

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Bc. Pavla Ottová

Mikrokalorimetrické studium termodynamické stability hybridních komplexů nukleových kyselin

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Studijní program: Fyzika, Biofyzika a chemická fyzika

2009

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc. za trpělivost a ochotu při vedení mé diplomové práce a za všestrannou pomoc a čas, který věnoval tomu, aby mohla tato práce vzniknout.

Skupině Ing. Ivana Rosenberga bych chtěla poděkovat za syntézu vzorků modifikovaných patnáctimerů deoxythymidinu. Mgr. Janu Vachouškovi děkuji za poskytnutí vzorků RNA vlásenek. Doc. RNDr. Jiřímu Bokovi, CSc. bych chtěla poděkovat za naprogramování softwaru Microcal na předzpracování dat naměřených pomocí mikrokolorimetru. Kolektivu oddělení Fyziky biomolekul FÚ UK děkuji za vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych ráda poděkovala svým rodičům za podporu během celého studia.

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

V Praze dne 6. 8. 2009

Pavla Ottová

Obsah

Úvod	6
NUKLEOVÉ KYSELINY A MIKROKALORIMETRIE	7
1 Nukleové kyseliny	7
1.1 Chemická struktura nukleových kyselin	7
1.2 Prostorové uspořádání nukleotidové jednotky	9
1.3 Sekundární struktura nukleových kyselin	10
1.4 Síly stabilizující prostorovou strukturu	12
1.5 Denaturace a renaturace vlivem teploty	13
1.6 Termodynamické parametry spojené s tvorbou komplexu.....	14
2 Genová exprese	16
2.1 Transkripce.....	16
2.2 Translace	17
3 Oligonukleotidová terapie.....	18
3.1 Antisensní strategie	18
3.2 Antisensní oligonukleotidy	19
3.3 Modifikované antisensní oligonukleotidy	19
3.4 Studium stability antisensních oligonukleotidů.....	22
4 Diferenční skenovací mikrokalorimetrie	24
4.1 Principy mikrokalorimetrie	24
4.2 Aplikace DSC	26
Cíle práce	28
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
5 Vzorky	29
5.1 Palindrom	29
5.2 Modifikované patnáctimery	29
5.3 Vlášeny	31
6 Diferenční skenovací mikrokalorimetr	33
6.1 Specifikace diferenčního skenovacího kalorimetru.....	33
6.2 Základní DSC experiment	34
6.3 Vymývání kalorimetru	35
6.4 Přípravné zpracování naměřených dat	35
6.5 Termodynamické modely: dvoustavový model	36
6.6 Termodynamické modely: McGhee – von Hippelův model	41
6.7 Termodynamické modely: hystereze.....	42

VÝSLEDKOVÁ ČÁST	44
7 Ověřovací a testovací měření.....	44
7.1 Kalibrace kalorimetru.....	44
7.2 Vliv rychlosti změny teploty.....	45
7.3 Odsávání vzorku z přívodních trubiček.....	47
7.4 Vliv pufry.....	48
7.5 Postup měření vzorku a vyhodnocení dat.....	51
7.6 Koncentrace vzorku	59
8 Hybridizace modifikovaných patnáctimerů	61
8.1 Ramanova spektroskopie	61
8.2 Experimentální podmínky	61
8.3 Předzpracování dat.....	64
8.4 Zpracování dat, výsledky a diskuze	67
9 RNA vlásenky.....	76
9.1 Experimentální podmínky	76
9.2 Předzpracování dat.....	80
9.3 Zpracování dat, výsledky a diskuze	84
9.4 Aptamer R06 – hystereze	93
Závěr	97
Poděkování za finanční podporu	99
Zkratky	100
Literatura.....	102

Název práce: Mikrokalorimetrické studium termodynamické stability hybridních komplexů nukleových kyselin

Autor: Bc. Pavla Ottová

Katedra (ústav): Fyzikální ústav UK

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

e-mail vedoucího: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstrakt: Práce se zabývá aplikací diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) pro studium potenciálních oligonukleotidových terapeutik. Byly stanoveny možnosti i limity použitého DSC přístroje a stanovené optimální podmínky pro měření komplexů nukleových kyselin. Byly zkoumané čtyři typy modifikovaných oligonukleotidů s izopolární neizosterní internukleotidovou spojkou, která vznikla vložením methylenové skupiny do fosfodiesterové vazby mezi atom fosforu a jeden ze dvou esterových kyslíků (methylenová skupina vložena na 3' nebo 5' konec spojky, modifikované spojky buď alternují s přirozenými, nebo jsou modifikované všechny). Stanovili jsme termodynamické charakteristiky hybridních duplexů složených z modifikovaných deoxythymidinových patnáctimerů a komplementárního RNA polymerního řetězce, kyseliny polyadenylové. Oligonukleotid s methylenovou skupinou na 3' konci, jehož všechny spojky jsou modifikované, s polyadenylovou kyselinou komplexu netvoří. Ostatní oligonukleotidy komplexu vytvářejí a jejich stabilita roste v pořadí (3' konec, alternující) ~ (5' konec, všechny) < přirozený (dT)₁₅ < (5' konec, alternující). U všech komplexů byla zjištěná vysoká kooperativita vazby oligonukleotidů na polymer. Dále byla termodynamicky charakterizována RNA vlásenka TAR segmentu HIV-1 a její aptamer R06. Vedle termodynamických parametrů přechodu při otevření vlásenky byl v případě R06 analyzován i druhý konformační přechod v oblasti nižších teplot s výraznou hysterezí. V ekvimolární směsi vlásenek TAR a R06 byl kvalitativně charakterizován vzniklý „kissing“ komplex.

Klíčová slova: DSC, modifikované oligonukleotidy, vlásenka, „kissing“ komplex, entalpie, entropie

Title: Thermodynamic Stability of Hybrid Nucleic Acid Complexes: Microcalorimetric Study

Author: Bc. Pavla Ottová

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: Prof. RNDr. Josef Štěpánek, CSc.

Supervisor's e-mail address: stepjos@karlov.mff.cuni.cz

Abstract: This work deals with implementation of differential scanning calorimetry (DSC) into research of potential oligonucleotide therapeutics. Capabilities and limits of the DSC device have been determined and optimal conditions for measurement of nucleic acids complexes specified. Four types of modified oligonucleotides with isopolar, non-isosteric internucleotide linkage, consisting in insertion of a methylene group into the phosphodiester linkage between the phosphorus and one of the two ester oxygens (the methylene group inserted or at 3' or at 5' side of the linkage, the modified linkages alternate with the natural ones or all linkages are modified) were investigated. We determined thermodynamics characteristics of hybrid duplexes composed of modified deoxythymidine pentadecamers and complementary RNA polymer chain, polyadenylic acid. The oligonucleotide with the methylene group at the 3' side, the all linkages of which are modified, does not form complexes with polyadenylic acid. Other oligonucleotides form complexes and their stability increase in succession (3' end, alternating) ~ (5' end, all) < natural (dT)₁₅ < (5' end, alternating). High cooperativity of the oligonucleotide to the polymer binding has been found out for all complexes. RNA hairpin of HIV-1 TAR element and its R06 aptamer have been also characterized thermodynamically. Besides the thermodynamic parameters of the hairpin opening transition, a second low-temperature transition with remarkable hysteresis was analyzed in the case of the R06 hairpin. The “kissing” complex formed in an equimolar mixture of TAR and R06 hairpins was characterized quantitatively.

Keywords: DSC, modified oligonucleotides, hairpin, kissing complex, enthalpy, entropy

Úvod

Nukleové kyseliny jsou důležité z hlediska zachování života, přitom však existuje velké množství nemocí, které souvisí s genovou expresí patologické genetické informace. Proto se současný vědecký výzkum zabývá otázkou zablokování patologické genetické informace technikou oligonukleotidové terapie. Synteticky připravené oligonukleotidy, často chemicky modifikované, oproti přirozeným nukleovým kyselinám, pro zvýšení jejich stability v prostředí živého organismu, mohou interagovat selektivně s nukleovými kyselinami na různém stupni procesu přenosu genetické informace a tento proces zastavit nebo výrazně utlumit.

Tato diplomová práce vznikla jako součást výzkumu, který probíhá na Oddělení fyziky biomolekul na Fyzikálním ústavu Univerzity Karlovy ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie AV ČR. V rámci této práce byla technika diferenční skenovací kalorimetrie zavedena a poprvé na ústavu využita pro studium modifikovaných oligonukleotidů, potencionálních chemoterapeutik, a dále pro studium termodynamické stability úseku vlásenky TAR RNA viru HIV, která je potenciálním cílovou strukturou oligonukleotidové terapie, a jejich komplexů s aptamerem.

Diplomový úkol měl dvě části. První byla metodická a spočívala v nalezení vhodného postupu měření nukleových kyselin na diferenčním skenovacím kalorimetru. Druhá byla tematicky zaměřena na problematiku oligonukleotidové strategie a spočívala v termodynamické charakterizaci potencionálních oligonukleotidových chemoterapeutik a jejich komplexů s molekulárními modely jejich cílových struktur.

Práce je rozdělena do tří částí. V první části jsou popsány základní rysy struktury nukleových kyselin, dále principy genové exprese a oligonukleotidových terapií. Závěr první části je věnován základům diferenční skenovací kalorimetrie. V druhé části práce jsou popsány měřené vzorky a úplná charakterizace měřícího zařízení, postup měření na diferenčním skenovacím mikrokolorimetru a základní přístupy k vyhodnocení v závislosti na měřeném vzorku. Ve třetí části jsou pak prezentovaná naměřená a vyhodnocená data a získané původní výsledky jsou diskutovány z hlediska jak obecného pohledu na fyzikálně-chemické vlastnosti nukleových kyselin, tak aplikace v oligonukleotidové terapii.

NUKLEOVÉ KYSELINY A MIKROKALORIMETRIE

1 Nukleové kyseliny

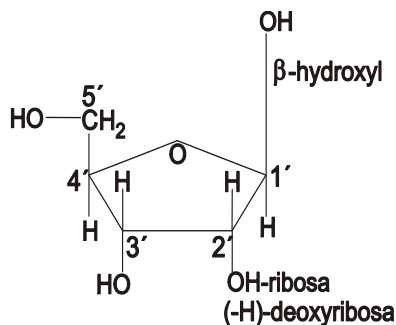
V každé buňce hrají důležitou biologickou roli makromolekuly, které nazýváme nukleové kyseliny. Jedná se o řetězce, jejichž základním opakujícím se motivem jsou nukleotidy. V přírodě se vyskytují dva základní druhy těchto molekul, jedním z nich jsou ribonukleové kyseliny (RNA) a druhým pak deoxyribonukleové kyseliny (DNA).

Strukturu nukleových kyselin popisujeme na dvou úrovních. Primární strukturou rozumíme posloupnost dusíkatých bází v řetězci. Sekundární struktura určuje prostorové uspořádání celého řetězce, popřípadě společné uspořádání více molekul.

V následujících podkapitolách budou popsány základní rysy nukleových kyselin, podrobnější informace o nukleových kyselinách lze získat z monografií Saenger (1984), Bloomfield (2000) a Voet, Voetová (1995).

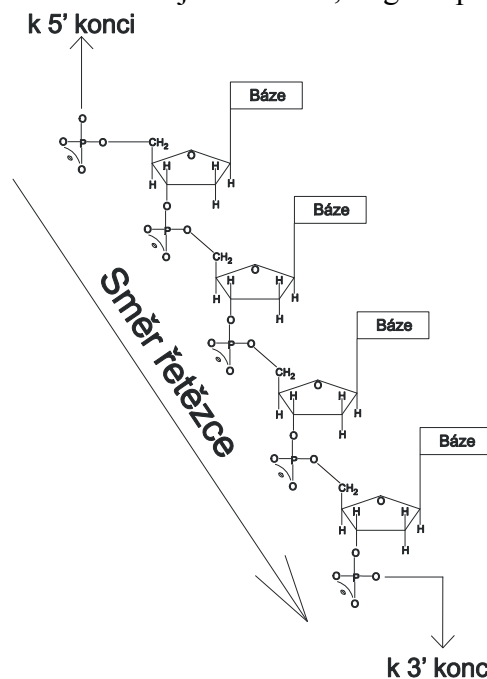
1.1 Chemická struktura nukleových kyselin

Nukleotidy tvoří stavební kameny nukleových kyselin. Každý nukleotid se skládá ze tří základních složek: sacharidu, dusíkaté báze a zbytku kyseliny fosforečné. Cukerná složka je tvořena pětičlenným furanózovým cyklem, viz Obrázek 1.1. V RNA je to β -D-ribofuranóza a v DNA je to β -D-2'-deoxyribofuranóza. Atomy furanózy číslujeme čísly s čárkami, abychom je odlišili od čísel atomů dusíkatých bází, které se v nukleových kyselinách vyskytují ve formě sloučenin odvozených buď od pyrimidinu, nebo purinu. Sloučeniny sacharidu a dusíkaté báze se nazývají nukleosidy. V nukleosidech jsou purinové a pyrimidinové báze vázány na cukernou složku kovalentně N-glykosidickou vazbou. Vazba vzniká mezi atomem N9 purinu nebo N1 pyrimidinu a uhlíkem 1' pentosy. Fosfát neboli zbytek kyseliny fosforečné je navázán na nukleosid esterovou vazbou na uhlík 5' sacharidu a vytváří tak nukleotid. Nukleotid je tedy fosforylovaný nukleosid.



Obrázek 1.1: Sacharidová jednotka nukleových kyselin.

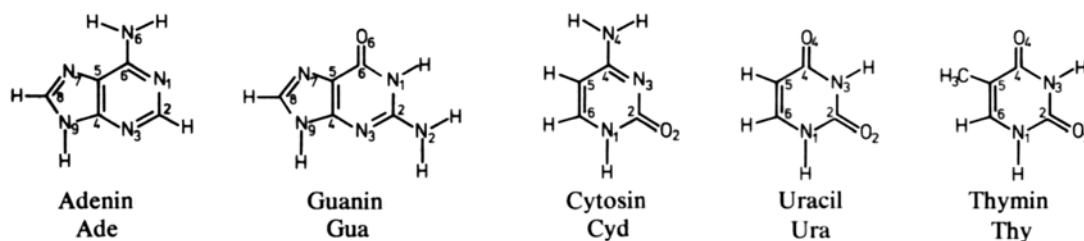
Nukleotidy se spojují do lineárních polymerních řetězců pomocí esterových vazeb (Obrázek 1.2). Mezi jednotlivými nukleosidy vytvářejí fosfáty můstky pomocí fosfodiesterových vazeb, které vznikají mezi hydroxylem na uhlíku 3' jedné pentosy a 5' následující pentosy. Vzniká tak 3' – 5' vazba, která se vyskytuje v molekulách DNA i RNA. V molekule RNA však může výjimečně vznikat i vazba 2' – 5'. Každé vlákno nukleové kyseliny má jednu volnou -OH skupinu na uhlíku 3' a druhou na uhlíku 5'. Řetězce se mohou dále prodlužovat pouze navázáním dalšího nukleotidu na 3' konec. Podle délky řetězce rozlišujeme mono-, oligo- a polynukleotidy.



Obrázek 1.2: Polynukleotidové vlákno DNA (Saenger, 1984).

Polymerní řetězce se skládají z cukr-fosfátové páteře, na kterou jsou připojeny různé báze. Primární struktura nukleových kyselin je tedy dána právě pořadím těchto bází. Podle konvence se vždy udává sekvence bází v řetězci ve směru od 5' konce k 3' konci.

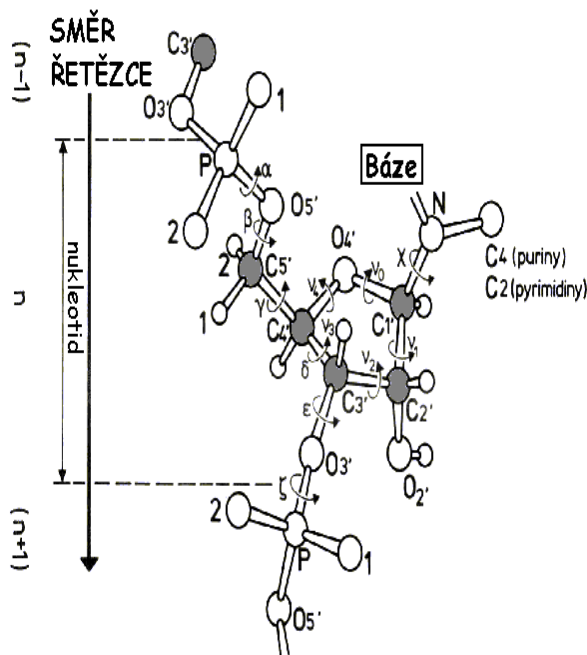
Dusíkaté báze jsou heterocyklické sloučeniny. Dělíme je podle sloučenin, od kterých jsou odvozeny, na bicyklické puriny a monocyklické pyrimidiny. Nejdůležitější purinové báze jsou adenin (A) a guanin (G) a pyrimidinové báze cytosin (C), uracil (U) a thymin (T), viz Obrázek 1.3. Obě purinové báze a cytosin můžeme najít jak v RNA, tak v DNA, avšak uracil se vyskytuje téměř výhradně v RNA, zatímco thymin se vyskytuje v DNA. Thymin je methylovaná forma uracilu, obě báze jsou funkčně ekvivalentní. Kromě těchto pěti základních bází se v některých nukleových kyselinách mohou vyskytovat i jiné, tzv. minoritní báze. Minoritní báze jsou většinou modifikací některé z běžných bází. Mohou se odlišovat nejenom v chemickém složení, ale i ve způsobu připojení na sacharid.



Obrázek 1.3: Nejběžnější báze nukleových kyselin s číslováním atomů (Saenger, 1984).

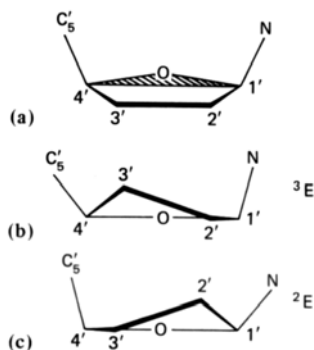
1.2 Prostorové uspořádání nukleotidové jednotky

Prostorové uspořádání nukleotidové jednotky je charakterizováno délkami vazeb, vazebnými úhly a možnými rotacemi skupin atomů okolo vazeb. Uspořádání je dáno samozřejmě silami, které působí mezi jednotlivými atomy, dále silami mezi jednotlivými částmi nukleotidu a nakonec také interakcí molekuly s okolím. Výsledná konformace molekuly musí být termodynamicky výhodná; molekuly se obecně snaží zaujmout konformaci odpovídající minimu Gibbsova potenciálu.



Obrázek 1.4: Definice torzních úhlů (Saenger, 1984).

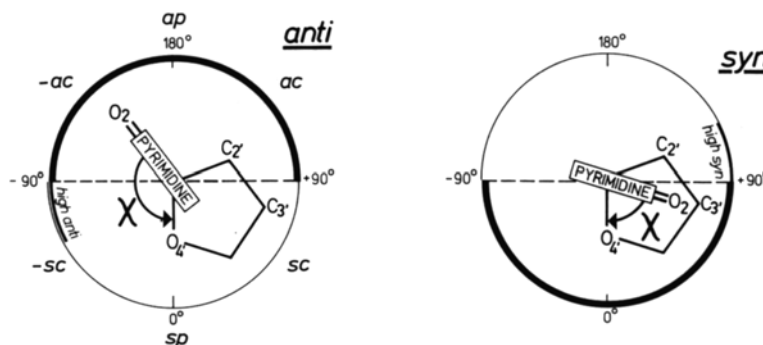
Geometrii nukleotidové jednotky určuje šest torzních úhlů fosfosacharidové páteře α , β , γ , δ , ϵ , ζ (Obrázek 1.4) a jeden torzní úhel popisující orientaci báze vzhledem k cukerné složce. Na každou jednotku tak připadá 7 stupňů volnosti. Torzní úhly ve fosfosacharidové páteři podléhají řadě vnitřních omezení, díky kterým dochází k omezení konformační volnosti. Přítomnost ribózového kruhu připojeného na fosfosacharidovou páteř a nekovalentní interakce fosfátových skupin zpevňují fosfosacharidový řetězec a omezují rozsahy jeho torzních úhlů. V polynukleotidech jsou konformační omezení ještě větší z důvodu prostorových nároků dusíkatých bází.



Obrázek 1.5: Konformace cukru (Saenger, 1984): (a) planární konformace (nevyskytuje se); b) C3'-endo konformace; (c) C2'-endo konformace.

Všechny dusíkaté báze, které se vyskytují v nukleových kyselinách, mají planární geometrii, což hraje důležitou roli při stabilizaci sekundární struktury nukleových kyselin (tzv. stacking). Naproti tomu pětičtené heterocykly furanóz vyskytujících se v nukleových kyselinách nemají planární geometrii, protože takováto konformace je pro ně energeticky nevýhodná. Preferované konformace pentóзовého cyklu jsou dvě, a sice C2'-endo a C3'-endo. Konformace *endo* znamená, že atomy C2', popřípadě C3', vybočují do stejného poloprostoru jako atom C5' vzhledem k rovině atomů C1'-O-C4', viz Obrázek 1.5.

Orientace dusíkaté báze vůči pentóзовému cyklu se popisuje pomocí torzního úhlu χ kolem N-glykosidické vazby. Běžně se vyskytují dvě geometrie. Pokud je poloha dusíkaté báze směrem k sacharidu, označujeme toto uspořádání *syn*, a pokud je směrem od sacharidu, pak toto uspořádání označujeme *anti*, viz Obrázek 1.6. Pro nukleosidy s purinovou bází jsou přibližně stejně zastoupené obě možné konformace, avšak u nukleosidů s pyrimidinovou bází převažuje konformace *anti*, protože u konformace *syn* dochází ke sterickému bránění cukerného zbytku s C2 substituentem pyrimidinu. Orientace báze vůči sacharidu také ovlivňuje konformaci sacharidu. V případě orientace *syn* je častější uspořádání C2'-endo, zatímco v případě orientace *anti* uspořádání C3'-endo.



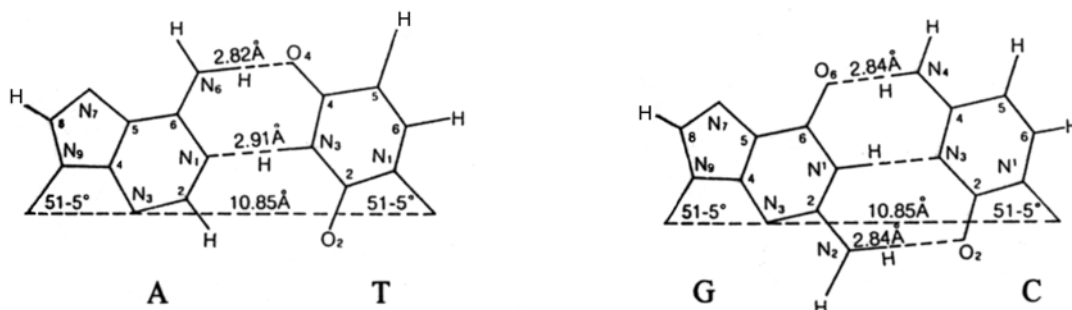
Obrázek 1.6: Schéma možných konformací bází vůči sacharidu: *anti* a *syn* (Saenger, 1984).

1.3 Sekundární struktura nukleových kyselin

Sekundární strukturou se rozumí prostorové uspořádání celé molekuly, popřípadě vzájemné uspořádání více molekul nukleových kyselin. Struktura nukleových kyselin není však rigidní a toto uspořádání závisí na mnoha faktorech, jako jsou primární struktura, teplota, koncentrace, iontová síla či pH roztoku. Polynukleotidové řetězce se mohou nacházet ve formě náhodného klubka nebo ve formě jedno- či vícevláknových šroubovic. Nejběžnějším typem sekundární struktury je duplex neboli dvoušroubovice. Dvoušroubovicovitá struktura vzniká vzájemným spletením dvou antiparalelních komplementárních vláken, popřípadě dvou komplementárních úseků jedné molekuly. V případě, že vznikne krátký úsek vnitromolekulární dvoušroubovice (stonek – stem), který je spojen úsekem nespárovaných bází (smyčka – loop), jedná se o sekundární strukturu označovanou jako vlásenka (hairpin). Zatímco DNA se v buněčném prostředí vyskytuje nejčastěji ve formě duplexu, RNA zůstává jednovláknová a v roztoku zaujímá složitou sekundární strukturu, jejímž nejběžnějším prvkem jsou vlásenky. U některých virů může i RNA tvořit duplexy ze dvou komplementárních vláken.

Pro spojování vláken nukleových kyselin je důležitá komplementarita bází. Specifické párování bází je základní podmínkou pro tvorbu šroubovice složené ze dvou vláken. Komplementárními páry jsou podle Watson-Crickova modelu adenin

s uracilem v molekule RNA, adenin s thyminem v molekule DNA a guanin s cytosinem v molekulách RNA i DNA. Báze v párech A·U a A·T jsou propojeny dvěma vodíkovými můstky, zatímco báze v páru G·C třemi vodíkovými můstky, viz Obrázek 1.7. Všechny zmíněné báze jsou izomorfní (mají stejný tvar a prakticky stejnou vzdálenost C1' – C1'). Dusíkaté báze jsou planární, jak již bylo zmíněno výše, a i takto vzniklý pár bází zůstává téměř planárním útvarem.



Obrázek 1.7: Watson-Crickovo párování bází (Guschlbauer, 1976).

Další možností párování bází je Hoogsteenovo párování, které se vyskytuje například u vícevláknových struktur. Hoogsteenovo párování rovněž může pomáhat stabilizovat strukturu, jak je tomu například v molekule tRNA.

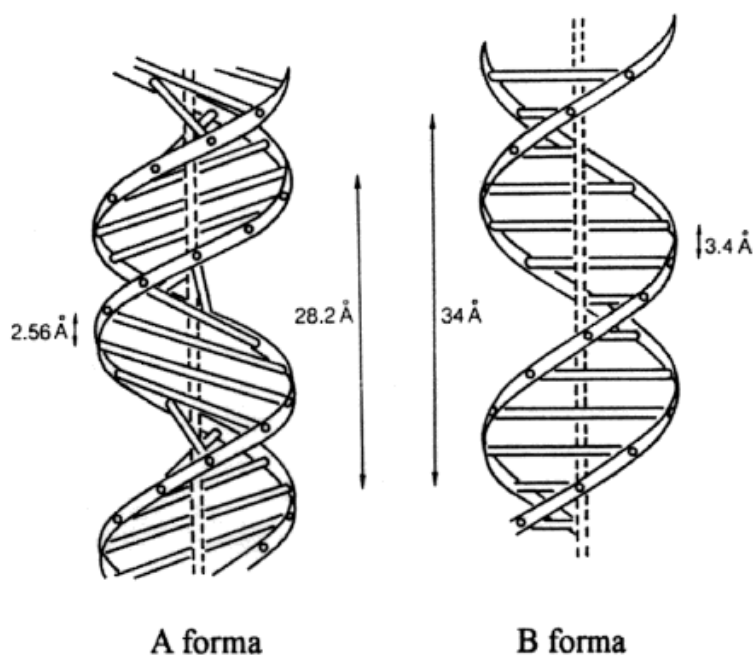
Struktura dvoušroubovice

Duplex je tvořen dvěma řetězci nukleových kyselin, které mají vzájemně komplementární báze složení a jsou vzájemně antiparalelní. Cukr-fosfátová páteř zůstává vně a páry dusíkatých bází vyplňují vnitřek dvoušroubovice. Toto uspořádání je výhodné, protože takto dochází k minimálnímu odpuzování mezi nabitými fosfátovými skupinami. Mezi cukr-fosfátovými řetězci vznikají dva charakteristické žlábký různé šířky a hloubky, malý a velký. Žlábký umožňují bázím interakci s vnějším prostředím a molekulami v okolí duplexu.

Dvoušroubovice DNA a RNA mohou mít několik různých prostorových uspořádání. Strukturu duplexu DNA objevili v 50. letech minulého století Watson a Crick. Dnes víme, že existuje několik forem duplexu DNA lišící se strukturálními parametry. Tři základní formy jsou označovány A-, B- a Z-DNA. Parametry ideálních struktur A- a B-DNA jsou popsány v Tabulce 1.1 a jejich tvar je vidět na Obrázku 1.8. Forma B se nejvíce podobá původnímu Watson-Crickovu modelu dvoušroubovice a je zároveň označována za nativní strukturu DNA, avšak skutečná struktura se od ideální může odchylovat. Jakou strukturu duplex zaujme, závisí na relativním obsahu vody, sekvenci bází a na přítomných kationtech. Na rozdíl od DNA nabývá dvoušroubovice RNA formy podobné ideální struktuře A. V buňkách se dále vyskytují hybridní dvoušroubovice skládající se z jednoho vlákna RNA a druhého DNA, takovéto duplexy mají rovněž konformaci spíše podobnou formě A.

Tabulka 1.1: Vlastnosti ideálních struktur A- a B-DNA (Voet a Voetová, 1995).

Vlastnosti	A	B
Směr šroubovice	pravotočivý	pravotočivý
Průměr	~ 2,6 nm	~ 2,0 nm
Počet párů v 1 závitě	11	10
Část dvoušroubovice připadající na 1 pár bází	33°	36°
Stoupání závitu dvoušroubovice	2,8 nm	3,4 nm
Stoupání závitu připadající na 1 pár bází	260 pm	340 pm
Sklon bází vzhledem k ose dvoušroubovice	20°	6°
Větší žlábek	úzký a hluboký	široký a hluboký
Menší žlábek	široký a mělký	úzký a hluboký
Konformace sacharidového kruhu	C3'-endo	C2'-endo
Glykosidová vazba	<i>anti</i>	<i>anti</i>



Obrázek 1.8: Konformace A- a B-DNA (Guschlbauer, 1976).

„Kissing“komplex

„Kissing“ komplex je dalším komplexem, který můžeme u nukleových kyselin pozorovat. Jedná se o spojení dvou vláseček interakcí jejich nespárovaných částí, tedy smyček, které musí mít opět komplementární báze složení, aby mohlo dojít k vytvoření specifického párování, které drží komplex pohromadě.

1.4 Síly stabilizující prostorovou strukturu

Dusíkaté báze v polynukleotidovém řetězci se snaží vytvářet vysoké stohy (stacks) tím, že se k sobě natáčí svými plochami. Planární kruhy purinových a pyrimidinových bází jsou v nukleových kyselinách paralelní a vzájemně se překrývají, tudíž jejich π -elektrony spolu mohou interagovat, což přispívá ke stabilizaci struktury. Stohové interakce (stacking) jsou formou Van der Waalových interakcí. Stacking je závislý na velikosti překryvu, na vzájemné orientaci bází nacházejících se nad sebou, ale také na sekvenci bází, a tím je určitým způsobem specifický. Nejsilnější je stohová interakce pro purin-purinový pár, následuje purin-

pyrimidinový pár a nejslabší je pro pár skládající se ze dvou pyrimidinů. Závisí také na délce řetězce; čím delší je řetězec, tím je interakce silnější. Stohové interakce jsou z velké části stabilizovány hydrofobními silami. Stohování bází je entalpicky výhodné a entropicky nevýhodné.

Vodíkové můstky přispívají ke stabilitě dvoušroubovice jen velice málo, mnohem důležitější jsou z hlediska specifického párování bází. Při studiu stability je ovšem nutné s nimi počítat. Oproti kovalentní vazbě je vodíkový můstek asi 20krát až 30krát slabší vazbou. Vodíkové můstky vytváří vazbu lokalizovanou a směrovanou. Působí v rovině kolmé na osu duplexu, kdežto stohové interakce působí ve směru osy helikální struktury. Ve vodném prostředí mohou vznikat vodíkové můstky nejen mezi bázemi, ale také mezi bázemi a molekulami vody. Díky stohové interakci je uvnitř šroubovice hydrofobní prostředí, které podporuje párování bází, a tak jsou přednostně vytvářeny a stabilizovány vodíkové můstky mezi bázemi.

Ke stabilizaci sekundární struktury nukleových kyselin přispívají i další faktory, které se velmi často vzájemně ovlivňují. Mezi tyto faktory patří teplota, tlak, délka a primární struktura polynukleotidového řetězce, rozpouštědlo, ale také koncentrace a druh iontů v prostředí. Iontové síly mezi záporně nabitými PO_2^- a kationty snižují elektrostatickou repulzi mezi záporně nabitými fosfáty fosfosacharidového řetězce a tím přispívají ke stabilizaci komplexu.

1.5 Denaturace a renaturace vlivem teploty

Komplexy nukleových kyselin se mohou vlivem zvyšující se teploty rozpadat a při zpětném ochlazení se opět formují. Teplota tání je definovaná jako teplota, při níž je právě polovina molekul ve formě komplexu a zbytek je uvolněn na volná vlákna, která zaujmají tvar náhodného klubka. Teplota tání, T_m , roste s délkou řetězce, s koncentrací iontů v prostředí a se vrůstajícím počtem G·C párů.

Denurací nazýváme rozpad komplexů popř. sekundární struktury vlivem zahřátí nad charakteristickou teplotu tání. Při denuraci dochází k narušení vodíkových vazeb v nukleotidovém páru a řetězce tvořící komplex se rozpletou na dvě samostatná vlákna, která zaujmou konformaci náhodného klubka, což souvisí se změnou stohové interakce. Denaturace je doprovázena také změnou fyzikálních vlastností, například změnou viskozity roztoku vzorku. Denaturace je kooperativní proces, což znamená, že zhroucení šroubovicovité struktury v jedné části postupně destabilizuje celý komplex.

Při rychlém ochlazení denaturovaného vzorku nukleových kyselin pod teplotu tání dojde pouze k částečnému spárování bází. Komplementární vlákna potřebují dostatek času na to, aby se našly a vytvořily komplex. Pokud však budeme vzorek ochlazovat dostatečně pomalu, postupně dojde k plné renaturaci vzorku. Opětovné zformování sekundární struktury nukleových kyselin je podmíněno vznikem jádra. U šroubovic tuto roli hraje spojení tří bázevých párů, přičemž uspořádání jádra je spojeno s energeticky nevýhodným příspěvkem k volné energii. Tři po sobě následující bázevé páry spolu stohují, a tím vytváří stabilní jádro. Vznik dalších bázevých párů je již spojen se záporným příspěvkem k volné energii a je tudíž energeticky výhodný, proto je další splétání vláken již spontánní. Denaturace je tedy proces vratný a celý proces připomíná rozepínání a zapínání zipu (Saenger, 1984).

Při rozpadu a vzniku komplexů nukleových kyselin dochází ke změně energie. Tvorba komplexu je proces entropicky nevýhodný, což souvisí s vyšší uspořádaností systému, ve kterém se nacházejí komplexy místo volných vláken, proto musí převážít

entalpická výhodnost tohoto procesu. Pokud naopak převáží entropická nevýhodnost pro daný komplex, rozpadne se na volná vlákna.

Pro studium tohoto procesu se používají dva základní typy experimentálních metod. Velmi časté jsou spektroskopické metody (UV absorpce, Ramanova spektroskopie nebo cirkulární dichroismus), v poslední době se však začíná hodně využívat mikrokolorimetrie, protože tato metoda poskytuje přesnější stanovení termodynamických parametrů spojených s rozpadem komplexu než metody spektroskopické.

1.6 Termodynamické parametry spojené s tvorbou komplexu

Rozpad dvoušroubovicovité struktury neboli přechod *duplex* \leftrightarrow *volná vlákna* můžeme aproximovat dvoustavovým modelem. Dvoustavový model předpokládá, že vlákna nukleových kyselin jsou buď úplně spojená v duplex, nebo úplně rozpojená na volná vlákna.

Vezmeme v úvahu rovnováhu danou vztahem (1.1a) pro spojování ne-auto-komplementárních sekvencí a vztahem (1.1b) pro spojování auto-komplementárních sekvencí a vytváření n -merní struktury (Breslauer, 1995).



kde n je molekularita reakce, která odpovídá počtu vláken spojujících se v komplex (v případě duplexu je $n = 2$). Rovnovážnou asociační konstantu můžeme vyjádřit vztahem (pro ne-auto-komplementární sekvence) (Breslauer, 1995):

$$K = \frac{[A_1 \dots A_n]}{[A_1] \dots [A_n]} = \frac{\alpha}{\left(\frac{C_T}{n}\right)^{n-1} (1-\alpha)^n}, \quad (1.2a)$$

kde α , udávající poměrný počet vláken v komplexech, je parametr přechodu závislý na teplotě a C_T je celková koncentrace složek komplexů (vláken). Předpokládá se, že všechny složky komplexu mají stejnou koncentraci, tedy (C_T/n) .

Pro auto-komplementární sekvence přepíšeme vztah do tvaru:

$$K = \frac{[A_n]}{[A]^n} = \frac{\alpha}{nC_T^{n-1}(1-\alpha)^n}. \quad (1.2b)$$

Pokud definujeme rovnovážnou konstantu při teplotě tání, můžeme za α dosadit $\frac{1}{2}$. Potom rovnovážná konstanta při T_m pro ne-auto-komplementární sekvence je dána výrazem (1.3a) a pro auto-komplementární sekvence výrazem (1.3b):

$$K_{T_m} = \frac{1}{\left(\frac{C_T}{2n}\right)^{n-1}}; \quad (1.3a)$$

$$K_{T_m} = \frac{1}{n\left(\frac{C_T}{2}\right)^{n-1}}. \quad (1.3b)$$

Van't Hoffova rovnice pro entalpii přechodu je:

$$\Delta H_{\text{vH}} = -RT^2 \left[\frac{d \ln K}{dT} \right]. \quad (1.4)$$

Vzorec pro vypočítání entalpie přechodu s obecnou molekuláritou lze odvodit dosazením vztahu (1.2a), popřípadě (1.2b) do rovnice (1.4). Výsledný vztah je (Breslauer, 1995):

$$\Delta H_{\text{vH}} = (2 + 2n)RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T=T_m}. \quad (1.5)$$

Vztah pro vypočítání Van't Hoffovy entalpie přechodu vyjde stejný pro oba typy sekvencí.

Pro případ duplexu je molekulárita $n = 2$ a vztah (1.5) se redukuje na vztah:

$$\Delta H_{\text{vH}} = 6RT_m^2 \left(\frac{\partial \alpha}{\partial T} \right)_{T=T_m}. \quad (1.6)$$

Pro změnu Gibbsovy energie platí vztah:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0, \quad (1.7)$$

kde indexem „⁰“ značíme rovnovážný stav, tedy jedná se o změny termodynamických potenciálů mezi komplexy a samostatnými složkami v rovnovážném stavu charakterizovaném teplotou T .

Změnu Gibbsova potenciálu však můžeme vyjádřit i pomocí rovnovážné konstanty následující rovnicí:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K. \quad (1.8)$$

Kombinací vztahů (1.3), (1.7) a (1.8) dostaneme lineární závislost převrácené hodnoty teploty tání na $\ln C_T$. Z tohoto vztahu lze určit termodynamické parametry spojené s tvorbou a rozpadem n složkového komplexu (Breslauer, 1995).

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{[\Delta S^0 - (n-1)R \ln 2n]}{\Delta H^0}, \quad (1.9a)$$

$$\frac{1}{T_m} = \frac{(n-1)R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{[\Delta S^0 - (n-1)R \ln 2 + R \ln n]}{\Delta H^0}, \quad (1.9b)$$

kde vztah (1.9a) je pro ne-auto-komplementární sekvence a vztah (1.9b) je pro auto-komplementární sekvence.

Dosazením do vztahů (1.9) $n = 2$ dostaneme vzorec pro bimolekulární komplex vznikající ze dvou řetězců, které nejsou auto-komplementární (1.10a) a které jsou auto-komplementární (1.10b):

$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{[\Delta S^0 - R \ln 4]}{\Delta H^0}, \quad (1.10a)$$

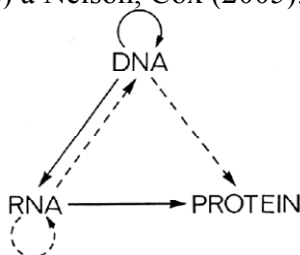
$$\frac{1}{T_m} = \frac{R}{\Delta H^0} \ln C_T + \frac{\Delta S^0}{\Delta H^0}. \quad (1.10b)$$

2 Genová exprese

DNA je ve všech buněčných formách života a i v některých virech nositelkou genetické informace. Genetická informace se přenáší z generace na generaci a to vyžaduje téměř bezchybný proces replikace. Každá buňka mnohobuněčného organismu obsahuje stejný komplet genetického materiálu, tento komplet nazýváme genom. Jednotkou genetické informace je gen, jedná se o kódující úsek molekuly DNA, která však vedle kódujících částí obsahuje i úseky nekódující.

Naproti tomu RNA plní v organismech několik funkcí. Ribozomální syntézu polypeptidů řídí messenger RNA (mRNA), strukturní a funkční úlohu má ribozomální RNA (rRNA), transferová RNA (tRNA) přináší aminokyseliny na ribozom při syntéze proteinů. Dále se RNA v buňkách nachází ve formě ribonukleoproteinů, které zajišťují některé posttranskripční úpravy RNA. U některých virů nese RNA genetickou informaci.

Centrální dogma molekulární biologie vyjadřuje vzájemné vztahy při přenosu informace mezi DNA, RNA a proteiny a může být znázorněno pomocí schématu na Obrázku 2.1. Ten znázorňuje, že DNA řídí svou vlastní replikaci i transkripci, tedy přenos informace na RNA. Ta dále předává svou informaci při translaci na proteiny. Podrobný popis přenosu genetické informace je například v monografiích Voet, Voetová (1995), Alberts (2002) a Nelson, Cox (2005).



Obrázek 2.1: Ústřední dogma molekulární biologie – schéma (Crick, 1970). Plně šipky označují běžný přenos probíhající v buňce; speciální typy přenosu jsou naznačeny přerušovanými šipkami. K přenosu genetické informace v jiných než vyznačených směrech nedochází.

2.1 Transkripce

Transkripci, čili přepis genetické informace z určitého úseku DNA do RNA, zajišťuje enzym RNA-polymeráza, který katalyzuje postupné řetězení ribonukleosidů. Ty vstupují do reakce ve formě trifosfátů, takže štěpící se makroenergetická vazba poskytuje dostatek energie pro funkci enzymu.

RNA-polymerázy se nacházejí ve všech buňkách. Prokaryota mají pouze jeden druh RNA-polymerázy a ta syntetizuje všechny druhy RNA molekul nacházejících se v buňce kromě RNA primerů potřebných pro replikaci DNA. Naproti tomu eukaryota mají více druhů RNA-polymeráz a každý druh syntetizuje jinou skupinu RNA molekul.

Syntéza RNA je iniciována navázáním RNA-polymerázy na místa se specifickou sekvencí na templátu DNA. Iniciační místa, ke kterým se enzym váže a kterým se říká promotory, jsou umístěny na 5' konci transkripčního startovacího místa a jejich délka je asi 40 bází. Další fází transkripce je elongace řetězce RNA podle předlohy DNA. RNA vlákno je syntetizováno ve směru od 5' konce k 3' konci.

Při tomto procesu musí být dvouvláknová DNA nejprve lokálně rozpletena, aby následně mohlo být templátové vlákno DNA přepsáno na komplementární RNA vlákno. Otevřená část dvoušroubovice postupuje společně s RNA-polymerázou. Délka rozvinuté oblasti je asi jeden závit dvoušroubovice. Při syntéze RNA se vytváří krátký úsek hybridního duplexu RNA-DNA. V buňkách je rychlost syntézy RNA vlákna asi 20 – 50 nukleotidů za sekundu při teplotě 37 °C. Komplementární vlákno RNA je syntetizováno s přesností přibližně jedné chyby na 10⁴ přepsaných bází. V terminační fázi je transkripce zakončena tím, že se na konci transkriptu vytvoří vlásenka, což způsobí jeho odpojení.

Takto vzniklá molekula RNA se označuje jako primární transkript. U eukaryotních buněk dochází k posttranskripčním úpravám, které se liší v závislosti na typu molekuly RNA. U mRNA se připojuje čepička, kterou tvoří 7-methylguanosin. Čepička je trifosfátovým můstkem 5' – 5' připojena k počátečnímu nukleotidu mRNA. Dále se k této molekule nasyntetizuje poly(A)-konec, který je tvořen 20 – 250 nukleotidy. Primární transkript eukaryot většinou obsahuje kromě kódujících částí (exonů) také nekódující úseky (introny). Součástí posttranskripčních úprav je proto i vyštěpení intronů a spojení exonů do souvislého řetězce. Jak transkripce, tak posttranslační úpravy probíhají u eukaryot v jádře. Následně mRNA jádro opouští, aby se uplatnila v dalším stupni genové exprese – translaci.

