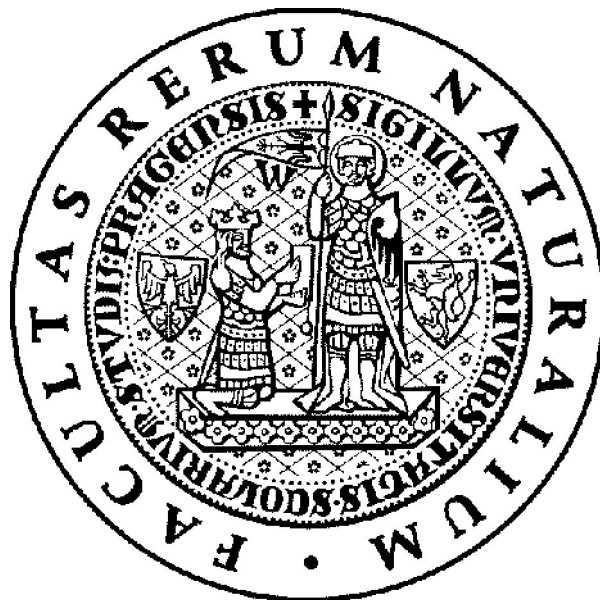


UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

KATEDRA BIOCHEMIE



Martin Plutinský

Výskyt a význam konformace „molten-globule“ v proteinech

Bakalářská práce

Školitel: Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2010

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

V Praze dne 10.8 2010

Martin Plutinský

Poděkování

Děkuju prof. RNDr. Jířímu Hudečkovi, CSc., za jeho rady, rodině a Monike Fojtíkovéj za podporu a Daniele Zdražilovej za gramatické a pravopisní konzultace.

Obsah

1. SEZNAM SKRATEK.....	4
1. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	5
2. ÚVOD	6
2.1. SBALOVÁNÍ PROTEINŮ.....	6
2.1.1. <i>Modely sbalování proteinů.....</i>	<i>8</i>
2.1.2. <i>Sbalování proteinů in vivo.....</i>	<i>10</i>
3. VÝZNAM MOLTEN GLOBULE	12
3.1. MOLTEN GLOBULE JAKO MEZIPRODUKT SBALOVÁNÍ BÍLKOVIN	12
3.2. FYZIOLOGICKÝ VÝZNAM MOLTEN GLOBULE	15
4. VÝSKYT MOLTEN GLOBULE	21
4.1. CYTOCHROM C.....	21
4.1.1. <i>Molten globule cytochromu c</i>	<i>23</i>
4.1.2. <i>Další výskyt molten globule u cytochromu c.....</i>	<i>25</i>
4.2. α -LAKTALBUMIN A LYSOZYM	27
4.2.1. <i>Molten globule u α-laktalbuminu.....</i>	<i>28</i>
4.2.2. <i>Molten globule u lysozymů.....</i>	<i>31</i>
4.3. APOMYOGLOBIN	32
4.3.1. <i>Molten globule při pH 4.....</i>	<i>32</i>
4.3.2. <i>Stabilizace denaturovaného apoMb solemi.....</i>	<i>33</i>
4.4. RIBONUKLEASA HI	33
4.5. β -LAKTOGLOBULIN	34
4.6. KARBONÁTANHYDRASA	35
4.7. STAFYLOKOKOVÁ NUKLEASA	37
4.8. β -LAKTAMASA.....	39
5. UV/VIS SPEKTROFOTOMETRIE.....	41
5.1. DERIVAČNÍ SPEKTROFOTOMETRIE.....	42
6. MATERIÁL A METODY	45
6.1. POUŽITÉ CHEMIKÁLIE.....	45
6.2. LABORATORNÍ PŘÍSTROJE	45
6.3. METODY.....	45
6.3.1. <i>Příprava pufrů a roztoků.....</i>	<i>45</i>
6.3.2. <i>Měření absorpčních spekter</i>	<i>46</i>
6.3.3. <i>Zpracování experimentálních dat</i>	<i>46</i>
7. VÝSLEDKY.....	47
7.1. VLIV pH NA KONFORMACI CYTOCHROMU C	47
7.2. VLIV ZVÝŠENÉ IONTOVÉ SÍLY NA KONFORMACI CYTOCHROMU C	52
8. DISKUSE	55
9. SOUHRN	57
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	58

