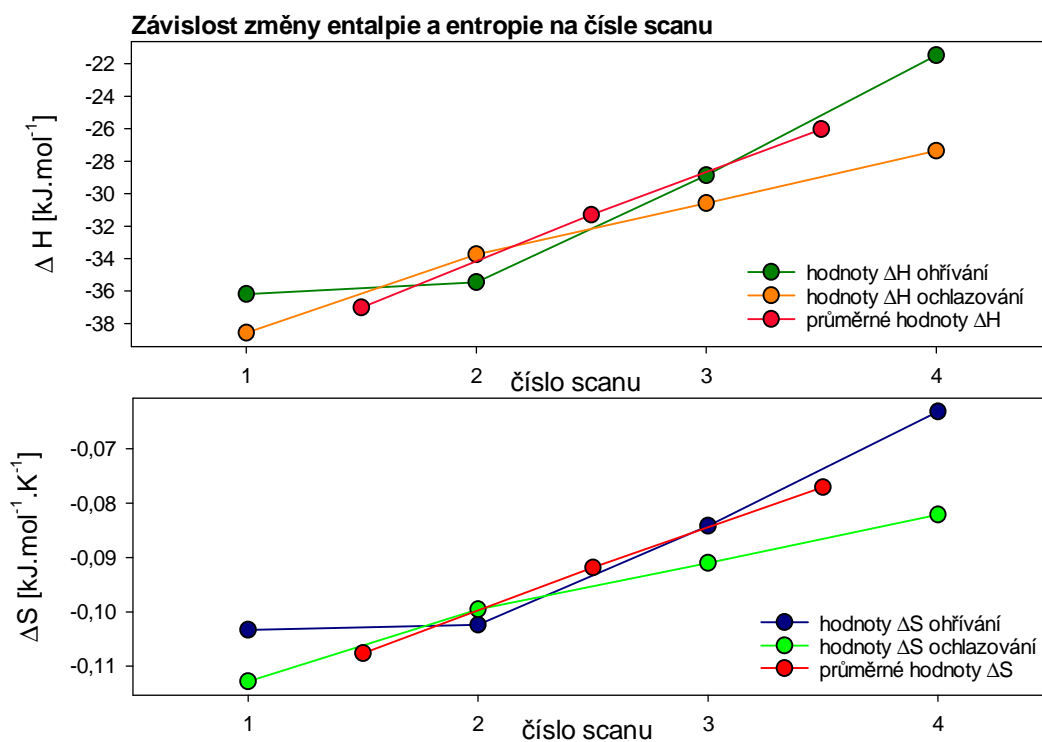


Obrázek 5.15: A:U - 1:1,5 , PBNa, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu
horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu
dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

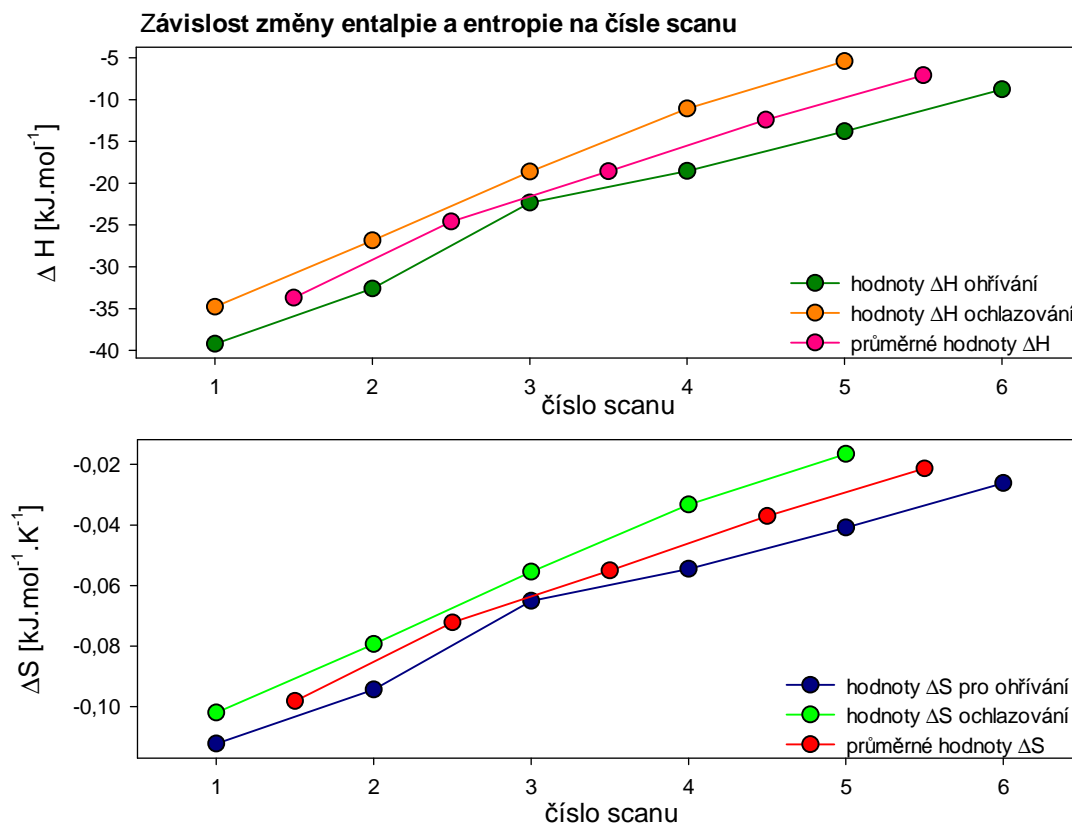
Měření s CaMg:



Obrázek 5.16: A:U - 1:1 , CaMg, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu
horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu
dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

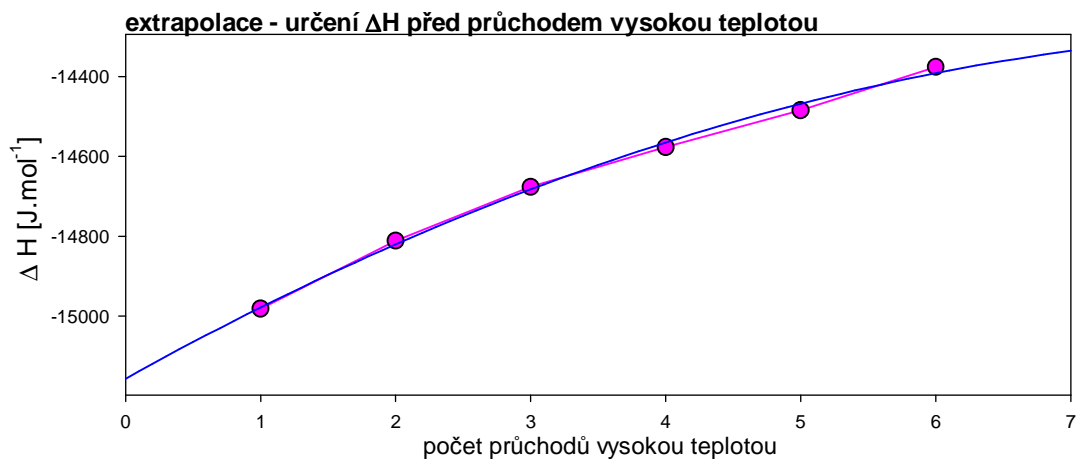


Obrázek 5.17: A:U - 1:2 , CaMg, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu
horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu
dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

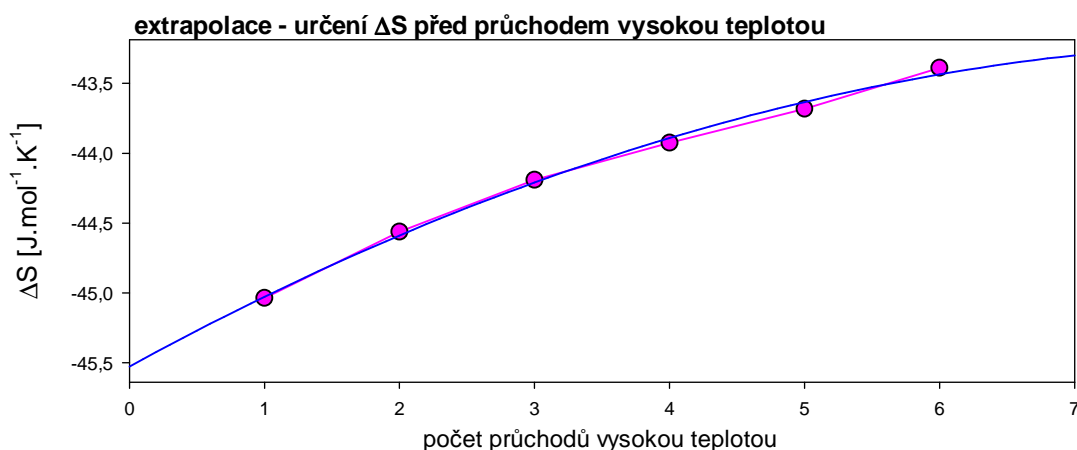


Obrázek 5.18: A:U - 1:1,5, CaMg, závislost změny entalpie a entropie na čísle scanu
 horní graf znázorňuje závislost entalpie na čísle scanu
 dolní graf znázorňuje závislost entropie na čísle scanu