2.2 Translace

Translace je proces, při kterém je syntetizován polypeptidový řetězec (protein) na základě informačního předpisu v mRNA. Molekula mRNA je při translaci čtena od svého 5' konce k 3' konci. Každá z 21 aminokyselin je kódována posloupností třech bází, tzv. kodonem. Ovšem sekvence třech bází dává 64 možností, takže některé aminokyseliny jsou kódovány více kodony; genetický kód je degenerovaný.

Na molekulách tRNA jsou specificky (podle antikodonu, tj. rozpoznávacího úseku komplementárního ke kodonu) připojené jednotlivé aminokyseliny kovalentní vazbou. V průběhu translace, kdy je na molekulu mRNA navázána malá a velká podjednotka ribozomu, nasedá tRNA nesoucí příslušnou aminokyselinu do vazebného místa ribozomu a svým antikodonem se váže na kodon mRNA.

Proces translace je iniciován tzv. startkodonem. Po iniciaci translace následuje elongace polypeptidového řetězce. Aminokyselinové zbytky jsou přinášeny molekulami tRNA, poté jsou peptidovou vazbou připojovány k C konci peptidového řetězce. Rychlost tohoto procesu je zhruba 40 aminokyselin za sekundu. Celý proces probíhá za přispění dalších proteinů, tzv. elongačních faktorů. Ukončení translace zajišťuje ve fázi terminace stopkodon. Po terminaci dochází k uvolnění polypeptidového řetězce, který může být ještě dále posttranslačně upravován. Každá molekula mRNA je během své existence překládána opakovaně.

3 Oligonukleotidová terapie

Snahou oligonukleotidových strategií je chemoterapeuticky uměle působit krátkými úseky nukleových kyselin (oligonukleotidy) na nežádoucí genetickou informaci. Oligonukleotid se v případě těchto terapií používá k tzv. „uspání“ genu.

Oligonukleotidovými terapiemi lze selektivně likvidovat nežádoucí organismy, potlačit reprodukci virů (především retrovirů) a dále pak potlačit růst vlastních buněk s patogenním chováním. V molekulární biologii mohou oligonukleotidové strategie pomoci identifikovat a objasnit funkci specifických genů.

Bohužel přirozené oligonukleotidy jsou v buněčném prostředí nestabilní, a protože se jedná o nabitě molekuly, tak je zde problém i s pronikáním do buněk buněčnou membránou, která je pro velké a nabitě molekuly nepropustná.

Oligonukleotidové strategie je název, který zaštiťuje několik různých mechanismů působení oligonukleotidu. Mezi oligonukleotidové terapie patří antigenní, antisensní (anti-mRNA, ribozymy, siRNA) a aptamerní strategie.

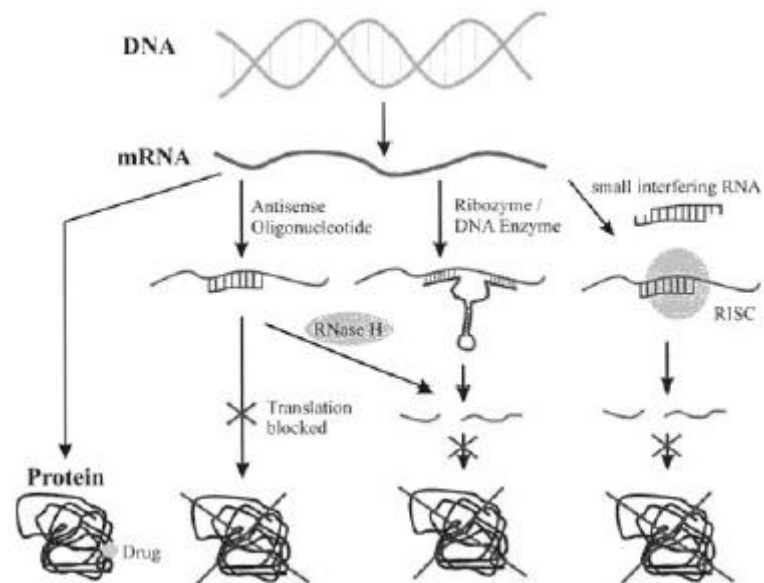
Předkládaná práce se vztahuje zejména k antisensní strategii, proto bude v následujících podkapitolách popsán tento mechanismus podrobně.

3.1 Antisensní strategie

V 70. letech 20. století byly poprvé antisensní oligonukleotidy navrženy jako terapeutika (Zamecnik, 1978). Základní princip antisensních terapií je sekvenčně specifická vazba antisensního oligonukleotidu na cílovou RNA. Výsledkem je vytvoření lokálního duplexu a zastavení genové translace. Specifita Watson-Crickova párování staví antisensní oligonukleotidy do pozice atraktivních nástrojů z hlediska rozpoznání a funkčnosti, jako terapeutik selektivně upravujících genovou expresi spojenou s patogeny a nemocemi (Aboul-Fadl, 2005). Antisensní oligonukleotidy bývají nazývány „další velkou vlnou biotechnologické revoluce“ a „farmakologií budoucnosti“ (Aboul-Fadl, 2005).

Existuje několik možností, jak mohou antisensní oligonukleotidy působit. Rozlišujeme tři typy anti-mRNA strategie (Aboul-Fadl, 2005). První využívá jednovláknový antisensní oligonukleotid k zablokování mRNA a následné aktivaci RNázy H, která rozštěpí RNA vlákno. Druhá spouští štěpení RNA díky katalytické aktivitě oligonukleotidu sloužícího jako ribozym a poslední zablokuje RNA za použití krátkých dvojřetězcových molekul RNA, jejichž část se naváže na cílovou mRNA a iniciuje její rozštěpení buněčným enzymatickým aparátem (viz Obrázek 3.1).

Všechny tyto antisensní metody jsou tedy založeny na blokování a/nebo degradaci cílové mRNA jako výsledek vazby komplementární nukleové kyseliny na část mRNA (Lee a Roth, 2003).



Obrázek 3.1: Mechanismy antisensního působení (Aboul-Fadl, 2005).

3.2 Antisensní oligonukleotidy

Antisensní oligonukleotidy (ASO) mohou být jak nemodifikované tak i chemicky modifikované ssDNA (jednovláčkové DNA), RNA a jejich analoga. Obvykle se jedná o vlákna dlouhá 13 – 25 nukleotidů, která jsou speciálně navržena tak, aby hybridizovala s cílovým úsekem RNA podle Watson-Crickova párování bází (Aboul-Fadl, 2005).

Mezi vlastnostmi důležitými pro účinnost antisensních oligonukleotidů je hlavní jejich chemická struktura, což zahrnuje nejenom efektivní hybridizaci s cílovou RNA, ale také jejich stabilitu v extra- a intracelulárním prostředí, dále pak schopnost pronikání do buněk a jejich hromadění v cílové části buňky.

Antisensní oligonukleotidy jako terapeutika specificky se vážající na mRNA mají některé výhody oproti tradičním farmaceutikům, která jsou zaměřena na cílový protein. Je to například jejich vysoká účinnost, jelikož každá mRNA je přeložena do proteinu několikrát před svou degradací, nebo vysoká selektivita (13 – 25 nukleotidů je dostačující počet pro specifické zablokování pouze nežádoucí mRNA). Před příchodem antisensních oligonukleotidů nebyla nikdy mRNA považována za možný receptor pro léky (Aboul-Fadl, 2005).

V dnešní době je ve stádiu klinických testů řada terapeutik založených na antisensní strategii. Léky se nacházejí v různých fázích těchto testů (Fáze I – III). Přehled části léků založených na antisensní terapii, které se nacházejí v klinických testech je například v práci Rayburn (2008). Avšak do dnešního dne byl schválen pouze jeden lék, a to VitraveneTM (Fomivirsen) jako lék proti CMV retinitidě (Rayburn, 2008). Mnoho navržených antisensních léků také v klinických testech již propadlo.

3.3 Modifikované antisensní oligonukleotidy

Nemodifikované antisensní oligonukleotidy jsou nukleázami (enzymy štěpící nukleové kyseliny) v biologických roztocích rychle degradovány. Navíc jejich velký záporný náboj znemožňuje snadné pronikání skrz buněčnou membránu. Proto se pozornost výzkumu zaměřuje na pokrok ve vytváření nových modifikovaných analog antisensních oligonukleotidů. Vyvíjejí se různé chemické modifikace, které mají

lepší odolnost vůči buněčným enzymům štěpícím nukleové kyseliny, delší poločas života v buněčné tkáni, zvýšenou specifickou afinitu k cílovému úseku přirozené nukleové kyseliny s komplementární bázovou sekvencí, účinnost a schopnost aktivovat RNázu H. U těchto modifikací je také snaha redukovat nespecifickou toxicitu a to i metabolických produktů (Chan a kol. 2006). Obecně rozlišujeme tři druhy modifikací, podle toho, která část nukleotidu je modifikována: modifikace báze, modifikace sacharidové jednotky (obvykle na pozici 2' ribózy) nebo modifikace cukr-fosfátové páteře (Kurreck, 2003).

Bohužel žádná z dosud nalezených modifikací neměla optimální vlastnosti, aby se využil celý potenciál antisensní strategie.

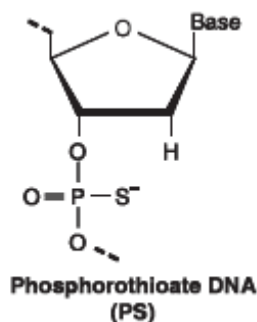
První generace antisensních oligonukleotidů

Do první generace antisensních oligonukleotidů řadíme ty, které obsahují fosforothioátovou skupinu namísto fosfátové (PS-modifikace) v cukr-fosfátové páteři (viz Obrázek 3.2). V PS-modifikaci je tedy jeden ne vazebný kyslík ve fosfodiesterové spojnici nahrazen atomem síry. Oligonukleotidy založené na fosforothioátech mají dobrou odolnost vůči degradaci buněčnými nukleázami. Tato modifikace zároveň aktivuje RNázu H, která následně štěpí cílovou mRNA (Chan, 2006).

Nevýhodou této modifikace je její slabší afinita. Teplota tání heteroduplexu ASO-mRNA klesá přibližně o 0,5 °C na nukleotid. Zároveň byla u této modifikace zjištěna nespecifická interakce s buněčným povrchem a intracelulárními proteiny.

Navzdory těmto nevýhodám je PS-modifikace nejlépe známá a nejrozšířenější ve studiích *in vitro* a *in vivo* (Chan, 2006)

Fomivirsin (první lék, který prošel klinickými testy a dnes je používán v lékařské praxi) je založen právě na této modifikaci (Chan, 2006).



Obrázek 3.2: Modifikace 1. generace (Chan, 2006).

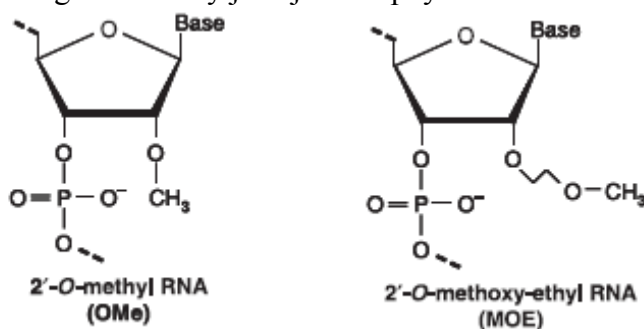
Druhá generace antisensních oligonukleotidů

Antisensní oligonukleotidy s alkylovou skupinou na 2' uhlíku ribózy patří do druhé generace. Nejvýznamější zástupci této skupiny jsou 2'-O-methyl (2'-OMe) a 2'-O-methoxy-ethyl (2'MOE), viz Obrázek 3.3 (Chan, 2006).

Tyto oligonukleotidy jsou méně toxické než PS-modifikace první generace a mají trochu větší afinitu k cílové RNA, ale nedokážou aktivovat RNázu H. Antisensní efekt takto modifikovaných oligonukleotidů je pouze ve sterickém zablokování translace, nebo mohou být využity při posttranskripčních úpravách (zabránění špatnému sestřihu). Tato technika byla využita při léčení genetické krevní vady β -thalassemie (Chan, 2006).

Protože je aktivace RNázy H důležitá (Chan, 2006), byly vyvinuty tzv. „chimerické“ antisensní oligonukleotidy s modifikacemi druhé generace kromě

úseku uprostřed vlákna, který obsahuje přibližně 10 nukleotidů s PS-modifikací. Takovéto antisensní oligonukleotidy jsou již schopny aktivovat RNázu H.



Obrázek 3.3: Modifikace 2. generace (Chan, 2006).

Třetí generace antisensních oligonukleotidů

V rámci třetí generace antisensních oligonukleotidů byla snaha dosáhnout dalšího zlepšení cílové afinity a odolnosti vůči nukleázám (Chan, 2006). Hlavní zástupci této generace jsou peptidová nukleová kyselina (PNA), uzavřená nukleová kyselina (LNA) a fosforoamidát morfolino oligomer (PMO), viz Obrázek 3.4.

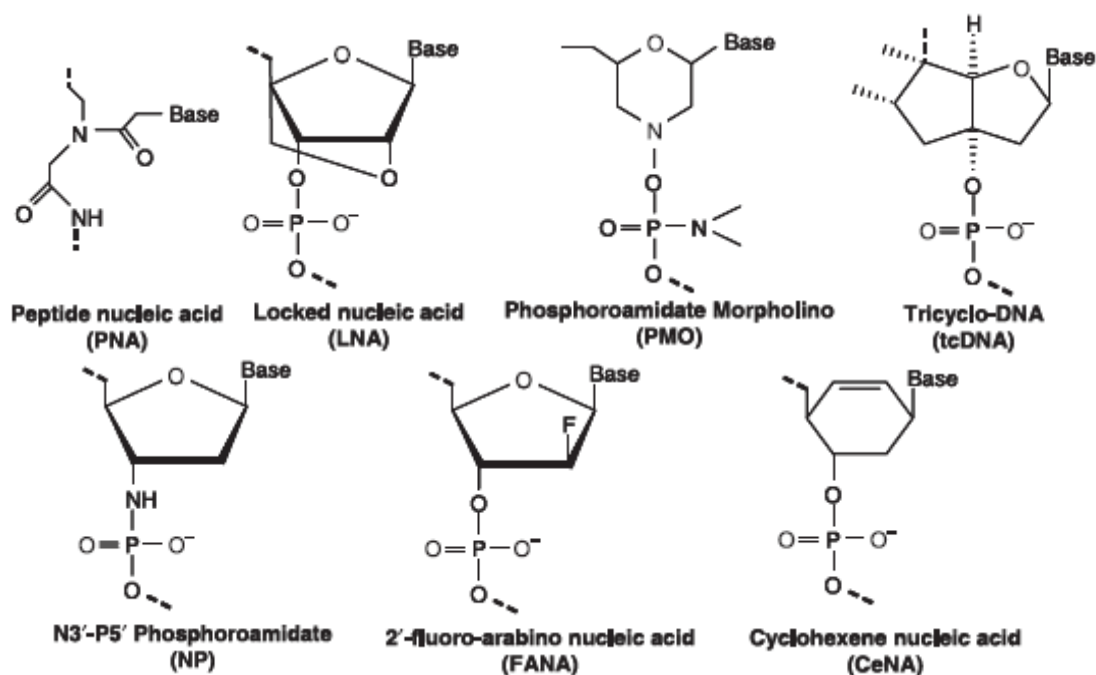
PNA je syntetická napodobenina DNA, ve které je fosfosacharidová páteř nahrazena flexibilním pseudopeptidovým polymerem (*N*-(2-aminoethyl)glycin) a báze jsou na kostru připojeny methylen karbonylovou vazbou. PNA je nenabitá, avšak může hybridizovat s DNA nebo RNA s vysokou afinitou a specifitou. PNA je v buněčném prostředí vysoce stabilní, protože není degradována ani nukleázami, ani peptidázami (enzymy štěpící proteiny).

PNA slouží v antisensní strategii pouze ke sterickému bránění translaci, protože PNA není schopná aktivovat RNázu H. PNA však může vyvolat antigenní efekt hybridizací s dvouvláknovou DNA (dsDNA), a tak zastavit transkripci.

LNA je konformačně omezený nukleotid obsahující 2'-*O*,4'-*C*-metylenový můstek na konfiguraci β -D-ribofuranosylu. Tato modifikace vysoce zlepšuje hybridizační afinitu k cílové mRNA a DNA, se značným zvýšením termální stability duplexu. LNA je rovněž stabilní vůči buněčným nukleázám. Avšak ani LNA neaktivuje RNázu H. LNA se však používá v „chimerických“ antisensních oligonukleotidech, aby docházelo k aktivování RNázy H. Výsledný oligomer má poté strukturu LNA/DNA/LNA, kde DNA je PS-modifikována. DNA je složena z cca. 10 nukleotidů. Takto vzniklý oligomer zajišťuje úspěšné štěpení cílové mRNA.

PMO reprezentuje skupinu nenabitých antisensních oligonukleotidů, ve kterých je ribózový kruh nahrazen šestičlenným morfolinovým kruhem a fosfodiesterová vazba je zaměněna za fosforoamidátovou vazbu. Ani PMO neaktivuje činnost RNázy H, proto slouží pouze jako sterická překážka bránící v translaci. Tato modifikace rovněž prokazuje výbornou odolnost vůči nukleázám a proteázám v biologických roztocích. PMO však špatně proniká přes buněčnou membránu savčích buněk. Výzkum ukázal, že při vazbě peptidů bohatých na arginin (ARP) na PMO se výrazně zvýší průnik do buněk a antisensní účinnost (zvýšením teplotní stability) heteroduplexu ARP-PMO-mRNA. Léky založené na PMO jsou v klinických testech.

Dalšími zástupci této generace jsou FANA (2'-Deoxy-2'-Fluoro- β -D-Arabino nukleová kyselina), NPs (N3'-P5' Fosforoamidáty), CeNAs (Cyklohexan nukleové kyseliny), nebo tcDNA (tricyklo-DNA) (Aboul-Fadl, 2005), viz obrázek 3.4.



Obrázek 3.4: Modifikace 3. generace (Chan, 2006).

3.4 Studium stability antisensních oligonukleotidů

Jedním z požadavků pro modifikované oligonukleotidy je specifická afinita k cílovému úseku mRNA s komplementárním bázevým složením, proto se provádí termodynamická charakterizace heteroduplexů ASO-RNA.

Mezi metodami používanými pro určování termodynamické stability komplexů nukleových kyselin a jejich analog, popřípadě komplexů vzniklých jejich kombinací, jsou nejvíce používané optické metody, především UV absorpce. Měření denaturace vlivem zvýšení teploty se provádí pozorováním poklesu hypochromicity, tedy růstu absorbance, na určité vlnové délce. Pro nukleové kyseliny je tato vlnová délka většinou 260 nm.

Určování termodynamické stability PNA v komplexech s DNA s použitím metody UV absorpce lze nalézt například v pracích Jensen a kol. (1997), Rättiläinen a kol. (2000). Tyto práce se zabývají jak plně komplementárními duplexy, tak i duplexy s obsahem nekomplementárních párů. Termodynamika a kinetika hybridizace PNA s vlásečkou DNA byla studována v práci Kushon a kol. (2001).

Formaci a stabilitou triplexu vzniklého z duplexu DNA a jednoho samostatného vlákna se zabývali práce Lacroix a kol. (2000) a Torigoe (2001). V těchto pracích byly porovnávány modifikované (NPs, PMO) s přirozenými oligomery vytvářející triplex (TFO – triplex-forming oligonucleotide). Bylo zjištěno, že v podmínkách neutrálního pH s 10 mM koncentrací hořečnatých iontů NPs modifikace TFO vytváří nejstabilnější triplex. Při absenci hořčíku za fyziologické koncentrace monovalentních kationtů (0,14 M) však vytváří s duplexem DNA stabilní triplexy pouze morfolinové oligonukleotidy. U PMO je zvláštností, že se jedná o tvorbu triplexu s nenabitým oligonukleotidovým třetím vláknem a duplexem DNA. Tento triplex je destabilizován vysokou koncentrací draselných iontů nebo hořečnatými ionty. Pro zkoumání stability triplexů byly kromě metody UV absorpce použity ještě EMSA (electrophoretic mobility shift assay) (Lacroix, 2000), ITC (isotermální

titrační kalorimetrie), IAsys (Interaction Analysis System), CD Spektroskopie (Cirkulární dichroismus) (Torigoe, 2001).

Studium termodynamiky oligonukleotidových triplexů je shrnuto v článku Plum (1997), k nejpoužívanějším metodám patří UV absorpce a kalorimetrie (DSC i ITC). Parametry získané z DSC a ITC se liší, zatímco DSC experiment sleduje teplotně indukovanou disociaci, ITC experiment měří asociační proces. Při ITC experimentu měříme teplo interakce jako funkci množství daného titrantu, takto získaná data dávají přímou informaci o entalpii asociace. Stechiometrii komplexu, asociační konstantu K a změnu Gibbsovy energie ΔG lze určit z fitování titrační křivky (Plum, 1998). Stabilita triplexu s třetím vláknem modifikovaným na pozici 2' ribózy (2'-aminoethoxy) byla v práci (Carlomagno, 2001) rovněž studována pomocí DSC.

Methylfosfonátové modifikace mají methylovou skupinu navázanou na fosfát výměnou za jeden kyslík, který se neúčastní fosfodiesterové vazby v internukleotidové spojnici. Tyto modifikace byly studovány pomocí UV absorpce například v pracích Reynolds (1996) a Thiviyathan (2002). Vliv modifikací (sulfamid a 3'-*N*-sulfamát dinukleotid fosforoamidát), které byly zabudovány do 16-meru DNA byl zkoumán UV absorpcí v práci Fettes (2002).

Další optická metoda použitá k určování termodynamických vlastností komplexů a kinetiky vzniku těchto komplexů je cirkulární dichroismus. Práce Sabahi (2001) studuje touto metodou hybridizační vlastnosti oligonukleotidů s modifikací na pozici 2' ribózy (zkoumané modifikace: 2'-fluoro-, 2'-*O*-propyl-, 2'-*O*-methoxy- a 2'-*O*-aminopropyl-) s komplementárními nemodifikovanými DNA nebo RNA oligomery. Dále při těchto měřeních byla použita fluorescence ke studiu hybridizační kinetiky.

V práci Gelfand (1999) byla ukázána možnost využití fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) k přímému určení rozdílu volné energie mezi referenčním duplexem (fluorescenčně značený) a testovaným duplexem (do vzorku se titrují volná vlákna). Takto lze studovat například změnu energie mezi duplexem plně komplementárním a duplexem, který obsahuje nekomplementární pár.

Kinetiku lze studovat i pomocí metody povrchové plasmonové rezonance. Použitím této metody se zabývají například práce Vaisocherová (2005) a Jensen (1997).

Existuje termodynamická databáze pro přirozené i modifikované nukleové kyseliny (Thermodynamic Database for Nucleic Acids – NTDB). Tato databáze obsahuje sekvence, strukturu a termodynamické informace, stejně jako experimentální podmínky, za kterých byly tyto informace získány (Chiu, 2001).

V Praze probíhá výzkum antisensních oligonukleotidů na FÚ UK na Oddělení fyziky biomolekul v úzké spolupráci se Skupinou oligonukleotidů Ing. Ivana Rosenberga z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, kde jsou oligomery syntetizovány.

Předkládaná diplomová práce se také zabývá touto problematikou. V rámci práce byla prováděna termodynamická charakterizace interakce polymerní RNA s oligonukleotidy s modifikovanou internukleotidovou spojkou, kdy je do spojky vložena methylenová skupina mezi fosfát a vazebný kyslík. Modifikace je tudíž izopolární a neizosterní.

4 Diferenční skenovací mikrokolorimetrie

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) je technika na určování termodynamických parametrů vzorků v roztoku. Tato experimentální metoda je důležitá i pro určování stability biomolekulárních komplexů. Současné mikrokolorimetry umožňují měření biomolekul díky své vysoké citlivosti a relativně malým požadavkům na objemy vzorků. DSC přímo měří změny tepelné kapacity biomolekulárních systémů v roztoku během kontrolovaného zvyšování a snižování teploty, které probíhá konstantní rychlostí.

Diferenční skenovací kalorimetry prodělaly za posledních několik desítek let rychlý vývoj. Dnešní kalorimetry patří do tzv. čtvrté generace mikrokolorimetrů. V současné době je možné měřit jak v režimu ohřívání, tak i ochlazování, což donedávna představovalo technický problém. Dokonce v obou režimech měří kalorimetr se stejnou přesností. Svou citlivostí se dostaly kalorimetry na takovou úroveň, kdy je možno měřit změnu tepelné kapacity na úrovni rozpadu komplexů biomolekul (Privalov, 1995).

4.1 Principy mikrokolorimetrie

Tepelná kapacita

$$C = \frac{dQ}{dT}, \quad (4.1)$$

je parametr, který velmi citlivě odráží tepelně indukované změny ve vzorku.

Změnu entalpie a entropie při tepelně indukovaných procesech v určitém intervalu teplot je možné z tepelné kapacity (obecně teplotně závislé) získat přímou integrací podle vztahů:

$$\Delta H = \int_{T_2}^{T_1} C_p dT, \quad (4.2)$$

$$\Delta S = \int_{T_2}^{T_1} \frac{C_p}{T} dT. \quad (4.3)$$

Entalpie je extenzivní veličinou na rozdíl od teploty, která je veličinou intenzivní. Dohromady tvoří fundamentální konjugované veličiny. Známe-li jejich funkční závislost, postačí nám to k získání celé termodynamické informace o makroskopickém stavu systému.

Diferenční skenovací kalorimetr je přístroj, který byl navržen tak, aby měřil rozdíl tepelných kapacit dvou kapalin (rozpouštědla a vzorku v roztoku). To však není možné v rámci jednoho experimentu, ve kterém je jedna kyveta naplněna jedním roztokem (rozpouštědlem) a druhá jiným roztokem (roztokem se vzorkem). Pro určení rozdílu tepelných kapacit, je nezbytné nejprve naplnit obě kyvety rozpouštědlem a určit základní linii (baseline) v celé teplotní škále. Tato základní linie většinou není lineární a neleží přesně na nule, na rozdíl od ideálního případu, kdy by byly obě kyvety zcela identické. Z technického hlediska však není možné

vyrobit dvě naprosto totožné kyvety, a proto se kyvety v reálném kalorimetru od sebe poněkud liší hmotností, objemem a tepelnou vodivostí. Avšak, jak se ukazuje při experimentech, základní linie je při opakovaných skenech dobře reprodukovatelná.

Kalorimetr je připojen k počítači, který při konstantním ohřevu (resp. ochlazování) zaznamenává dorovnávací příkon, který odpovídá rozdílu tepelných kapacit roztoků v kyvetách. Dorovnávací příkon můžeme vyjádřit podle Privalova (1995) vztahem:

$$\Delta P = \left\{ \left[V^{\text{cell}} C^{\text{solute}} \frac{C_p^{\text{vz}}}{MW} + (V^{\text{cell}} - V^{\text{vz}}) \rho C_s \right] - V^{\text{cell}} \rho C_s \right\} \frac{dT}{dt}, \quad (4.4)$$

kde V^{cell} je objem kyvety, C^{solute} je koncentrace vzorku v roztoku (v jednotkách g l^{-1}), C_p je molární tepelná kapacita vzorku v roztoku, MW je molekulová váha rozpouštěné látky, V^{vz} je celkový objem rozpouštěné látky v kyvetě, ρ je hustota rozpouštědla a C_s je tepelná kapacita na jednotku váhy rozpouštědla.

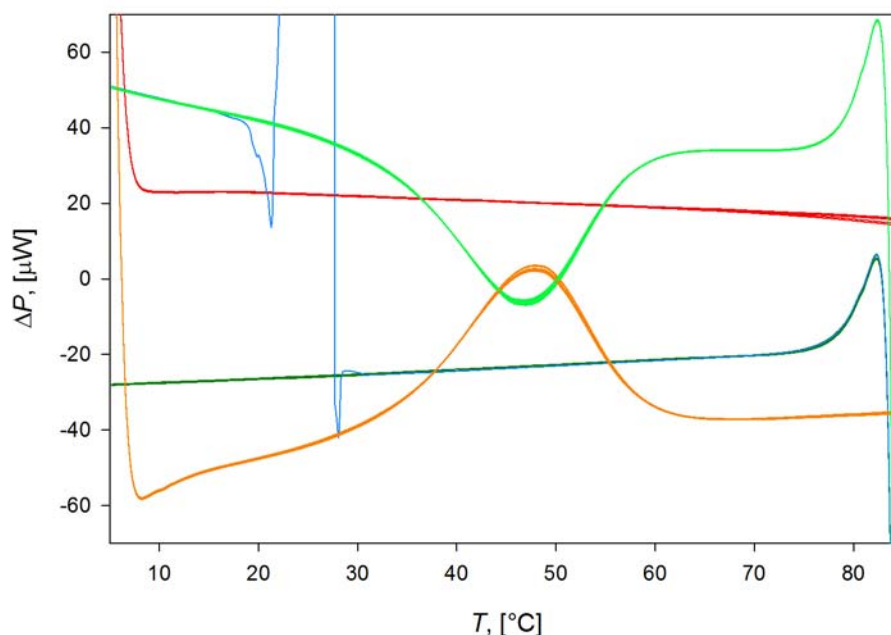
Podle vzorce (4.4) by dorovnávací příkon ΔP_{rozp} pro skeny, při kterých jsou obě kyvety naplněny rozpouštědlem, vyšel nulový ($\Delta P_{\text{rozp}} = 0 \text{ W}$). Tento vzorec však platí přesně jen pro ideální kalorimetr s naprosto totožnými kyvetami. Pro reálný kalorimetr musíme vzorec upravit na tvar (Privalov, 1995):

$$\Delta P = \left\{ \left[V_{\text{vz}}^{\text{cell}} c^{\text{vz}} C_p^{\text{vz}} + (V_{\text{vz}}^{\text{cell}} - V^{\text{vz}}) \rho C_s \right] - V_{\text{ref}}^{\text{cell}} \rho C_s \right\} \frac{dT}{dt}, \quad (4.5)$$

kde $V_{\text{vz}}^{\text{cell}}$ ($V_{\text{ref}}^{\text{cell}}$) je objem vzorkové (referenční) kyvety a c^{vz} je molární koncentrace vzorku. Po úpravě pro skeny pouze s rozpouštědlem dostáváme vztah (Privalov, 1995):

$$\Delta P_{\text{rozp}} = (V_{\text{vz}}^{\text{cell}} - V_{\text{ref}}^{\text{cell}}) \rho C_s \frac{dT}{dt}. \quad (4.6)$$

Na Obrázku 4.1 je ukázka typického záznamu z experimentu provedeného na diferenčním skenovacím kalorimetru.



Obrázek 4.1: Originální DSC záznam z měření vzorku duplexu DNA (9 bp). Rychlost ohřívání a ochlazování: 1 K min^{-1} ; koncentrace duplexu v roztoku: $0,57 \text{ mM}$ ve vláknech jednoho typu; rozpouštědlo: 25 mM TRIS , $10 \text{ \% D}_2\text{O}$. Na obrázku jsou zachyceny průběhy základních linií červeně (ohřev) a tmavě zeleně (ochlazování), modře je základní linie, při které byl vložen vzorek do vzorkové kvyety. Průběhy skenů se vzorkem jsou oranžově (ohřívání) a světle zeleně (ochlazování) (Ottová, 2007).

4.2 Aplikace DSC

Diferenční skenovací kalorimetr může být použit k detekci a sledování tepelně indukovaných přechodů mezi uspořádaným a neuspořádaným stavem biopolymerů a jiných tepelně labilních molekul a molekulárních komplexů. Kalorimetry se využívají k měření biomolekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny a lipidy.

DSC je nejrozšířenější pro studium proteinů, avšak i nukleové kyseliny jsou v poslední době hodně zkoumány. U nukleových kyselin se DSC nejvíce využívá pro studium komplexů, jako je například duplex v pracích Chalikian a kol. (1999) a Holbrook a kol. (1999).

Völker a kol. (1999) ukazovali, že DSC může být použita k získání profilu tání DNA plasmidu, a že tyto výsledky jsou stejné jako profily získané z optických metod. Před nástupem DSC byly pro získání termodynamických vlastností používány výlučně optické metody.

Pomocí DSC byly zkoumány také sekvence, ve kterých se opakuje základní motiv tří nukleotidů (Amrane a kol., 2005). Konkrétně se jednalo o oligonukleotidy dlouhé $12 - 75$ nukleotidů se základním motivem $(\text{CTG})_n$. V této práci byla DSC jednou z měřících metod, dále byly využity UV absorpce a cirkulární dichroismus. Bylo zjištěno, že všechny oligomery vytvářejí stabilní intramolekulární struktury v blízkosti fyziologických podmínek a že teplota tání jen velmi málo závisí na délce oligomeru.

V práci Hofr a kol. (2005) využili DSC jako jednu z metod ke zkoumání termální stability duplexu DNA tvořeného patnáctimerními vlákny s intervláknovou spojkou z *trans*-diamminedichloroplatiny(II).

Termodynamiku a kinetiku kvadruplexů zkoumali pomocí DSC Mergny a kol. (2006). Efekt chemických modifikací na termální stabilitu různých G-kvadruplexů vzniklých z oligonukleotidů zkoumala Saccà a kol. (2005).

Práce Riccelli a kol. (2002) studuje tání komplexů heteromorfních duplexů DNA.

Terui a kol (2005) zkoumali pomocí DSC stabilizaci nukleových kyselin vyvolanou polyaminy produkovanými extrémními termofily. Existují dva druhy polyaminů: lineární a větvené, a autoři objasňovali jejich fyziologickou roli. Testovali vliv na stabilitu DNA a RNA a zjistili, že lineární polyaminy efektivně stabilizují v buňkách termofilů DNA, zatímco větvené polyaminy stabilizují RNA.

Cíle práce

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) slouží k pozorování teplotně indukovaných konformačních přechodů nebo rozpadů komplexů ve vzorku, podobně jako optické metody (UV absorpce). Avšak oproti optickým metodám, kde jsou termodynamické parametry, změna entalpie a změna entropie, při fitování změřených průběhů teplotně indukovaných změn optických spekter silně korelované ve vlivu na celkový součet čtverců odchylek, může DSC přinést přesnější hodnoty. Samotnou změnu entalpie lze například již určit jednoduchou integrací DSC pásu. Nová vyspělá technologie umožnila konstrukci citlivých mikrokolorimetrů, kde je možné provádět měření biomolekul za poměrně nízkých koncentrací při nevelkých objemech vzorku. To značně rozšiřuje oblasti použitelnosti této techniky při studiu biomolekul. Na druhé straně zařízení pracuje na samé mezi dosažitelné citlivosti elektronických čidel, a proto jsou klíčové otázky přesnosti a spolehlivosti prováděných experimentů.

Cílem diplomové práce bylo zavedení DSC do zkoumání stability modifikovaných oligonukleotidů potenciálně vhodných pro použití v tzv. oligonukleotidových terapiích. První měření prováděná na diferenčním skenovacím kalorimetru na FÚ UK Oddělení fyziky biomolekul však ukázala některé negativní jevy ovlivňující přesnost a reprodukovatelnost výsledků. Proto bylo prvním úkolem práce provedení ověřovacích a testovacích měření, jejichž cílem bylo stanovení přesnosti zařízení a nalezení optimálních parametrů a postupů pro měření nukleových kyselin včetně jejich analog a vyhodnocování výsledků.

Hlavním cílem byla termodynamická charakterizace vlivu izopolární neizosterní modifikace internukleotidové spojky na hybridizačních schopnosti modifikovaného oligonukleotidu vůči polymerní RNA. Vznik příslušných komplexů byl již strukturně charakterizován pomocí Ramanova rozptylu, ale změřené teplotní závislosti nebyly dostatečné pro věrohodné stanovení termodynamických charakteristik komplexů. DSC proto měla umožnit termodynamickou charakterizaci.

Dalším cílem bylo provedení pilotních experimentů v oblasti termodynamického studia RNA vlásenek pomocí DSC. V těchto případech nemá DSC křivka charakter jednoduchého výrazného pásu, a proto jsme hledali i vhodný způsob vyhodnocení naměřených dat.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Vzorky

V předkládané práci byly na diferenčním skenovacím kalorimetru prováděny experimenty, které měly ověřit přesnost kalorimetru, a také jeho citlivost na některé měřící postupy. V rámci těchto experimentů byl měřen vzorek nukleových kyselin s palindromatickou sekvencí. Dále byly studovány dva systémy nukleových kyselin. Níže jsou detailně popsány výchozí látky, příprava vzorků a podmínky, za kterých byly měřeny.

5.1 Palindrom

Při testovacích měřeních byl použit krátký DNA oligonukleotid s palindromatickou sekvencí bází 5' – CATC GATG – 3'. U palindromatické sekvence jsou vlákna auto-komplementární, tedy tvoří duplexy sama se sebou. Molekulová váha jednoho vlákna je 2 409,6. Vzorek byl zakázkově nasyntetizován v Laboratoři funkční genomiky a proteomiky Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Vzorek byl výrobcem dále HPLC přečištěn a podroben několikanásobné lyofilizaci.

Pro stabilizaci pH byl použit 25 mM fosfátový pufr s 10 % D₂O (PBNa-HW). (Tento přídatek těžké vody neměl pro náš experiment žádný význam, ale umožnil, aby byl vzorek použitelný i pro NMR experiment probíhající mimo rámec této diplomové práce.) Do pufru byl přidán chlorid sodný (NaCl) tak, aby výsledná koncentrace sodných iontů (Na⁺) byla 200 mM. Všechny chemikálie (NaCl, Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) byly zakoupeny od firmy Fluka. Výsledné pH 7,0 bylo změřeno na pH-metru Orion. Nakonec byl pufr přefiltrován přes filtr MILLEX GP od firmy Millipore Corporation s průměrem pórů 0,22 μm.

Vzorek byl rozpuštěn ve fosfátovém pufru tak, aby výsledná koncentrace byla 125 μM ve vláknech.

5.2 Modifikované patnáctimery

Měřený systém je tvořen deoxythymidinovými patnáctimery s modifikovanou cukr-fosfátovou spojkou. Modifikace spočívá v prodloužení internukleotidové spojky vložением -CH₂- skupiny mezi fosfor a esterový kyslík; takto vzniklá prodloužená spojka je izopolární, ale neizosterní vzhledem ke spojce přirozené. Měřená sada oligonukleotidů se skládala z jednoho přirozeného DNA patnáctimeru a čtyř různých modifikací. Ve dvou byla -CH₂- skupina vložena blíže 5' uhlíku spojky (5'-O-CH₂-P-O-3') a ve druhých dvou případech byla skupina vložena blíže 3' uhlíku (5'-O-P-CH₂-O-3'). Dvojice oligonukleotidů s modifikací stejného typu se lišila v tom, zda se modifikované spojky v řetězci střídaly s přirozenými, či byly všechny spojky modifikované. Všechny oligomery thyminu jsou na Obrázku 5.1. V práci Rejman (2001) byla zkoumána stabilita těchto modifikací vůči nukleázám v extraktu L 1210 a bylo zjištěno, že všechny modifikace jsou rezistentní. Dále byla v citované práci

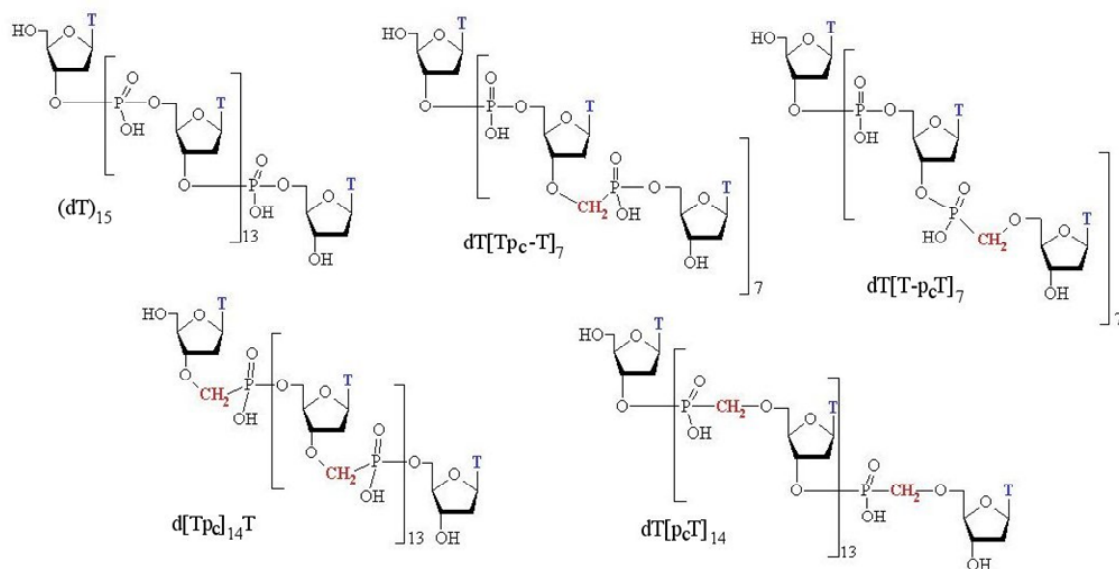
zkoumána schopnost aktivovat RNázu H a bylo zjištěno, že pouze modifikace $dT[Tp_cT]_7$ je schopna aktivovat RNázu H.

Při našich měřeních byla zkoumána tvorba hybridních komplexů těchto deoxythymidinových oligomerů s komplementárním, přirozeným RNA vláknem polyadenylové kyseliny (poly(rA)).

Čtyři oligothymidylátová analoga byla syntetizována a HPLC přečištěna skupinou Ing. Ivana Rosenberga z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR. Polyadenylová kyselina (draselná sůl) byla zakoupena od firmy Sigma a přirozený deoxythymidinový pentadekamer (sodná sůl) byl zakoupen od firmy Eurogentec; oba vzorky byly bez dalšího přečištění.

pH bylo stabilizováno 50 mM kakodylátovým pufrům (CaKMG). Do pufru byl přidán 50 mM chlorid draselný (KCl) a 2 mM chlorid hořečnatý ($MgCl_2$). Tyto soli byly přidány tak, aby výsledná koncentrace jednomocných iontů byla 100 mM a koncentrace dvojmocných iontů byla 2 mM. Všechny použité chemikálie (kakodylát sodný, HCl, KCl, $MgCl_2$) byly zakoupeny od firmy Fluka. Pomocí pH-metru Orion bylo nastaveno pH 6,2. Na závěr celé přípravy byl pufr přefiltrován přes filtr MILLEX GP od firmy Millipore Corporation s průměrem pórů 0,22 μm .

Vzorky byly rozpuštěny v kakodylátovém pufru v koncentraci dané látkovým množstvím, které bylo k dispozici. Vzorek $(dT)_{15}$ byl měřen v koncentraci 30,67 μM , $dT[Tp_c-T]_7$ v koncentraci 28,67 μM , $dT[T-p_cT]_7$ v koncentraci 26 μM , $d[Tp_c]_{14}T$ v koncentraci 30,67 μM a vzorek $dT[p_cT]_{14}$ v koncentraci 18 μM . Všechny uvedené koncentrace jsou uvedeny ve vláčkách. Koncentrace polyadenylové kyseliny byla taková, aby stechiometrický poměr mezi bázemi adeninu a thyminu byl 1:1. Ve všech případech byla zachována koncentrace monovalenčních iontů ($Na^+ + K^+$) 100 mM a koncentrace divalentních iontů (Mg^{2+}) 2 mM.



Obrázek 5.1: Deoxythymidinové patnáctimery s přírodní a prodlouženou spojkou. $(dT)_{15}$ je přirozený patnáctimer, $dT[Tp_c-T]_7$ je modifikace, ve které se $-CH_2-$ skupina nachází na 3' konci spojky a modifikované spojky alternují s přirozenými, $dT[T-p_cT]_7$ je modifikace, ve které se $-CH_2-$ skupina nachází na 5' konci spojky a modifikované spojky alternují s přirozenými, $d[Tp_c]_{14}T$ je modifikace, ve které se $-CH_2-$ skupina nachází na 3' konci spojky a všechny spojky jsou modifikované, a $dT[p_cT]_{14}$ je modifikace, ve které se $-CH_2-$ skupina nachází na 5' konci spojky a všechny spojky jsou modifikované.

5.3 Vlášeny

Dalším měřeným systémem nukleových kyselin jsou RNA vlášeny. Konkrétně se jedná o vlásenku HIV-1 TAR a její aptamer R06.

Úsek TAR (Trans-Activation Response element) se vyskytuje na 5' konci genomu viru HIV. Zahrnuje prvních 59 nukleotidů, které vytvářejí nedokonalou vlásenku zakončenou šestičetnou smyčkou s dlouhým stonkem, ve kterém je výduť (bulge) a dva nadpočetné nukleotidy (viz Obrázek 5.2). TAR slouží jako regulační element, neboť jeho vrcholová část slouží jako vazebné místo pro proteinový komplex obsahující cyklin-dependentní kinázu 9. Ta aktivuje RNA polymerázu II a tím pomáhá zvyšovat frekvenci replikace genomu HIV viru. Jako molekulární model TAR byla pro měření použita její vrcholová část, kterou tvoří krátký řetězec o délce 14 bází. Ten má strukturu dokonalé malé vlášeny se stonkem tvořeným čtyřmi bázovými páry a smyčkou ze šesti nukleotidů. Bázové složení měřeného segmentu TAR vlášeny je 5' – GAGC CUGGGA GCUC – 3'.