1. Seznam skratek

α -LA	α -laktalbumin
ANS	8-anilinonaftalen-1-sulfonát
DDAB-DTAC	didodecyldimethylammoniumbromide– dodecyltrimethylammoniumchloride
ER	endoplazmatické retikulum
FPLC (fast protein liquid chromatography)	rychlá kapalinová chromatografie proteinů
Gdn-HCl	guanidiniumchlorid
HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells)	lidský α -lactalbumin je letální k tumorovým buňkám
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol
HX (hydrogen exchange)	výměna vodík-deuterium
MG	molten globule
NMR	nukleární magnetická rezonance
NOE (nuclear Overhauser effect)	jaderný Overhauserův efekt
pre-MG	pre-molten globule
RNasa HI	ribonukleasa HI
SAXS (small angle X-ray scattering)	maloúhlý rozptyl Rentgenových paprsků
TFE	trifluoroetanol

1. Cíl bakalářské práce

Cílem bakalářské práce bylo:

- 1) Zpracování rešerše o současných znalostech konformačního stavu MG.
- 2) Seznámit se metodikou a využitím absorpčních a derivačních spekter na spektrofotometru HP 8453 při studiu konformačních změn cytochromu *c* v závislosti na pH a iontové síle.

2. Úvod

2.1. Sbalování proteinů

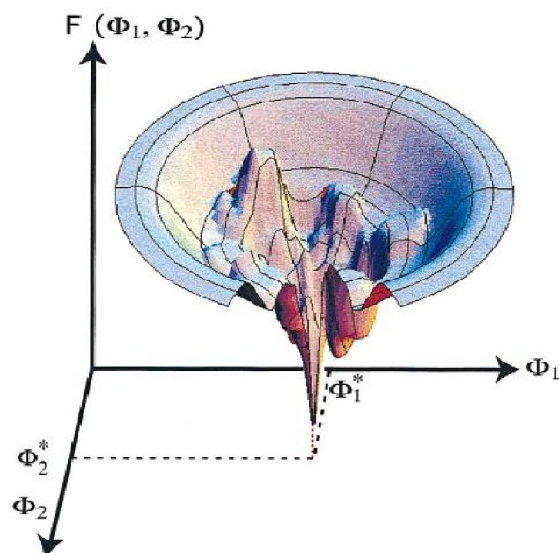
Zatímco syntéza polypeptidového řetězce, tedy tvorba primární struktury proteinu – je známá docela dobře, pochopení procesu vytváření prostorové – sekundární a terciární - struktury stále zůstává jednou ze základních nezodpovězených otázek současné biochemie. Sbalování nebo svinutí (anglicky folding) proteinu je proces, při kterém dochází k uspořádání rozbaleného polypeptidového řetězce proteinu do specifické nativní struktury. Jenom proteiny ve své nativní struktuře se vyznačují biologickou aktivitou. Pod vlivem vnějšího (denaturačního) stresu pak protein může tuto svoji nativní strukturu ztratit. Pod pojmem denaturační tlak rozumíme změnu parametrů prostředí, například pH, teplotu, iontovou sílu roztoku, přítomnost denaturačních činidel - obecně chemické složení okolí molekuly bílkoviny. V posledních letech se ustálila definice denaturace jako každé podstatné změny prostorového uspořádání biopolymeru, která vede ke ztrátě jeho biologické aktivity. Tato definice vylučuje změny kovalentní struktury vyvolané zářením, chemickou modifikací či fotooxidací. I když tyto zásahy zpravidla rovněž vedou ke ztrátě biologické aktivity, nespádají do kategorie „fyzikálně-chemické“ denaturace. Pod pojem denaturace neřadíme procesy spojené s precipitací proteinu. Zde volíme raději pojmy koagulace. Pojem deaktivace enzymu je vhodné použít, pokud neznáme přesný důvod ztráty aktivity enzymu.¹ Dobrý přehled problematiky sbalování bílkovin poskytuje několik přehledných článků.^{2,3}