Teplotu tání lze určit pomocí vzorce (2.9). V případě našich měření však bylo nejprve nutné vyrovnat se s rozdílností hodnot z jednotlivých scanů. Rozdíly scanů pro ohřívání a pro ochlazování jsme ošetřili použitím průměrných hodnot. I u těchto průměrů však zůstala zachována klesající tendence (v absolutní hodnotě). Vyhodnotili jsme tedy jejich závislost na počtu průchodů vysokou teplotou (nemůžeme uvažovat závislost na čísle scanu, protože používáme průměr dvou hodnot z různých scanů) a zjistili jsme, že u vzorků bez hořčíku je možné ji aproximovat kvadratickým polynomem (viz obr. 5.19 a 5.20). Pomocí této aproximace bylo možné provést extrapolaci na nulový počet průchodů vysokou teplotou, neboli stanovit hodnoty termodynamických parametrů vzorku $\Delta H^{(0)}$, $\Delta S^{(0)}$. Tyto hodnoty odpovídají vzorku ustálenému po průchodu teplotním cyklem, nejsou však zatíženy negativními vlivy, které během měření způsobují postupné změny DSC křivek. U vzorků s hořčíkem jsme zvolili obdobný postup, vzhledem k charakteru změn však bylo vhodnější omezit se jen na několik prvních průchodů a použít lineární aproximaci.



Obrázek 5.19: příklad aproximace závislosti ΔH na počtu průchodů vysokou teplotou, vzorek A:U - 1:2, PBNa, růžově jsou hodnoty změny entalpie po jednotlivých průchodech vysokou teplotou, modře je fit kvadratickým polynomem



Obrázek 5.20: příklad aproximace závislosti ΔS na počtu průchodů vysokou teplotou, vzorek A:U - 1:2, PBNa, růžově jsou hodnoty změny entropie po jednotlivých průchodech vysokou teplotou, modře je fit kvadratickým polynomem

Hodnoty výsledných termodynamických parametrů získané extrapolací jsou uvedeny v tabulce 5.1, teplota tání je v tomto případě počítána jako podíl $\Delta H/\Delta S$.

Tabulka 5.1: Tabulka hodnot ΔH a ΔS získaných extrapolací, T_m je dopočtena jako podíl $\Delta H/\Delta S$

poměr A:U	ΔH [kJ.mol ⁻¹]	ΔS [J.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	T_m [°C]
<i>rozpouštědlo PBNa</i>			
1:1	-23,1	-69,3	59,57
1:1,5	-52,0	-155,8	60,60
1:2	-37,9	-113,8	59,75
<i>rozpouštědlo CacMg</i>			
1:1	-19,6	-57,4	68,75
1:1,5	-39,9	-116,1	70,45
1:2	-42,5	-122,8	72,85

Dílní hodnoty T_m dopočtené podle vzorce (2.9) společně s hodnotami ΔH a ΔS v jednotlivých scanech nalezneme v tabulkách 5.2a, 5.2b. Zde je také uvedena teplota tání počítaná jako podíl $\Delta H/\Delta S$ pro jednotlivé scany.

Tabulka 5.2a: Tabulka dopočtených hodnot ΔH a ΔS pro jednotlivé scany, T_m podle vzorce (2.9) (extrapolované hodnoty pro výpočet byly získány kvadratickým fitem) i jako podíl $\Delta H/\Delta S$, hodnoty pro měření s rozpouštědlem PBNa

poměr A:U	číslo průchodu vys. teplotou	ΔH [kJ.mol ⁻¹]	ΔS [J.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	T_m [°C] dle vzorce (2.9)	T_m [°C] jako $\Delta H/\Delta S$
1:1	1	-22,7	-68,5	59,0	59,0
	2	-22,5	-68,0	58,7	58,5
	3	-22,1	-66,6	57,8	58,0
	4	-21,8	-65,8	57,3	57,5
	5	-21,5	-65,2	56,9	57,0
1:1,5	1	-51,6	-154,8	60,5	60,2
	2	-51,0	-153,2	60,3	59,8
	3	-50,9	-153,1	60,2	59,4
	4	-50,4	-151,6	60,0	59,1
	5	-49,8	-150,1	59,8	58,8
	6	-49,3	-148,8	59,7	58,5
	7	-49,1	-148,1	59,6	58,2
1:2	1	-37,5	-112,6	59,5	59,5
	2	-37,0	-111,4	59,2	59,2
	3	-36,7	-110,5	59,0	59,0
	4	-36,4	-109,8	58,8	58,7
	5	-36,2	-109,2	58,7	58,4
	6	-35,9	-108,5	58,5	58,2