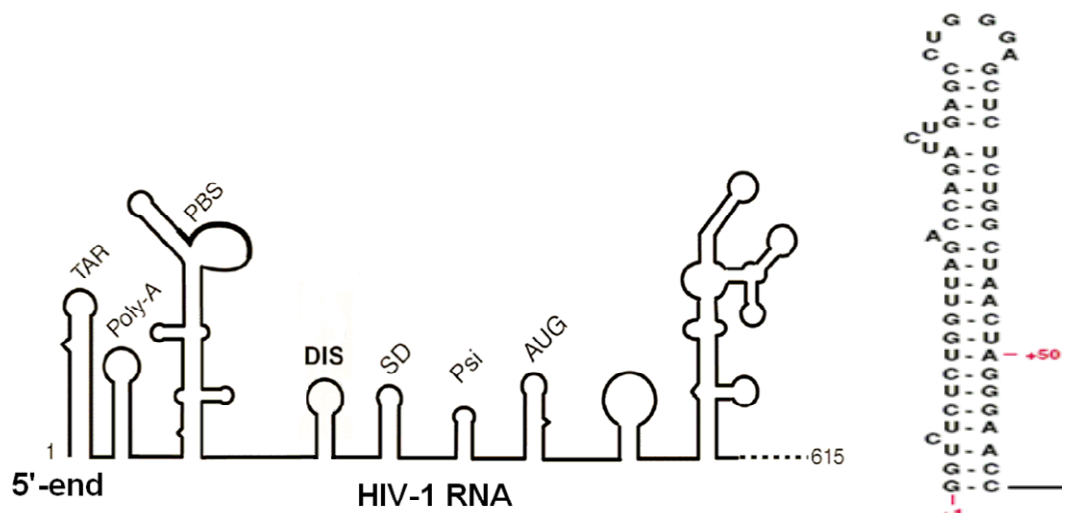
Pod označením R06 se nachází vlásenka, která je složena z 16 bází a která byla vybrána jako vhodný aptamer k vlásence TAR. Aptamer byl vybrán metodou SELEX (Selection of Ligand by Exponential Enrichment) (Duconge and Toulme, 1999).

Stonk aptameru R06 je tvořen čtyřmi bázovými páry, následuje atypický purin-purinový pár a celá vlásenka je zakončena smyčkou obsahující šest bází s komplementárním bázovým složením ke smyčce TAR vlášeny. Bázové složení aptameru je 5' – CACG G UCCCAG A CGUG – 3'. Ukazuje se, že atypický purin-purinový pár je zřejmě důležitý z hlediska vytvoření stabilní prostorové struktury, která je vhodná pro vytvoření „kissing“ komplexu vlášeny TAR s aptamerem R06. Kromě samotných RNA smyček byl měřen také jejich směsný roztok, kde by se měly vytvářet tzv. kissing komplexy (viz schéma na Obrázku 5.3), což je požadovaná interakce díky které R06 inhibuje regulační funkci TAR.

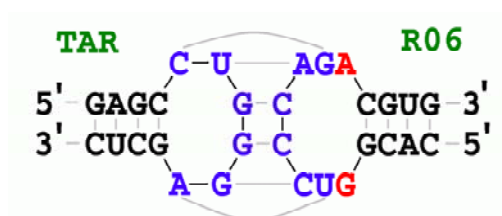
Vzorky (segment TAR vlášeny a aptamer R06) byly zakázkově připraveny firmou Dharmacon.

Pro stabilizaci pH byl použit 20 mM kakodylátový pufr (CaNaKMg). Do pufru byl přidán 20 mM chlorid sodný (NaCl), 140 mM chlorid draselný (KCl) a 3 mM chlorid hořečnatý (MgCl₂). Všechny chemikálie (kakodylát sodný, HCl, NaCl, KCl, MgCl₂) byly zakoupeny od firmy Fluka. Na pH-metru Orion bylo změřeno pH 6,3. Na závěr přípravy byl pufr přefiltrován přes filtr MILLEX GP od firmy Millipore Corporation s průměrem pórů 0,22 μm.

Tyto vzorky byly měřeny v následujících koncentracích: vlásenka TAR v koncentraci 66 μM a 149,7 μM, aptamer R06 v koncentracích 56,25 μM a 125 μM, směs TAR + R06 v koncentracích 61,125 μM a 137,35 μM. Všechny uvedené koncentrace jsou koncentrace ve vlásenkách.



Obrázek 5.2: Vlevo je strukturální schéma genomu HIV-1 RNA viru. Vpravo je sekvence bází úseku TAR.



Obrázek 5.3: Schéma „kissing“ komplexu vlásenky TAR a jejího aptameru R06.

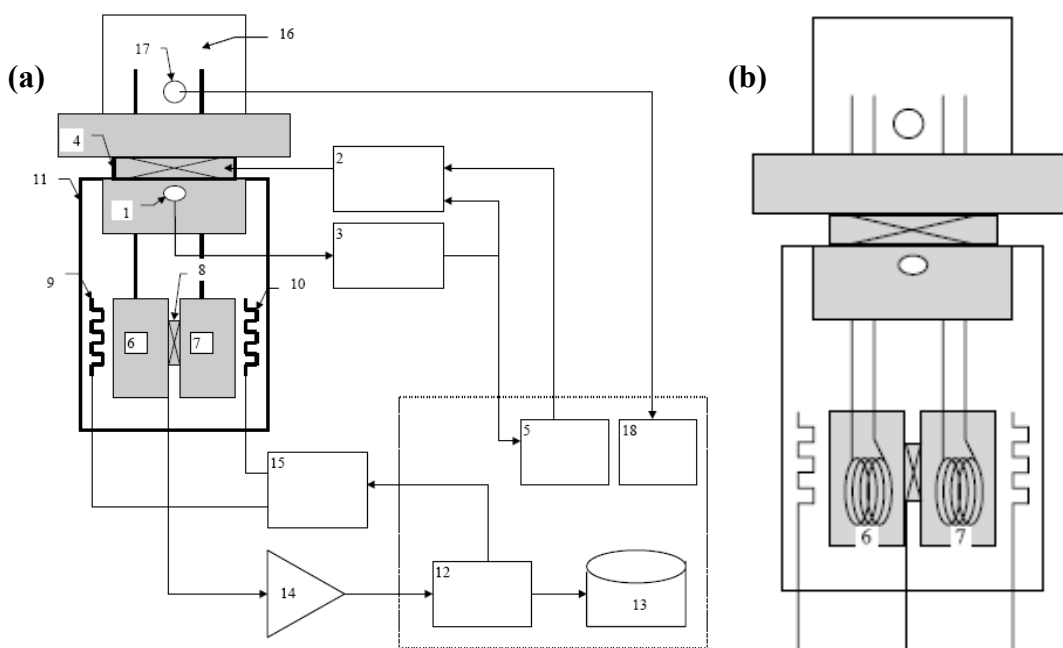
6 Diferenční skenovací mikrok calorimetr

6.1 Specifikace diferenčního skenovacího kalorimetru

Všechna měření byla provedena na komerčním diferenčním skenovacím kalorimetru na Fyzikálním ústavu UK na Oddělení fyziky biomolekul. Jedná se o model 6100 Nano-DSC II od firmy Calorimetric Science Corporation. Tento diferenční skenovací mikrok calorimetr je určen pro termodynamickou charakterizaci biomolekul v roztoku v širokém teplotním rozsahu. Podrobná specifikace přístroje je v Tabulce 6.1, schéma mikrok calorimetru je na Obrázku 6.1.

Tabulka 6.1: Specifikace kalorimetru 6100 Nano-DSC II

Čas odezvy	poločas = 5 s
Opakovatelnost základní linie	standardní odchylka; $\pm 4 \mu\text{cal deg}^{-1}$ při ohřevu 1 K min^{-1}
Šum základní linie	standardní odchylka; $\pm 0,015 \mu\text{W}$
Konstrukce kyvety	kapilára; 24K zlato
Objem vzorkové kyvety	0,299 ml
Objem referenční kyvety	0,298 ml
Rozmezí přetlaku v kyvetách	0 – 3 atm
Rozmezí teplot pro skenování	(-10) – 130 °C
Rychlost ohřívání	nastavitelné od 0 do 2 K min^{-1}



Obrázek 6.1: (a) Schéma mikrok calorimetru Nano DSC II. 1 – platinový teploměr; 2 – jednotka řídicí teploty; 3 – obvod měřící teploty; 4 – ohřívací a chladící Peltierovy prvky; 5 – kontrolní blok teploty; 6, 7 – kyvety; 8 – diferenční termosenzor; 9, 10 – topná tělíska vyrovnávajícího příkonu; 11 – plášť; 12 – blok vyhodnocení a odezvy na signál termosenzoru; 13 – datový soubor; 14 – zesilovač signálu; 15 – kompenzační můstek vyrovnávajícího příkonu; 16 – manostat; 17 – tlakový senzor; 18 – měřič tlaku. (b) Detail měřící jednotky kapilárních kyvet. 6, 7 – kapilární kyvety.

V kalorimetru je tepelný plášť ohříván a ochlazován konstantní rychlostí. Ohřev nebo ochlazování kyvet je přitom zajišťován tepelným tokem přes přírodní trubičky, které jsou s pláštěm v kontaktu. Teplota pláště je kontrolována počítačem. Obvod měřící teplotu porovnává referenční napětí s napětím na platinovém teploměru, který je uvnitř tepelného pláště. Po zjištění rozdílu počítač nastaví napětí na ohřívací a ochlazovací Peltierovy prvky. Tato zpětná odezva zajistí, že kyvety jsou ohřívány a ochlazovány konstantní rychlostí. Maximální rychlost změny teploty je 2 K min^{-1} a minimální 0 K min^{-1} , což odpovídá izotermnímu měření.

V tomto kalorimetru je použita polovodičová termoelektrická baterie jako diferenční termosenzor. Teplotní rozdíl mezi kyvetami vyvolává napěťový signál termosenzoru, který je dále zesílen. Po vyhodnocení signálu se zapíná jako odezva na tento signál jedno nebo druhé přídavné topné tělísko. Použitím vhodného dorovnávacího příkonu topného tělíska je udržován teplotní rozdíl v blízkosti nuly. Topná tělíska jsou připojena přímo ke kyvetám a ovládána zpětnou odezvou kontrolního algoritmu a kompenzačním můstkem. Velikost dorovnávacího příkonu je zaznamenávána počítačem.

Kyvety jsou vyrobeny z 24 karátového zlata ve tvaru navinuté kapilární trubičky a nedají se z kalorimetru vyjmout. Profil kapilárního labyrintu minimalizuje možnost vzniku teplotního gradientu uvnitř kyvety. Zlaté kyvety jsou doplněny platinovými přírodními trubičkami, pomocí nichž se kyvety plní. Trubičky jsou otevřeny do manostatu, který udržuje konstantní přetlak. Objem samotných kyvet je přibližně 300 μl , na úplné naplnění (i s přírodními trubičkami) je však potřeba 600 μl roztoku.

Přetlak v manostatu je nastaven polohou manuálně ovládaného pístu v tlakovacím válci, který umožňuje nastavení přetlaku 0 – 3 atm. Přetlak v kyvetovém prostoru je měřen pomocí piezoelektrického senzoru. Informace o nastaveném přetlaku, teplotě pláště a dorovnávacím příkonu je průběžně zobrazována na monitoru počítače. Mikrokalorimetr je úplně řízen pomocí firemního počítačového programu DSCRUN. Podle výrobce kalorimetr není citlivý na běžnou změnu pokojové teploty a vlhkosti.

6.2 Základní DSC experiment

Před měřením na diferenčním skenovacím kalorimetru je nutné důkladně odvzdušnit měřené roztoky. Pokud by byly do kyvet vloženy neodvzdušněné vzorky, mohly by se vlivem zvyšující se teploty vytvořit bublinky, které by znehodnotily celé měření. V záznamu z měření se bubliny projeví velkými fluktuacemi v dorovnávacím příkonu. K odvzdušňování se používá exsikátor, kde vývěvou snižujeme tlak. Odvzdušňování probíhá přibližně 25 minut za stálého míchání roztoku magnetickým míchadélkem ve skleněné nádobce při pokojové teplotě. Vliv odvzdušňování na koncentraci vzorku byl zkoumán již v rámci bakalářské práce (Ottová, 2007), kde bylo zjištěno, že relativní úbytek objemu vodného roztoku za jednu hodinu činí asi 5,5 %.

Během přípravné fáze před vlastním experimentem je vhodné si připravit kalorimetr provedením tzv. předběhu. Jde o jeden teplotní cyklus (jedno ohřívání a jedno ochlazování), během kterého se na stěnách kyvet vytvoří stabilní povrchová vrstva a při vlastním měření by již nemělo docházet k další interakci stěn kyvet s roztoky. Předběh probíhá pouze s rozpouštědlem, které je naplněno do obou kyvet. Rychlost ohřevu je možno nastavit vyšší než při samotném měření.

Poté co máme takto připravený kalorimetr i měřené roztoky, můžeme přistoupit k samotnému měření. Měření je rozděleno na dvě části. V první fázi experimentu jsou obě kyvety naplněny rozpouštědlem a změří se několik základních linií (baseline). V druhé fázi se odsaje ze vzorkové kyvety rozpouštědlo a kyveta se opět naplní, tentokrát však vzorkem a měří se teplotní charakteristika vzorku.

Roztoky se do kyvet plní pomocí pipety, na jejíž špičku je nutné nasadit kousek hadičky. Hadička vytváří spojku mezi přívody kyvety, na které se nasadí, a špičkou pipety. Při manipulaci s roztoky je nutné dát pozor, aby se nevytvořily v již odvzdušněném roztoku opět bublinky. Po naplnění kyvet roztokem se na jednu přívodní trubičku každé kyvety nasadí plastová čepička. Celý kyvetový prostor se uzavře víčkem s tlakovacím pístem a ručně se nastaví přetlak.

Před začátkem experimentu se v programu DSCRun zadávají parametry měření, tj. počet skenů, měřený teplotní interval, rychlost změny teploty a směr prvního skenu. Rychlost změny teploty se může lišit pro ohřívání a ochlazování.

6.3 Vymývání kalorimetru

Po každém experimentu je nutné důkladně vymýt kyvety kalorimetru, aby nedošlo k negativnímu ovlivnění dalšího experimentu. Kyvety jsou v kalorimetru umístěny fixně, proto se musí vymývat speciálními procedurami.

Po měření se běžně provádí tzv. klasická procedura mytí. Během této procedury se naplní obě kyvety kalorimetru 50% kyselinou mravenčí a spustí se jeden ohřev od 25 °C do 80 °C rychlostí 1 K min⁻¹. Poté co se kyvety opět ochladí na 25 °C je nutné je propláchnout 1 l deionizované vody. Tato procedura vymývání kalorimetru trvá celá asi 1,5 hodiny a je vhodné provést ji dvakrát. Pokud experimenty nenavazují hned za sebou, je vhodné provést jednu klasickou proceduru vymývání i před experimentem, aby byla zaručena čistota kyvet.

Pokud je potřeba vymýt kalorimetr důkladněji, je možno použít jinou proceduru. Vzorková kyveta se nejprve naplní roztokem pepsinu s koncentrací 1 mg ml⁻¹. Rozpouštědlem je 2% kyselina octová s 0,5 M chloridem sodným (NaCl). Referenční kyvetu naplníme pouze deionizovanou vodou, protože nepředpokládáme výrazné znečištění referenční kyvety. Takto naplněné kyvety kalorimetru necháme otevřené (ani nečepičkujeme, ani neuzavíráme víčkem s tlakovacím válcem) a zahřejeme na 30 °C a necháme na této teplotě alespoň 3 hodiny (lépe je déle). Poté propláchneme deionizovanou vodou (alespoň 100 ml). Druhým krokem je vložení 4 M roztoku hydroxidu sodného (NaOH) do obou kyvet a zahřátí na 90 °C, na této teplotě ohřev zastavíme a necháme celou noc. Po dosažení teploty 90 °C a ustálení hodnoty dorovnávacího příkonu se všechny čtyři přívody uzavřou plastovými čepičkami, aby přes noc nedošlo k odpaření vody. Druhý den se kyvety ochladí zpět na 25 °C, a pak se hydroxid sodný odsaje a kyvety se propláchnou 100 ml deionizované vody. Třetím bodem procedury je naplnění obou kyvet 50% kyselinou mravenčí. Ohřejeme na 75 °C a tam ohřev zastavíme na 20 minut. Po následovném zpětném ochlazení na teplotu 25 °C opět propláchneme 100 ml deionizované vody. Posledním krokem je propláchnutí 100 ml 2% SDS a na závěr necháme přes kyvety přečerpat 1 l deionizované vody. Celá procedura zabere 2 dny.

6.4 Přípravné zpracování naměřených dat

Zpracování naměřených dat a získávání termodynamických charakteristik měřených vzorků se provádí fitem naměřených průběhů na odpovídající

termodynamický model. Než je možno naměřené hodnoty fitovat, je nutná počáteční příprava dat.

Kalorimetr během měření zaznamenává hodnotu teploty, vyrovnávacího příkonu a času v pravidelných časových intervalech (cca 6 s). Základním výstupem je tedy závislost dorovnávacího příkonu na teplotě. Z naměřených hodnot teplot a času byla pomocí programu Microcal, který byl vytvořen doc. RNDr. Jiřím Bokem, CSc. z FÚ UK na základě požadavků formulovaných v rámci předkládané práce, numericky vypočítána derivace teploty podle času pro každou zaznamenanou hodnotu teploty. Program počítá derivaci kvadratickým fitem z 25 bodů. Naměřené hodnoty teplotní závislosti vyrovnávacího příkonu jsou poté vyděleny vypočítanou derivací, čímž je získána veličina dQ/dT , pro kterou podle vzorce (4.5) platí vztah

$$\frac{dQ}{dT} = [V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} + (V_{vz}^{cell} - V^{vz}) \rho Cs] - V_{ref}^{cell} \rho Cs, \quad (6.1)$$

pro skeny se vzorkem. Pro základní linie pak z (4.6) dostáváme vztah

$$\frac{dQ_{rozp}}{dT} = (V_{vz}^{cell} - V_{ref}^{cell}) \rho Cs. \quad (6.2)$$

Program ještě převede hodnoty dQ/dT na jednotnou ekvidistantní teplotní stupnici s krokem 0,1 °C.

Protože základní linie při opakovaném měření trochu „plavou“, snažili jsme se používat linie naměřené těsně před vložením vzorku. To lze jednoduše udělat v případě ohřevu, ale poslední základní linie pro ochlazování není z důvodu vkládání vzorku úplná. Proto byl zvolen následující postup. Byl určen průměr základních linií z předcházejících skenů a lineární funkcí aproximována jeho odchylka od neporušené části poslední linie. Tato odchylka byla pak k průměrnému průběhu přičtena v celém teplotním intervalu a tím co nejlépe aproximován průběh základní linie posledního skenu pro ochlazování.

Tyto základní linie byly přímo odečteny od skenů se vzorkem. Podle (6.1) a (6.2) tak dostáváme veličinu

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} = V_{vz}^{cell} c^{vz} C_p^{vz} - V^{vz} \rho Cs, \quad (6.3)$$

kde člen $V^{vz} \rho Cs$ většinou není znám, ale při dalším zpracování je možno předpokládat jeho nepříliš výraznou (lineární) závislost na teplotě.

Na závěr celého předzpracování dat se omezí teplotní interval a to kvůli přechodovým oblastem, které se nacházejí vždy na začátku skenu a jsou způsobeny přechodem z ustáleného stavu o neměnné teplotě do stavu, kdy se teplota plynule mění konstantní rychlostí.

6.5 Termodynamické modely: dvoustavový model

Při fitování DSC křivek tepelně indukovaného rozpadu duplexů nukleových kyselin se nejčastěji uvažuje jednoduchý dvoustavový model, který předpokládá, že ve vzorku se nacházejí buď komplexy, nebo volná vlákna. Jedná se tedy o přechod bez mezistavu. Rozpad komplexu je spojen se změnami termodynamických veličin, tedy se zvýšením entalpie i entropie. Obvykle se udávají změny termodynamických veličin spojené s vytvořením komplexu, tedy jako $\Delta H < 0$ a $\Delta S < 0$.

Komplex ze dvou různých oligonukleotidů

Duplexy jsou tvořeny ze dvou druhů vláken, jejichž sekvence jsou vzájemně komplementární. Měřený vzorek je vytvořen jako směsný roztok s poměrem koncentrací obou typů vláken 1:1.

Při zvyšování teploty se obecně mění koncentrace duplexů c^{du} a současně i volných vláken c^{ss} (označuje koncentraci jednoho druhu volných vláken) v roztoku; jejich souvislost můžeme vyjádřit rovnicí:

$$c^{\text{ss}} = c^{\text{vz}} - c^{\text{du}}, \quad (6.4)$$

kde c^{vz} je koncentrace roztoku vzorku vyjádřená v koncentraci jednoho vlákna (současně je to při daném stechiometrickém poměru maximální dosažitelná koncentrace duplexů).

Pro duplexy vytvořené ze dvou různých vláken můžeme vztah (6.3) přepsat do tvaru:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{\text{rozp}}}{dT} = V_{\text{vz}}^{\text{cell}} \left[c^{\text{du}} C_p^{\text{du}} + c^{\text{ss}} (C_p^{\text{ss1}} + C_p^{\text{ss2}}) + \Delta H \frac{dc^{\text{du}}}{dT} \right] - V^{\text{vz}} \rho C_s, \quad (6.5)$$

kde C_p^{du} , C_p^{ss1} , C_p^{ss2} jsou po řadě molární tepelné kapacity duplexu, jednoho a druhého typu volných vláken. Při fitování se předpokládá lineární závislost všech těchto molárních tepelných kapacit na teplotě.

Rovnovážnou konstantu (definovanou vztahem 1.2a) lze vyjádřit jako poměr koncentrací duplexu a součinu koncentrací volných vláken. Z předpokladu stechiometrického poměru 1:1 a vztahu (6.4) dostáváme:

$$K(T) = \frac{c^{\text{du}}}{c^{\text{ss1}} c^{\text{ss2}}} = \frac{c^{\text{du}}}{(c^{\text{vz}} - c^{\text{du}})^2}. \quad (6.6)$$

Z rovnice (6.6) je možno získat vztah pro výpočet molární koncentrace duplexů:

$$c^{\text{du}} = c^{\text{vz}} - \frac{-1 + \sqrt{1 + 4Kc^{\text{vz}}}}{2K}. \quad (6.7)$$

Rovnovážná konstanta se pak vyjádří z Van't Hoffovy rovnice pro dvoustavový model:

$$K(T) = \frac{1}{c^{\text{H}_2\text{O}}} \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right), \quad (6.8)$$

kde $c^{\text{H}_2\text{O}}$ je molární koncentrace vody ($c^{\text{H}_2\text{O}} = 55,5 \text{ M}$).

S použitím vztahů (6.7) a (6.8) lze určit derivaci koncentrace duplexů podle teploty:

$$\frac{dc^{\text{du}}}{dT} = -\frac{-1 - 2Kc^{\text{vz}} + \sqrt{1 + 4Kc^{\text{vz}}}}{2K\sqrt{1 + 4Kc^{\text{vz}}}} \frac{\Delta H}{RT^2}. \quad (6.9)$$

Naměřená data se fitují pomocí rovnice:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{\text{rozp}}}{dT} = (A_0 + A_1 T) c^{\text{du}} + (B_0 + B_1 T) (c^{\text{vz}} - c^{\text{du}}) + V_{\text{vz}}^{\text{cell}} \Delta H \frac{dc^{\text{du}}}{dT}, \quad (6.10)$$

kde první dva členy na pravé straně fitují pozadí a třetí člen odpovídá DSC pásu v oblasti přechodu. Fit má šest volných parametrů (A_0 , A_1 , B_0 , B_1 , ΔS , ΔH).

Komplex ze dvou stejných auto-komplementárních vláken

Pro auto-komplementární vlákna je možno použít stejný model, rovnice se však musí adekvátně upravit. Měřený vzorek obsahuje pouze jeden typ vláken. Při zvyšování teploty se mění koncentrace duplexů a volných vláken podle vztahu:

$$c^{ss} = c^{vz} - 2c^{du}, \quad (6.11)$$

v tomto případě je c^{vz} udávající koncentraci jednoho typu oligonukleotidů současně celkovou koncentrací oligonukleotidů ve vzorku.

Vztah (6.5) přejde na vztah:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} = V_{vz}^{cell} \left[c^{du} C_p^{du} + c^{ss} C_p^{ss} + \Delta H \frac{dc^{du}}{dT} \right] - V^{vz} \rho C_s. \quad (6.12)$$

Rovnovážnou konstantu danou vztahem (1.2b) vyjádříme jako poměr duplexů a volných vláken vztahem:

$$K(T) = \frac{c^{du}}{(c^{ss})^2} = \frac{c^{du}}{(c^{vz} - 2c^{du})^2}. \quad (6.13)$$

Z rovnice (6.13) lze získat vztah pro výpočet molární koncentrace duplexů, výsledný vztah je:

$$c^{du} = \frac{c^{vz}}{2} - \frac{-1 + \sqrt{1 + 8Kc^{vz}}}{8K}. \quad (6.14)$$

Van't Hoffova rovnice má pro oba typy vláken stejný tvar a tedy rovnice (6.8) platí i pro auto-komplementární vlákna.

Z rovnic (6.8) a (6.14) se tedy vypočítá derivace molární koncentrace duplexů podle teploty:

$$\frac{dc^{du}}{dT} = - \frac{-1 - 4Kc^{vz} + \sqrt{1 + 8Kc^{vz}}}{8K\sqrt{1 + 8Kc^{vz}}} \frac{\Delta H}{RT^2}. \quad (6.15)$$

Naměřená data se fitují pomocí rovnice:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} = (A_0 + A_1 T) c^{du} + (B_0 + B_1 T) (c^{vz} - 2c^{du}) + V_{vz}^{cell} \Delta H \frac{dc^{du}}{dT}. \quad (6.16)$$

Jednomolekulární přechody (vlásenky)

Jeden přechod

U oligonukleotidů může docházet i ke vzniku intramolekulárních komplexů. To je případ vzniku vlásenky, při kterých se spojí oba konce jednoho vlákna (pokud jsou na nich vzájemně komplementární sekvence) a vytvoří stonek, na jehož konci zůstane nespárovaná smyčka.

Při zvyšování teploty se mění molární koncentrace uzavřených (c^{cl}) a otevřených (c^{op}) vlásenek podle vztahu:

$$c^{op} = c^{vz} - c^{cl}, \quad (6.17)$$

koncentrace vzorku c^{vz} se opět udává jako koncentrace vláken.

Vztah (6.5) má pro případ vlásenek tvar:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} = V_{vz}^{cell} \left[c^{cl} C_p^{cl} + c^{op} C_p^{op} + \Delta H \frac{dc^{cl}}{dT} \right] - V^{vz} \rho C_s. \quad (6.18)$$

Rovnovážná konstanta vyjadřuje poměr uzavřených a otevřených vlásenek:

$$K(T) = \frac{c^{\text{cl}}}{c^{\text{op}}} = \frac{c^{\text{cl}}}{c^{\text{vz}} - c^{\text{cl}}}. \quad (6.19)$$

Odtud:

$$c^{\text{cl}} = \frac{Kc^{\text{vz}}}{1 + K}. \quad (6.20)$$

V tomto případě (v případě jednomolekulární reakce) je rovnovážná konstanta bezrozměrná veličina a Van't Hoffova rovnice bude mít tvar:

$$K(T) = \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right). \quad (6.21)$$

Z rovnic (6.20) a (6.21) vyjádříme derivaci koncentrace uzavřených vlásenek podle teploty:

$$\frac{dc^{\text{cl}}}{dT} = \frac{Kc^{\text{vz}}}{(1 + K)^2} \frac{\Delta H}{RT^2}. \quad (6.22)$$

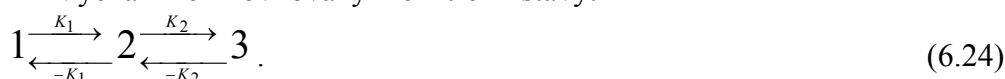
Základní rovnice, pomocí níž se fitují naměřená data zůstává ve stejném tvaru jako (6.10) (pouze c^{du} nahradíme c^{cl}):

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{\text{rozp}}}{dT} = (A_0 + A_1T)c^{\text{cl}} + (B_0 + B_1T)(c^{\text{vz}} - c^{\text{cl}}) + V_{\text{vz}}^{\text{cell}} \Delta H \frac{dc^{\text{cl}}}{dT}. \quad (6.23)$$

Dva přechody

Naše měření ukázala, že vlásenky mohou mít dva teplotně indukované přechody. První (nízkoteplotní) odpovídá zřejmě rozvolnění geometrie smyčky a druhý (vysokoteplotní) odpovídá rozpadu vlásenky, a tedy rozpletení stonku. Pokud se v DSC křivkách objeví dvě oblasti přechodu, je na jejich fitování potřeba použít speciální rovnice.

Vycházíme z rovnováhy mezi třemi stavy:



Vztah (6.5) se pro tento případ prepíše do tvaru:

$$\frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{\text{rozp}}}{dT} = V_{\text{vz}}^{\text{cell}} \left[c_1 C_p^1 + c_2 C_p^2 + c_3 C_p^3 + \Delta H_1 \frac{dc_1}{dT} + \Delta H_2 \frac{d(c_2 + c_1)}{dT} \right] - V^{\text{vz}} \rho C_s. \quad (6.25)$$

Koncentrační poměry mezi oběma stavy pak popisují dvě rovnovážné konstanty:

$$K_1(T) = \frac{c_1}{c_2}. \quad (6.26)$$

$$K_2(T) = \frac{c_2}{c_3}. \quad (6.27)$$

Z těchto dvou vztahů vyjádříme jednotlivé koncentrace:

$$c_1 = \frac{K_1 K_2 c^{\text{vz}}}{1 + K_2 + K_1 K_2}; \quad (6.28)$$

$$c_2 = \frac{K_2 c^{vz}}{1 + K_2 + K_1 K_2}; \quad (6.29)$$

$$c_3 = \frac{c^{vz}}{1 + K_2 + K_1 K_2}. \quad (6.30)$$

Pro rovnovážné konstanty K_1 a K_2 platí stejné vztahy jako pro rovnovážnou konstantu v případě jednoho přechodu u vlásenek (viz vztah 6.21):

$$K_i(T) = \exp\left(-\frac{\Delta H_i - T\Delta S_i}{RT}\right), i = 1, 2. \quad (6.31)$$

Z rovnic (6.28), (6.29) a (6.31) se odvodí vztah pro derivaci koncentrací c_1 a c_2 podle teploty:

$$\frac{dc_1}{dT} = \frac{K_1 K_2 c^{vz}}{(1 + K_2 + K_1 K_2)^2} \frac{\Delta H_1(1 + K_2) + \Delta H_2}{RT^2}, \quad (6.32)$$

$$\frac{dc_2}{dT} = \frac{K_2 c^{vz}}{(1 + K_2 + K_1 K_2)^2} \frac{-\Delta H_1 K_1 K_2 + \Delta H_2}{RT^2}. \quad (6.33)$$

DSC křivky dvou teplotně indukovaných přechodů se potom fitují pomocí rovnice:

$$\begin{aligned} \frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} = (A_0 + A_1 T)c_1 + (B_0 + B_1 T)c_2 + (D_0 + D_1 T)c_3 + \\ + V_{vz}^{cell} \Delta H_1 \frac{dc_1}{dT} + V_{vz}^{cell} \Delta H_2 \frac{d(c_2 + c_1)}{dT} \end{aligned} \quad (6.34)$$

Určení změny entalpie přímou integrací

Jiným možným postupem pro určení ΔH je použití parametrů A_0 , A_1 , B_0 a B_1 získaných buď fitem na části DSC křivky mimo přechod, nebo z fitu podle příslušného termodynamického modelu sloužícího pak pouze jako první odhad. Tím získáme průběh pozadí DSC křivky:

$$\frac{dQ_{bas}}{dT} = (A_0 + A_1 T)c^{du} + (B_0 + B_1 T)(c^{vz} - c^{du}). \quad (6.35)$$

Takto získané pozadí je následně možné odečíst od předzpracovaných dat daných rovnicí (6.5) a získat tak tepelnou kapacitu přechodu (excess heat capacity):

$$C_p^{excess} = \frac{dQ}{dT} - \frac{dQ_{rozp}}{dT} - \frac{dQ_{bas}}{dT}. \quad (6.36)$$

Z této křivky je možné určit změnu entalpie přímou integrací bez nutnosti použití konkrétního termodynamického modelu:

$$\Delta H = \frac{1}{V_{vz}^{cell} c^{vz}} \int C_p^{excess}(T) dT. \quad (6.37)$$

6.6 Termodynamické modely: McGhee – von Hippelův model

McGhee – von Hippelův model (McGhee, von Hippel, 1974) popisuje vazbu ligandu k polymeru a jeho použití se týká tvorby komplexů mezi deoxythymidinovými patnáctimery a polyadenylovou kyselinou. V případě aplikace dvoustavového modelu se na polymerní vlákno RNA pohlíží jako na soubor nezávislých segmentů o délce patnácti nukleotidů. Jinými slovy, jednostavový model nerozlišuje mezi tím, zda protějškem pro vazbu oligo-deoxythymidinů jsou oligo-adenosiny o stejné délce, nebo polymerní molekula o délce řádově tisíců nukleotidů. McGhee – von Hippelův model vystihuje to, že vazba ligandu, který k vazbě potřebuje určitý souvislý úsek polymeru, může způsobit větší úbytek vazebných míst na polymeru, pokud se naváže poblíž jiného ligandu v takové vzdálenosti, že mezi nimi už není dostatečně volný úsek pro vazbu ligandu třetího.

Pokud u vazby ligandů není kooperativita, tedy ligandy se vážou se stejnou pravděpodobností blízko sebe jako daleko od sebe, pak podle tohoto modelu platí vztah:

$$\frac{r}{L} = K(1 - nr) \left(\frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right)^{n-1}, \quad (6.38)$$

kde parametr r vystihuje relativní úspěšnost tvorby komplexu, L je koncentrace nenavázaných ligandů, K je rovnovážná asociační konstanta a n označuje počet monomerů polymeru potřebných k navázání jednoho ligandu (v našem případě $n = 15$). Parametr r je poměr mezi počtem navázaných ligandů a počtem monomerních jednotek polymeru, což při bákové stechiometrii 1:1 je:

$$r = \frac{c^{\text{du}}}{nc^{\text{vz}}}, \quad (6.39)$$

kde c^{du} je koncentrace duplexu a c^{vz} je koncentrace oligonukleotidů. Koncentraci nenavázaných ligandů L vyjádříme vztahem:

$$L = c^{\text{vz}} - c^{\text{du}} = c^{\text{vz}}(1 - nr). \quad (6.40)$$

Odlišnost zlomku na pravé straně vztahu (6.38) od jedničky je mírou, jak se tento model liší od jednoduchého dvoustavového modelu.

Pokud však není stejná pravděpodobnost, že se ligandy naváží blízko nebo daleko od sebe, může být do vztahu (6.38) zaveden další parametr tzv. kooperativita vazby ω :

$$\frac{r}{L} = K(1 - nr) \left(\frac{(2\omega - 1)(1 - nr) + r - R}{2(\omega - 1)(1 - nr)} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right)^2, \quad (6.41)$$

kde R je dáno vztahem:

$$R = \sqrt{[1 - (n+1)r]^2 + 4\omega r(1 - nr)}. \quad (6.42)$$

Kooperativita ω představuje rovnovážnou konstantu mezi vazbou ligandu do blízkosti jiného ligandu a vazbou ligandu do vzdálenějšího místa. Pokud ligandy upřednostňují vazbu blízko sebe, pak je $\omega > 1$, v tom případě označujeme kooperativitu jako pozitivní. Naproti tomu, pokud ligandy mají tendenci vázat se

daleko od sebe, pak je $\omega < 1$ a kooperativitu označujeme jako negativní. V případě, že je $\omega = 1$, pak žádná kooperativita není a vztah (6.41) přechází v (6.38). Samotný tvar rovnice (6.41), však není vhodný pro fitování, protože při $\omega = 1$ dostáváme u prvního zlomku neurčitost typu 0/0. Jednoduchou úpravou však můžeme převést tento vztah do vhodnějšího tvaru:

$$\frac{r}{L} = K(1 - nr) \left(\frac{2\omega(1 - nr)}{(2\omega - 1)(1 - nr) + r + R} \right)^{n-1} \left(\frac{1 - (n+1)r + R}{2(1 - nr)} \right)^2. \quad (6.43)$$

6.7 Termodynamické modely: hystereze

Pokud je rychlost změny teploty při experimentu příliš vysoká v porovnání s teplotní závislostí rychlostních konstant a v systému se tedy nestihne ustálovat rovnováha, je při dané teplotě koncentrace komplexů vyšší při ohřevu a nižší při ochlazování, než koncentrace rovnovážná. Pro ohřev a ochlazování dostáváme různé teplotní závislosti – tedy hysterezi. Hysterezní průběhy nelze vypočítat analyticky. Vyhodnocením experimentálně určených hysterezních průběhů se zabývali Rougee a kol. (1992). Jejich přístup jsme modifikovali pro měření DSC křivek a jednomolekulární přechod.

Vycházíme z rovnováhy mezi dvěma stavy:



kde k_a je teplotně závislá rychlostní konstanta při přechodu ze stavu 1 do stavu 2 a k_b je rychlostní konstanta opačného přechodu. Dále můžeme vyjádřit časový vývoj populací stavů 1 a 2 vztahy:

$$\frac{dc_1}{dt} = k_b c_2 - k_a c_1; \quad (6.45)$$

$$\frac{dc_2}{dt} = k_a c_1 - k_b c_2. \quad (6.46)$$

Systém se vždy snaží dostat do rovnováhy, časová závislost tohoto děje je při stále teplotě exponenciální. Poté co systém přejde do rovnováhy, musí být časová změna koncentrace nulová, a tedy platí:

$$\frac{k_b}{k_a} = \frac{c_1}{c_2} = K, \quad (6.47)$$

kde K je rovnovážná konstanta (vztažená k přechodu $2 \rightarrow 1$).

Zavedeme relativní výtěžek reakce vztahem:

$$\alpha = \frac{c_2}{c_1 + c_2} = \frac{c_1}{c_{vz}}, \quad (6.48)$$

kde c_{vz} je koncentrace vzorku. Se zavedeným relativním výtěžkem můžeme vztahy (6.46) a (6.47) přepsat do tvaru:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k_a - \alpha(k_a + k_b). \quad (6.49)$$

Jestliže se teplota mění rovnoměrně, a tedy platí vztah

$$T(t) = T_0 \pm \xi t, \quad (6.50)$$

kde horní znaménko platí pro ohřev a spodní pro ochlazování, pak lze teplotu brát jako jednoznačnou funkci času a platí:

$$\frac{d\alpha}{dt} = \frac{d\alpha}{dT} \frac{dT}{dt} = \frac{d\alpha}{dT} \xi. \quad (6.51)$$

Dosazením vztahu (6.51) do vztahu (6.49) získáme pro ohřívání vztah:

$$\frac{d\alpha_h}{dt} = \frac{k_a}{\xi} - \alpha_h \left(\frac{k_a}{\xi} + \frac{k_b}{\xi} \right), \quad (6.52)$$

pro ochlazování pak vztah:

$$\frac{d\alpha_c}{dt} = -\frac{k_a}{\xi} + \alpha_c \left(\frac{k_a}{\xi} + \frac{k_b}{\xi} \right). \quad (6.53)$$

Řešením těchto rovnic pak dostaneme vztahy:

$$k_a = \xi \frac{\alpha_c \frac{d\alpha_h}{dt} + \alpha_h \frac{d\alpha_c}{dt}}{\alpha_c - \alpha_h}; \quad k_b = \xi \frac{(1 - \alpha_c) \frac{d\alpha_h}{dt} + (1 - \alpha_h) \frac{d\alpha_c}{dt}}{\alpha_c - \alpha_h}. \quad (6.54)$$

Veličiny α_h , $\frac{d\alpha_h}{dt}$, α_c , $\frac{d\alpha_c}{dt}$ je však třeba určit z experimentu. To je v principu možné, pokud se nám pořadí izolovat pás DSC křivky a využít toho, že jeho tvar je úměrný časové změně výtěžku reakce.

Z termodynamiky jsou známy následující vztahy:

$$K(T) = \exp\left(-\frac{\Delta H - T\Delta S}{RT}\right) = \exp\left(-\frac{\Delta H}{RT}\right) \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right); \quad (6.55)$$

$$k_a = k_a^0 \exp\left(-\frac{\Delta E - \Delta H}{RT}\right); \quad (6.56)$$

$$k_b = k_b^0 \exp\left(-\frac{\Delta E}{RT}\right), \quad (6.57)$$

kde ΔE je aktivační energie přechodu. Na základě těchto vztahů je možné ze směrnice časové závislosti logaritmu rychlostních konstant určit ΔH a ΔE , a z poměru amplitud jejich exponenciální závislosti ΔS :

$$\frac{k_b^0}{k_a^0} = \exp\left(\frac{\Delta S}{R}\right); \quad (6.58)$$

VÝSLEDKOVÁ ČÁST

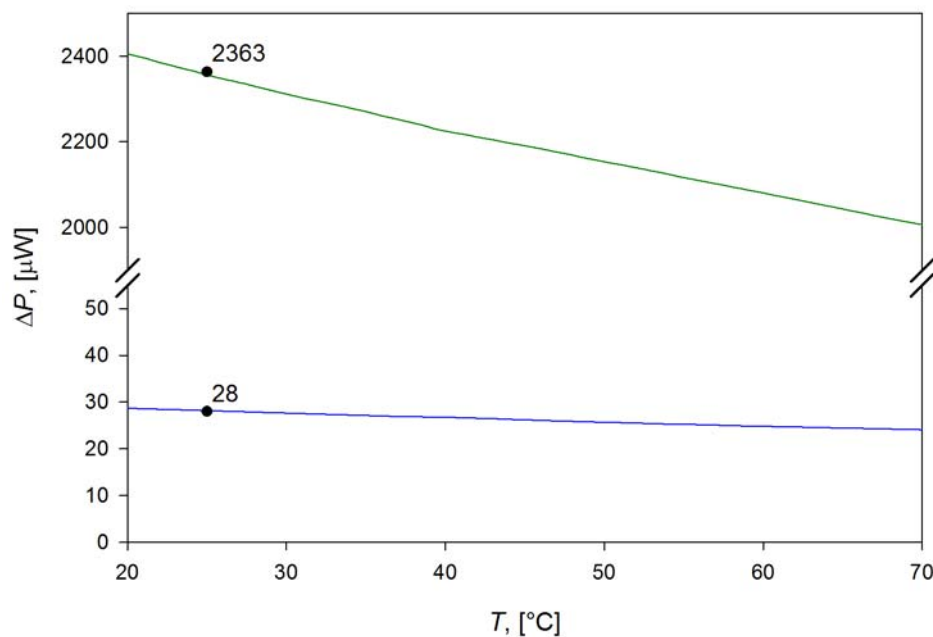
7 Ověřovací a testovací měření

Prvním úkolem diplomové práce bylo provedení série testovacích měření, která měla ověřit a stanovit absolutní a relativní přesnost měření diferenčního skenovacího kalorimetru a zjistit citlivost výsledků měření na volbu parametrů a postupu měření.

7.1 Kalibrace kalorimetru

Absolutní přesnost diferenčního skenovacího kalorimetru byla zjišťována v experimentech, při kterých byly použity dvě látky se známou tepelnou kapacitou. S ohledem na dostupné literární údaje o teplotní závislosti tepelné kapacity a přiblížení se podmínkám našich experimentů byly vybrány lehká (H_2O – Braibanti, 1996) a těžká (D_2O – Braibanti, 1996) voda.

Nejprve jsme naplnili obě kyvety kalorimetru lehkou vodou a nechali proběhnout několik měřících teplotních cyklů. Měřili jsme v teplotním intervalu od $6\text{ }^\circ\text{C}$ do $96\text{ }^\circ\text{C}$, rychlost změny teploty byla 1 K min^{-1} pro ohřívání i ochlazování. Ve druhém experimentu byla vzorková kyveta naplněna těžkou vodou a referenční kyvetu jsme naplnili lehkou vodou. Parametry experimentu jsme ponechali stejné, tedy teplotní interval $6\text{--}96\text{ }^\circ\text{C}$ a rychlost změny teploty 1 K min^{-1} pro ohřev i ochlazování. Na Obrázku 7.1 jsou zobrazeny první skeny z obou experimentů.



Obrázek 7.1: Určení absolutní tepelné kapacity. Modrá křivka je první sken z experimentu s H_2O (obě kyvety: H_2O), zelená křivka první sken z experimentu s D_2O (referenční kyveta: H_2O ; vzorková kyveta: D_2O). Parametry měření byly u obou měření shodné (rychlost změny: 1 K min^{-1} ; teplotní interval $6\text{--}96\text{ }^\circ\text{C}$).

Teplo potřebné k ohřátí kapaliny lze vypočítat podle vzorce:

$$Q = c_p \rho V \Delta T, \quad (7.1)$$

kde c_p měrná tepelná kapacita kapaliny, ρ je hustota kapaliny, V je ohříváný objem kapaliny a ΔT je změna teploty kapaliny. Dále lze vypočítat tepelný tok podle vztahu:

$$\Phi = \frac{Q}{\Delta t}, \quad (7.2)$$

kde Δt je čas potřebný k ohřevu o ΔT .

Měrná tepelná kapacita c_p i hustota ρ jsou teplotně závislé veličiny. Tabelovaná hodnota měrné tepelné kapacity při teplotě 25 °C je 4,179 6 J g⁻¹ K⁻¹ pro H₂O (Braibanti, 1996) a 4,211 J g⁻¹ K⁻¹ pro D₂O (Braibanti, 1996). Tabelované hodnoty hustoty při 25 °C jsou 997,048 kg m⁻³ pro H₂O a 1 104,4 kg m⁻³ pro D₂O (Lide a Frederikse, 1993). Spočítali jsme tepelné toky pro vodu i těžkou vodu a rozdíl těchto hodnot:

$$\Delta P_{\text{teorie}} = \Phi_{\text{D}_2\text{O}} - \Phi_{\text{H}_2\text{O}}. \quad (7.3)$$

Vypočítaný rozdíl tepelných toků by měl odpovídat rozdílu experimentálně zjištěných hodnot dorovnávacích příkonů:

$$\Delta P_{\text{experiment}} = \Delta P_{\text{D}_2\text{O}} - \Delta P_{\text{H}_2\text{O}}. \quad (7.4)$$

Hodnotu získanou výpočtem jsme porovnali s hodnotou zjištěnou z experimentů. V Tabulce 7.1 jsou uvedeny všechny vypočítané a naměřené hodnoty. Zjištěný rozdíl mezi hodnotami je 3 % z tabulkové hodnoty. Pokud vyjdeme z předpokladu, že se v tomto rozdílu nepromítají nepřesnosti literárních údajů, lze dojít k závěru, že měření kalorimetru má absolutní chybu 75 μW při rozdílu vyrovnávacích příkonů 2,3 mW. Tuto chybu lze zčásti přičíst chybě měřidla vyrovnávacího příkonu a zčásti nevyrovnanosti tepelných toků mezi základním termoregulačním prvkem a měřicími kyvetami. Můžeme tedy předpokládat, že při menším rozdílu tepelných kapacit měřicí a referenční kyvety (při našich experimentech s nukleovými kyselinami se vyrovnávací příkony pohybují v hodnotách do ± 100 μW) se relativní chyba měřidla nebude zvětšovat.

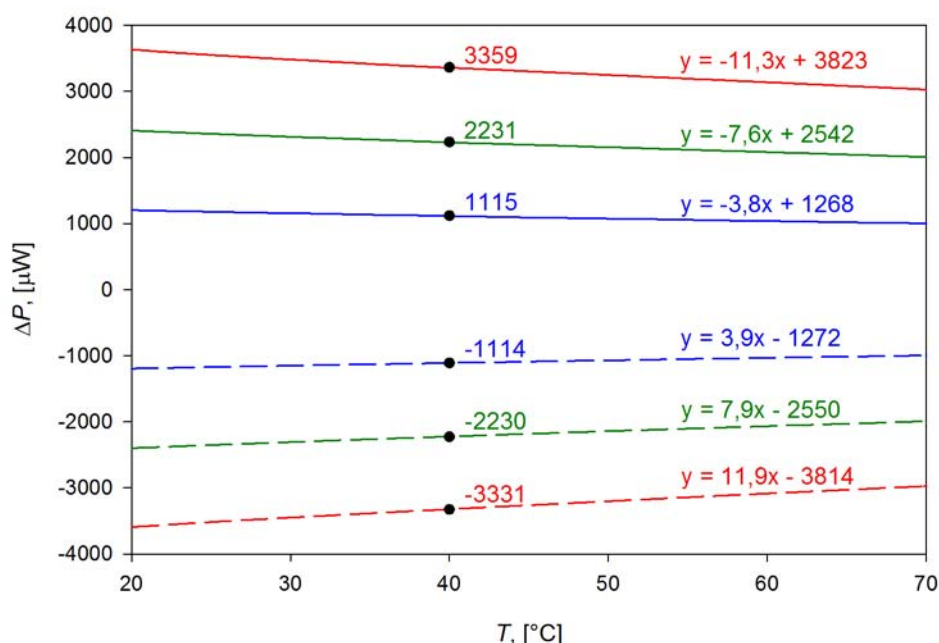
Tabulka 7.1: Vypočítané a experimentální hodnoty dorovnávacího příkonu při testovacím měření přesnosti kalorimetru.

	H ₂ O	D ₂ O
Φ [μW]	20 766	23 176
ΔP [μW]	28	2 363
$\Delta P_{\text{teoret.}}$ [μW]		2 410
$\Delta P_{\text{experiment}}$ [μW]		2 335

7.2 Vliv rychlosti změny teploty

Provedli jsme srovnávací měření při různých rychlostech změn teploty, abychom zjistili, zda se při změně rychlosti změní směrnice a absolutní hodnota dorovnávacího příkonu a zda jsou tyto rozdíly úměrné nastavené rychlosti teplotní změny.

Experimenty byly prováděny s těžkou vodou (referenční kyveta: H₂O; vzorková kyveta: D₂O), v teplotním intervalu 6 – 96 °C při rychlostech změny teploty: 1,5 K min⁻¹, 1 K min⁻¹ a 0,5 K min⁻¹ (viz Obrázek 7.2).



Obrázek 7.2: DSC záznam pro různé rychlosti změny teploty. Vzorková kyveta: H₂O; referenční kyveta: D₂O, teplotní interval 25 – 65 °C; rychlost změny teploty (ohřívání i ochlazování): 1,5 K min⁻¹ (červená), 1,0 K min⁻¹ (zelená) a 0,5 K min⁻¹ (modrá). V grafu jsou uvedeny hodnoty dorovnávacího příkonu při 40 °C a rovnice přímek, kterými lze průběhy dorovnávacího příkonu aproximovat.

Pro všechny rychlosti jsou průběhy téměř lineární, takže je lze charakterizovat hodnotou při jedné referenční teplotě (zvoleno 40°C) a směrnicí. Při přepočtu na množství tepla potřebného na jednotkovou změnu teploty (viz Tabulka 7.2) se ukazuje, že naměřené průběhy si vzájemně velmi dobře odpovídají – největší rozdíly nepřesahují 0,9 % z hodnoty parametrů.

Tabulka 7.2: Parametry průběhu dorovnávacího příkonu při testovacím měření vlivu rychlosti teplotní změny na výsledek měření. Měření D₂O vůči H₂O.

dT/dt [deg min ⁻¹]	$\Delta P(40\text{ }^\circ\text{C})$ [μW]	$d(\Delta P)/dT$ [μW deg ⁻¹]	$\Delta Q/\Delta T(40\text{ }^\circ\text{C})$ [μJ deg ⁻¹]	$d(\Delta Q/\Delta T)/dT$ [μJ deg ⁻²]
0,5	1 115	-3,8	9,29	-0,032
1,0	2 231	-7,6	9,30	-0,032
1,5	3 359	-11,3	9,33	-0,031
-0,5	-1 114	3,9	9,28	-0,033
-1,0	-2 230	7,9	9,29	-0,033
-1,5	-3 331	11,9	9,25	-0,033

Lze uvažovat o dvou příčinách zjištěných drobných rozdílů. První příčinou by mohla být skutečnost, že část vzorků se nachází v oblasti přívodních trubiček do měřících kyvet, jejichž otevřený konec je po celou dobu měření na pokojové teplotě. Může tedy difúzí docházet k migraci molekul mezi měřící kyvetou a konci přívodních trubiček, což by vedlo k vedlejšímu energetickému toku, jehož velikost by závisela na rozdílu tepelných kapacit a difúzních pohyblivostí. Tento proces by měl mít opačný vliv na měření při ohřevu a při ochlazování vzorku a měl by se zvyrazňovat se snižující se rychlostí teplotní změny, protože tím by se zvyšoval počet přemístěných molekul na jednotkovou změnu teploty. Naše výsledky však

ukazují právě opačnou tendenci, tedy zvětšování rozdílů mezi měřeními při ohřevu a při ochlazování se zvyšováním rychlosti teplotních změn.

Druhou možnou příčinou je setrvačnost systému. To znamená, že naměřená hodnota vyrovnávacího příkonu neodpovídá zcela přesně aktuální teplotě, ale teplotě, která byla nastavena o určitý časový okamžik dříve. V případě našeho měření, kdy hodnota vyrovnávacího příkonu klesá s rostoucí teplotou, to znamená, že při ohřívání by měla být naměřená hodnota $\Delta Q/\Delta T$ poněkud vyšší a při ochlazování naopak poněkud nižší; tento efekt by se měl zvýraznit při zvyšování rychlosti teplotních změn. Tento charakter variace hodnot $\Delta Q/\Delta T$ skutečně pozorujeme. Pomocí fitu (minimum součtu čtverců odchylek) sloupce $\Delta Q/\Delta T$ tabulky s uvážením rychlosti změn teploty a směrnice teplotní závislosti (1. a 5. sloupec tabulky) podle vztahu

$$\left(\frac{\Delta Q}{\Delta T}\right)_{\text{exp}} = \left(\frac{\Delta Q}{\Delta T}\right)_{\text{skut}} + \frac{d\left(\frac{\Delta Q}{\Delta T}\right)}{dT} \frac{dT}{dt} \Delta t \quad (7.5)$$

můžeme odhadnout velikost časového zpoždění údaje o hodnotě vyrovnávacího příkonu na $\Delta t = -42 \pm 10$ s.

7.3 Odsávání vzorku z přívodních trubiček

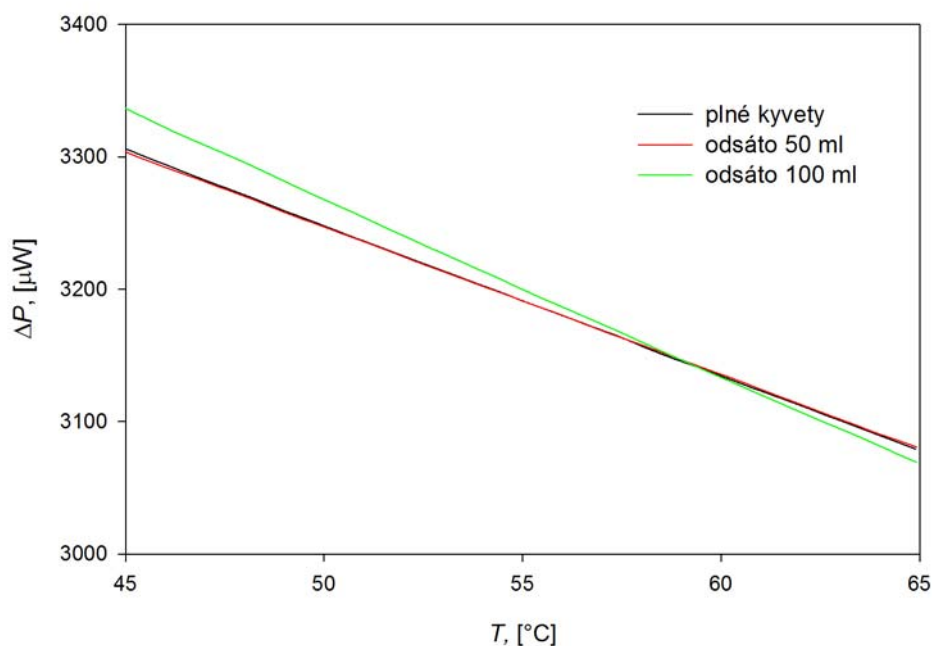
Některé experimenty prováděné na mikrokolorimetru ukázaly, že zřejmě dochází k interakci měřených vzorků nukleových kyselin s platinovými stěnami přívodních trubiček (Říhová, 2008). (Objem měřících zlatých kyvet je 300 μl , ale plnicí objem kyvet i s platinovými přívodními trubičkami je přibližně 490 μl .) Během měření tak dochází k úbytku vzorku v kyvetách adsorpcí na stěny přívodů a z toho důvodu k poklesu efektivní koncentrace vzorku v roztoku. Tento jev je zvláště výrazný při měření s polynukleotidy.

Rozhodli jsme se tedy vyzkoušet postup, při kterém se naplní pouze kyvety a přívodní trubičky zůstanou prázdné. Jaké množství je možno odsát, aniž by to mělo vliv na naměřená data, jsme zjišťovali v experimentu s postupným odsáváním definovaného malého množství. Po každém odsátí daného množství jsme naměřili jeden teplotní cyklus. Definované množství jsme z přívodních trubiček odsávali pomocí mikropipety Hamilton (25 μl). Vzhledem k tomu, že kyvety jsou kapilární, rozhodli jsme se postupně odsávat vždy stejné množství z obou přívodů, aby bylo zajištěno, že hladina je v obou přívodních trubičkách na stejné úrovni.

Nejprve jsme tedy naplnili obě kyvety obvyklým způsobem (referenční kyveta: H_2O ; vzorková kyveta: D_2O) a změřili jsme jeden teplotní cyklus. Teplotní interval jsme zvolili od 25 $^\circ\text{C}$ do 65 $^\circ\text{C}$ a rychlost změny (pro ohřívání i ochlazování) 1,5 K min^{-1} . Po naměření teplotního cyklu jsme opatrně odsáli z každé kyvety 50 μl (tedy z každé přívodní trubičky 25 μl). A opět jsme naměřili stejný teplotní cyklus. Celý tento proces jsme zopakovali 4krát (při čtvrtém odsávání jsme odsáli pouze 40 μl z každé kyvety), takže celkové odsáté množství bylo 190 μl z každé kyvety. Další odsávání nebylo možné, protože se již pomocí mikropipety nepodařilo nic nasát a při dalším odsávání bychom již odsávali roztok z měřících kyvet. Celý tento experiment jsme zopakovali několikrát, abychom vyloučili náhodnou chybu.

Z experimentů vyplývá, že je možno odsát 50 μl , aniž by to mělo nějaký vliv na měření. Další odsávání způsobí změnu tvaru a směrnice naměřených křivek. Ačkoliv v přívodních trubičkách je téměř 200 μl navíc (nad objem kyvet), lze odsát pouze čtvrtinu tohoto množství. Na Obrázku 7.3 jsou křivky pro ohřívání z jednoho z experimentů.

Úplné naplnění kyvet a následné odsátí 50 μl je jedinou možností, jak alespoň částečně omezit vliv přívodních trubiček. Naplnění kyvet menším objemem není možné, protože v takovém případě není jistota (ani zpětná kontrola) správného naplnění kapilárních kyvet, které mají tvar navinuté trubičky. Při odsávání je však nutné dávat pozor, aby při manipulaci s již odvzdušněným roztokem nevznikly v kyvetách bublinky.



Obrázek 7.3: DSC záznam – postupné odsávání. Vzorková kyveta: D_2O , referenční kyveta: H_2O ; teplotní interval 25 – 65 °C; rychlost změny teploty (ohřívání i ochlazování): 1,5 K min^{-1} .

7.4 Vliv pufru

Základní linie (jejich tvar a stabilita) jsou důležité pro celé měření a jeho následné vyhodnocení. V rámci provedených experimentů jsme testovali nejenom, jaký vliv má na výslednou stabilitu základních linií druh pufru a obsah solí v něm, ale také použitý měřicí postup. U měřicího postupu nás zajímalo, zda je nutné provádět před měřením předběh. Zkoumali jsme pufrы, které se běžně používají pro stabilizaci neutrálního pH u nukleových kyselin (fosfátový a kakodylátový pufr).

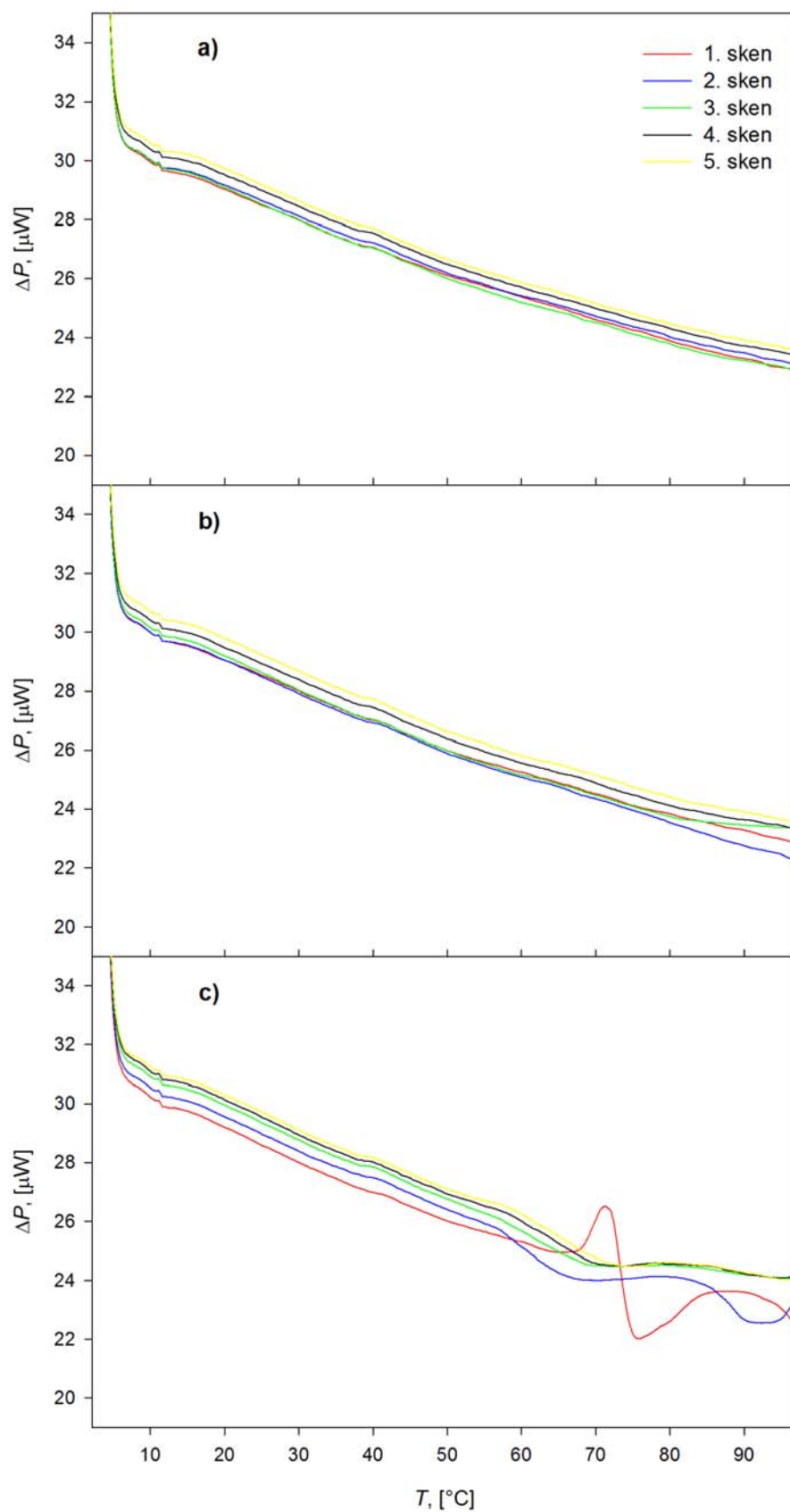
Pro měření jsme nejprve použili 25 mM fosfátový pufr (pH 7,0). Do pufru byl přidán chlorid sodný (NaCl) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 160 mM. Takto vzniklý pufr budeme dále označovat (PBNa). S tímto pufrem jsme provedli dvě měření, jedno s předběhem a druhé bez předběhu. Parametry experimentů byly: teplotní interval 2 – 97 °C a rychlost změny teploty 1 K min^{-1} .

Na Obrázku 7.4 jsou výsledky obou experimentů (ukazujeme pouze skeny pro ohřívání, protože při ochlazování se nestabilita skenů projevuje méně). Z obrázku vyplývá, že stabilnější jsou základní linie pro měření pufru PBNa s předběhem. Bez předběhu skeny více „plavou“, což je dobře patrné u vyšších teplot. Dokonce skeny mají i trochu odlišný tvar (viz 3. sken). Z těchto měření tedy vyplynulo, že pokud před vlastním měřením neprovedeme předběh, základní linie jsou trochu méně stabilní při opakovaných skenech a mohou i měnit tvar.

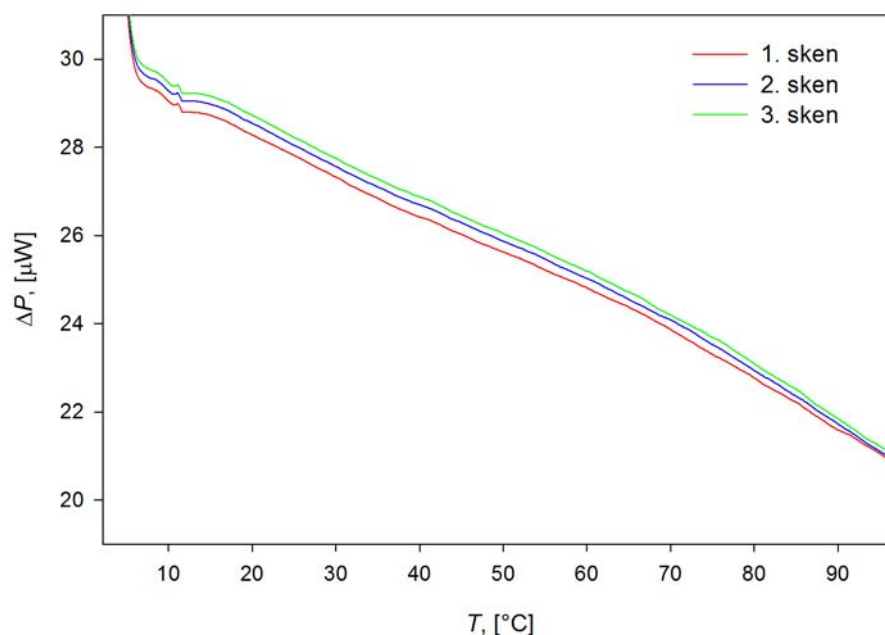
Dále jsme do pufru PBNa přidali chlorid hořečnatý (MgCl_2) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 5 mM – označení pufru PBNaMg. Provedli jsme měření (s předběhem), jehož parametry jsme ponechali stejné jako v předcházejících případech. Na Obrázku 7.4 je záznam z tohoto měření. Jak se ukázalo při tomto experimentu, tak pufr PBNaMg není bohužel pro kalorimetrická měření vůbec vhodný. Základní linie nejsou v oblasti vysokých teplot reprodukovatelné. Domníváme se, že vlivem přidání chloridu hořečnatého do vodného roztoku dochází k precipitaci. Z roztoku se vysráží v neutrálním pH nerozpustný hydroxid hořečnatý a vytvoří sraženinu, která způsobí zvlnění základních linií v oblasti vysokých teplot. Vzhledem k tomu, že při měření nukleových kyselin je často nutné přidávat do rozpouštědla dvojmocné ionty, hledali jsme jiný pufr, který by to umožňoval. Další možností byl kakodylátový pufr.

Měření kakodylátový pufr měl 20 mM koncentraci a pH 6,3. Do pufru jsme přidali chlorid sodný (NaCl) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 20 mM, dále pak chlorid draselný (KCl) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 140 mM, a nakonec také chlorid hořečnatý (MgCl_2) tak, aby jeho výsledná koncentrace byla 3 mM. Tento pufr budeme značit CacNaKMg. S tímto pufrem jsme provedli jeden experiment (s předběhem) se stejnými parametry experimentu jako v předcházejících případech (viz Obrázek 7.5). Základní linie jsou v tomto případě stabilní, proto pro měření, při kterých je potřeba přidat do rozpouštědla dvojmocné ionty, je možné použít kakodylátový pufr.

Na stabilitu základních linií má kromě předběhu vliv i řada dalších faktorů, kterými jsou například čistota kyvet, důkladné odvzdušnění a správné naplnění. Občas se první sken liší od ostatních (podobně jako se liší první sken u měření se vzorkem – viz část 7.5). Tato odlišnost je zřejmě způsobena mikrobublínkou, která se vytvoří u stěny přívodní trubičky a uvolní se během prvního skenu a následné skeny již nejsou bublinkou ovlivněny a jsou většinou stabilní.



Obrázek 7.4: Fosfátový pufr – skeny pro ohřev. a) PBNa s předběhem; b) PBNa bez předběhu; c) PBNaMg s předběhem. Barvy značí pořadí ohřevacích skenů.



Obrázek 7.5: Kakodylátový pufr (CaNaKMg) s předběhem. Barvy značí pořadí ohřivacích skenů.

7.5 Postup měření vzorku a vyhodnocení dat

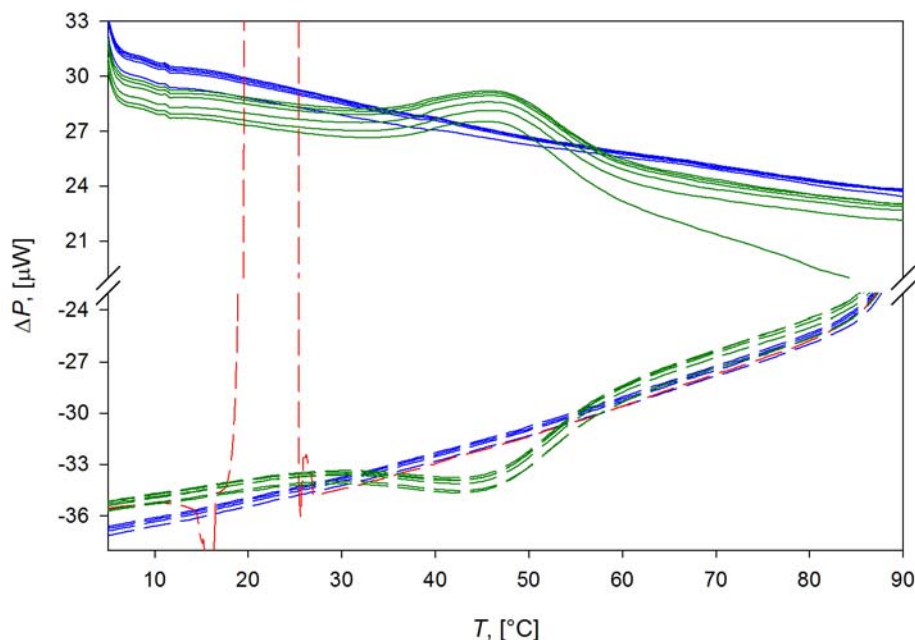
Pro experimenty, při nichž jsme testovali citlivost kalorimetru na měřicí postup, jsme zvolili vzorky nukleových kyselin s palindromickou sekvencí, konkrétně se jedná o DNA oktamery s bázevým složením 5' – CATC GATG – 3'. Zvolili jsme vlákna s palindromickou sekvencí, protože takováto vlákna jsou autokomplementární a vytvářejí duplex sami se sebou, čímž je zajištěno, že za nízkých teplot dojde ke komplexaci všech vláken (nejsou chyby způsobené nepřesností stechiometrického poměru jako v případě dvou různých partnerů).

Prověřovali jsme dva postupy měření. Koncentrace (125 μM ve vláknech), rozpouštědlo (PBNa-HW) i parametry měření (rychlost změny teploty 1 K min⁻¹; teplotní interval 2 – 97 °C; před měřením proveden jeden předběh) byly v obou případech totožné. Jediné, v čem se experimenty lišily, byl způsob vkládání vzorku do kyvety.

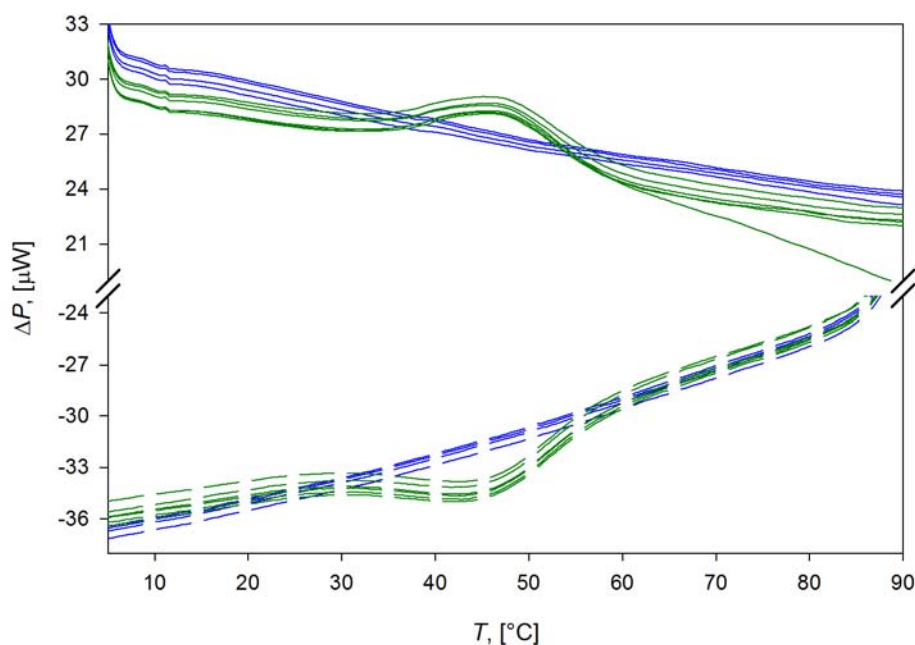
Při prvním měření jsme vzorek vložili během měření (tzv. „on the fly“ postup). Naplnili jsme obě kyvety fosfátovým pufrem a naměřili jsme základní linie. Poté jsme během jednoho ochlazovacího skenu (konkrétně 10. sken) při teplotě 30 °C odtlakovali a otevřeli kyvetový prostor. Z přívodu vzorkové kyvety jsme odstranili plastovou čepičku a odsáli pufr ze vzorkové kyvety. Následně jsme kyvetu opět naplnili, tentokrát však odvzdušněným vzorkem. Nasadili novou čepičku na jeden přívod kyvety, uzavřeli kyvetový prostor a opět nastavili přetlak 3 atm. Celý proces vložení vzorku do kyvety trvá přibližně 10 minut a v jeho průběhu kalorimetr stále měří.

Druhý experiment se skládal ze dvou oddělených etap. V prvním jsme naplnili obě kyvety rozpouštědlem, tedy fosfátovým pufrem a naměřili jsme několik teplotních cyklů, abychom získali základní linie. Po skončení tohoto experimentu a po ustálení teploty na 25 °C jsme odsáli rozpouštědlo ze vzorkové kyvety a bez vymývání vložili odvzdušněný vzorek. Poté, co jsme nasadili čepičku na jeden přívod a nastavili požadovaný přetlak 3 atm, jsme spustili druhý experiment.

Záznam z prvního experimentu je na Obrázku 7.6 a z obou měření druhého experimentu pak na Obrázku 7.7. Oba záznamy jsou na první pohled totožné. Ukazuje se, že zásah do měření v podobě odtlakování kyvetového prostoru odsátí jednoho roztoku a vložení jiného roztoku nemá na měření roztoků oligonukleotidů žádný zásadní vliv.



Obrázek 7.6: Záznam z měření palindromu CATC GATG (koncentrace: $125 \mu\text{M}$ ve vláknech). Rozpouštědlo: PBNa-HW; teplotní interval $2 - 97 \text{ }^\circ\text{C}$; rychlost změny teploty: 1 K min^{-1} ; vzorek vložen do kalorimetru „on the fly“; proveden předběh. Modře jsou na obrázku základní linie, zeleně jsou skeny se vzorkem a červeně je znázorněna základní linie, při které byl vložen vzorek (10. sken).

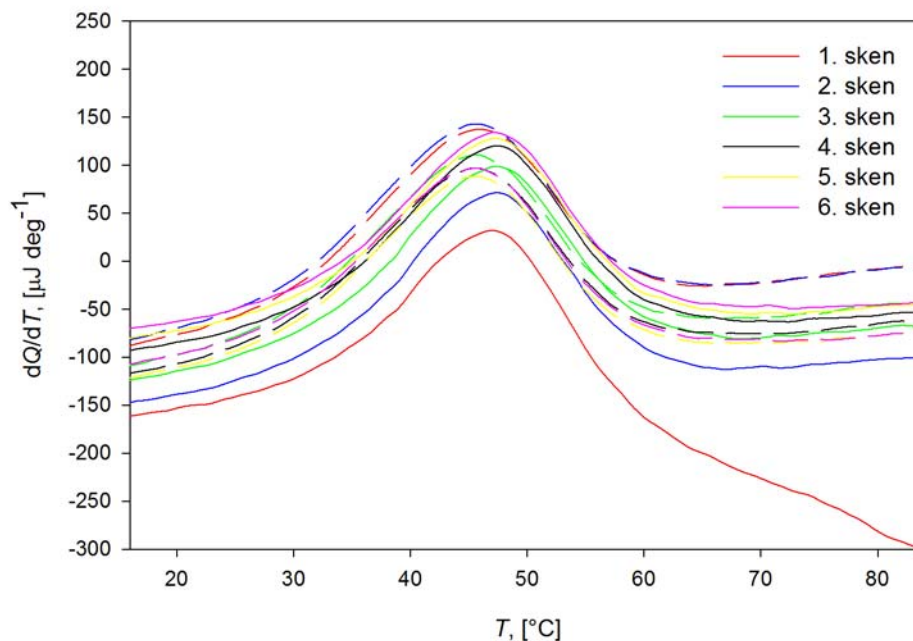


Obrázek 7.7: Záznam z postupných dvou měření. Modře je znázorněno měření pouze základních linií, zeleně pak měření, při kterém byl měřen vzorek s palindromatickou sekvencí CATC GATG ($125 \mu\text{M}$ ve vláknech). Rozpouštědlo: PBNa-HW; teplotní interval $2 - 97 \text{ }^\circ\text{C}$; rychlost změny teploty: 1 K min^{-1} ; před měřeními základních linií proveden předběh.

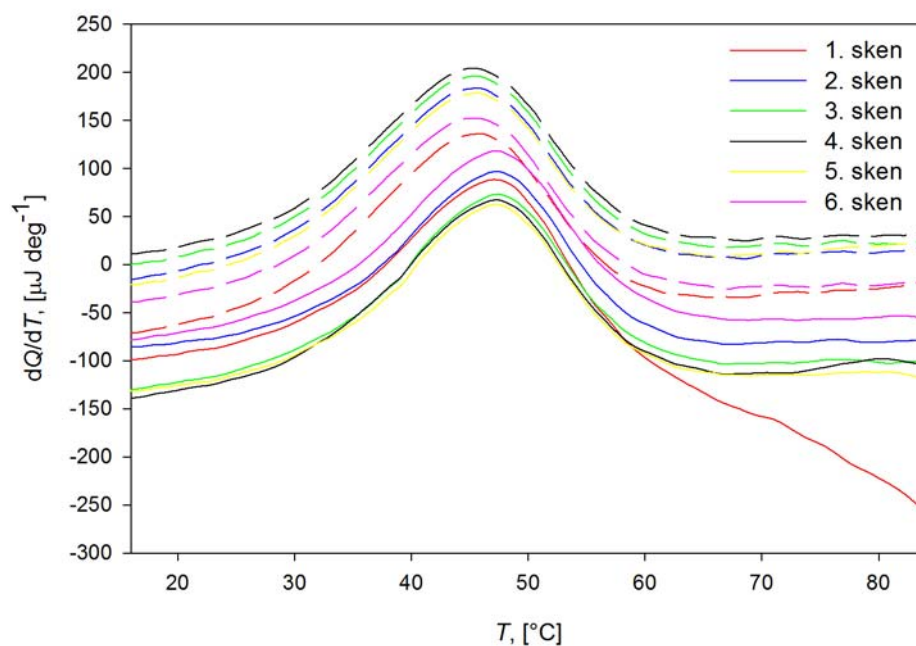
Takto naměřená data jsme nejprve předzpracovali (dělili jsme je derivací teploty podle času, odečetli jsme základní linii od skenů se vzorkem a zúžili teplotní interval tak, abychom se zbavili hran na začátku skenů). Předzpracovaná data jsou na Obrázcích 7.8 a 7.9. Pro oba experimenty platí, že v oblastech nízkých a vysokých teplot mají křivky lineární charakter. Uprostřed teplotního intervalu je patrný přechod (duplex – volná vlákna), v této oblasti dochází k nárůstu dorovnávacího příkonu. Všechny křivky jsou hladké a při opakovaných skenech se zachovává tvar křivky a společně s ním i poloha maxima. Rozdíl v poloze maxima pro skeny při ohřívání a ochlazování je přibližně $1,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, což je v souladu s odhadnutou setrvačností kalorimetru (viz část 7.2), podle které by při dané rychlosti teplotní změny měl být efektivní vzájemný posun teplotních škál při ohřevu a ochlazování $1,4 \pm 0,3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Naproti tomu jsou zde rozdíly mezi oběma experimenty ve stabilitě opakovaných skenů. Jednotlivé křivky získané z druhého experimentu více „plavou“, než data z prvního experimentu. Zatímco při prvním experimentu (vlození vzorku během měření) je rozdíl mezi nejvýše položeným skenem a nejnižše položeným skenem přibližně $100\text{ }\mu\text{J deg}^{-1}$ u druhého experimentu je tato odlehlost $150\text{ }\mu\text{J deg}^{-1}$. Pokud budeme porovnávat stabilitu opakovaných skenů při ohřevu a ochlazování, zjistíme, že při prvním experimentu více plavou skeny pro ohřívání, zatímco u druhého experimentu je tomu naopak.

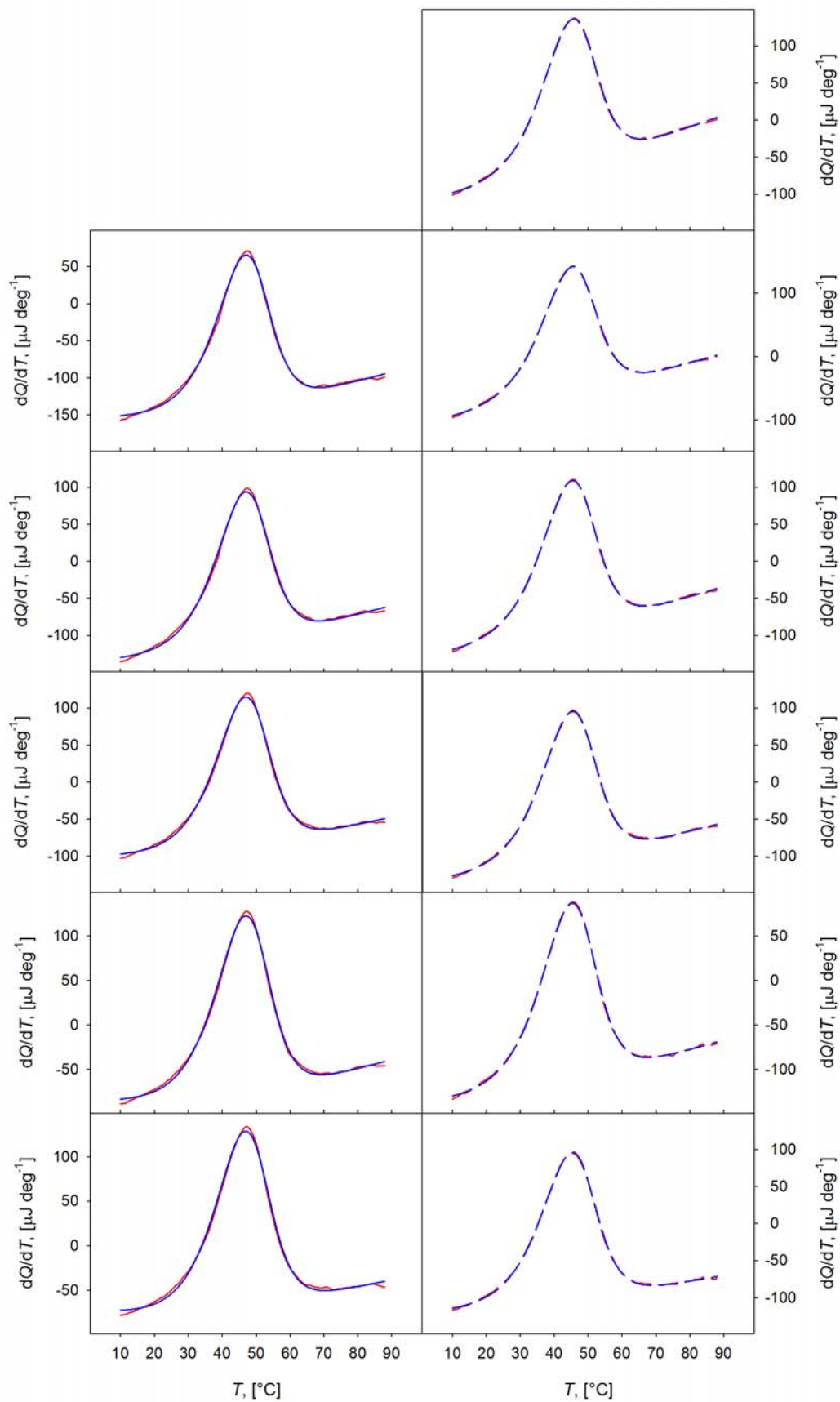
Dále je možné si všimnout, že v obou případech se první sken pro ohřívání výrazně liší od ostatních skenů. Tuto skutečnost zatím nedovedeme vysvětlit. Pravděpodobně může jít o vznik mikrobublinek v přívodní trubičce při plnění kyvet, které se během prvního skenu uvolní a následující skeny již neovlivňují. S jistotou však nelze říci, čím to je způsobeno. Proto jsme první skeny vyřadili z dalšího zpracování.



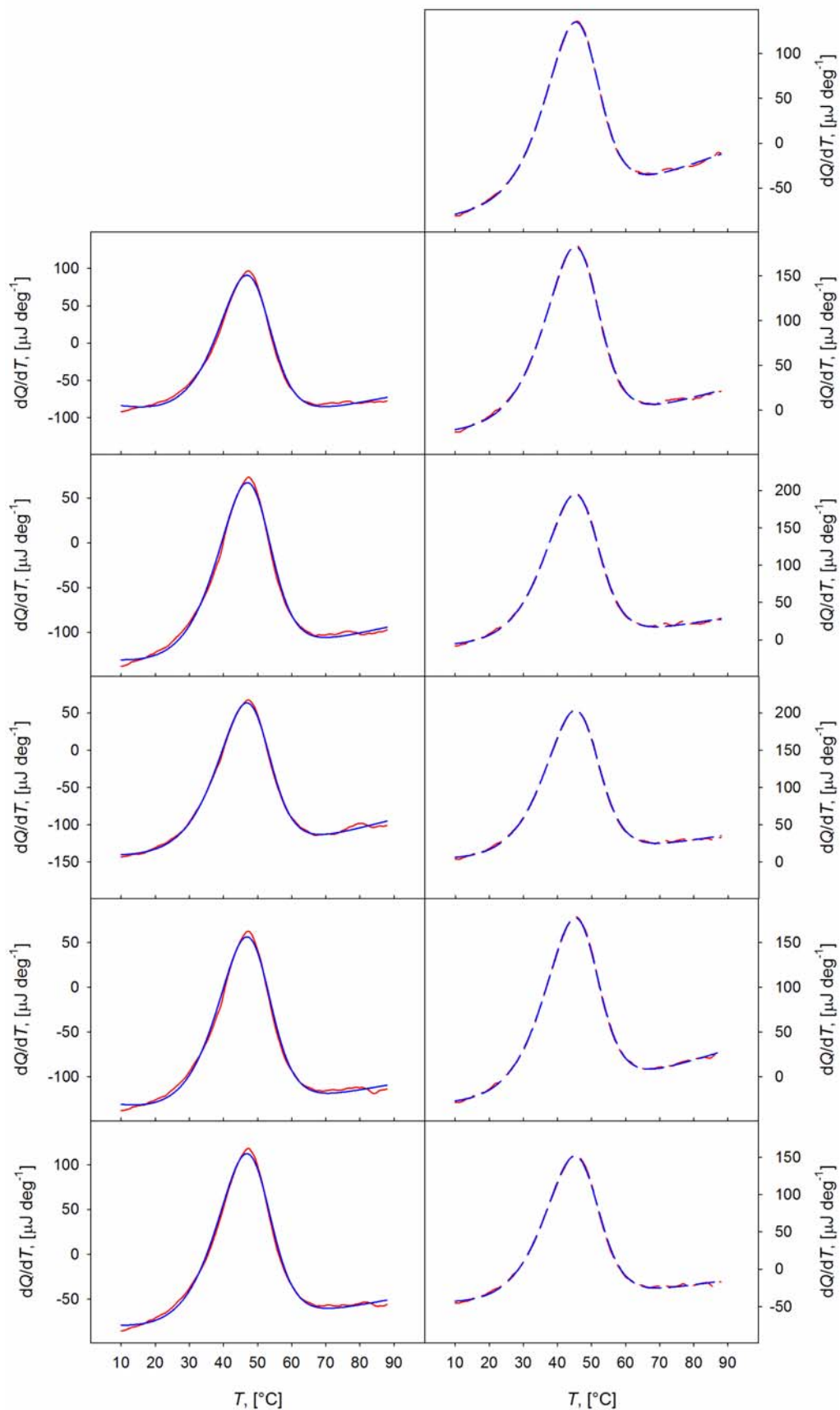
Obrázek 7.8: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 - 88 °C). Experiment s vložením vzorku do kalorimetru během měření. Vzorek: DNA (CATC GATG); koncentrace: 125 μM ve vláknech; rozpouštědlo: PBNa-HW. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



Obrázek 7.9: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 - 88 °C). Experiment s měřením vzorku v samostatném experimentu. Vzorek: DNA (CATC GATG); koncentrace: 125 μM ve vláknech; rozpouštědlo: PBNa-HW. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).