Tabulka 5.2b: Tabulka dopočtených hodnot ΔH a ΔS pro jednotlivé scany, T_m podle vzorce (2.9) (extrapolované hodnoty pro výpočet byly získány lineárním fitem) i jako podíl $\Delta H/\Delta S$, hodnoty pro měření s rozpouštědlem CacMg,

poměr A:U	číslo průchodu vys. teplotou	ΔH [kJ.mol ⁻¹]	ΔS [J.mol ⁻¹ .K ⁻¹]	T_m [K] dle vzorce (2.9)	T_m [K] jako $\Delta H/\Delta S$
1:1	1	-17,2	-50,4	62,3	67,2
	2	-14,7	-43,7	55,1	63,2
	3	-12,1	-36,4	46,5	60,0
	4	-9,9	-29,8	37,7	57,4
1:1,5	1	-33,7	-98,2	66,4	70,1
	2	-24,6	-72,2	59,0	67,4
	3	-18,6	-55,0	52,6	64,6
	4	-12,4	-37,1	44,0	62,0
	5	-7,1	-21,4	32,6	59,2
1:2	1	-37,0	-107,6	69,6	70,9
	2	-31,3	-91,9	65,8	67,6
	3	-26,0	-77,1	61,7	64,6

5.4. Diskuse výsledků

5.4.1 Změny DSC křivek při opakovaných scanech

Stabilita komplexů se obvykle charakterizuje pomocí veličin ΔH a ΔS , které vyjadřují snížení entalpie a entropie při vzniku komplexu. Při našich měřeních jsme však překvapivě zjistili, že při opakovaných scanech jsou tyto parametry nereprodukovatelné. Závislost jejich absolutní hodnoty na čísle scanu měla ve všech měřeních klesající charakter, což bylo zřetelné z postupného zmenšování píků DSC křivek.

To, že se průběh křivek mění při násobných teplotních cyklech může mít několik vysvětlení. Protože se tyto tendence nijak nezměnily ani po použití inhibitoru RNas, můžeme vyloučit enzymatické štěpení polynukleotidů v průběhu měření. Přesto je možné, že při zahřátí roztoku polynukleotidů dochází k hydrolýze řetězců. Tento děj by mohl být katalyzován účinky kovového povrchu měřících kyvet (měřící elektrody??), především jejich přírodních trubiček, které jsou vyrobeny z platiny. Při hydrolýze by docházelo k postupnému zkracování polynukleotidových řetězců. Do každého nového teplotního cyklu by tedy vstupovaly čím dál kratší řetězce, jejichž teplota tání i změny entalpie a entropie by byly přirozeně nižší než u delších řetězců.

Dalším možným vysvětlením může být, že určitá část polynukleotidů se adsorbuje na povrch měřící kyvety. Následkem toho se sníží efektivní koncentrace polynukleotidů v měřeném objemu. I v tomto případě by nejpravděpodobněji docházelo k interakci s povrchem platinových přírodních trubiček. Je totiž známo, že platina se může koordinačně vázat na dusíkové atomy N7 adeninu.

Abychom mohli rozhodnout mezi těmito dvěma možnostmi, spočítali jsme teplotu tání všech vzorků pro jednotlivé scany dvěma způsoby. První způsob je obvyklé určení T_m jako podílu ΔH a ΔS . Tímto způsobem bychom měli získat skutečnou hodnotu teploty tání odpovídající situaci při měření daného scanu. Druhý postup vychází z předpokladu, že změny enthalpie a entropie vztahované na látkové množství se nesnižují. Naměřené hodnoty ale přesto klesají kvůli poklesu koncentrace komplexů v roztoku. V tom případě je hodnota ΔH přímo úměrná koncentraci komplexů a poměr $(\Delta H^{(0)} - \Delta H) / \Delta H^{(0)}$ tedy představuje relativní úbytek komplexů v roztoku. Změna teploty tání by pak měla odpovídat vztahu (2.9).