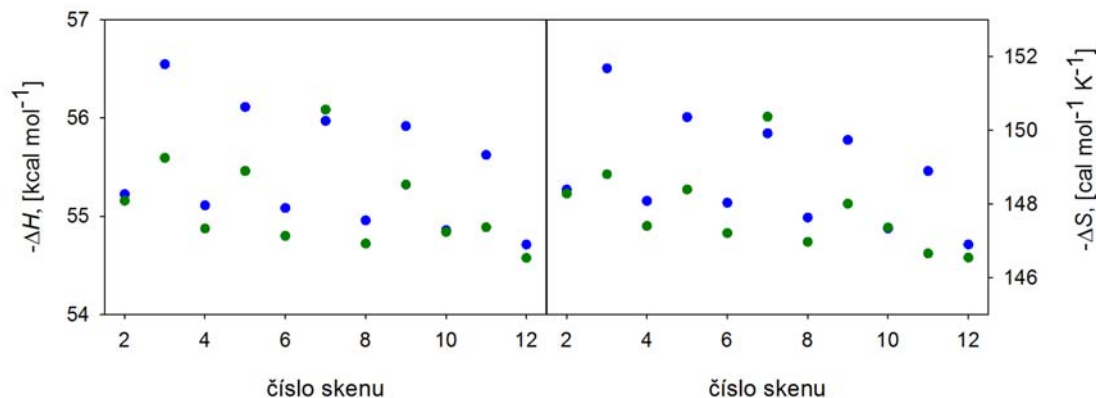


Obrázek 7.10: Fity jednotlivých skenů 1. experiment. Vlevo data pro ohřev a vpravo pro ochlazování. V každém obrázku je experimentální křivka (červeně) spolu s křivkou nafitovanou (modře).



Obrázek 7.11: Fity jednotlivých skenů 2. experiment. Vlevo data pro ohřev a vpravo pro ochlazování. V každém obrázku je experimentální křivka (červeně) spolu s křivkou nafitovanou (modře).

Termodynamické parametry jsme z předzpracovaných dat získali fitováním na dvoustavový model. Rovnice, pomocí nichž jsme data fitovali, jsou uvedeny v části 6.5. Zpracovávali jsme každý sken zvlášť (viz Obrázek 7.10 a 7.11) a získané termodynamické parametry v závislosti na pořadovém čísle skenu jsou vyneseny na Obrázku 7.12. Z Obrázků 7.10 a 7.11 je vidět dobrá shoda naměřených a nafitovaných dat, ale je možno si všimnout, že pro ochlazování fity souhlasí lépe než pro ohřívání, kde je patrná odchylka naměřených a nafitovaných dat v maximu. I přes tuto malou odchylku je možno považovat shodu za dostačující.



Obrázek 7.12: Závislost změny entalpie (vlevo) a entropie (vpravo) na čísle skenu pro vzorek DNA (sekvence: CATC GATG; koncentrace: 125 μM ve vláknech; rozpouštědlo: PBNa-HW). Číslo skenu udává průběžné pořadí skenu (lichá čísla: ohřívání; sudá čísla: ochlazování). Modře jsou termodynamické parametry získané ze skenů z prvního experimentu (vlození vzorku během měření), zeleně pak termodynamické parametry z druhého experimentu (měření vzorku v samostatném experimentu).

Z Obrázku 7.12 je patrné, že se vzrůstajícím číslem skenu klesají absolutní hodnoty změn termodynamických parametrů, tento trend je výraznější pro první experiment. U prvního experimentu je rovněž zřetelné, že tato přibližně lineární závislost je strmější pro termodynamické parametry získané z ohřívacích skenů, než ze skenů pro ochlazování. Dále si můžeme všimnout, že rozdíl v termodynamických parametrech pro skeny při ohřívání a ochlazování je v případě druhého experimentu menší (s výjimkou skenu 7).

Pokles (přibližně lineární) získaných termodynamických parametrů s rostoucím číslem skenu zřejmě souvisí s již zmíněnou částečnou adsorcí řetězců nukleových kyselin na platinové přívodní trubičky. Proto jsme se rozhodli za správnou považovat hodnotu termodynamických parametrů extrapolovanou na nulový čas pobytu vzorku v kalorimetru. Každé hodnotě termodynamického parametru jsme přiřadili časový údaj odpovídající časově středu skenu. Data jsme extrapolovali pomocí lineární závislosti velikosti parametru na tomto čase získané fitem pomocí metody nejmenších čtverců odchylek. Vyhodnocovali jsme zvlášť skeny pro ohřev a zvlášť pro ochlazování. Jako výslednou hodnotu termodynamických parametrů pak bereme aritmetický průměr extrapolovaných hodnot pro ohřívání a ochlazování. Tento postup jsme zvolili kvůli zmíněnému systematickému rozdílu mezi hodnotami pro ohřívání a ochlazování. Chybu extrapolovaných termodynamických parametrů jsme určili jako součet absolutní hodnoty maximální odchylky dat od interpolovaného průběhu a chyby v určení přesnosti přímky (tedy chyba absolutního členu přímky). Chybu aritmetického průměru jsme určili jako aritmetický průměr chyb

vypočítaných pro extrapolované hodnoty. Všechny výsledné hodnoty jsou v Tabulce 7.3.

Tabulka 7.3: Termodynamické parametry získané extrapolací na nulovou dobu pobytu vzorku v kalorimetru.

	1. experiment	2. experiment
$\Delta H_{\text{extrapol, ohřív.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	$(56,7 \pm 0,3)$	$(56,0 \pm 1,1)$
$\Delta H_{\text{extrapol, ohlaz.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	$(55,3 \pm 0,1)$	$(55,1 \pm 0,2)$
$\Delta H_{\text{extrapol, průměr.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	$(56,0 \pm 0,2)$	$(55,6 \pm 0,7)$
$\Delta S_{\text{extrapol, ohřív.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	$(152,2 \pm 0,8)$	$(150,0 \pm 3,4)$
$\Delta S_{\text{extrapol, ohlaz.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	$(148,7 \pm 0,3)$	$(148,2 \pm 0,8)$
$\Delta S_{\text{extrapol, průměr.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	$(150,4 \pm 0,5)$	$(149,1 \pm 2,1)$

Termodynamické parametry získané extrapolací se v rámci chyb shodují. Vypočítané chyby pro data z druhého experimentu jsou trochu větší, což je způsobeno jejich větší fluktuací. (Ačkoliv je rozdíl mezi parametry pro ohřívání a ochlazování menší, hodnoty zvláště pro ohřívání a ochlazování více fluktuují, zatímco u prvního experimentu jsou rozdíly mezi parametry pro ohřívání a ochlazování větší, ale hodnoty zvláště pro ohřívání a pro ochlazování leží téměř přesně na přímce.)

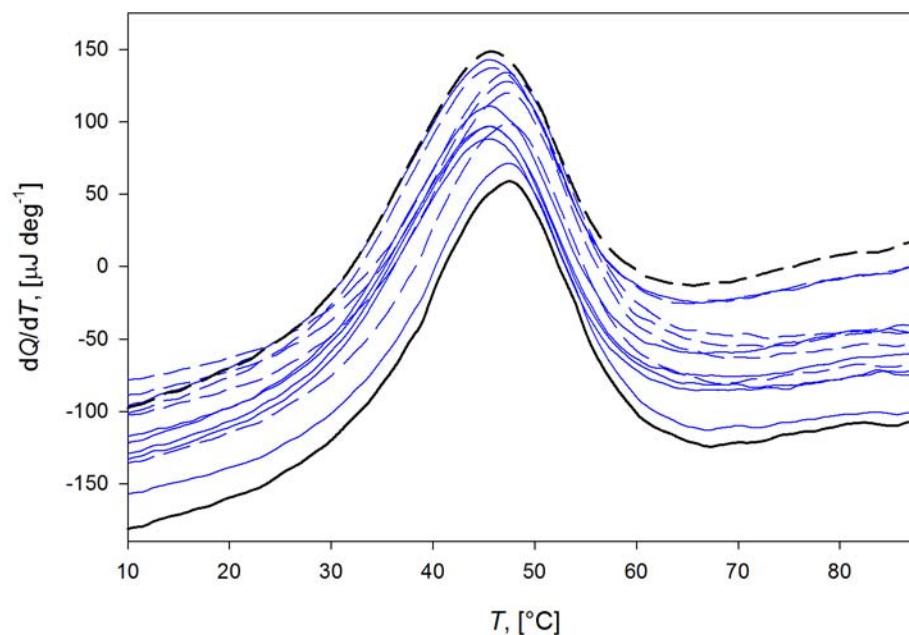
Z porovnání výsledků obou experimentů vyplývá, že z hlediska stability je poněkud lepší první postup, tedy ten, při němž byl vzorek do kalorimetru vložen během měření „on the fly“ a nikoli v rámci samostatného experimentu.

Na datech z prvního experimentu jsme se rozhodli ještě vyzkoušet druhý způsob zpracování dat. Vypočítali jsme sken extrapolovaný na nulový čas pomocí metody nejmenších čtverců z naměřených skenů zvláště pro ohřívání (zde jsme vynechali první sken ze stejného důvodu jako v předchozím případě) a pro ochlazování (viz Obrázek 7.13) tak, že jsme extrapolaci spočítali pro každý bod křivky. Takto vzniklé skeny jsme poté fitovali stejnými rovnicemi jako naměřená data při předchozím zpracování (viz Obrázek 7.14). Tato metoda je výhodná v tom případě, projevují-li se v opakovaných skenech negativní vlivy, které jsou s každým následujícím skenem více zřetelné, protože pak zpracování jednotlivých skenů může být zatíženo chybou vlivem špatné shody naměřených a nafitovaných dat.

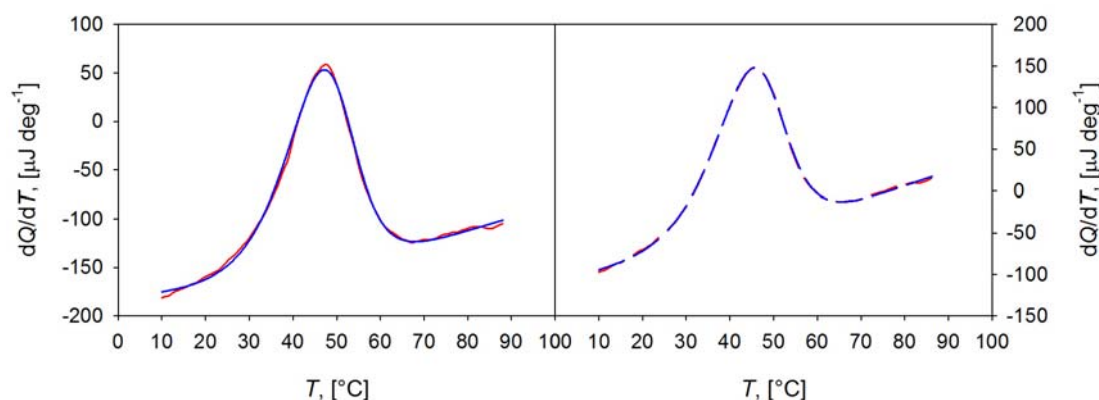
Výsledné termodynamické parametry získané fitováním extrapolovaných skenů (2. způsob) jsou prakticky totožné s výsledky z předchozího zpracování (1. způsob) – viz Tabulka 7.4.

Tabulka 7.4: Extrapolované termodynamické parametry 1. experiment.

1. experiment	1. způsob	2. způsob
$\Delta H_{\text{extrapol, ohřív.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	56,7	56,7
$\Delta H_{\text{extrapol, ohlaz.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	55,3	55,3
$\Delta H_{\text{extrapol, průměr.}} [\text{kcal mol}^{-1}]$	56,0	56,0
$\Delta S_{\text{extrapol, ohřív.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	152,2	152,2
$\Delta S_{\text{extrapol, ohlaz.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	148,7	148,7
$\Delta S_{\text{extrapol, průměr.}} [\text{cal mol}^{-1} \text{K}^{-1}]$	150,4	150,4



Obrázek 7.13: Extrapolované křivky (černé) a naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



Obrázek 7.14: Fity extrapolovaných skenů. Vlevo data pro ohřev a vpravo pro ochlazování. V každém obrázku je experimentální křivka (červeně) spolu s křivkou nafitovanou (modře).

7.6 Koncentrace vzorku

Koncentrační limity již byly studovány (Ottová, 2007), zde pouze shrneme, co bylo zjištěno. Toto shrnutí uvádíme proto, aby byl podán ucelený obraz testování diferenčního skenovacího kalorimetru.

Testování koncentračních limitů bylo provedeno na vzorku DNA z vláken se sekvencí 5′ - GCA TAT CAC - 3′ a 5′ - GTG ATA TGC - 3′. Stabilita pH byla udržována pufrům 25 mM TRIS s 10 % D₂O (pH 7,4). Měření probíhala v teplotním intervalu 5 – 85 °C, rychlost změny teploty byla 1 K min⁻¹, vzorek byl vkládán za chodu přístroje a před každým měřením byl proveden předběh.

Vzorek byl proměřen ve třech koncentracích: 570 μM, 160 μM a 44,5 μM (uvedené koncentrace jsou vyjádřeny jako koncentrace jednoho vlákna). Naměřená data byla zpracována fitem na dvoustavový model. Bylo zjištěno, že koncentrace 44,5 μM ještě není koncentračním limitem, protože součet čtverců odchylek mezi experimentálním průběhem a fitem není tvořen šumem, ale odpovídá úbytku signálu

se snižovanou koncentrací. Získané termodynamické parametry pro jednotlivé koncentrace se podle předpokladu v rámci chyb měření shodovaly.

Ačkoliv nejnižší měřená koncentrace (0,4 mM v báзовých párech) nebyla koncentračním limitem, při dalším snižování by mohly převážit další zdroje chyb a došlo by k negativnímu ovlivnění získaných dat.

8 Hybridizace modifikovaných patnáctimerů

Hlavním úkolem diplomové práce bylo určení termodynamických charakteristik komplexů sady čtyř modifikovaných deoxythymidinových patnáctimerů s polyriboadenylovou kyselinou. Tento systém představuje z hlediska délek řetězců interagujících molekul realistický model vazby antisensního oligonukleotidu na mRNA. Výsledné charakteristiky, které kromě poklesu entalpie a entropie při tvorbě komplexu zahrnují i parametr kooperativity vazby oligonukleotidů na polymerní vlákno, byly srovnávány s charakteristikou přirozeného DNA oligonukleotidu.

8.1 Ramanova spektroskopie

Sada modifikovaných patnáctimerů proměřovaná v rámci předkládané práce pomocí DSC byla na FÚ UK studována již dříve v rámci disertační práce Daniela Němečka (2005) metodou Ramanovy spektroskopie. Tato měření byla provedena pro různé stechiometrické poměry adeninu (Poly(rA)) a thyminu (oligonukleotid). Z nich vyplynulo, že pro všechny stechiometrické poměry se tvoří výhradně duplexy a nikoli triplexy. Úplná termodynamická charakteristika komplexů však nebyla na základě teplotních závislostí Ramanových spekter možná z důvodu velké korelace velikostí změny entalpie a entropie při jejich fitování.

8.2 Experimentální podmínky

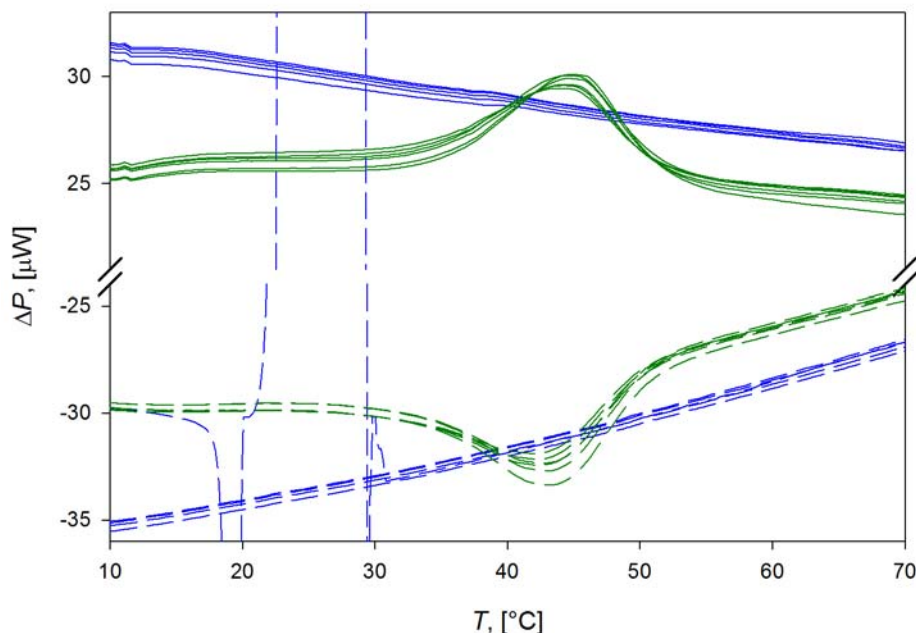
Všechny experimenty probíhaly za stejných podmínek. Měřili jsme v teplotním intervalu 2 – 90 °C. Rychlost změny teploty byla nastavena na 1 K min⁻¹ pro ohřívání i ochlazování. Před každým měřením byl proveden předběh a vzorek byl do kalorimetru vložen během měření. Rozpouštědlo (CaNaMg) bylo rovněž ve všech případech totožné. Jediné, v čem se měření od sebe lišila, byla koncentrace vzorku, která se lišila podle toho, kolik jsme měli daného vzorku k dispozici. Vzorky, u kterých jsme měli k dispozici větší molární množství, jsme totiž nechtěli zbytečně ředit. Vzhledem k tomu, že termodynamické parametry, které nás zajímají, nejsou koncentračně závislé, lze získané výsledky snadno mezi sebou porovnat. Vzorky byly připraveny tak, aby se koncentrace na bázi obou komplementárních partnerů v roztoku rovnala (stechiomerický poměr v bázích 1:1). Originální výsledky měření jsou na Obrázcích 8.1 – 8.5.

Ihned z naměřených dat bylo vidět, že modifikace, ve které se nachází -CH₂- skupina na 3'-konci internukleotidové spojky a všechny spojky jsou modifikované, nevytváří s přirozenou ribonukleovou kyselinou poly(rA) komplexy; u ostatních experimentů je patrná oblast přechodu.

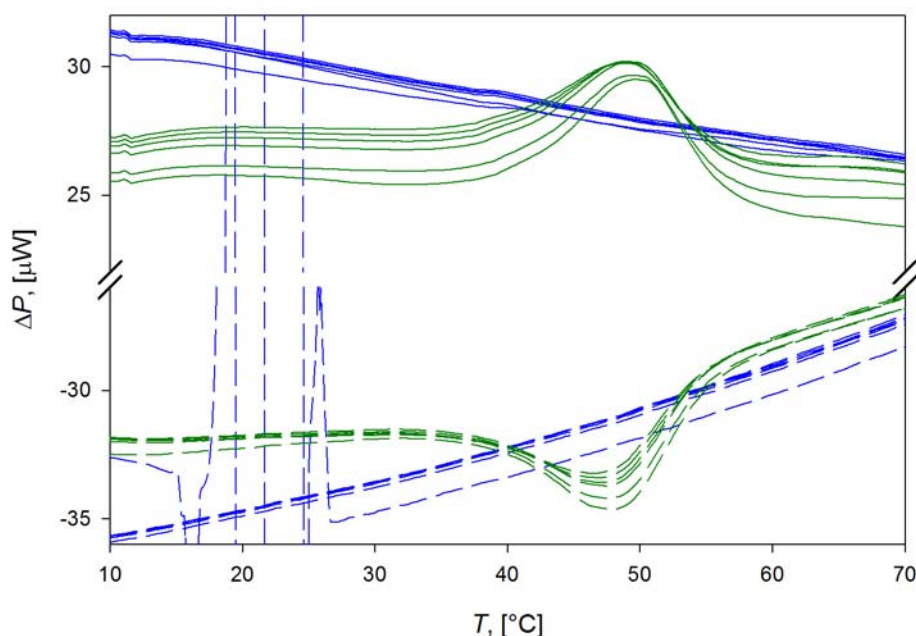
Při měření modifikace, kdy je -CH₂- skupina na 3' konci a modifikované spojky alternují s nemodifikovanými, po třetím skenu se vzorkem vypadl proud. Vzorek se z 90 °C samovolně ochladil na 25 °C a ihned po obnovení dodávky proudu jsme pustili další skeny, proto sken 4 v datech chybí.

U vzorků, kde je -CH₂- skupina v každé spojce jsme vždy při 5. skenu (cca při 30°C) odtlakovali a odsáli 50 µl z každé kyvety, proto u těchto měření 5. sken při zpracování dat neuvažujeme.

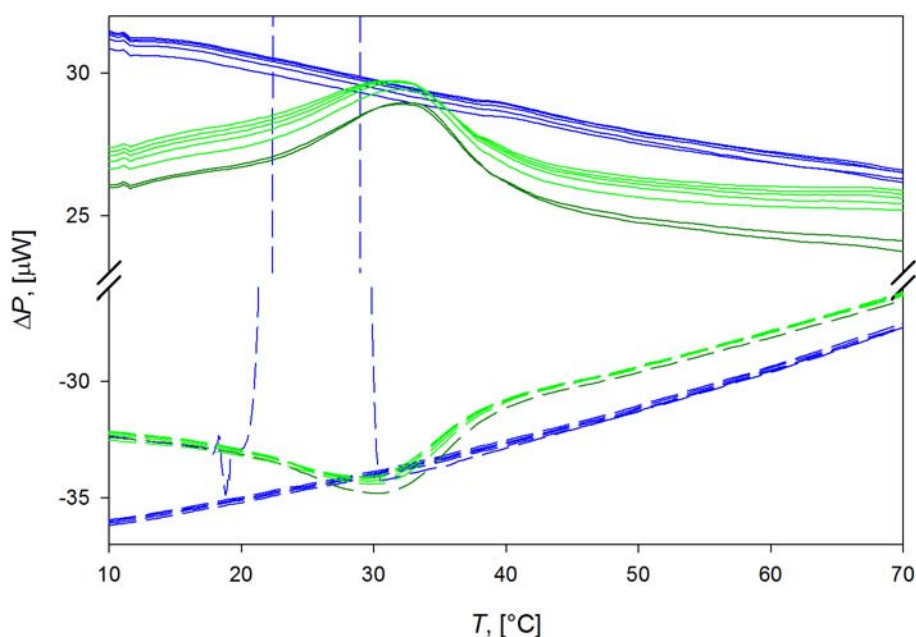
U žádného ze vzorků deoxythymidinových oligonukleotidů s Poly(rA) není odlišnost prvního skenu tak zřetelná jako při měření palindromu (viz část 7.5 „Postup měření vzorku a vyhodnocení dat“), přesto jsme první sken do zpracování dat nezahrnuli.



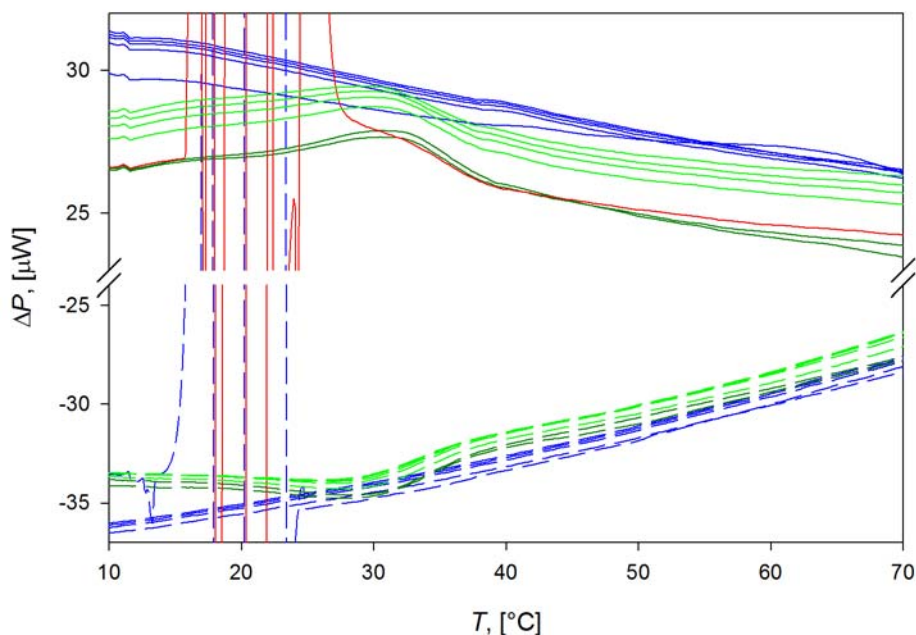
Obrázek 8.1: Naměřená data poly(rA) – (dT)₁₅. Modře jsou v obrázku vyznačeny základní linie a zeleně pak skeny se vzorkem (koncentrace: 30,67 μM ve vlákních oligodeoxythymidinů). Vzorek vložen v 10. skenu. Rozpouštědlo: CaNaMg, teplotní interval: 2 – 90 °C, rychlost změny teploty: 1 K min⁻¹, vzorek vložen do kalorimetru během měření, před měřením proveden předběh.



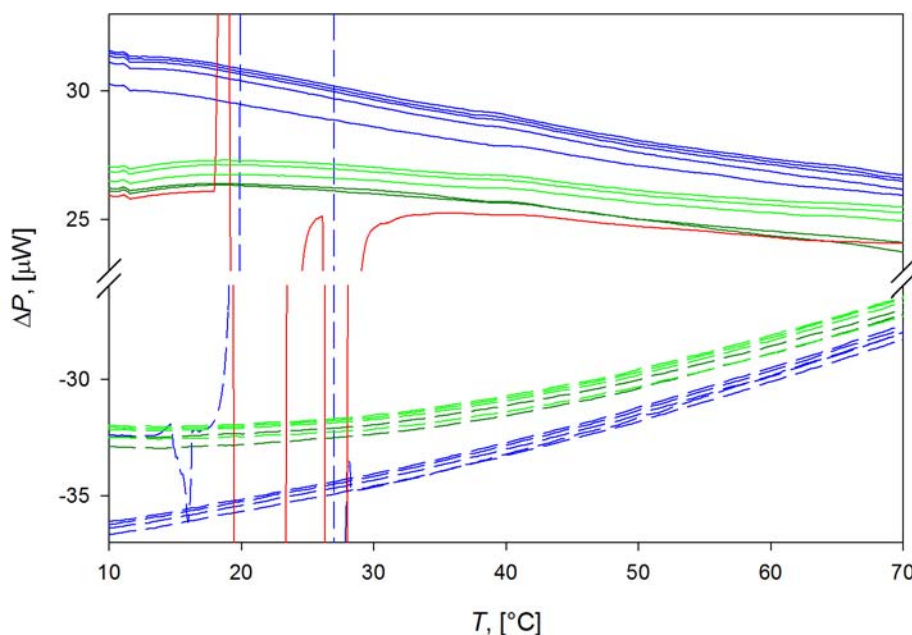
Obrázek 8.2: Naměřená data poly(rA) – dT[T-p,T]₇. Modře jsou v obrázku vyznačeny základní linie a zeleně skeny se vzorkem. (koncentrace: 26 μM ve vlákních oligodeoxythymidinů). Vzorek vložen ve 12. skenu. Rozpouštědlo: CaNaMg, teplotní interval: 2 – 90 °C, rychlost změny teploty: 1 K min⁻¹, vzorek vložen do kalorimetru během měření, před měřením proveden předběh.



Obrázek 8.3: Naměřená data poly(rA) – dT[T_{p_c} -T]₇. Modře jsou v obrázku vyznačeny základní linie a tmavě zeleně skeny se vzorkem před výpadkem proudu světle zeleně po výpadku proudu. (koncentrace: 28,67 μ M ve vlákních oligodeoxythymidinů). Vzorek vložen v 10. skenu. Rozpouštědlo: CaNaMg, teplotní interval: 2 – 90 °C, rychlost změny teploty: 1 K min⁻¹, vzorek vložen do kalorimetru během měření, před měřením proveden předběh.



Obrázek 8.4: Naměřená data poly(rA) – dT[p_cT]₁₄. Modře jsou na obrázku vyznačeny základní linie a tmavě zeleně skeny se vzorkem před odsátím, červeně skeny, při kterém jsme odsávali 50 μ l, světle zeleně skeny po odsátí (koncentrace: 18 μ M ve vlákních oligodeoxythymidinů). Vzorek vložen v 10. skenu. Rozpouštědlo: CaNaMg, teplotní interval: 2 – 90 °C, rychlost změny teploty: 1 K min⁻¹, vzorek vložen do kalorimetru během měření, před měřením proveden předběh.



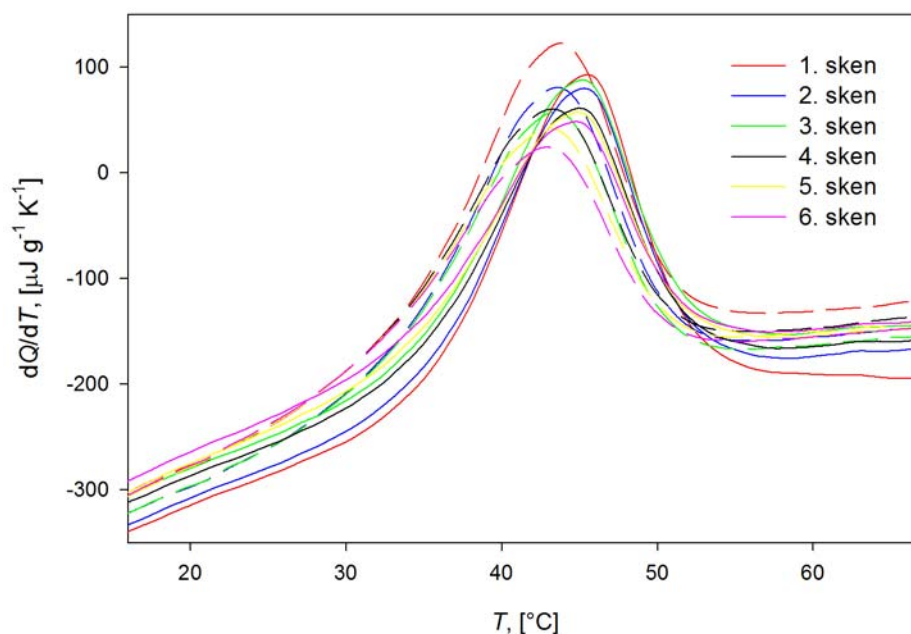
Obrázek 8.5: Naměřená data poly(rA) – d[TPc]₁₄T. Modře jsou na obrázku vyznačeny základní linie a tmavě zeleně skeny se vzorkem před odsátím, červeně skeny, při kterém jsme odsávali 50 μl, světle zeleně skeny po odsátí (koncentrace: 30,67 μM ve vlákních oligodeoxythymidinů). Vzorek vložen v 10. skenu. Rozpouštědlo: CaNaMg, teplotní interval: 2 – 90 °C, rychlost změny teploty: 1 K min⁻¹, vzorek vložen do kalorimetru během měření, před měřením proveden předběh.

8.3 Předzpracování dat

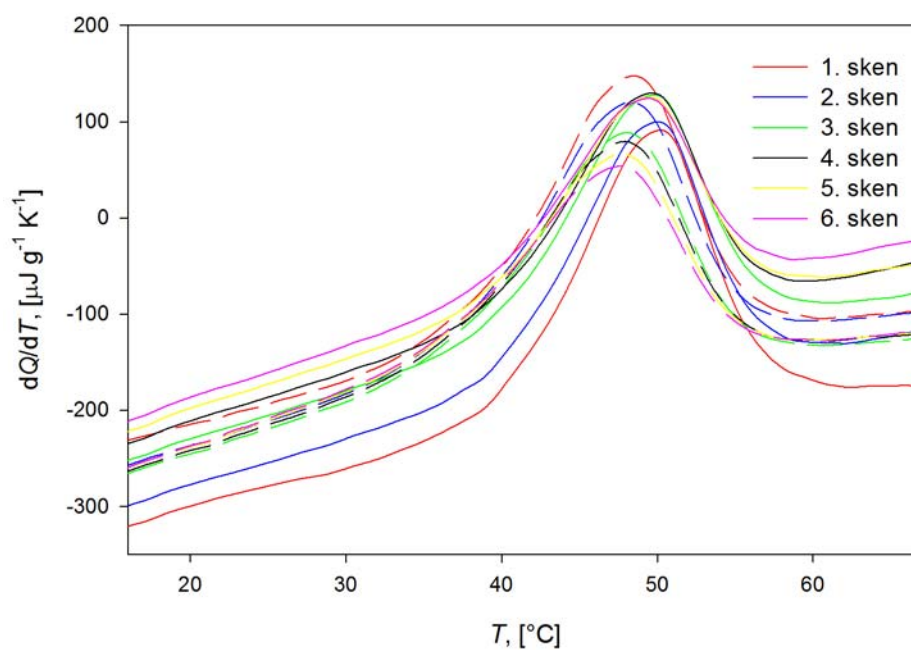
Naměřená data jsme v přípravné fázi zpracování dělili derivací teploty podle času, odečetli jsme od skenu se vzorkem základní linie a zúžili jsme teplotní interval. Obrázky 8.6 – 8.10 ukazují předzpracovaná data.

Na Obrázcích 8.6 – 8.9 je patrný jeden ostrý přechod, který se projevuje nárůstem dorovnávacího příkonu. U nízkých a vysokých teplot je vidět lineární pozadí. Opakované skeny „plavou“, tj. nemají reprodukovatelnou polohu křivky pozadí, avšak poloha maxima zůstává stejná. Poloha maxima se trochu liší pro ohřívání a ochlazování (cca 2 °C), což však je prakticky na úrovni odhadnuté velikosti vlivu setrvačnosti samotného kalorimetru.

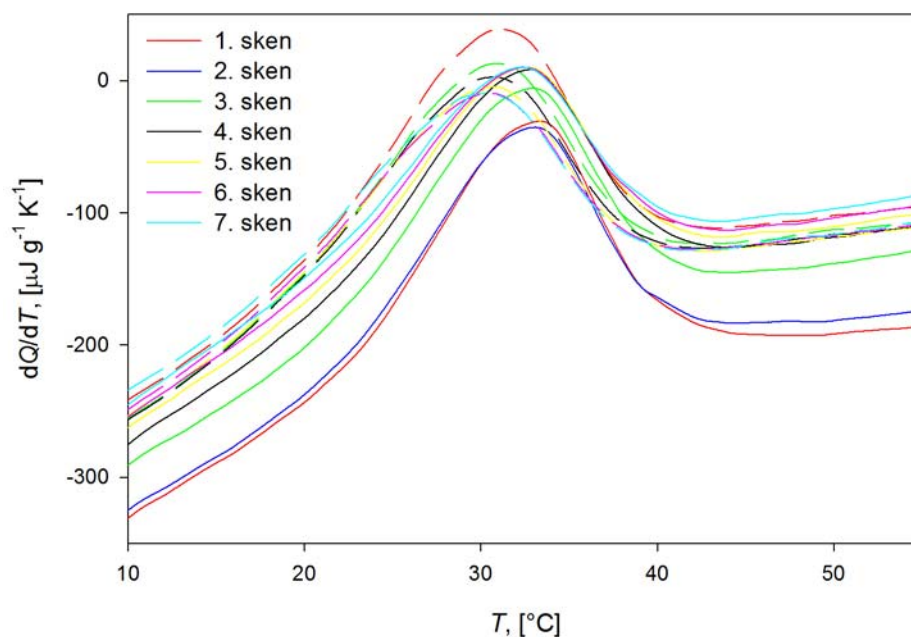
U vzorku poly(rA) – d[TPc]₁₄T (Obrázek 8.10) je vidět pouze zakřivka pozadí, ale žádný nárůst dorovnávacího příkonu svědčící o tepelně indukovaném rozpadu a tvorbě komplexů. To jsme očekávali již podle naměřených dat, ale předzpracováním dat jsme ověřili, že se v naměřených datech nevyskytuje ani slabý pík. Předzpracování dat tedy potvrdilo, že modifikace s methylenovou skupinou na 3' konci všech internukleotidových spojek s přirozenou poly(rA) komplexu vůbec nevytváří. Data z měření tohoto vzorku nebyla tedy dále zpracovávána.



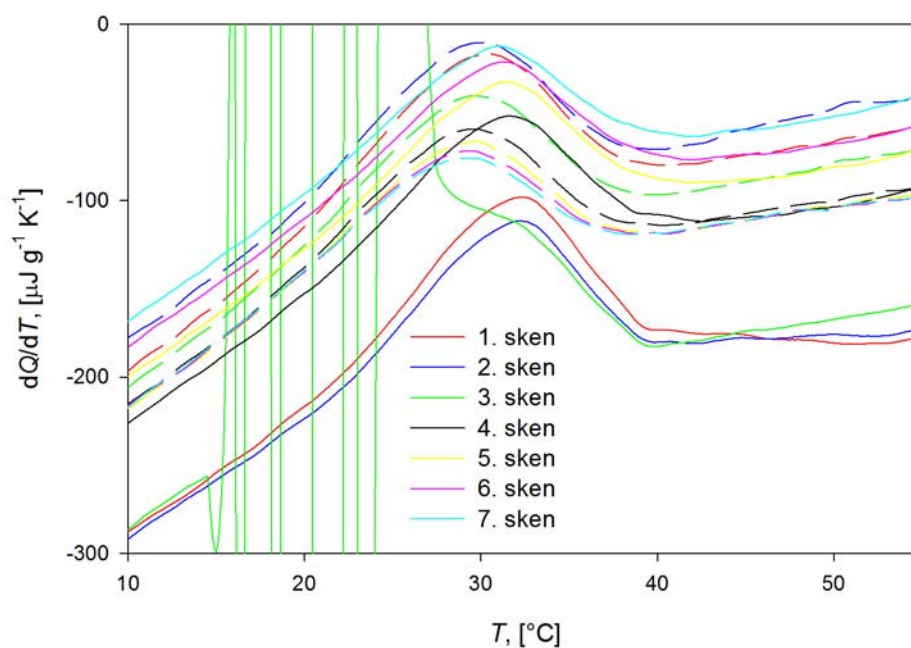
Obrázek 8.6: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 16 - 67 °C). Vzorek: poly(rA) – (dT)₁₅, koncentrace: 30,67 μM ve vlákních oligodeoxythymidinů, rozpouštědlo: CacNaMg. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



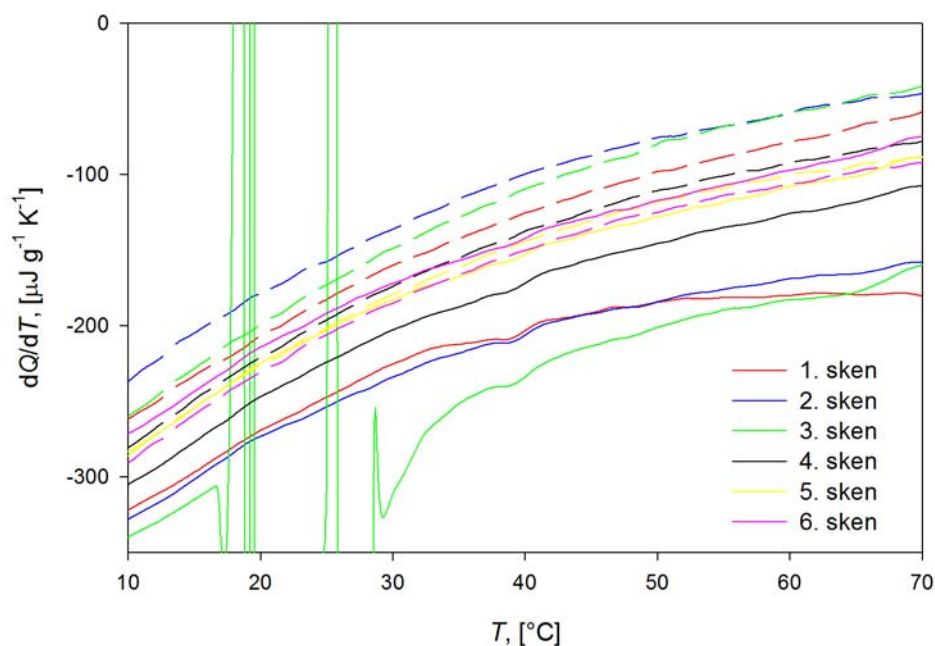
Obrázek 8.7: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 16 - 67 °C). Vzorek: poly(rA) – dT[T-p_cT]₇, koncentrace: 26 μM ve vlákních oligodeoxythymidinů, rozpouštědlo: CacNaMg. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



Obrázek 8.8: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 - 55 °C). Vzorek: poly(rA) – dT[T_{p_c} -T]₇, koncentrace: 28,67 μM ve vláknech oligodeoxythymidinů, rozpouštědlo: CacNaMg. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



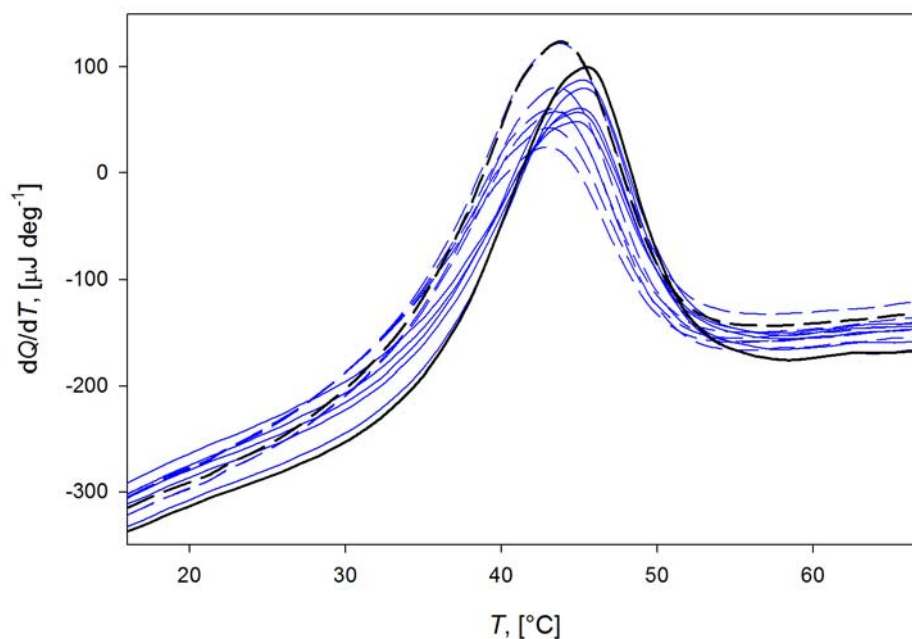
Obrázek 8.9: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 - 55 °C). Vzorek: poly(rA) – dT[p_cT]₁₄, koncentrace: 18 μM ve vláknech oligodeoxythymidinů, rozpouštědlo: CacNaMg. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



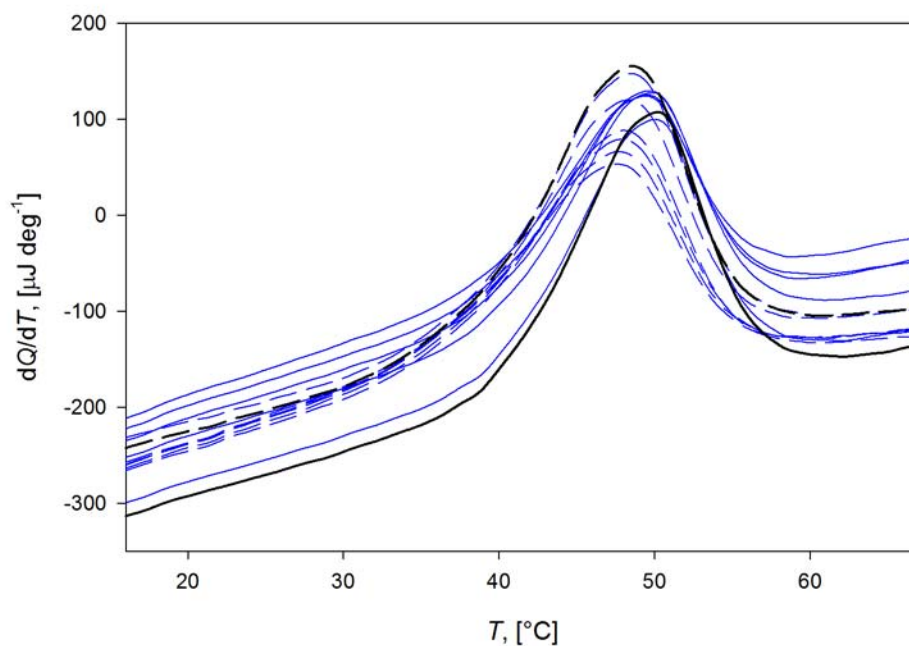
Obrázek 8.10: Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 - 70 °C). Vzorek: poly(rA) – d[TP_c]₁₄T, koncentrace: 30,67 μM ve vláčkách oligodeoxythymidinů, rozpouštědlo: CaNaMg. Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).

8.4 Zpracování dat, výsledky a diskuze

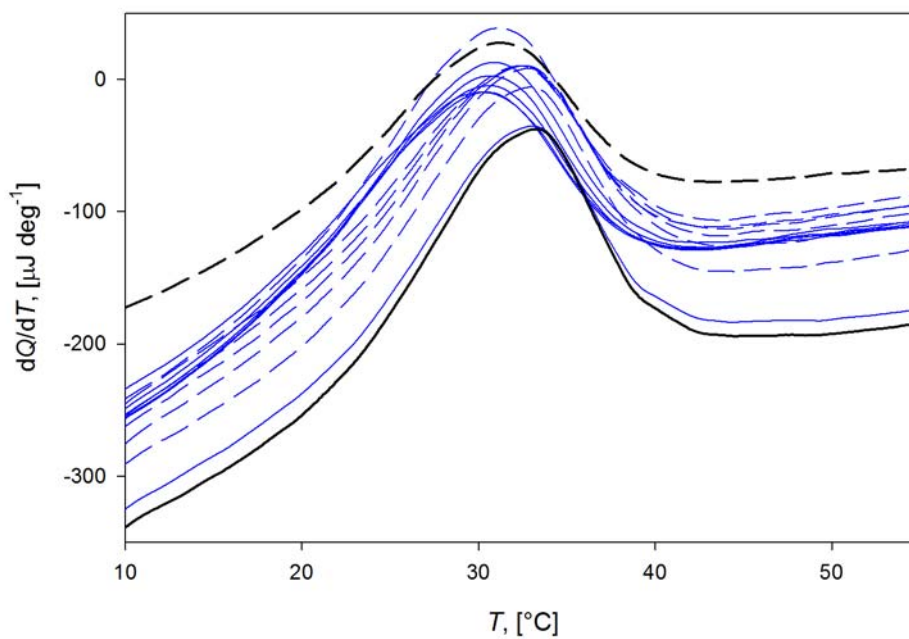
Naměřená data jsme se rozhodli zpracovat tak, že jsme nejprve určili skeny extrapolované na nulový čas pobytu vzorku ve vzorkové kyvetě. Pro každou teplotu byla závislost dQ/dT na čase skenu proložena metodou nejmenších čtverců přímkou a extrapolovaná hodnota určena jako absolutní člen. Získané křivky jsou na Obrázcích 8.11 – 8.14.



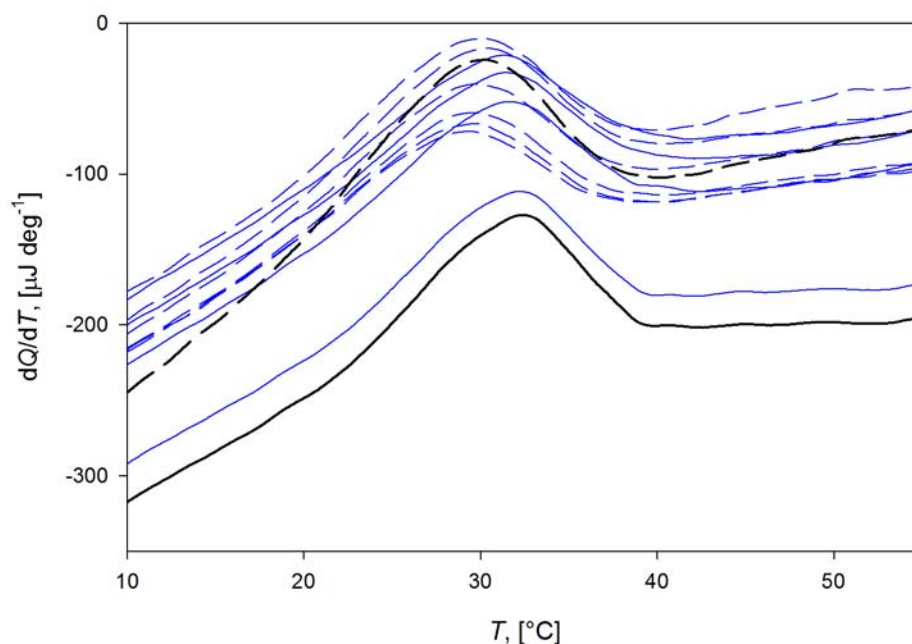
Obrázek 8.11: Poly(rA) – (dT)₁₅. Extrapolované křivky (černé) a naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



Obrázek 8.12: Poly(rA) – $dT[T-p_c T]_7$. Extrapolované křivky (černé) a naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.

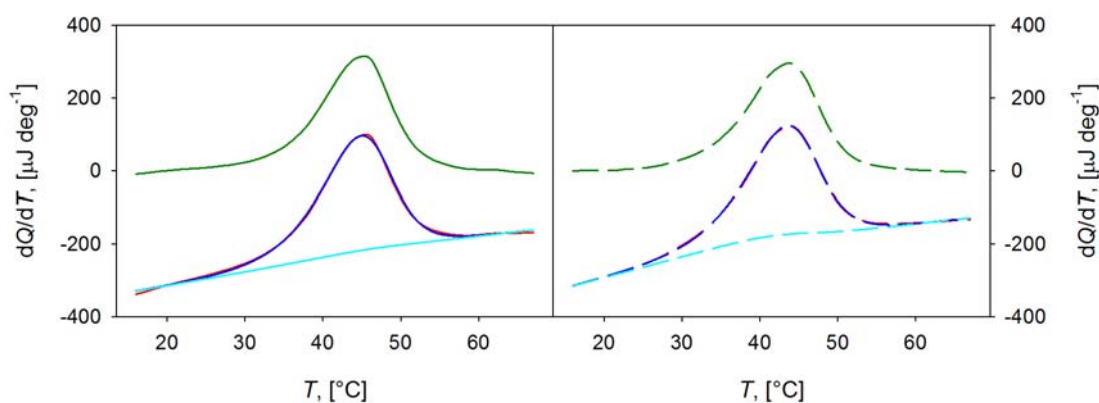


Obrázek 8.13: Poly(rA) – $dT[Tp_c - T]_7$. Extrapolované křivky (černé) a naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.

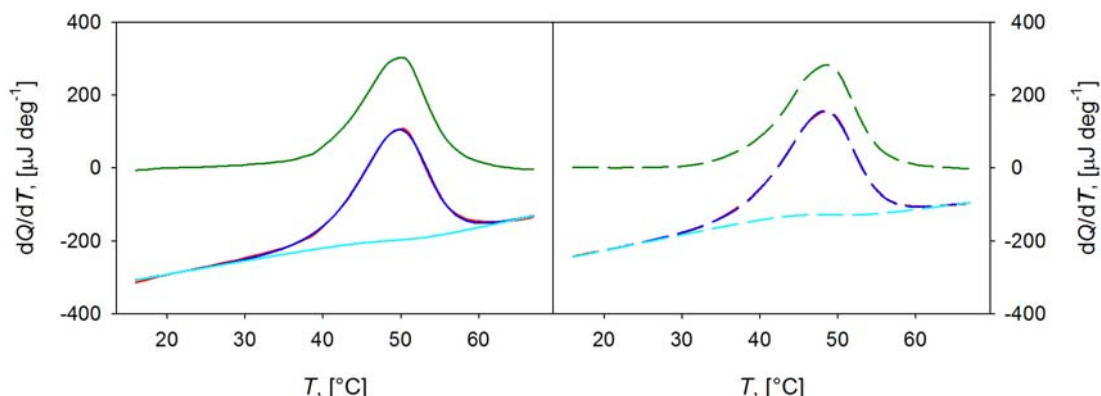


Obrázek 8.14: Poly(rA) – dT[p_cT]₁₄. Extrapolované křivky (černé) a naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.

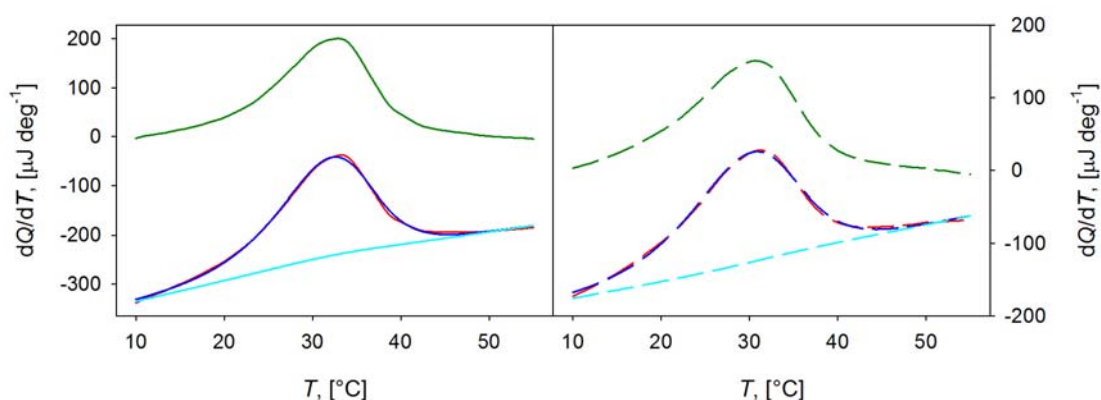
DSC křivky extrapolované na nulový čas byly zdrojovými daty pro určení termodynamických charakteristik. Nejprve jsme použili fit podle jednoduchého dvoustavového modelu (rovnice 6.10), ze kterého jsme získali hodnoty ΔH_{jm} , ΔS_{jm} a koeficienty pozadí. K získání velikosti změny entalpie spojené se vznikem komplexu jsme použili i alternativní postup. Z fitu na dvoustavový model jsme využili koeficienty pozadí a křivku pozadí určenou podle rovnice (6.35) jsme od DSC křivky odečetli. Z DSC křivek bez pozadí jsme určili změnu entalpie přímou integrací podle vzorce (6.37). Data zpracovaná fitem podle jednoduchého dvoustavového modelu jsou na Obrázcích 8.15 – 8.18. Termodynamické parametry získané z fitu jsou v Tabulkách 8.1 a 8.2.



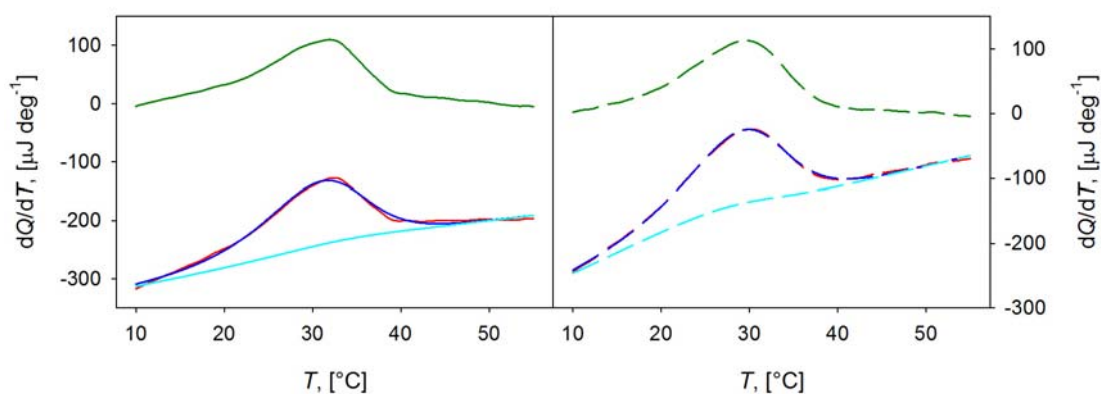
Obrázek 8.15: Fity extrapolovaných skenů vzorku poly(rA) – (dT)₁₅. Červeně jsou naměřená data, modře průběh podle dvoustavového modelu s naitovanými parametry, tyrkysově je pozadí podle fitu a zeleně naměřené hodnoty po odečtení tohoto pozadí.



Obrázek 8.16: Fity extrapolovaných skenů vzorku poly(rA) – dT[T_{p_cT}]₇. Červeně jsou naměřená data, modře průběh podle dvoustavového modelu s naitovanými parametry, tyrkysově je pozadí podle fitu a zeleně naměřené hodnoty po odečtení tohoto pozadí.



Obrázek 8.17: Fity extrapolovaných skenů vzorku poly(rA) – dT[T_{p_cT}]₇. Červeně jsou naměřená data, modře průběh podle dvoustavového modelu s naitovanými parametry, tyrkysově je pozadí podle fitu a zeleně naměřené hodnoty po odečtení tohoto pozadí.



Obrázek 8.18: Fity extrapolovaných skenů vzorku poly(rA) – dT[p_cT]₁₄. Červeně jsou naměřená data, modře průběh podle dvoustavového modelu s naitovanými parametry, tyrkysově je pozadí podle fitu a zeleně naměřené hodnoty po odečtení tohoto pozadí.

Vedle jednoduchého dvoustavového modelu jsme zpracovávali DSC křivky i podle složitějšího McGhee – von Hippelova modelu (viz část 6.6), který by měl lépe vystihovat situaci, kdy se váže poměrně krátký oligonukleotid k dlouhému polymernímu řetězci. Nejprve jsme zkusili fit podle vztahu (6.38), kde není započítána případná kooperativita mezi vazbou ligandů do blízkých poloh na polymeru. Ukázalo se však, že v tomto případě dostáváme velmi špatnou shodu mezi

experimentálními daty a McGhee – von Hippelovým modelem (mnohem horší než u dvoustavového modelu).

Použili jsme proto rovnici (6.43), která zahrnuje parametr kooperativity. V tomto případě jsme dostali dobrou shodu s experimentálními daty, ale ukázalo se, že všechny tři parametry fitu, tj. změnu entalpie, změnu entropie a parametr kooperativity nelze spolehlivě určit, protože jsou silně korelované ve svém vlivu na součet čtverců odchylek. V každém případě však fity ukázaly, že shoda s experimentálními daty je podmíněna vysokou hodnotou parametru kooperativity. To znamená, že navázání oligonukleotidu do určitého místa polymeru zvyšuje pravděpodobnost vazby dalšího oligonukleotidu do blízké pozice. Tuto kooperativitu lze jednoduše vysvětlit tím, že lokální helikální uspořádání polymeru v místě vytvoření duplexu s oligonukleotidem částečně přesahuje i na sousední nukleotidy a tím se snižuje entropická nevýhodnost tvorby dalšího duplexu v bezprostřední blízkosti. Vysoká kooperativita vazby také částečně kompenzuje efekt snižování vazebných míst na polymeru díky nedostatečným mezerám mezi navázanými oligonukleotidy. Tím lze vysvětlit velmi dobrou shodu s jednoduchým dvoustavovým modelem.

K určení parametru kooperativity jsme využili znalost změny entalpie při tvorbě komplexu z přímé integrace a rovnici (6.43) pro určení parametru kooperativity ω a změny entropie. Získané hodnoty jsou rovněž uvedené v Tabulkách 8.1 a 8.2.

Pro jednoduché srovnání stabilit komplexů jsme z určených změn entalpie a entropie vypočítali změnu Gibbsovy energie (podle vztahu 1.7) při referenční teplotě 37 °C (310,15 K).

Dále jsme se zabývali odhadem chyb určených termodynamických parametrů. Je třeba uvažovat o dvou hlavních zdrojích chyb. Zaprvé se projevuje systematická chyba v měřené hodnotě dorovnávacího příkonu ΔP , kterou odhadujeme na 3 % (viz část 7.1 „Kalibrace kalorimetru“). Hodnotě ΔP jsou úměrné hodnoty ΔH a ΔS , proto se do nich tato 3% chyba přenáší. I u parametru kooperativity ω , který má silnou korelaci s ΔH a ΔS podle McGhee – von Hippelova modelu můžeme počítat s touto chybou.

Dále se projeví chyba daná odečtením pozadí, která má úzkou souvislost se zkrácením teplotního intervalu. Při použití širšího teplotního intervalu je přesnost určení pozadí negativně ovlivněná deformací tvaru DSC křivky v oblasti počátečních teplot skenu, kdežto u příliš úzkého intervalu je křivka pozadí překryta částí DSC pásu odpovídajícího měřenému přechodu. Tuto chybu jsme určili tak, že jsme u naměřených dat pro vzorek poly(rA) – (dT)₁₅ omezili teplotní interval pěti různými způsoby a vždy jsme provedli celé vyhodnocení (fit jednoduchým dvoustavovým modelem, určení změny entalpie přímou integrací a fit na McGhee – von Hippelův model). Naměřené křivky spolu s křivkami nafitovanými, nafitovaným pozadím a křivkou s odečteným pozadím jsou pro všech pět způsobů omezení teplotního intervalu na Obrázku 8.19. Z výsledného souboru pěti hodnot pro každý parametr jsme určili střední kvadratickou odchylku σ_A . Jako odhadovanou absolutní chybu ε_A pocházející z nepřesnosti určení pozadí bereme trojnásobek získané střední kvadratické odchylky σ_A . Data z určování této chyby pro všechny parametry jsou uvedeny v Tabulce 8.3. Výsledné odhadnuté chyby jsou uvedené u příslušných veličin v Tabulkách 8.1. a 8.2.

Tabulka 8.1: Termodynamické parametry^a komplexů deoxythymidinových patnáctimerů a poly(rA) - ohřívání.

poly(rA):X	X				
	(dT) ₁₅	dT[T-p _c T] ₇	dT[Tp _c -T]	dT[p _c T] ₁₄	dT[Tp _c] ₁₄
poloha -CH₂- modifikované spojky	–	5'-konec alternují	3'-konec alternují	5'-konec všechny	3'-konec všechny
ΔH_{jm} [kcal mol ⁻¹]	(-97,8 ± 4,7)	(-105,8 ± 4,9)	(-77,5 ± 4,1)	(-71,7 ± 3,9)	–
ΔS_{jm} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-279 ± 14)	(-298 ± 15)	(-225 ± 12)	(-206 ± 12)	–
ΔH_i [kcal mol ⁻¹]	(-97,8 ± 4,6)	(-105,8 ± 4,8)	(-77,1 ± 3,9)	(-70,9 ± 3,8)	–
ΔS_{MGH} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-279 ± 14)	(299 ± 14)	(-223 ± 12)	(-203 ± 11)	–
ω	(11,1 ± 2,5)	(11,4 ± 2,5)	(11,9 ± 2,5)	(11,5 ± 2,5)	–
$\Delta G_{jm, 37^\circ C}$ [kcal mol ⁻¹]	-11,4	-13,3	-7,9	-7,9	–
$\Delta G_{MGH, 37^\circ C}$ [kcal mol ⁻¹]	-11,4	-13,2	-7,8	-7,9	–

Poznámky:

^{a)} ΔH_{jm} , ΔS_{jm} jsou změny entalpie a entropie určené z dvoustavového fitu, ΔH_i je změna entalpie určená z přímé intergrace, ΔS_{MGH} je změna entropie určená z McGhee – von Hippelova fitu, ω je kooperativita, $\Delta G_{jm, 37^\circ C}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_{jm} a ΔS_{jm} při referenční teplotě 37 °C a $\Delta G_{MGH, 37^\circ C}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_i a ΔS_{MGH} při referenční teplotě 37 °C.

Tabulka 8.2: Termodynamické parametry^a komplexů deoxythymidinových patnáctimerů a poly(rA) - ochlazování.

poly(rA):X	X				
	(dT) ₁₅	dT[T-p _c T] ₇	dT[Tp _c -T]	dT[p _c T] ₁₄	dT[Tp _c] ₁₄
poloha -CH₂- modifikované spojky	–	5'-konec alternují	3'-konec alternují	5'-konec všechny	3'-konec všechny
ΔH_{jm} [kcal mol ⁻¹]	(-94,7 ± 4,6)	(-102,2 ± 4,8)	(-66,8 ± 3,7)	(-72,7 ± 3,9)	–
ΔS_{jm} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-270 ± 14)	(-289 ± 15)	(-191 ± 11)	(-210 ± 12)	–
ΔH_i [kcal mol ⁻¹]	(-94,7 ± 4,5)	(102,2 ± 4,8)	(-65,7 ± 3,6)	(-71,7 ± 3,8)	–
ΔS_{MGH} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-270 ± 13)	(289 ± 14)	(-188 ± 11)	(-207 ± 12)	–
ω	(11,4 ± 2,5)	(11,6 ± 2,5)	(12,9 ± 2,5)	(12,2 ± 2,5)	–
$\Delta G_{jm, 37^\circ C}$ [kcal mol ⁻¹]	-11,0	-12,7	-7,6	-7,5	–
$\Delta G_{MGH, 37^\circ C}$ [kcal mol ⁻¹]	-10,9	-12,6	-7,5	-7,5	–

Poznámky:

^{a)} ΔH_{jm} , ΔS_{jm} jsou změny entalpie a entropie určené z dvoustavového fitu, ΔH_i je změna entalpie určená z přímé intergrace, ΔS_{MGH} je změna entropie určená z McGhee – von Hippelova fitu, ω je kooperativita, $\Delta G_{jm, 37^\circ C}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_{jm} a ΔS_{jm} při referenční teplotě 37 °C a $\Delta G_{MGH, 37^\circ C}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_i a ΔS_{MGH} při referenční teplotě 37 °C.

Tabulka 8.3: Určení absolutní chyby měření všech termodynamických parametrů^a.

teplotní interval	ΔH_{jm} [kcal mol ⁻¹]	ΔS_{jm} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔH_i [kcal mol ⁻¹]	ΔS_{MGH} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	ω
10 – 80 °C	-96,5	-274,2	-96,5	-274,5	10,13
16 – 75 °C	-97,4	-277,3	-97,4	-277,4	10,84
16 – 67 °C	-97,8	-278,5	-97,8	-278,7	11,11
20 – 75 °C	-97,6	-278,0	-97,5	-278,0	11,87
20 – 67 °C	-97,9	-278,9	-97,8	-278,8	11,79
σ_A [A]	0,6	1,9	0,5	1,8	0,72
ε_A [A]	1,8	5,6	1,6	5,3	2,16

Poznámky:

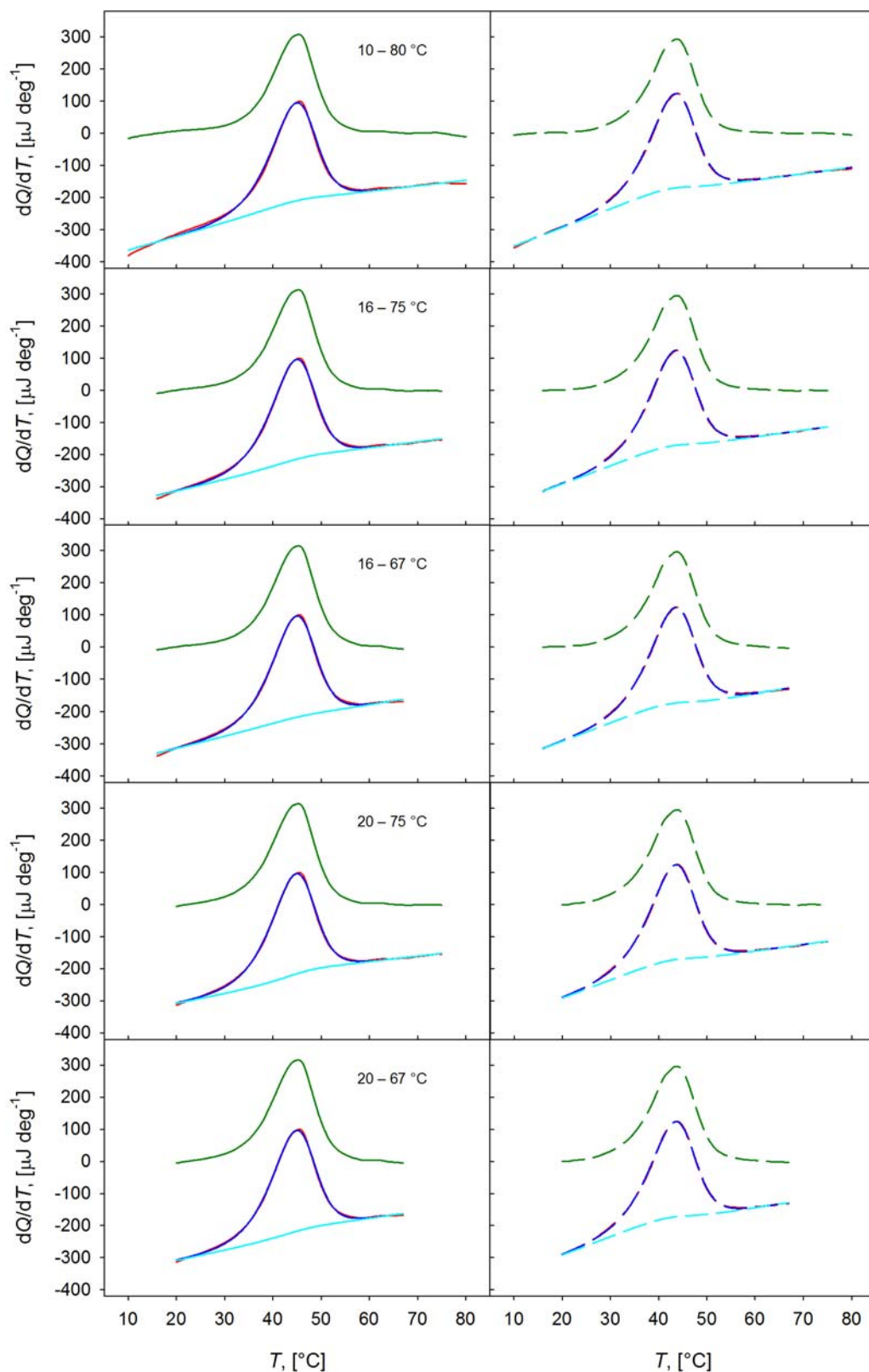
^{a)} ΔH_{jm} , ΔS_{jm} jsou změny entalpie a entropie určené z dvoustavového fitu, ΔH_i je změna entalpie určená z přímé intergrace, ΔS_{MGH} je změna entropie určená z McGhee – von Hippelova fitu, ω je kooperativita.

Tabulka 8.4: Termodynamické parametry^a komplexů deoxythymidinových patnáctimerů a poly(rA) – průměrné hodnoty.

poly(rA):X	X				
	(dT) ₁₅	dT[T-p _c T] ₇	dT[Tp _c -T]	dT[p _c T] ₁₄	dT[Tp _c] ₁₄
poloha -CH₂- modifikované spojky	–	5'-konec alternují	3'-konec alternují	5'-konec všechny	3'-konec všechny
ΔH_{jm} [kcal mol ⁻¹]	(-96,3 ± 4,6)	(-104,0 ± 4,9)	(-72,2 ± 3,9)	(-72,2 ± 3,9)	–
ΔS_{jm} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-274 ± 14)	(-293 ± 14)	(-208 ± 12)	(-208 ± 12)	–
ΔH_i [kcal mol ⁻¹]	(-96,2 ± 4,5)	(-104,0 ± 4,7)	(-71,4 ± 3,8)	(-71,3 ± 3,8)	–
ΔS_{MGH} [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	(-274 ± 14)	(-294 ± 14)	(206 ± 12)	(-205 ± 12)	–
ω	(11,3 ± 2,5)	(11,5 ± 2,5)	(12,4 ± 2,5)	(11,8 ± 2,5)	–
$\Delta G_{jm, 37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	-11,2	-13,0	-7,7	-7,7	–
$\Delta G_{MGH, 37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	-11,1	-12,9	-7,7	-7,7	–

Poznámky:

^{a)} ΔH_{jm} , ΔS_{jm} jsou změny entalpie a entropie určené z dvoustavového fitu, ΔH_i je změna entalpie určená z přímé intergrace, ΔS_{MGH} je změna entropie určená z McGhee – von Hippelova fitu, ω je kooperativita, $\Delta G_{jm, 37^\circ\text{C}}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_{jm} a ΔS_{jm} při referenční teplotě 37 °C a $\Delta G_{MGH, 37^\circ\text{C}}$ je změna Gibbsovy energie určená z hodnot ΔH_i a ΔS_{MGH} při referenční teplotě 37 °C.



Obrázek 8.19: DSC křivky vzorku Poly(rA) – (dT)₁₅ vyhodnocované v různých teplotních intervalech. Červeně jsou naměřená data, modře průběh podle dvoustavového modelu s nafiťovanými parametry, tyrkysově je pozadí podle fitu a zeleně naměřené hodnoty po odečtení tohoto pozadí.

Termodynamické parametry získané zvláště pro ohřívání a ochlazování se vzájemně liší v rozmezí odhadnuté chyby. Jsou to však odchylky systematické, které jsou způsobené setrvačností kalorimetru (viz část 7.2 „Vliv rychlosti změny teploty“) a může se zde projevit i určitá, ale nevelká setrvačnost v ustalování rovnováhy ve vzorku. Za správné proto považujeme průměrné hodnoty z ohřevu a ochlazování (viz Tabulka 8.4). Jako chybu průměrných hodnot bereme průměr chyb pro ohřívání a ochlazování.

Z Tabulek 8.1, 8.2 a 8.4 je vidět, že hodnoty změny entalpie získané z jednoduchého modelu a z přímé integrace jsou téměř shodné. Stejně tak hodnoty změny entropie získané z jednoduchého modelu a z Mc Ghee – von Hippelova modelu.

Porovnáním hodnot získaných pro jednotlivé modifikace je ihned patrné, že modifikace s methylenovou skupinou na 5' konci, ve které se střídají modifikované spojky s nemodifikovanými, vytváří s přirozenou poly(rA) dokonce stabilnější komplexy než přirozený patnáctimer deoxythymidinu. Na druhé straně modifikace s methylenovou skupinou na 3' konci, ve které modifikované spojky alternují s nemodifikovanými a modifikace s -CH₂- skupinou na 5' konci, ve které jsou všechny spojky modifikované, vytvářejí s přirozenou poly(rA) komplexy, avšak tyto komplexy jsou méně stabilní než komplexy poly(rA) s přirozeným oligomerem (dT)₁₅. Modifikace s methylenovou skupinou na 3' konci, ve které jsou všechny spojky modifikované, s přirozenou poly(rA) komplexy nevytváří, jak již bylo zmíněno výše.

Kooperativita vazby ligandu na polymer pozitivní a poměrně silná – parametr kooperativity, který představuje poměr mezi pravděpodobností vazby oligonukleotidu do sousedství oligonukleotidu již navázaného a vazby do vzdáleného místa má hodnoty 11 až 12. Je zajímavé, že pro všechny oligonukleotidy tvořící komplexy je tato hodnota prakticky stejná; liší se podstatně méně, než je odhadnutá chyba. Pozitivní kooperativita znamená, že ve všech případech vyvolává vazba oligonukleotidu na polymer konformační změnu přesahující rozmezí lokálního duplexu a vhodnou pro vytvoření dalšího navazujícího duplexu.

9 RNA vlásenky

Dalším úkolem diplomové práce bylo studium termodynamických parametrů RNA vlásenek, jejichž interakce je základem potenciální aptamerní strategie proti viru HIV. Jedná se o vrcholovou vlásenku segmentu TAR, který se přirozeně vyskytuje na začátku genomu HIV-1 viru a slouží jako regulační element, a vlásenku aptameru R06. Podrobnosti o studovaných molekulách jsou uvedeny v části 5.3.

Vlásenka TAR i aptamer R06 jsou paralelně studované technikami optické, zejména Ramanovy spektroskopie v rámci práce (Vachoušek, 2010). První výsledky z teplotních závislostí Ramanových spekter ukázaly (Vachoušek, 2008), že kromě očekávaného přechodu, při kterém dochází k otevření vlásenky, dochází v oblasti teplot pod tímto přechodem k dalším strukturním změnám, které se týkají především změny střední geometrie nukleotidů ve smyčce. Teplotní závislost tohoto procesu bylo však v Ramanových spektrech možné popsat pouze jako lineární změnu spektra s teplotou. Měření prováděná v rámci této diplomové práce měla ukázat, jak vypadají příslušné DSC křivky a zda budou moci poskytnout přesnější termodynamické údaje jak o přechodu při otevření smyčky, tak o strukturních změnách za nižších teplot. Měl být také proveden první experiment s tvorbou „kissing“ komplexu mezi vlásenkou a aptamerem.

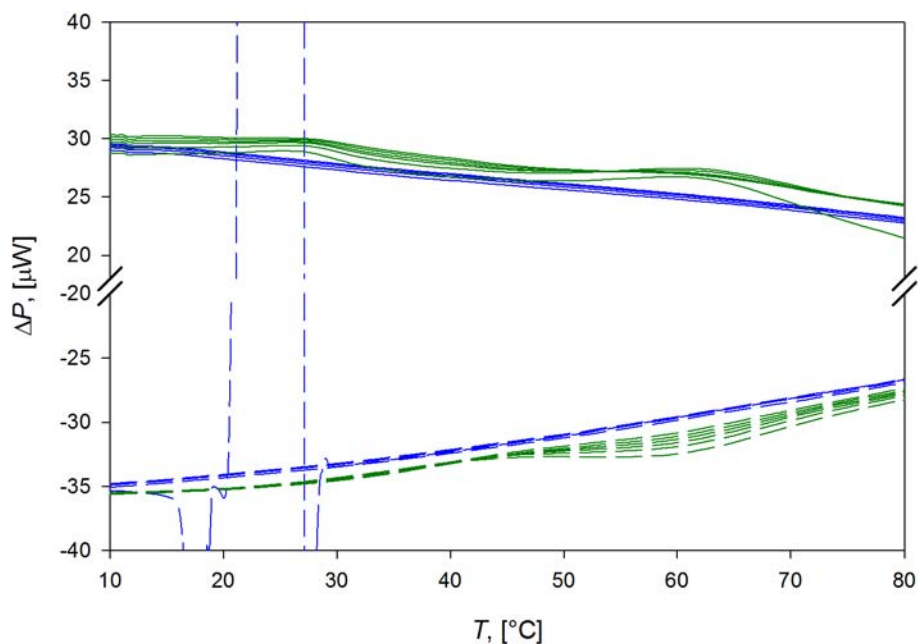
9.1 Experimentální podmínky

Provedli jsme dvě série měření s rozdílnými experimentálními podmínkami, (všechna měření v rámci jedné série měla stejné experimentální podmínky), v rámci každé série byly naměřeny: DSC křivka TAR vlásenky, DSC křivka aptameru R06 a křivka jejich „kissing“ komplexu, přesně řečeno ekvimolární směsi. Dvě sady měření za různých podmínek měly vyjasnit vliv experimentálních podmínek na výsledky experimentu.

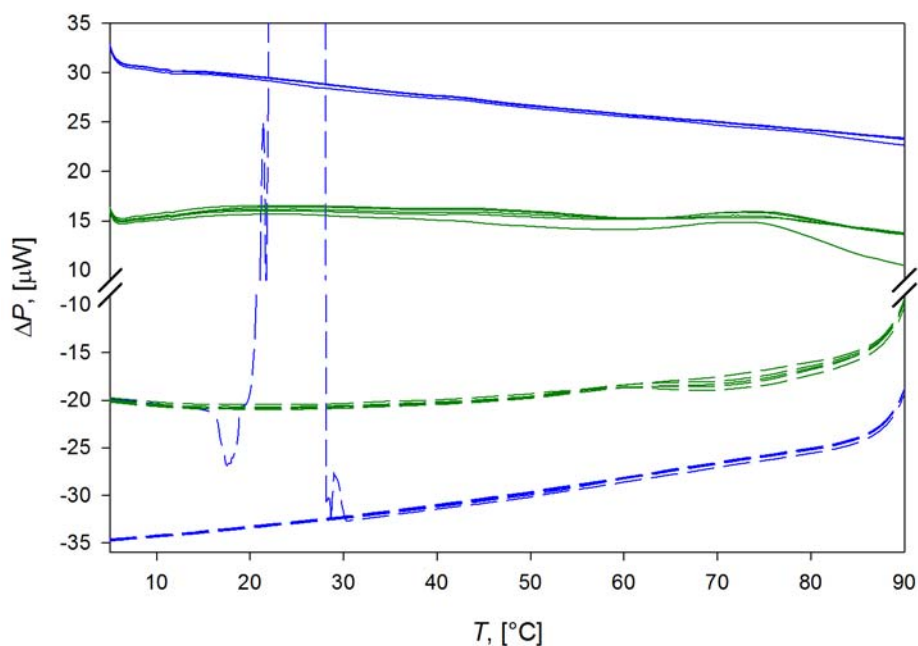
První série měla následující experimentální podmínky: měřili jsme v teplotním intervalu od 2 °C do 97 °C, rychlost změny teploty byla 1 K min⁻¹ pro ohřívání i ochlazování. Před každým měřením byl proveden předběh a vzorky byly do měřící kyvety vkládány během měření výměnou za pufr. Měřená koncentrace TAR vlásenky byla 66 μM a aptameru R06 56 μM. Pro měření „kissing komplexu“ byly tyto roztoky smíchány objemově v poměru 1:1 (výsledná koncentrace všech vláken dohromady byla 61,125 μM).

Při druhé sérii měření jsme změnili rychlost ohřívání (resp. ochlazování) z 1 K min⁻¹ na 0,5 K min⁻¹. Dále jsme změnili koncentrace vzorků: TAR vlásenku jsme měřili při koncentraci 149,7 μM a aptamer R06 při koncentraci 125 μM. Pro měření „kissing“ komplexu jsme opět smíchali měřené vzorky v poměru 1:1 objemově (výsledná koncentrace všech vláken ve vzorku tedy byla 137,35 μM). Teplotní rozsah a použité rozpouštědlo zůstaly stejné jako při měření první série. Před všemi měřeními byl opět proveden předběh a roztoky vzorků byly umístěny do měřící kyvety během měření přístroje výměnou za pufr.

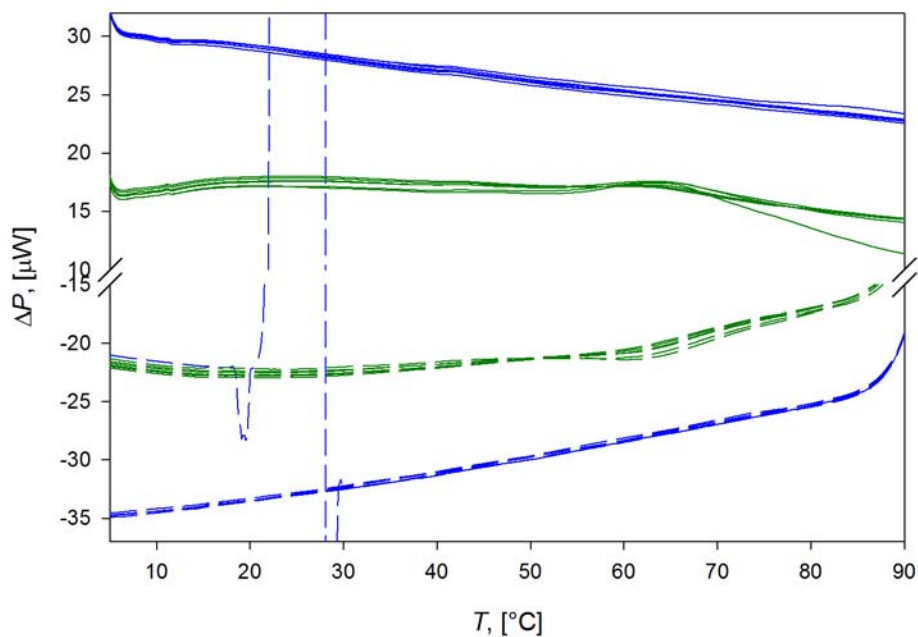
Naměřená data první série ukazují Obrázky 9.1 – 9.3, druhá série je pak na Obrázcích 9.4 – 9.6.



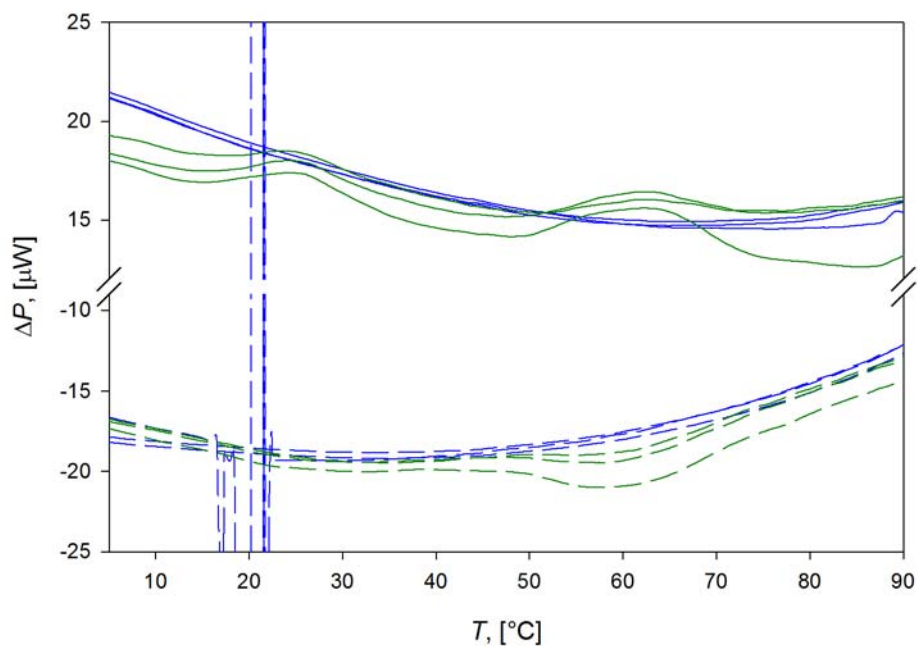
Obrázek 9.1: Záznam z měření aptameru R06 (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: CaNaKMg ; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 1 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.



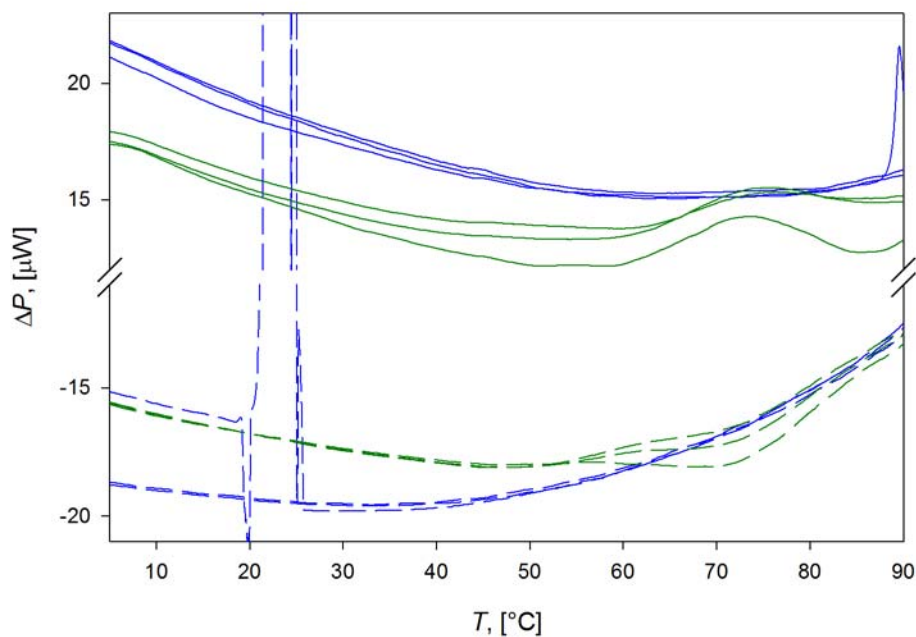
Obrázek 9.2: Záznam z měření vlásenky TAR (koncentrace: 66 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: CaNaKMg ; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 1 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.