Pokud by hodnoty T_m vypočítané oběma způsoby byly stejné, svědčilo by to pro hypotézu, že se polynukleotidy zachytávají na stěnách kyvety kalorimetru. Pokud by teplota tání dopočtená podle poměru $\Delta H/\Delta S$ klesala prudčeji než teplota tání určená vzorcem (2.9), svědčilo by to o tom, že se polynukleotidy po průchodu vyššími teplotami rozpadají.

Podívejme se tedy podrobněji, jak dopadly naše výpočty:

Pro rozpouštědlo PBNa se hodnoty vypočtené podle vzorce (2.9) a hodnoty získané jako podíl ΔH a ΔS poměrně dobře shodují, i když s rostoucím číslem scanu se již hodnoty liší o trochu více (viz tabulka 5.2a). To lze patrně přičíst tomu, že u scanů s vyšším pořadovým číslem nebylo možné aproximovat pozadí tak přesně jako u předchozích scanů. Při výpočtu teploty tání podílem se tato nepřesnost projeví v obou veličinách ΔH i ΔS . Oproti tomu při výpočtu pomocí vzorce (2.9) používáme pouze hodnotu ΔH pro daný scan a hodnoty změny entalpie i entropie získané aproximací, takže se v tomto údaji chyba při odečtu pozadí projeví méně. Můžeme tedy konstatovat, že pro vzorky neobsahující hořčík naše výsledky ukazují, že nejpravděpodobnější příčinou změn termodynamických parametrů při opakovaných scanech je úbytek

polynukleotidů v roztoku v důsledku adsorpce na stěny kyvet, přesněji na stěny platinových přírodních trubiček.

Jinak však dopadlo srovnání u vzorků s hořčíkem. Teploty tání počítané oběma způsoby jsou zřetelně rozdílné i u scanů ze začátku měření (viz tabulka 5.2b). I když v tomto případě byly chyby při odečtu pozadí větší, nelze tím vysvětlit zjištěný rozdíl, který se prudce zvyšuje s rostoucím číslem scanu. V rozporu s očekáváním však teplota tání dopočtená vzorcem (2.9) klesá v tomto případě mnohem prudčeji než T_m dopočtená jako podíl. To jinými slovy znamená, že velikost změny entalpie klesá prudčeji než odpovídá poklesu teploty tání. Tento vývoj tedy nemůžeme vysvětlit štěpením řetězců polynukleotidů, protože v tom případě by byly rozdíly mezi teplotami tání určenými oběma způsoby opačné. Ani s představou postupné nevratné adsorpce na povrch kyvety ale nemůžeme vystačit. Podle všeho půjde o složitější děje odehrávající se v měřicí kyvetě, které probíhají za přítomnosti hořčíku.

5.3.2 Stabilita duplexů a triplexů, vliv hořčíku

V důsledku chování polynukleotidů v měřicí kyvetě, kde zřejmě dochází k adsorpci na kovový povrch, nemáme k dispozici spolehlivé údaje o koncentraci polynukleotidů v roztoku při jednotlivých scanech kalorimetru. V tabulce 5.1. jsou proto spočítané hodnoty změn entropie a entalpie vztažené na jednotkové látkové množství za předpokladu, že byla zachována původně připravená koncentrace polynukleotidů. Při porovnání těchto hodnot je však zřejmé, že skutečné koncentrace se musely u jednotlivých vzorků různě lišit a to dokonce i za situace odpovídající extrapolaci na nulový průchod vysokou teplotou. Například totiž není možné, aby u vzorků bez hořčíku hodnoty ΔH pro koncentrační poměr 1:1,5 byly mimo rozmezí hodnot odpovídajících poměrům 1:1 a 1:2.

Můžeme alespoň provést částečné kvantitativní srovnání zjištěných hodnot teploty tání (pro extrapolované hodnoty $\Delta H^{(0)}$ a $\Delta S^{(0)}$), protože ty jsou podstatně méně citlivé na rozdíly v koncentracích. U koncentračního poměru 1:1 lze předpokládat, že je preferovaná tvorba duplexů, zatímco stechiometrický poměr 1:2 podporuje triplexy.