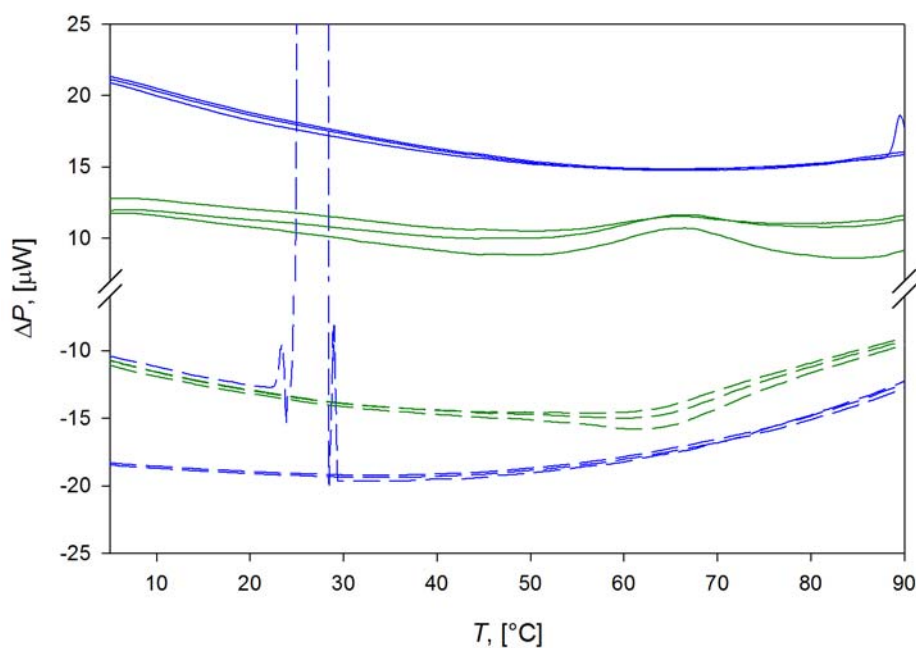
Obrázek 9.3: Záznam z měření směsi vlásenky TAR a aptameru R06 (koncentrace: 61,125 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: CacNaKMg; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 1 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.



Obrázek 9.4: Záznam z měření aptameru R06 (koncentrace: 125 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: CacNaKMg; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 0,5 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.



Obrázek 9.5: Záznam z měření vlásenky TAR (koncentrace: 149,7 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}/\text{MgCl}_2$; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 0,5 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.

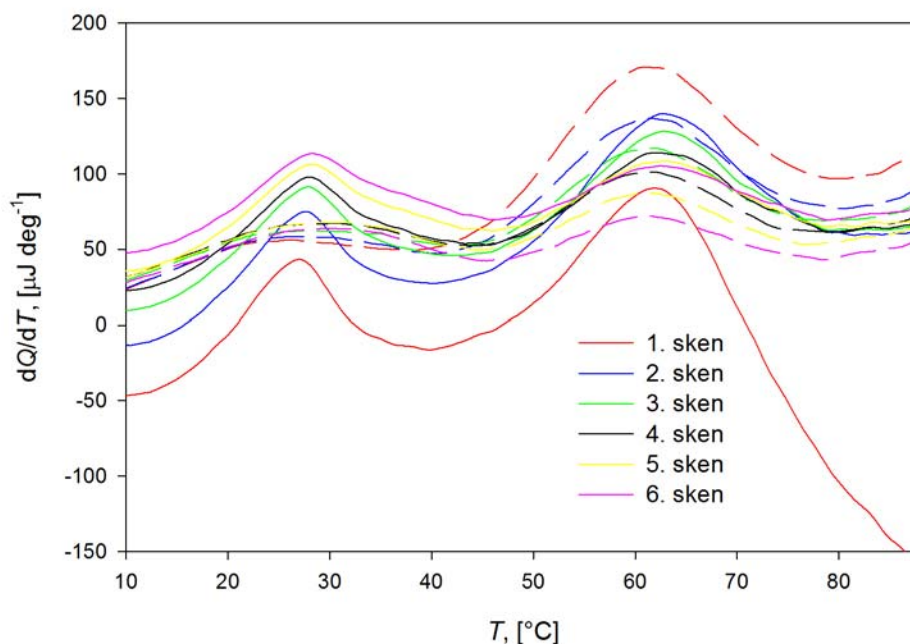


Obrázek 9.6: Záznam z měření směsi vlásenky TAR a aptameru R06 (koncentrace: 137,35 μM ve vláknech). Rozpouštědlo: $\text{CaCl}_2/\text{NaCl}/\text{MgCl}_2$; teplotní interval 2 – 97 $^{\circ}\text{C}$; rychlost změny teploty 1 K min^{-1} ; proveden předběh; vzorek vložen do kalorimetru za běhu přístroje. Zeleně jsou na obrázku základní linie a modře jsou skeny se vzorkem.

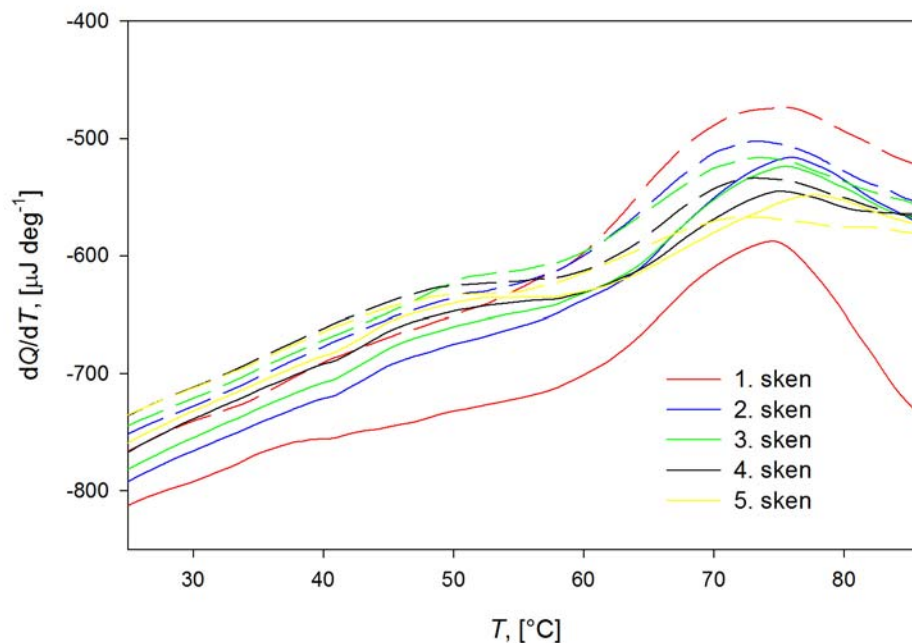
První série měla nižší koncentraci, a proto jsou v naměřených datech oblasti přechodu poměrně nevýrazné. U druhé série jsou však již oblasti přechodu výraznější. U aptameru R06 si můžeme všimnout při ohřívacích skenech existence dvou piků. U TAR vlásenky a „kissing“ komplexu je však v základních datech vidět pouze jedna oblast přechodu.

9.2 Předzpracování dat

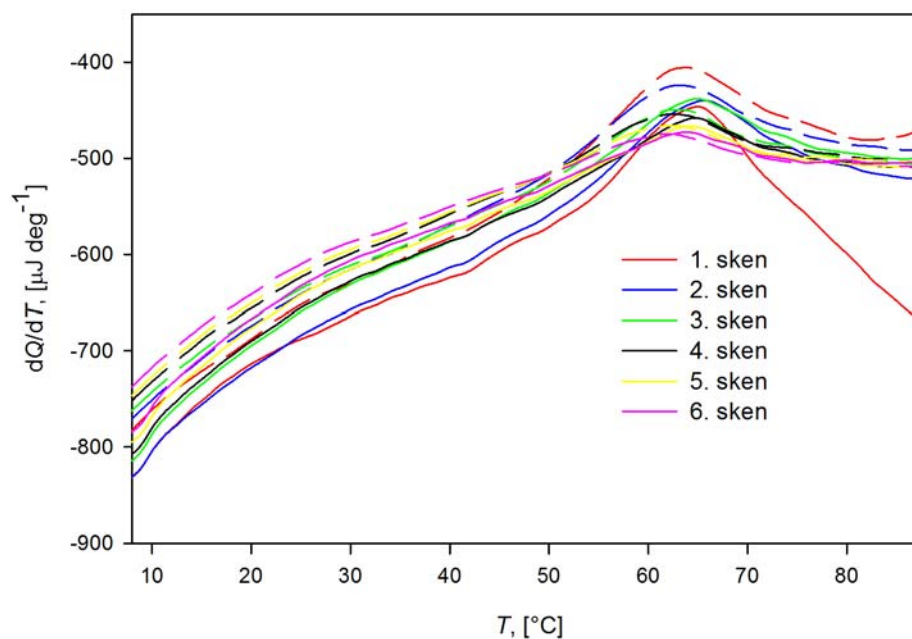
Naměřená data obou sérií byla předzpracována standardním způsobem: nejprve jsme dělili derivací teploty podle času, následně jsme odečetli základní linii od skenu se vzorkem a nakonec zkrátili teplotní interval. Předzpracovaná data první série jsou na Obrázcích 9.7 – 9.9; na Obrázcích 9.10 – 9.12 jsou pak předzpracovaná data druhé série.



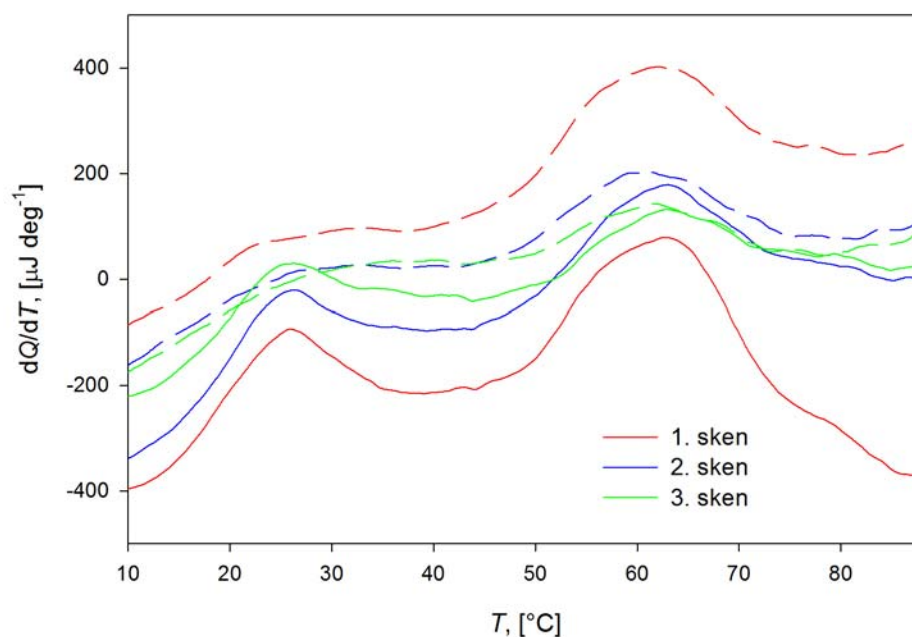
Obrázek 9.7: Aptamer R06 (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 10 – 88 $^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



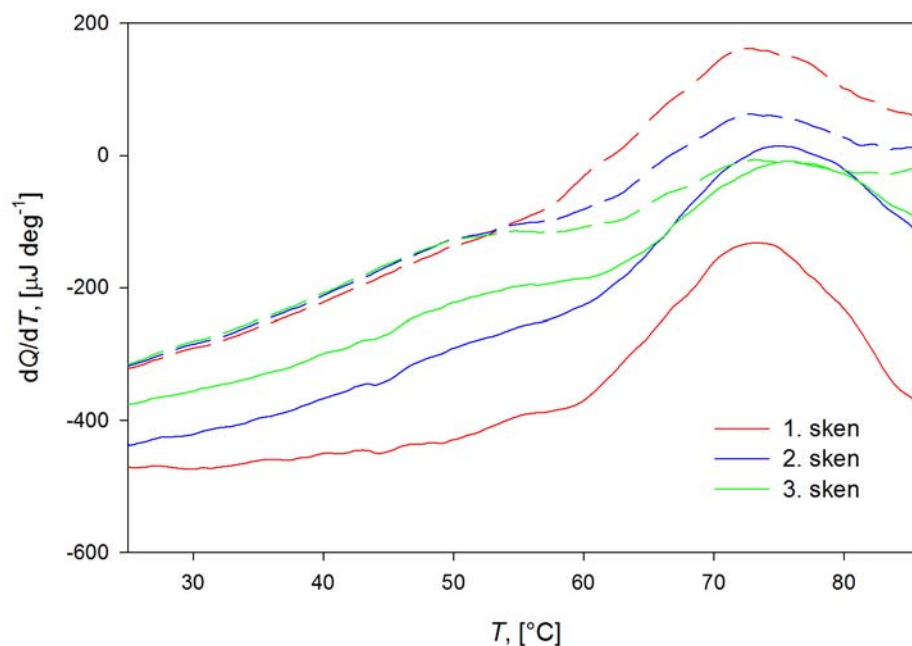
Obrázek 9.8: Vlášenska TAR (koncentrace: $66 \mu\text{M}$ ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na $25 - 86 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



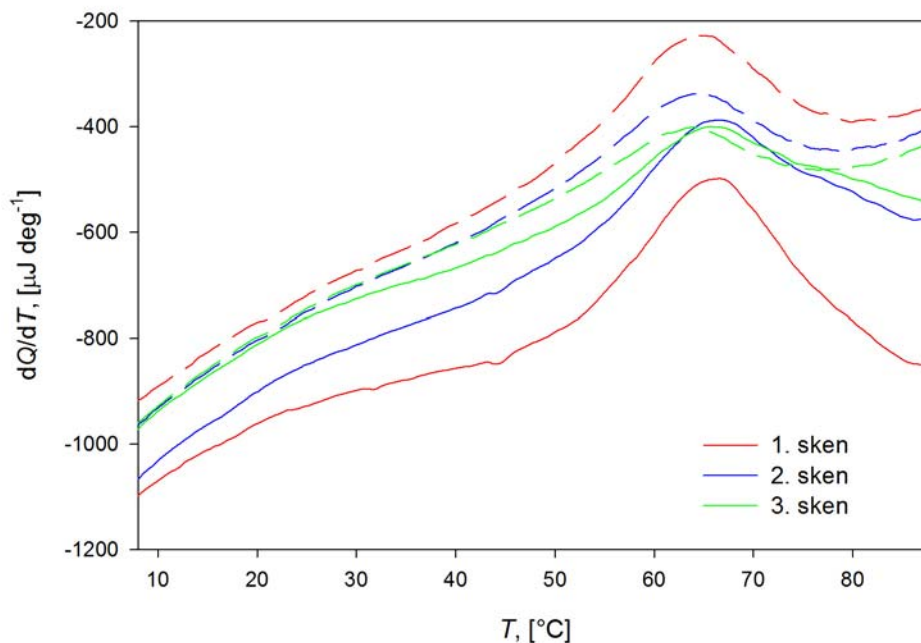
Obrázek 9.9: Směs vlásenky TAR a aptameru R06 (koncentrace: $61,125 \mu\text{M}$ ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na $8 - 88 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



Obrázek 9.10: Aptamer R06 (koncentrace: $125 \mu\text{M}$ ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na $10 - 88 ^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



Obrázek 9.11: Vlášenska TAR (koncentrace: $149,7 \mu\text{M}$ ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na $25 - 86 ^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).



Obrázek 9.12: Směs vlásenky TAR a aptameru R06 (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech; rozpouštědlo CaNaKMg). Předzpracovaná data (dělená derivací teploty podle času, odečtená základní linie a zúžený teplotní rozsah na 8 – 88 $^{\circ}\text{C}$). Barva křivky udává pořadí skenu, typ čáry pro ohřívání (plná čára) nebo ochlazování (přerušovaná čára).

Z předzpracovaných dat je vidět, že data druhé série mají překvapivě horší poměr signál/šum (křivky naměřené při první sérii jsou více hladké), přestože koncentrace vzorku byla vyšší. Podle všeho vyšší šum je důsledkem pomalejší změny teploty.

Po předzpracování se u vzorku aptameru R06 objevily v datech dva ostré píky, jak jsme již předpokládali z naměřených dat, přičemž nízkoteplotní pík má výrazně rozdílný tvar pro ohřívání a ochlazování. Můžeme tedy zde pozorovat hysterezi skenu pro ohřev a ochlazování. Vysokoteplotní pík u vzorku R06 je pro ohřívání a ochlazování shodný. Hystereze nízkoteplotního píku patrně souvisí s rychlostí ohřevu. Vzhledem k tomu, že rychlost změny teploty není dostatečně nízká, nestihne se při ochlazování sekundární struktura ustanovit dostatečně přesně, ale během 10 minut, při nichž kalorimetr čeká, než začne vzorek opět ohřívát, se sekundární struktura opět vytvoří (obnoví se). Proto opakované skeny pro ohřívání i opakované skeny pro ochlazování jsou shodné. Pro druhou sérii jsme zvolili pomalejší změnu teploty, avšak jak je vidět z Obrázku 9.10, snížení rychlosti na polovinu nestačí. Bylo by potřeba měřit se změnou teploty ještě pomalejší. Nízkoteplotní přechod může být spjat s rozvolněním struktury smyčky jako u vlásenky TAR (Vachoušek, 2008), nebo se může jednat o druhou možnou konformaci smyčky vlásenky, popřípadě se mohou párovat dvě vlákna (konce vytvoří šroubovice a mezi nimi vznikne výdut').

Naproti tomu u TAR vlásenky a směsi vlásenky TAR a aptameru R06 žádnou hysterezi nepozorujeme, skeny pro ohřev a ochlazování jsou v rámci chyby měření shodné (až na posunutí maxim pro ohřev a ochlazování vlivem setrvačnosti systému a kolísání pozadí následných skenu).

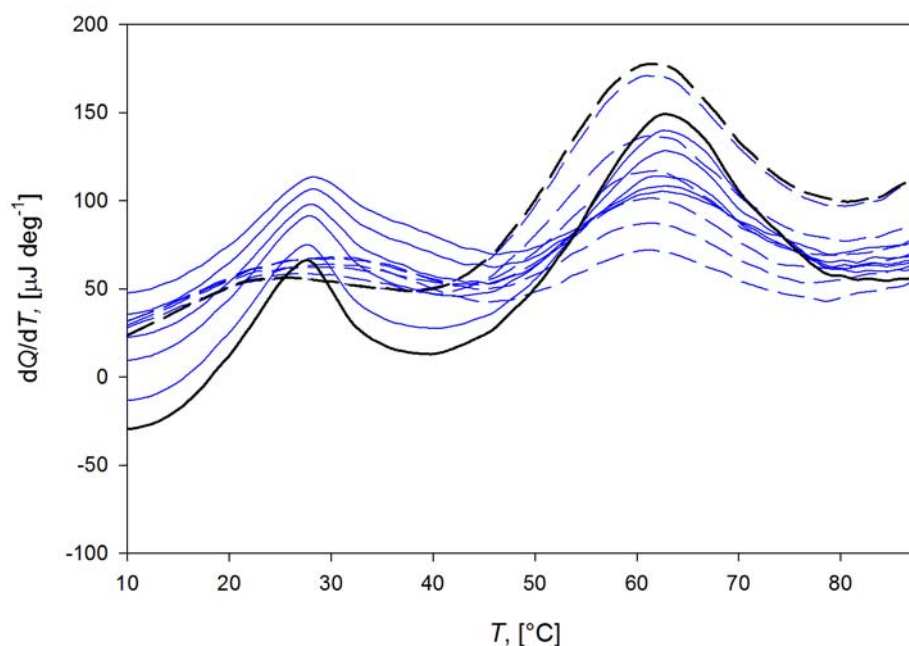
Vlásenka TAR nemá výrazný nízkoteplotní přechod jako vlásenka R06. Při vyšší rychlosti ohřívání je však vidět široký pás v oblasti nízkých teplot a výrazný pík u vysokých teplot. Při nižší rychlosti skenování jako by však nízkoteplotní pás zmizel.

V naměřených datech směsi vlásenky TAR a aptameru R06 vidíme opět jen jeden přechod u vysokých teplot. Toto maximum by však mělo být superpozicí tří dílčích maxim, protože předpokládáme tři přechody. První je rozpad „kissing“ komplexu a dva zbylé odpovídají otevření obou vlásenek. Naměřená data však ukazují pouze jednu oblast přechodu, což může naznačovat, že když dojde k rozvolnění jedné vlásenky, prakticky okamžitě dojde k rozpadu komplexu. Protože se u nízkých teplot neprojevil nízkoteplotní přechod, který jsme zaznamenali u vlásenky R06, předpokládáme, že pokud tento přechod souvisí s rozvolněním struktury vlásenky, tak komplex vlásenku stabilizuje natolik, že k tomuto rozvolnění nedojde. Pokud tento přechod souvisí s druhou konformací vlásenky, tak je vznik této konformace pro vznik komplexu nevhodný, a proto nevzniká.

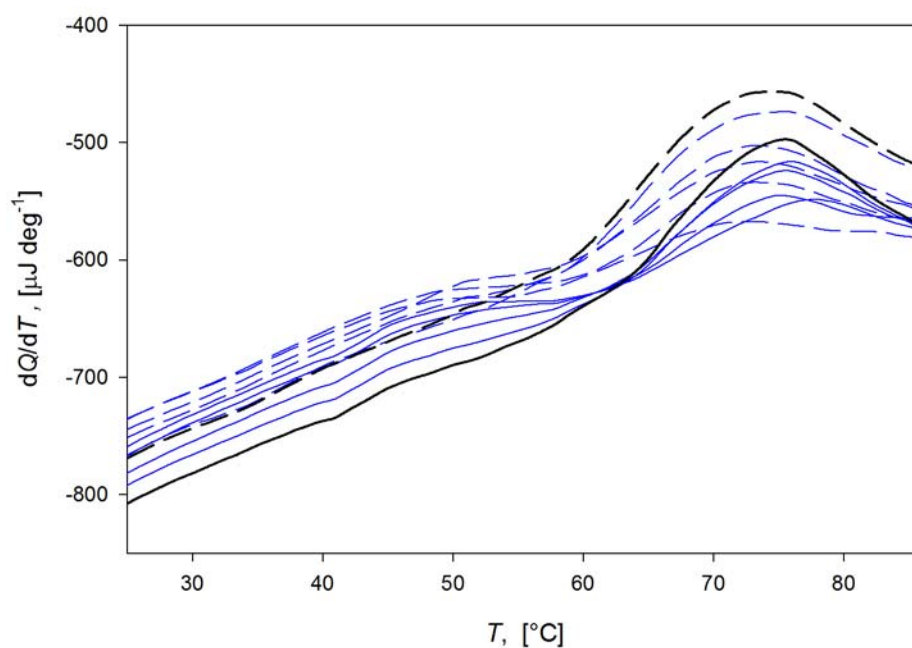
Můžeme si také všimnout, že ve všech případech vidíme již dříve zmíněný efekt, kdy se první sken liší od následných skenů. Proto jsme ho do dalšího zpracování dat nezahrnuli.

9.3 Zpracování dat, výsledky a diskuze

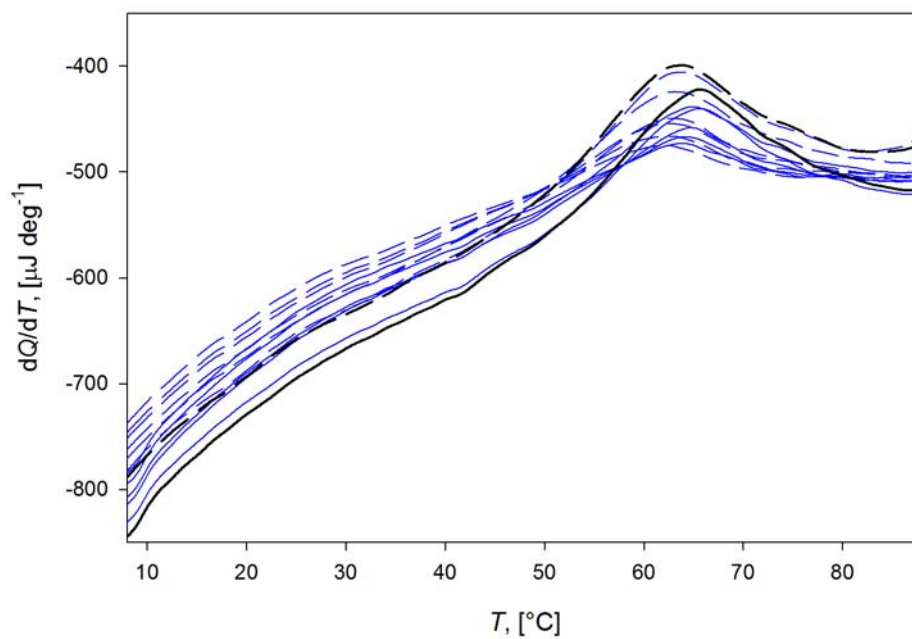
Z naměřených dat jsme určili skeny extrapolované na nulový čas, abychom vyloučili vliv změn ve vzorku, které s postupem času mohou v kalorimetru nastávat. Extrapolované skeny jsou na Obrázcích 9.13 –9.15 pro první sérii a na Obrázcích 9.16 – 9.18 pro druhou sérii.



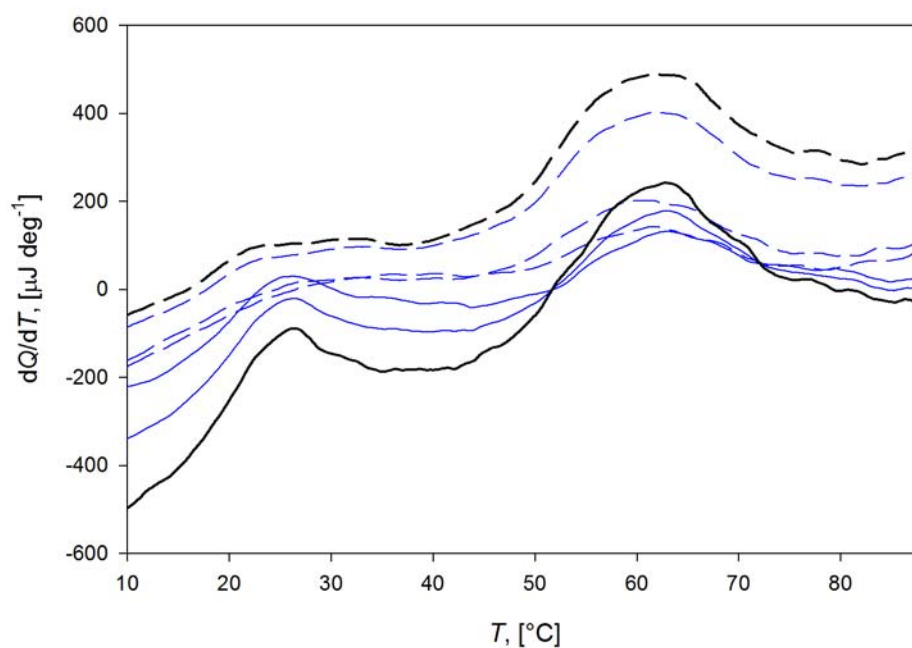
Obrázek 9.13: Aptamer R06 (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



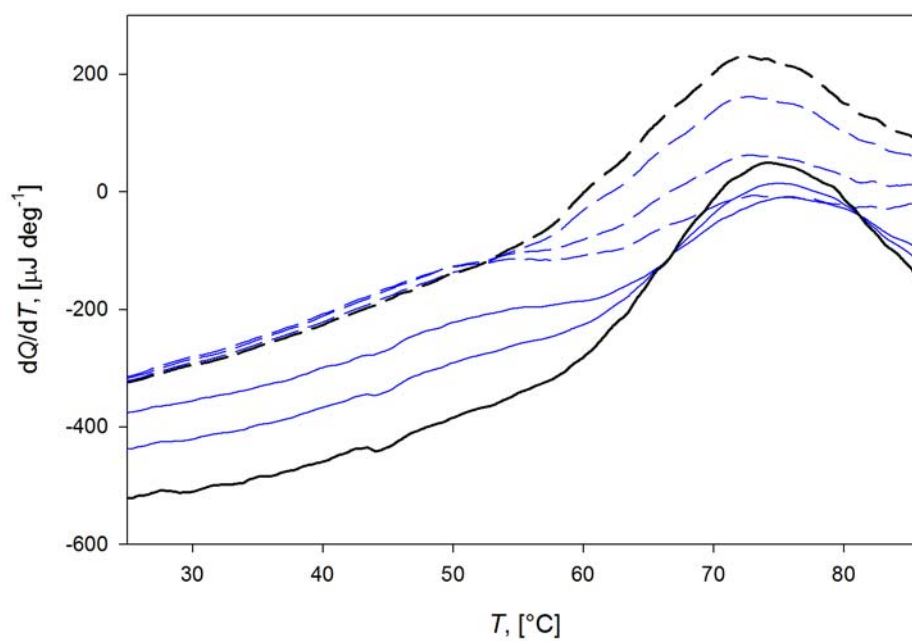
Obrázek 9.14: Vlášenska TAR (koncentrace: $66 \mu\text{M}$ ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



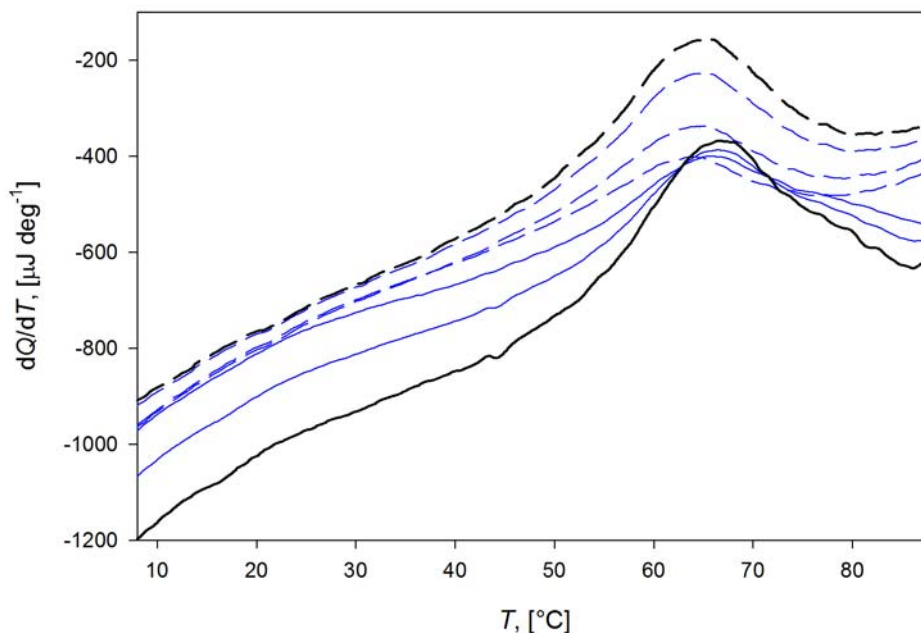
Obrázek 9.15: „Kissing“ komplex (koncentrace: $61,125 \mu\text{M}$ ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



Obrázek 9.16: Aptamer R06 (koncentrace: 125 μM ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



Obrázek 9.17: Vlása TAR (koncentrace: 149,7 μM ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.



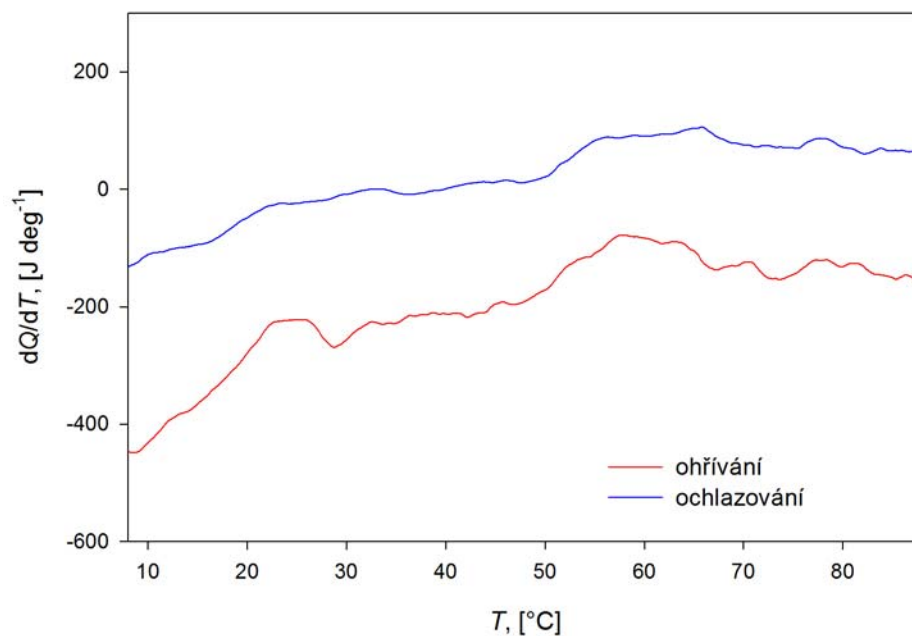
Obrázek 9.18: „Kissing“ komplex (koncentrace: 137,35 μM ve vláknech): extrapolované křivky (černé) naměřené křivky (modré). Ochlazování přerušovanou čarou; ohřívání plnou čarou.

Nejprve jsme zjišťovali, zda ve vzorku nedochází ke dvou- a vícemolekulárním přechodům. Od extrapolované experimentální křivky z druhé série jsme odečetli extrapolovanou experimentální křivku z první série přenásobenou poměrem koncentrací. Pokud by docházelo k tvorbě vícemolekulárních komplexů, projevilo by se to píkem v diferenciálním spektru, pokud však během měření dochází pouze k tvorbě a rozpadu vnitromolekulárních komplexů, diferenciální spektrum bude jen jakési pozadí.

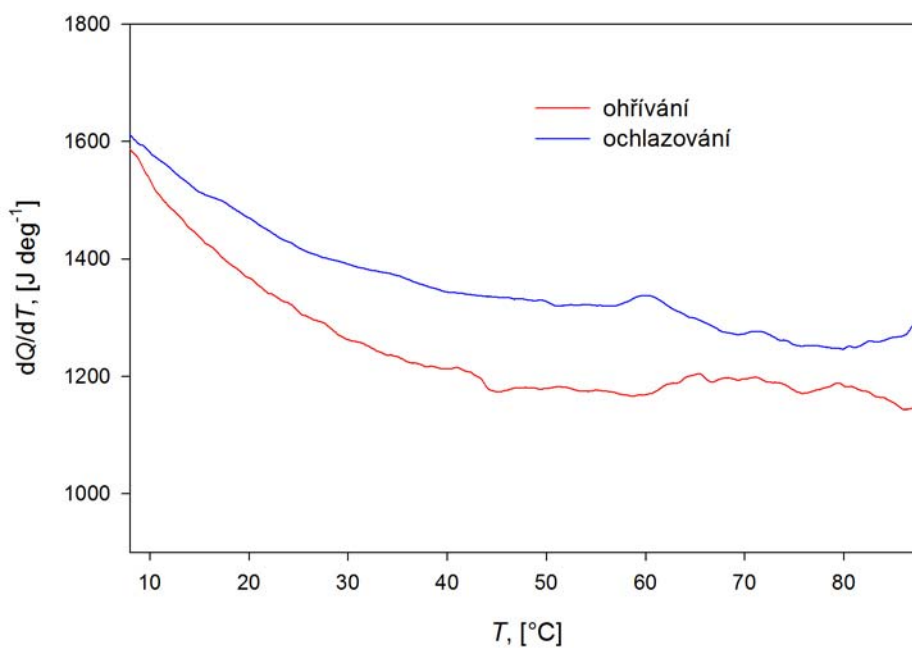
Na Obrázku 9.19 jsou uvedena diferenciální spektra pro ohřev a ochlazování aptameru R06. Trochu se propisuje do pozadí tvar původního spektra, což může být způsobeno částečným úbytkem oligonukleotidu. Z obrázku je však dobře patrné, že k žádným vícemolekulárním přechodům ve vzorku nedochází.

Diferenciální spektra pro ohřev a ochlazování jsme vytvořili i pro vlásenku TAR (viz Obrázek 9.20). Výsledná spektra jsou pouze zakřivená pozadí s nepatrným zbytkem hlavního maxima (pro ohřívání je tento zbytek kladný, pro ochlazování je záporný), což přisuzujeme efektu ubývání oligonukleotidu (viz část 7.3). Jinak v diferenciálním spektru není žádný příznak, že by během měření docházelo k nějakým dvoumolekulárním reakcím.

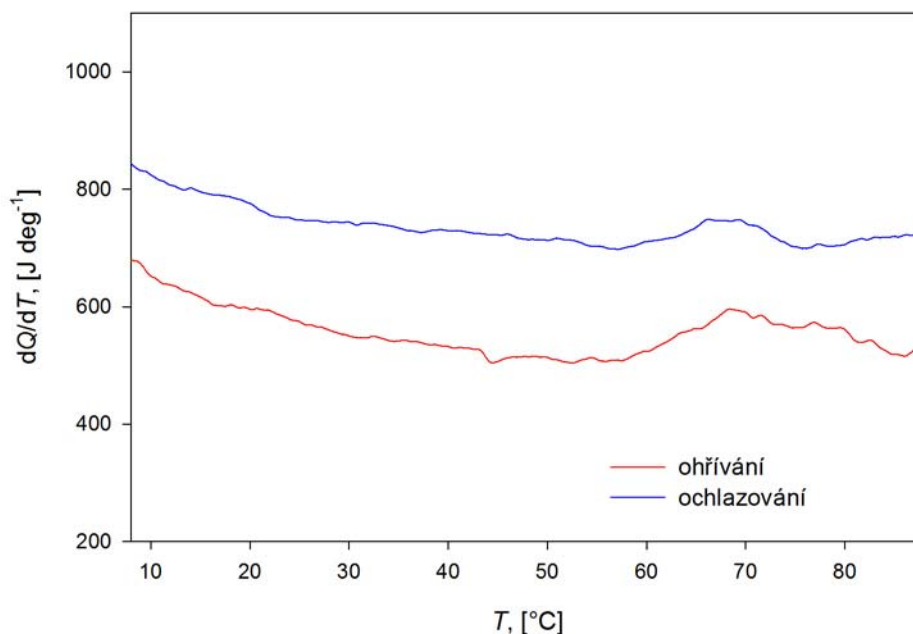
I pro směs vlásenky TAR a aptamer R06 jsme vytvořili diferenciální spektra stejným způsobem jako pro vlásenky (viz Obrázek 9.21). U tohoto vzorku jsme očekávali, že se v diferenciálním spektru objeví maximum související s tvorbou komplexu. Z obrázku je patrné, že se v diferenciálním spektru opravdu slabé maximum vyskytuje. Bohužel je toto maximum slabé a proto nemůžeme tyto skeny analyzovat fitem na nějaký komplexní model.



Obrázek 9.19: Diferenční spektra aptameru R06 – rozdíl mezi DSC křivkami naměřenými pro dvě různé koncentrace, křivky normované na koncentraci 125 μM .

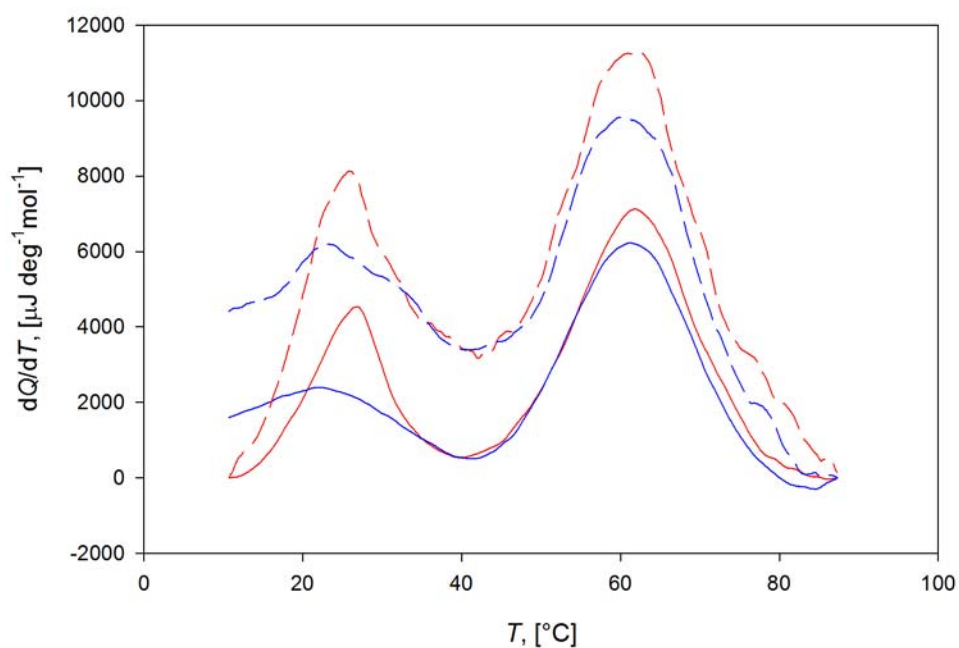


Obrázek 9.20: Diferenční spektra vlásenky TAR – rozdíl mezi DSC křivkami naměřenými pro dvě různé koncentrace, křivky normované na koncentraci 149,7 μM .

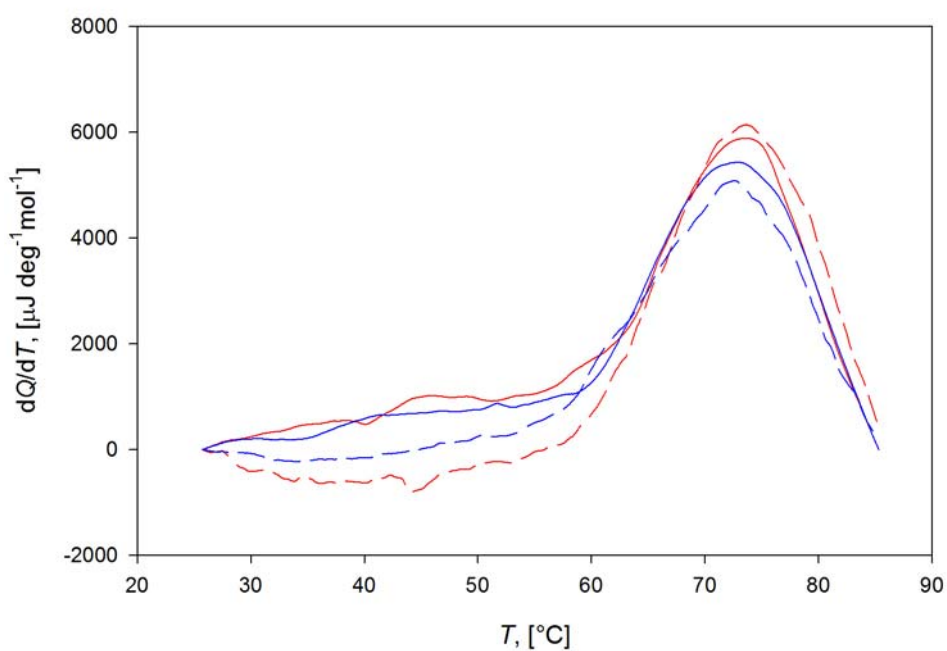


Obrázek 9.21: Diferenční spektra směsi vlásenky TAR a aptameru R06 – rozdíl mezi DSC křivkami naměřenými pro dvě různé koncentrace, křivky normované na koncentraci 137,35 μM .