V případě vzorků bez hořčíku je zřejmé, že teploty tání duplexů i triplexů jsou zhruba stejné, protože můžeme vidět jen velmi malý rozdíl teplot tání při různých stechiometrických poměrech (poněkud vyšší hodnota u poměru 1:1,5 zřejmě koreluje s podstatně vyšší reálnou koncentrací polynukleotidů, čemuž napovídá vysoká hodnota $\Delta H^{(0)}$). Znamená to, že připojení třetího řetězce k duplexu nevede ke zvýšení stability celého komplexu, pokud v roztoku nejsou přítomné vícemocné kationty.

V pufru CaMg jsou oproti pufru PBNa hořčnaté ionty. Lze očekávat, že přítomnost hořčnatých iontů bude napomáhat stabilitě komplexů. Tento náš předpoklad se potvrdil, neboť teplota tání komplexů je u roztoků s rozpouštědlem CaMg znatelně vyšší než u roztoků s PBNa pro všechny koncentrační poměry (viz tabulka 5.1) a to i pro všechny jednotlivé scany (porovnání tabulek 5.2a, 5.2b). Zároveň vidíme stabilizující účinek hořčíku přímo na triplexy, protože za přítomnosti hořčíku je teplota tání komplexů ve vzorku se stechiometrickým poměrem 1:2 vyšší než u vzorku s poměrem 1:1. V přítomnosti hořčíku tedy navázání třetího řetězce k duplexu komplex stabilizuje.

6. Závěr

V rámci bakalářské práce byla na diferenciálním scanovacím mikrokalořimetru proměřena série vzorků modelového systému RNA, který se skládal ze syntetických homopolymerů s komplementárními bázemi, polyA a polyU. Jako vzorky jsme použili neutrální vodné směsné roztoky o různých stechiometrických poměrech polyA a polyU buď bez přítomnosti vícemocných kationtů nebo s přidavkem hořčíku. Z naměřených křivek byly vyhodnoceny změny entalpie a entropie při jednotlivých teplotních cyklech kalorimetru.

Získané výsledky ukázaly, že v průběhu měření dochází v mikrokalořimetru k procesům, jejichž následkem je systematická změna naměřených charakteristik při opakovaných scanech. Byla vyloučena možnost enzymatického štěpení. Analýzou závislosti teploty tání a změn entalpie na opakovaných scanech bylo ukázáno, že v případě vzorků bez hořčíku se velmi pravděpodobně jedná o postupnou adsorpci polynukleotidů na kovový povrch měřicí kyvety kalorimetru. Naopak v případě vzorků s hořčíkem se jedná o složitější proces, který nebylo možné blíže charakterizovat. Lze ale prakticky vyloučit, že by příčinou byla hydrolýza řetězců polynukleotidů. Tyto výsledky představují závažná a v literatuře dosud nepopsaná zjištění týkající se aplikovatelnosti scanovací mikrokalořimetrie pro přesná kvantitativní termodynamická studia ribonukleové kyseliny. Na základě těchto zjištění budou v laboratoři Fyzikálního ústavu provedena podrobná testovací měření, která by měla potvrdit a upřesnit mechanismus interakce řetězců RNA s měřicí kyvetou a umožnit stanovení limitů kalorimetrických měření nukleových kyselin, popřípadě i nalézt modifikaci metodiky měření, která by uvedené vlivy minimalizovala.

Na základě vyhodnocených teplot tání bylo prověřeno, že bez přítomnosti vícemocných kationtů nedochází ke zvýšení stability komplexu při připojení třetího vlákna polyU k duplexu polyA:polyU. Přítomnost hořčíku však vede nejen ke zvýšení stability duplexů i triplexů, ale i k tomu, že triplex má vyšší stabilitu proti duplexu.

Literatura

- Breslauer K. J. (1995): Extracting Thermodynamic Data from Equilibrium Meeting Curves for Oligonucleotide Order-Disorder Transitions. *Methods Enzymol.* **259**, 221 – 242.
- Hrabáková J. (2003): Investigation of Heavy Metal Ion Interaction with Important Biomolecules. Diploma Thesis, MFF UK, Prague
- Palacký J. (2005): Spektroskopické studium vlastností nových modifikovaných oligonukleotidů – potenciálních chemoterapeutik. Diplomová práce, MFF UK. Praha.
- Privalov G., Kavina V., Freire E., Privalov P. L. (1995): Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solution. *Anal.Biochem.* **232**, 79-85.
- Saenger W. (1984): Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, New York.
- Misra V. K., Draper D. E. (1999): The Interpretation of Mg^{2+} Binding Izoterms for Nucleic Acid using Poisson-Boltzmann Theory. *J. Mol. Biol.* **294**, 1135-1147.