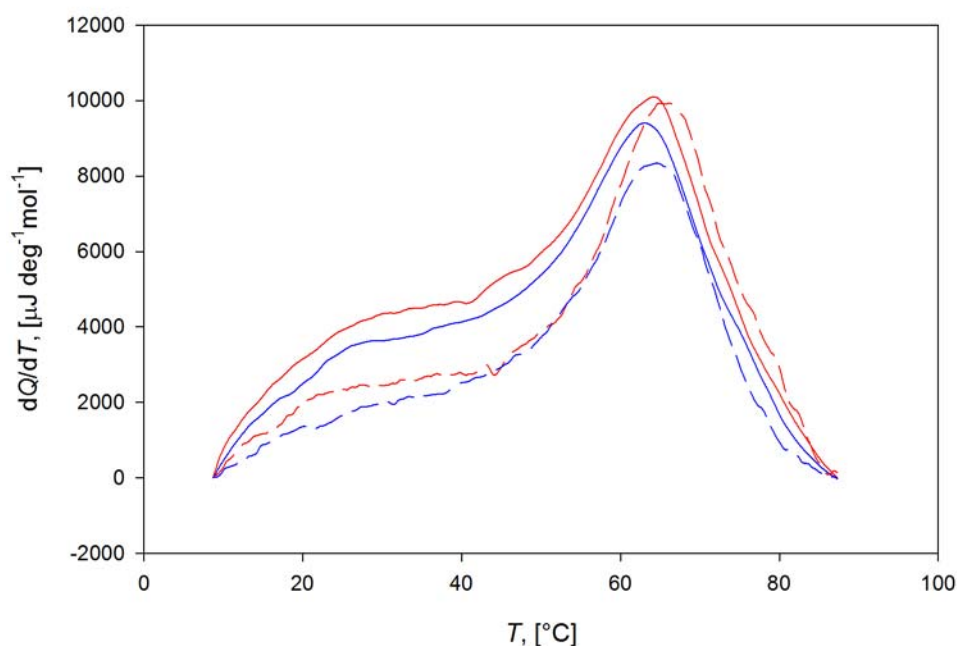
Dále jsme provedli korekci extrapolovaných skenů pro ohřívání a ochlazování podle zjištěné setrvačnosti přístroje (viz část 7.2). Extrapolované skeny první série jsme posunuli v teplotní škále o $0,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ohřívací sken jsme posunuli směrem k nižším teplotám a ochlazovací sken naopak směrem k vyšším teplotám) a druhé série o $0,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ohřívací sken jsme posunuli směrem k nižším teplotám a ochlazovací sken naopak směrem k vyšším teplotám). Dále byly od skenů odečteny přímky spojující počáteční a koncový bod skenu. Pro ochlazovací skeny aptameru R06 byla tato přímka odhadnuta, protože nízkoteplotní přechod (pík) je v rámci vyhodnocovaného teplotního úseku nedokončený. Výsledky jsou na Obrázcích 9.22 – 9.24. Z obrázků je vidět, že skeny pro ohřev a ochlazování pro vlásenku TAR a kissing komplex si v rámci jednoho experimentu velmi dobře odpovídají. Dále si můžeme všimnout dobré shody i mezi oběma experimenty. Hlavní maxima si odpovídají velice dobře, pouze v nízkoteplotní oblasti měřeného intervalu je shoda obou experimentů horší. Na křivkách pro aptamer R06 je vidět již výše zmíněná hystereze (nízkoteplotní pík), proto mají nízkoteplotní píky posunutá maxima v důsledku jiné velikosti teplotní změny.



Obrázek 9.22: Korigované extrapolované skeny aptameru R06 s odečtem odhadnutého přímkového pozadí. Červeně ohřívání; modře ochlazování. Plnou čarou první experiment (koncentrace: 56,25 μM), přerušovanou čarou druhý experiment (koncentrace: 125 μM).



Obrázek 9.23: Korigované extrapolované skeny vlásenky TAR s odečtem odhadnutého přímkového pozadí. Červeně ohřívání; modře ochlazování. Plnou čarou první experiment (koncentrace: 66 μM), přerušovanou čarou druhý experiment (koncentrace: 149,7 μM).



Obrázek 9.24: Korigované extrapolované skeny směs vlásenky TAR a aptameru R06. Červeně ohřívání; modře ochlazování. Plnou čarou první experiment (koncentrace: 61,125 μM), přerušovanou čarou druhý experiment (koncentrace: 137,35 μM).

Extrapolované skeny pro vlásenku TAR i aptamer R06 (při tomto zpracování jsme neanalyzovali hysterezi nízkoteplotního přechodu, jen jsme zpracovávali výsledky z křivek při ohřívání a při ochlazování samostatně) jsme zpracovávali fitem na dva přechody (viz Obrázky 9.25 – 9.28) podle rovnice (6.34). Jako odhad parametrů jsme vzali hodnoty, které nám vyšli z fitování na jeden přechod (teplotní interval jsme rozdělili na dva úseky odpovídající prvnímu a druhému přechodu a každý úsek zvlášť jsme fitovali rovnicemi pro jeden jednomolekulární přechod – viz část 6.5 „Termodynamické modely: dvoustavový model“). Ačkoliv u TAR vlásenky není v naměřených datech nízkoteplotní přechod tak dobře patrný jako u vlásenky R06, přesto jsme i tato data zpracovávali fitem na dva přechody, protože zejména u prvního experimentu (koncentrace 66 μM) to vypadá, že by se v nízkoteplotní části mohl nějaký široký pás vyskytovat a od fitu na dva přechody jsme očekávali, že by ho mohl odhalit. Dále jsme ze získaných parametrů vypočítali podle vztahu (1.7) změnu Gibbsovy energie pro oba přechody. Všechny získané výsledky jsou uvedeny v Tabulce 9.1 pro vlásenku R06 a v Tabulce 9.2 pro vlásenku TAR. Chyby měření jsme odhadli na 3 % jako chybu v určení pozadí a k ní jsme přičetli chybu 3 % jako celkovou chybu zařízení zjištěnou v části 7.1 „Kalibrace kalorimetru“. Celková chyba je tedy 6 % z výsledných hodnot uvedených v tabulkách.

Z naměřených dat směsi vlásenky TAR a aptameru R06 jsme nezískali termodynamické parametry, protože se jedná o složitý systém, ve kterém dochází jak k dvoumolekulárním reakcím, tak i jednomolekulárním přechodům. Přesnost DSC křivek není dostatečná k tomu, abychom k jejich vyhodnocení mohli použít složitý model předpokládající několik přechodů.

Z vypočítaných hodnot uvedených v Tabulkách 9.1 a 9.2 je vidět, že hodnoty získané pro vysokoteplotní pík si velmi dobře odpovídají, zatímco hodnoty pro nízkoteplotní „přechod“ jsou značně rozdílné. U TAR vlásenky se potvrdilo, že u prvního experimentu (66 μM) se vyskytuje u nízkých teplot široký pás, zatímco u

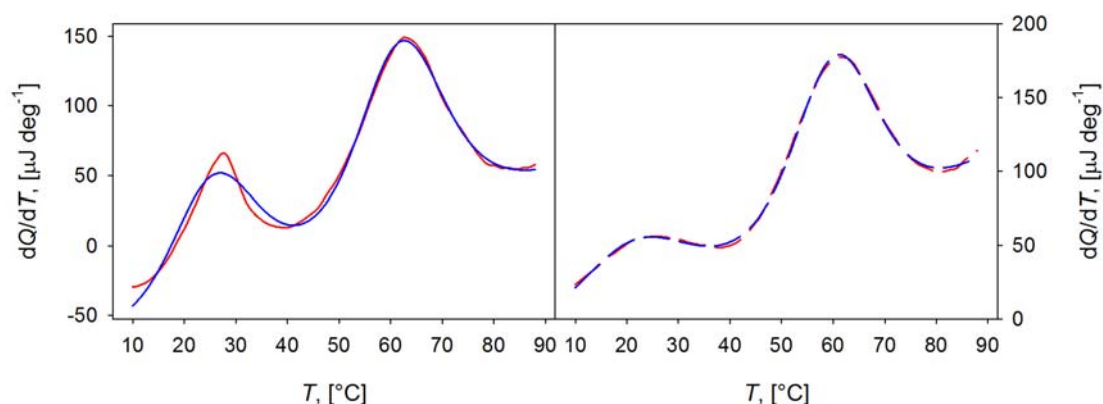
druhého experimentu (149,7 μM) žádný pás není. Hodnoty změny Gibbsovy energie jsou pro ohřívání a ochlazování v dobré shodě. Pouze pro nízkoteplotní přechod u TAR vlásenky se více odlišují.

Tabulka 9.1: Získané termodynamické parametry pro aptamer R06 z fitu na dva přechody.

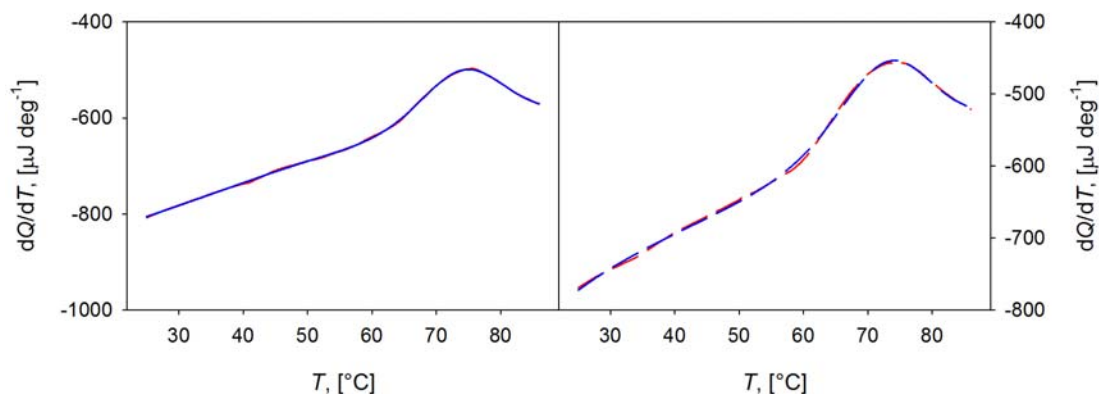
aptamer R06	56,25 μM		125 μM	
	ohřívání	ochlazování	ohřívání	ochlazování
ΔH_1 [kcal mol ⁻¹]	-31,6	-23,1	-38,2	-27,6
ΔS_1 [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-105,7	-78,4	-128,3	-92,8
ΔH_2 [kcal mol ⁻¹]	-41,0	-40,4	-43,4	-42,6
ΔS_2 [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-122,1	-120,8	-129,8	-127,5
$\Delta G_{1,37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	1,2	1,2	1,6	1,2
$\Delta G_{2,37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	-3,1	-2,9	-3,2	-3,0

Tabulka 9.2: Získané termodynamické parametry pro vlásenku TAR z fitu na dva přechody.

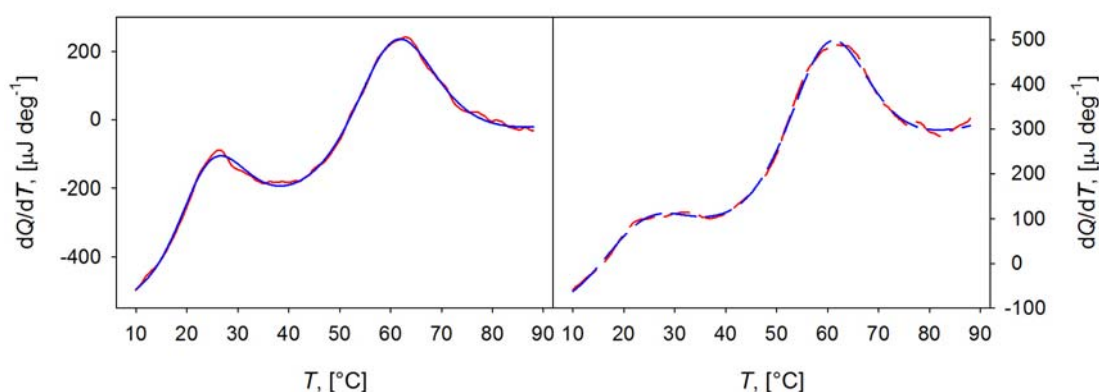
vlásenka TAR	66 μM		149,7 μM	
	ohřívání	ochlazování	ohřívání	ochlazování
ΔH_1 [kcal mol ⁻¹]	-20,1	-24,1	-6,2	0
ΔS_1 [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-60,3	-84,9	-16,1	0
ΔH_2 [kcal mol ⁻¹]	-43,2	-44,0	-40,0	-41,7
ΔS_2 [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-124,4	-126,6	-117,1	-121,8
$\Delta G_{1,37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	-1,4	2,2	-1,2	0
$\Delta G_{2,37^\circ\text{C}}$ [kcal mol ⁻¹]	-4,7	-4,7	-3,6	-4,0



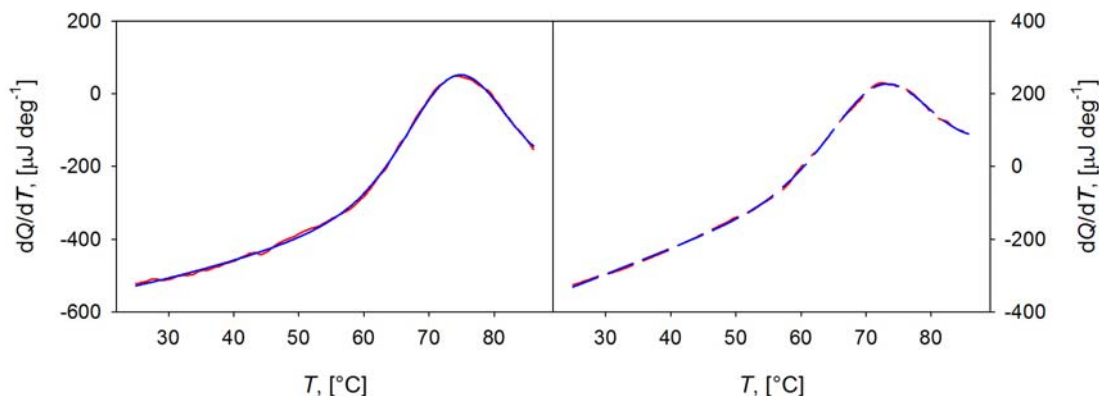
Obrázek 9.25: Fity extrapolovaných skenů – aptamer R06 (koncentrace 56,25 μM ve vláknech). Vlevo data pro ohřev, vpravo data pro ochlazování. Červeně experimentální křivka, modře průběh podle modelu s naitovanými parametry.



Obrázek 9.26: Fity extrapolovaných skenů – vlásenka TAR (koncentrace 66 μM ve vláknech). Vlevo data pro ohřev, vpravo data pro ochlazování. Červeně experimentální křivka, modře průběh podle modelu s naitovanými parametry.



Obrázek 9.27: Fity extrapolovaných skenů – aptamer R06 (koncentrace 125 μM ve vláknech). Vlevo data pro ohřev, vpravo data pro ochlazování. Červeně experimentální křivka, modře průběh podle modelu s naitovanými parametry.



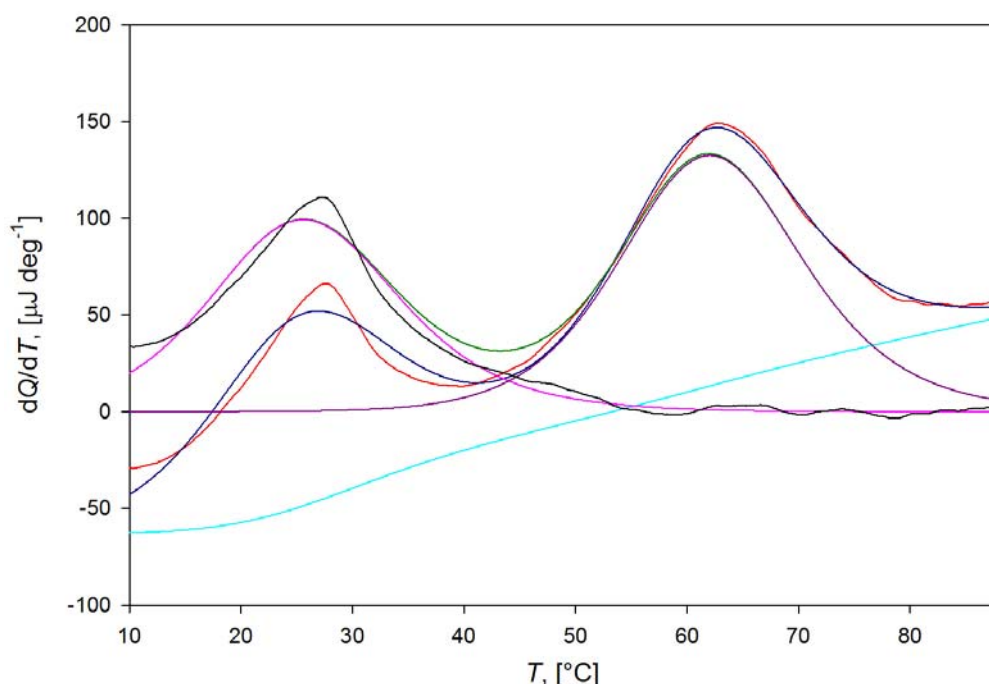
Obrázek 9.28: Fity extrapolovaných skenů – vlásenka TAR (koncentrace 149,7 μM ve vláknech). Vlevo data pro ohřev, vpravo data pro ochlazování. Červeně experimentální křivka, modře průběh podle modelu s naitovanými parametry.

9.4 Aptamer R06 – hystereze

Podle článku Rougee a kol.(1992), kde autoři navrhli postup, jakým by bylo možné experimentálně určené hysterézní průběhy vyhodnotit, jsme se pokusili vyhodnotit naše naměřená data pro aptamer R06, konkrétně tu část dat, která odpovídá nízkoteplotnímu přechodu. Citovaný článek se týkal tvorby triplexů a

měření teplotní závislosti UV absorpce, avšak úvaha je univerzální a na jednomolekulární přechod měřený pomocí DSC ji lze aplikovat. Teorie a všechny související rovnice byly uvedeny již dříve v části 6.7 „Termodynamické modely: hystereze“.

Nejprve však bylo potřeba z naměřených dat odseparovat nízkoteplotní přechod. Separaci jsme provedli tak, že z fitu pro dva přechody jsme vystihli pozadí skenu a navýšení dané oběma přechody. Dále jsme oddělili navýšení odpovídající první a druhé oblasti přechodu. Na závěr jsme pozadí i horní přechod odečetli od experimentálních dat a zůstala nám křivka odpovídající nízkoteplotnímu píku (viz Obrázek 9.29). Takto získanou křivku jsme dále zpracovávali. Tím, že jsme odseparovali z naměřených dat vysokoteplotní pík, jsme získali veličinu úměrnou časové derivaci relativního výtěžku α . Vhodným normováním této veličiny lze získat derivaci relativního výtěžku podle teploty. Samotný relativní výtěžek α jsme určili integrací křivky a následným normováním.



Obrázek 9.29: Příklad separace nízkoteplotního píku z naměřených dat. Extrapolovaný sken pro ohřívání aptameru R06 z prvního měření (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech). Červeně naměřená křivka, modře naitovaná křivka, tyrkysově naitované pozadí, zeleně naitovaná křivka navýšení daného oběma přechody, růžová naitovaná křivka navýšení prvního přechodu, fialová naitovaná křivka navýšení druhého přechodu a černá křivka experimentálních dat po odečtení naitovaného pozadí a naitované křivky navýšení druhého přechodu.

Problémem je, že píky nízkoteplotního přechodu nejsou celé, chybí jim vždy část pro nejnižší teploty (viz Obrázek 9.30). Kdyby byly píky symetrické, mohli bychom odhadnout chybějící část, ale právě hystereze vede k asymetrii, takže pro ohřívání by měla být větší část píku od maxima směrem k vyšším teplotám a pro ochlazování naopak. Avšak integrály přes celý teplotní obor by měly být pro ohřev a ochlazování stejné, tedy měl by platit vztah:

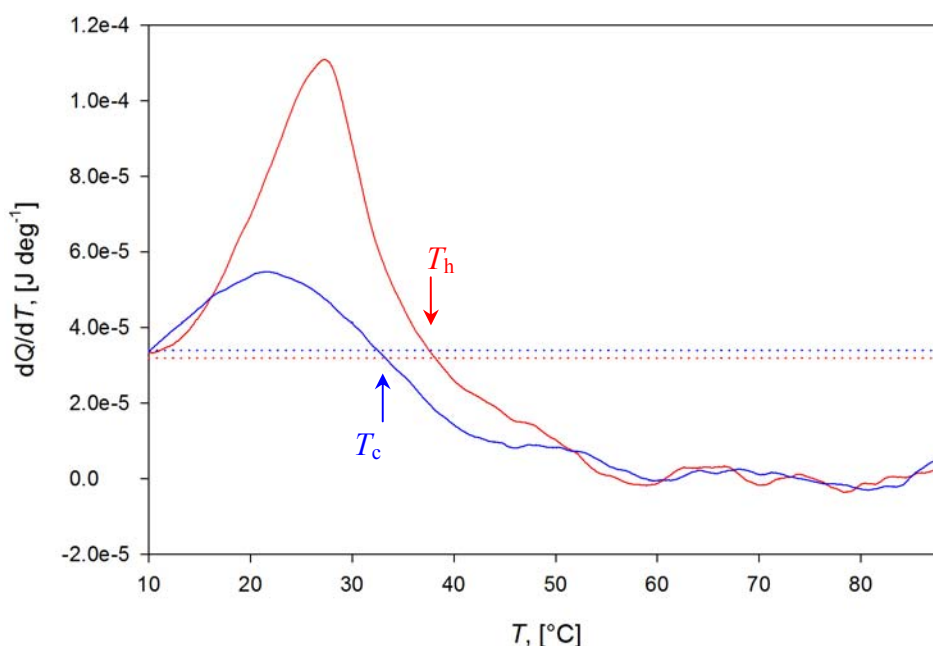
$$I_h = \int \frac{dQ_h}{dT} dT = I_c = \int \frac{dQ_c}{dT} dT = -V_{\text{cell}} C_{\text{vz}} \Delta H_1, \quad (9.1)$$

kde I_h (resp. I_c) je integrál křivky pro ohřev (resp. ochlazování).

Integrály spočítané přes celý experimentálně dostupný interval označíme I_h^{exp} , resp. I_c^{exp} , a integrály přes symetricky položenou část křivky k chybějící části označíme $I_h^{T_h}$, resp. $I_c^{T_c}$ (T_h , resp. T_c , v horním indexu značí, od které teploty začíná symetrická část, od této teploty integrujeme celý zbytek teplotního intervalu, viz Obrázek 9.30). A dále označíme B_h a B_c chybějící části. Platí následující vztahy:

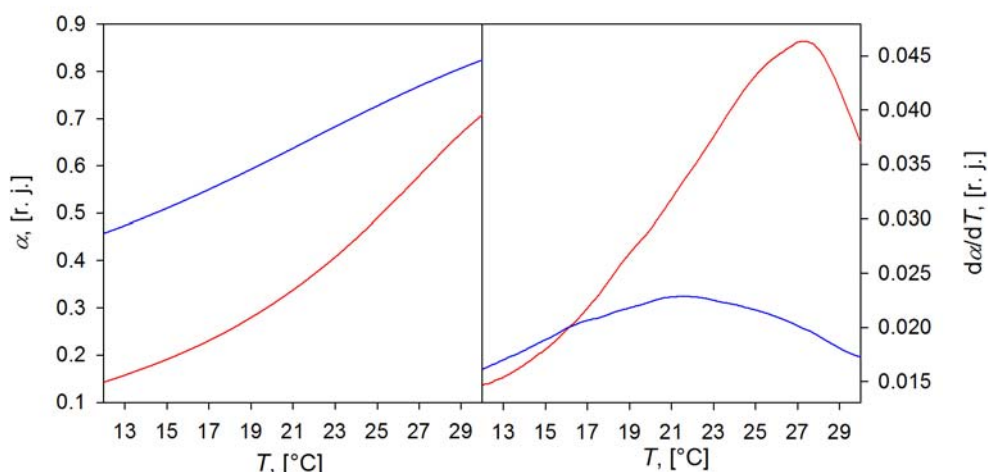
$$\begin{aligned} I_h &= I_h^{\text{exp}} + B_h = I_c = I_c^{\text{exp}} + B_c \\ 0 < B_h < I_h^{T_h} &, \\ I_c^{T_c} < B_c & \end{aligned} \quad (9.2)$$

Z těchto nerovnic dostaneme meze pro B_h . V rámci zpracování dat jsme přes získaný interval možných B_h položili síť 10 ekvidistantních bodů a pro každý bod jsme provedli vyhodnocení pomocí rovnic uvedených v části 6.7.



Obrázek 9.30: Ilustrace k dopočtu chybějící nízkoteplotní části. Aptamer R06 (koncentrace: 56,25 μM ve vláknech). Červeně data pro ohřívání, modře data pro ochlazování.

Z hodnoty B_h jsme nejprve vypočítali hodnoty B_c a dále hodnoty I_h a I_c ze vztahů (9.2). Dále jsme získali posunutě integrační křivky, abychom získali veličiny α_h , $\frac{d\alpha_h}{dt}$, α_c , $\frac{d\alpha_c}{dt}$, normovali jsme tak, aby limitní hodnota α_h a α_c při vysokých teplotách byla 1 (viz Obrázek 9.31). Dále jsme podle rovnic (6.54) spočítali velikosti rychlostních konstant. Poté jsme omezili teplotní interval tak, aby se příliš neuplatňovala chyba v odečtu horního přechodu (v našem případě se jedná o interval 12 – 30 $^{\circ}\text{C}$) a na tomto intervalu jsme fitovali rovnice (6.56) a (6.57). Dopočtem podle rovnic (6.47), (6.55), (6.56), (6.57) a (6.58) jsme získali aktivační energii, změnu entalpie a změnu entropie.



Obrázek 9.31: Vlevo teplotní závislost relativního výtěžku. Vpravo teplotní závislost derivace relativního výtěžku podle teploty. Červeně data pro ohřívání, modře pro ochlazování.

Z deseti hodnot pro každý bod sítě jsme určili průměrnou hodnotu a střední kvadratickou odchylku σ . Jako chybu získaných parametrů bereme 3σ , dále k chybě přidáváme celkovou chybu zařízení (3 % z výsledné hodnoty – viz část 7.1 „Kalibrace kalorimetru“) a ještě 3 % z výsledné hodnoty, jako chybu způsobenou nepřesnostmi v odečtu pozadí a vysokoteplotního píku.

Ze získané aktivační energie ΔE pro obě koncentrace jsme vypočítali její přirozený logaritmus. Jako výslednou hodnotu odhadu aktivační energie bereme průměrnou hodnotu logaritmů a jako chybu uvažujeme polovinu jejich rozdílu.

Výsledné hodnoty pro obě koncentrace i s určenými chybami jsou v Tabulce 9.3. Z výsledných hodnot uvedených v tabulce je vidět dobrá shoda hodnot ΔH a ΔS pro oba experimenty.

Tabulka 9.3: Získané termodynamické parametry pro nízkooteplotní přechod aptameru R06 na základě analýzy s uvažováním hystereze DSC křivky.

	56,25 μM	125 μM
ΔH [kcal mol ⁻¹]	-22,9 \pm 4,1	-25,4 \pm 2,5
ΔS [cal mol ⁻¹ K ⁻¹]	-78 \pm 14	-86 \pm 9
$\ln(\Delta E)$	2,1 \pm 0,7	

Závěr

V rámci předkládané diplomové práce byly prověřeny parametry diferenciálního skenovacího mikrokolorimetru a prověřena jeho přesnost a spolehlivost při měření vodných roztoků nukleových kyselin. Byl stanoven postup měření a zpracování dat. Dále byly určeny termodynamické parametry komplexů mezi sadou modifikovaných deoxythymidinových patnáctimerů a komplementárním RNA polymerem a studovány krátké RNA vlásenky, TAR viru HIV a jeho aptamer R06. Konkrétně byly dosažené tyto výsledky:

1. Vlastnosti zařízení a metodika experimentu.

- Byla určena přesnost zařízení pomocí dvou látek s tabelovanou tepelnou kapacitou. Chyba udávaného vyrovnávacího příkonu nepřesahuje 3 % jeho hodnoty.
- Byla zjištěná setrvačnost systému a její velikost stanovená na (42 ± 10) s.
- Bylo zjištěno, že z přívodních trubiček lze odsát 50 μ l aniž by to nějakým způsobem ovlivnilo měření, toto množství však představuje pouze čtvrtinu obsahu přívodních trubiček a jeho odsátí zřejmě neumožní eliminovat nežádoucí efekty prisuzované interakci molekul měřeného roztoku se stěnami přívodních trubiček.
- Zjistili jsme, že fosfátový pufr je pro měření pomocí DSC vhodný pouze bez přítomnosti hořčíku. Pro práci s hořčíkem byla ověřená dobrá použitelnost kakodylátového pufru.
- Prokázali jsme, že předběh (teplotní cyklování s pufrem v obou kyvetách, který je pro vlastní měření vyměněn) před započítáním měření stabilizuje základní linii.
- Pokud se vzorek vloží do kyvety výměnou za pufr během měření přístroje, pak jsou naměřené skeny stabilnější a získané termodynamické parametry z jednotlivých skenů méně fluktuují. Také jsme zjistili, že měřicí postup nemá vliv na odlišnost v prvním skenu se vzorkem, ta je zřejmě způsobena vytvořením mikrobublinek při vkládání vzorku do kyvety.

2. Hybridní komplexy modifikovaných oligodeoxythymidinů s RNA.

- Byly proměřeny ekvimolární směsi (v bázích) čtyř modifikovaných 15-merů a jednoho přirozeného s poly(rA) a určeny termodynamické parametry vzniklých hybridních komplexů, včetně parametru kooperativity vazby oligomerů na polymer. Tyto údaje umožňují nejen posouzení hybridizačních schopností jednotlivých typů modifikací a tedy vhodnost pro potenciální využití při antisensní terapii, ale umožní i zkompletovat výsledky měření Ramanových spekter, která by měla odhalit souvislosti se strukturními odchylkami v jednotlivých řetězcích.

- Modifikace s methylenovou skupinou na 3' konci, ve které jsou všechny spojky modifikované, s přirozenou polyadenylovou kyselinou nehybridizuje.
- Naopak modifikace s methylenovou skupinou na 5' konci, ve které se modifikované spojky střídají s nemodifikovanými, vytváří s přirozenou polyadenylovou kyselinou komplexy více stabilní než přirozený oligomer thyminu.
- Ostatní dvě modifikace (s methylenovou skupinou na 3' konci, ve které modifikované spojky alternují s nemodifikovanými, a modifikace s methylenovou skupinou na 5' konci se všemi spojkami modifikovanými) vytváří s přirozenou kyselinou polyadenylovou komplexy, avšak méně stabilní než vytváří přirozený oligomer.
- Pomocí Mc Ghee – von Hipplova modelu jsme zjistili velmi vysokou (a prakticky stejnou) kooperativitu vazby oligonukleotidů (kromě modifikace, která komplexy nevytváří) na polymerní vlákno.

3. Krátké RNA vlásenky a jejich komplex

- Byla proměřená vrcholová vlásenka segmentu TAR z RNA HIV-1, její aptamer R06 a jejich ekvimolární směs, kde dochází k tvorbě „kissing“ komplexů.
- Byly určeny termodynamické parametry přechodů otevření vlásenky u obou oligonukleotidů.
- U aptameru R06 byl zjištěn druhý výrazný přechod v oblasti teplot kolem 25 °C. Tento přechod vykazuje výraznou hysterezi křivek při ohřevu a ochlazování a to i při menší teplotní změně 0,5°C min⁻¹. Bylo ověřeno, že se jedná o jednomolekulární přechod, a byly určeny termodynamické charakteristiky tohoto přechodu včetně odhadu aktivační energie.
- U vlásenky TAR nebyl zjištěn výrazný druhý přechod. Pokud existuje, pak je velmi široký a zasahuje od nejnižších teplot až do oblasti otvírání vlásenky.
- DSC křivky směsi vlásenek TAR a R06 se výrazně odlišují od superpozice křivek pro samostatné vlásenky, což prokazuje vznik komplexů. Vzhledem ke složitosti systému nebylo možné tyto komplexy termodynamicky charakterizovat, je však zřejmé, že komplex strukturně stabilizuje vlásenky – přinejmenším R06, neboť jeho výrazný nízkoteplotní přechod se ve směsi nepozoruje.

Poděkování za finanční podporu

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy (výzkumný záměr MSM0021620835), Grantové agentury České Republiky (projekt 203/05/0827) a Grantové agentury Univerzity Karlovy v Praze (projekt 1475/07).

Zkratky

(dT)₁₅	přirozený deoxythymidinový patnáctimer
2'-OMe	2'- <i>O</i> -methyl
2'MOE	2'- <i>O</i> -methoxy-ethyl
A	adenin
ARP	peptid bohatý na arginin (arginine rich peptid)
ASO	antisensní oligonukleotid
AV ČR	Akademie věd České republiky
C	cytosin
CacKMg	50 mM kakodylátový pufr, 50 mM KCl, 2 mM MgCl ₂ , pH 6,2
CacNaKMg	20 mM kakodylátový pufr, 20 mM NaCl, 140 mM KCl, 3 mM MgCl ₂ , pH6,3
CD	cirkulární dichroismus (circular dichroism)
CeNAs	cyklohexan nukleové kyseliny
CMV	cytomegalovirus
d[TP_c]₁₄T	modifikace (dT) ₁₅ , ve které se -CH ₂ - skupina nachází na 3' konci spojky a všechny spojky jsou modifikované
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribonucleic acid)
DSC	diferenční skenovací kalorimetrie (differential scanning calorimetry)
dsDNA	dvouvláknová DNA (double-strand DNA)
dT[p_cT]₇	modifikace (dT) ₁₅ , ve které se -CH ₂ - skupina nachází na 5' konci spojky a všechny spojky jsou modifikované
dT[T-p_cT]₇	modifikace (dT) ₁₅ , ve které se -CH ₂ - skupina nachází na 5' konci spojky a modifikované spojky alternují s přirozenými
dT[TP_c-T]₇	modifikace (dT) ₁₅ , ve které se -CH ₂ - skupina nachází na 3' konci spojky a modifikované spojky alternují s přirozenými
EMSA	(electrophoretic mobility shift assay)
FANA	2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabino nukleová kyselina
FRET	fluorescenční rezonanční přenos energie (fluorescence resonance energy transfer)
FÚ UK	Fyzikální ústav Univerzity Karlovy
G	guanin
HIV	virus lidského imunodeficitu (human immunodeficiency virus)
HPLC	high performance liquid chromatography
IAsys	Interaction Analysis Systém
ITC	isotermální titrační kalorimetrie (isothermal titration calorimetry)
LNA	uzavřená nukleová kyselina (locked nucleic acid)
mRNA	messenger RNA
NMR	nukleární magnetická rezonance (nuclear magnetic resonance)
NPs	N3'-P5' fosforoamidáty
NTDB	Termodynamická databáze nukleových kyselin (Thermodynamic Database for Nucleic Acids)
PBNa	25 mM fosfátový pufr, 160 mM NaCl; pH 7,0
PBNa-HW	25 mM fosfátový pufr s 10 % D ₂ O, 200 mM Na ⁺ ; pH 7,0

PBNaMg	25 mM fosfátový pufr, 160 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ ; pH 7,0
PMO	fosforoamidát morfolino oligomer (phosphoroamidate morpholino oligomer)
PNA	peptidová nukleová kyselina (peptid nucleic acid)
poly(rA)	polyriboadenylová kyselina
PS	fosforothioát
RNA	ribonukleová kyselina (ribonucleic acid)
rRNA	ribosomální RNA
SELEX	Selection of Ligand by Exponential Enrichment
ssDNA	jednovláknová DNA (single strand DNA)
T	thymin
TAR	Trans-Activation Response element
tcDNA	tricyklo-DNA
TFO	triplex vytvářející oligonukleotidy (triplex-forming oligonucleotide)
tRNA	transferová RNA
U	uracil
UV	ultrafialová (ultraviolet)

Literatura

Aboul-Fadl T. (2005): Antisense oligonucleotides: The State of the Art. *Current Medicinal Chemistry* **12**, 763-771.

Alberts B. et al. (2002): Molecular biology of the cell. Garland Science, New York.

Amrane S., Saccà B., Mills M., Chauhan M., Klump H. H., Mergny J.-L. (2005): Length-dependent energetics of (CTG)_n and (CAG)_n trinucleotide repeats. *Nucleic Acids Research* **33(13)**, 4065-4077.

Bloomfield V. A. et al. (2000): Nucleic Acids structures, properties and functions. Univ. Science Books, Sausalito.

Braibanti A., Fiscaro E., Ghiozzi A., Compari C. (1996): Isobaric heat capacity and structure of water and heavy water in the liquid state. *Thermochim. Acta* **286**, 51-66.

Breuslauer K. J. (1995): Extracting Thermodynamic Data from Equilibrium Melting Curves for Oligonucleotide Order-Disorder Transitions. *Methods Enzymol.* **259**, 221-242.

Carlomagno T., Blommers M. J. J., Meiler J., Cuenoud B., Griesinger Ch. (2001): Determination of Aliphatic Side-Chain Conformation Using Cross-Correlated Relaxation: Application to an Extraordinarily Stable 2'-aminoethoxy-Modified Oligonucleotide Triplex. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7364-7370.

Crick F. (1970): Central Dogma of Molecular Biology. *Nature* **227**, 561-563.

Duongé F., Toulmé J.-J. (1999): In vitro selection identifies key determinants for loop-loop interactions: RNA aptamers selective for the TAR RNA element of HIV-1. *RNA* **5**, 1605-1614.

Fettes K. J., Howard N., Hickman D. T., Adah S., Player M. R., Torrence P. F., Micklefield J. (2002): Synthesis and nucleic-acid-binding properties of sulfamide- and 3'-N-sulfamate-modified DNA. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1**, 485-495.

Gelfand C. A., Plum G. E., Mielewczyk S., Remeta D. P., Breslauer K. J. (1999): A quantitative method for evaluating the stabilities of nucleic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 6113-6118.

Guschlbauer W. (1976): Nucleic Acid Structure. Spriger-Verlag, New York.

Hofr C., Brabec V. (2005): Thermal Stability and Energetics of 15-mer DNA Duplex Interstrand Crosslinked by *trans*-Diamminedichloroplatinum(II). *Biopolymers* **77**, 222-229.

Holbrook J. A., Capp M. W., Saecker R. M., Record, Jr. M. T. (1999): Enthalpy and Heat Capacity Changes for Formation of an Oligomeric DNA Duplex: Interpretation in Terms of Coupled Processes of Formation and Association of Single-Stranded Helices. *Biochemistry* **38**, 8409-8422.

Chalikian T. V., Völker J., Plum G. E., Breslauer K. J. (1999): A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 7853-7858.

Chan J. H. P., Lim S., Wong W. S. F. (2006) Antisense oligonucleotides: From design to therapeutic application. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* **33**, 533-540.

Chiu W. L. A. K., Sze Ch., N., Ip L. N., Chan S. K., Au-Yeung S. Ch. F. (2001): NTDB: Thermodynamic Database for Nucleic Acids. *Nucleic Acids Research* **29(1)**, 230-233.

Jensen K. K., Ørum H., Nielsen P. E., Nordén B. (1997): Kinetics for Hybridization of Peptide Nucleic Acids (PNA) with DNA and RNA Studied with BIAcore Technique. *Biochemistry* **36**, 5072-5077.

Kurreck J. (2003): Antisense technologies. *Eur. J. Biochem.* **270**, 1628-1644.

Kushon S. A., Jordan J. P., Seifert J. L., Nielsen H., Nielsen P. E., Armitage B. A. (2001): Effect of Secondary Structure on the Thermodynamics and Kinetics of PNA Hybridization to DNA Hairpins. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 10805-10813.

Lacroix L., Arimondo P. B., Takasugi M., Héline C., Mergny J. L. (2000): Pyrimidin MorpholinoOligonucleotides Form a Stable Triple Helix in the Absence of Magnesium Ions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **270**, 363-369.

Lee L. K., Roth Ch. M. (2003): Antisense technology in molecular and cellular bioengineering. *Current Opinion in Biotechnology* **14**, 505-511.

Lide D. R., Frederikse H. P. R. (1993): CRC Handbook of chemistry and physics. CRC Press.

McGhee J.D., von Hippel P.H. (1974): Theoretical aspects of DNA-Protein Interactions: Co-operative and Non-co-operative Binding of Large Ligands to a One-dimensional Homogeneous Lattice. *J. Mol. Biol.* **86**, 469-489.

Mergny J.-L., De Clan A., Amrane S., da Silva M. W. (2006): Kinetics of double-chain reversals bridging contiguous quartets in tetramolecular quadruplexes. *Nucleic Acids Research* **34(8)**, 2386-2397.

Nelson D. L., Cox M. M. (2005): Lehninger Principles of Biochemistry. W. H. Freeman&Co., New York.

Němeček D. (2005): Une nouvelle génération d'oligonucléotides synthétiques utilisables en stratégie antisens: propriétés d'hybridation et stabilité des complexes formés avec leur compléments d'ADN naturel. PhD. Thesis, Université Paris VI..

Ottová P. (2007): Mikrokolorimetrické stanovení změn energie při tvorbě duplexu DNA. Bakalářská práce, MFF UK, Praha.

Plum G. E. (1997): Thermodynamics of Oligonucleotide Triple Helices. *Biopolymers* **44**, 241-256.

Privalov G., Kavina V., Freire E., Privalov P. L. (1995): Precise scanning calorimetry for studying thermal properties of biological macromolecules in dilute solution. *Anal. Biochem.* **232**, 79-85.

Ratilainen T., Holmén A., Tuite E., Nielsen P. E., Nordén B. (2000): Thermodynamics of Sequence-Specific Binding of PNA to DNA. *Biochemistry* **39**, 7781-7791.

Rayburn E. R., Zhang R. (2008): Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible? *Drug Discovery Today* **13(11/12)**, 513-521.

Rejman D., Snášel J., Liboska R., Točík Z., Pačes O., Králíková Š., Rinnová M. Koiš P., Rosenberg I. (2001): Oligonucleotides with Isopolar Phosphonate Internucleotide linkage: A New Perspective for Antisense compounds? *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **20(4-7)**, 819-823.

Reynolds M. A., Hogrefe R. I., Jaeger J. A., Schwartz D. A., Riley T. A., Marvin W. B., Daily W. J., Vahefi M. M., Beck T. A., Knowles S. K. Klem R. E, Arnold jr L. J. (1996): Synthesis and thermodynamics of oligonucleotides containing chirally pure R_p methylphosphonate linkage. *Nucleic Acids Research* **24(22)**, 4584-4591.

Riccelli P. V., Hall T. S., Pancoska P., Mandell K. E., Benight A. S. (2003): DNA Sequence Context and Multiplex Hybridization Reactions: Metling Studies of Heteromeric Duplex DNA Complexes. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 141-150.

Rougée M., Faucon B., Mergny J. L., Barcelo F., Giovannangeli C., Garestier T., Hélène C. (1992): Kinetics and thermodynamics of triple-helix formation: effects of ionic strength and mismatches. *Biochemistry* **31(38)**, 9269-9278.

Říhová M. (2008): Mikrokolorimetrické stanovení termodynamické stability triplexu RNA. Bakalářská práce, MFF UK, Praha.

Sabahi A., Guidry J., Inamati G. B., Manoharan M., Wittung-Stafshede P. (2001): Hybridization of 2'-ribose modified mixed-sequence oligonucleotides: thermodynamic and kinetic studies. *Nucleic Acids Research* **29(10)**, 2163-2170.

Saccà B., Lacroix L., Mergny J.-L. (2005): The effect of chemical modifications on the thermal stability of different G-quadruplex-forming oligonucleotides. *Nucleic Acids Research* **33(4)**, 1182-1192.

Saenger W. (1984): Principles of Nucleic Acid Structure. Springer-Verlag, New York.

Terui Y., Ohnuma M., Hiraga K., Kawashima E., Oshima T. (2005): Stabilization of nucleic acids by unusual polyamines produced by an extreme thermophile, *Thermus thermophilus*. *Biochem. J.* **388**, 427-433.

Thiviyanathan V., Vyazovkina K. V., Gozansky E. K., Bichenchova E., Abramova T., Luxon B. A., Lebedev A. V., Gorenstein D. G. (2002): Structure of Hybrid Backbone Methylphosphonate DNA Heteroduplexes: Effect of R and S Stereochemistry. *Biochemistry* **41**, 827-838.

Torigoe H. (2001): Thermodynamic and Kinetic Effects of N3'→N5' Phosphoramidate Modification on Pyrimidine Motif Triplex DNA Formation. *Biochemistry* **40**, 1063-1069.

Vachoušek J. (2008): Raman study of HIV TAR structural stability. *Spectroscopy* **22**, 267-277.

Vachoušek J. (2010): Studium komplexů řetězců nukleových kyselin významných z hlediska terapeutického použití oligonukleotidů metodami optické spektroskopie. Disertační práce. MFF UK, Praha.

Vaisocherová H., Zítová A., Lachmanová M., Štěpánek J., Králíková Š., Liboska R., Rejman D., Rosenberg I., Homola J. (2006) Investigating Oligonucleotide Hybridization at Subnanomolar Level by Surface Plasmon Resonance Biosensor Method. *Biopolymers* **82**, 394-398.

Voet D., Voetová J. G. (1995): Biochemie. Victoria Publishing, Praha.

Völker J., Blake R. D., Delcourt S. G., Breslauer K. J. (1999): High-Resolution Calorimetric and Optical Melting Profiles of DNA Plasmids: Resolving Contributions from Intrinsic Melting Domains and Specifically Designed Inserts. *Biopolymers* **50**, 303-318.

Zamecnik P. C., Stephenson M. L. (1978): Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by specific oligodeoxynucleotide. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **75**, 280-284.