Dlouho probíhala diskuze, zda je sbalování a rozbalování řízeno termodynamicky, tedy dosažením struktury s minimem Gibbsovy energie, nebo kineticky, tedy vytvořením nativní struktury co nejrychleji. Pokusy provedené Anfinsenem na ribonuklease *in vitro* ukazují, že proces sbalování je vratný a veškerá informace nutná k tvorbě prostorové struktury je obsažena v pořadí aminokyselin. Z tohoto tzv. Anfinsenova postulátu plyne, že sbalování proteinů je řízeno termodynamicky.⁴ Na druhou stranu je počet možných konformací proteinu velmi velký. Pokud by hledání správné konformace probíhalo náhodně, protein by se nikdy správně nesbalil. Odhad^{5,6} počtu možných konformací u proteinu s n aminokyselinami je 3^{n-1} . Kdyby poté protein složený ze 101 aminokyselin „sám zkoušel najít tu správnou konformaci“ testováním všech možných ($3^{101} = 5 \cdot 10^{47}$) rychlostí 10^{13} konformací za sekundu (!), našel by tu správnou za 10^{27} sekund. Jelikož se stáří vesmíru odhaduje na $6 \cdot 10^{17}$ sekund, je jasné,

že sbalování proteinu nemůže být proces náhodný. Tato úvaha je známá jako tzv. Levinthalův paradox.⁵ Sám Levinthal navrhl kinetický model sbalování proteinu do nativního stavu, o kterém předpokládal, že je pouze metastabilní. Sbalování v kinetickém modelu probíhá přes kondenzaci několika nukleačních center v různých částech polypeptidového řetězce. Sbalovací cesta (anglicky folding pathway) k nativnímu proteinu znamená existenci definovaných sekvencí dějů následujících po sobě. Tyto děje začínají u rozvinutého náhodného klubka a končí v metastabilním nativním stavu.⁶ Tato nukleační centra jsou realizována interakcemi krátkého a středního dosahu a omezují počet možných konformací, které může protein zaujmout.

Takzvaný „nový pohled“ na sbalování bílkoviny z denaturovaného do nativního stavu představil Wolynes⁷. Reprezentuje ho „sbalovací nálevka“, jakési symbolické zobrazení průběhu volné energie jako funkce stupňů volnosti. Má často komplikovaný energetický profil s výrazným minimem odpovídajícím nativnímu stavu (obr. 1, další strana). Rychlost sbalování je zpomalována „záhyby“, oblastí s lokálními maximy a minimy, které odpovídají tvorbě přechodně stabilních meziproductů. Jinak je rychlost sbalování určena sklonem stěn nálevky. Jak se zužuje energetický profil, klesá jak entropie polypeptidového řetězce, tak počet možných konformací.

Dnes je přijímán názor, že sbalování probíhá sérií reakčních drah, jenž vedou k minimu Gibbsovy energie. Tyto dráhy zaručují, že proces proběhne dostatečně rychle, protože vysoké energetické bariéry neumožní sbalení proteinu podle nesprávných mechanismů.² Mnohé proteiny jsou složeny z domén, globulárních částí, v zásadě nezávislých na struktuře ostatních částí bílkovin. Domény jsou schopny samostatného sbalování nezávisle na ostatních částech bílkoviny. Je tomu tak například u glycerinaldehyddehydrogenasy, aspartátaminotransferasy, pankreatické elastasy. I když jsou některé domény schopny samostatného sbalování, jejich schopnost vytvořit samostatně biologicky funkční bílkovinu je značně omezena.



Obrázek 1. Znázornění sbalovací nálevky v trojrozměrném prostoru. $F(\Phi_1, \Phi_2)$ = volná energie, Φ_1, Φ_2 = stupně volnosti (převzato z cit. 8)

Je možné, že se v proteinech vyskytují fragmenty polypeptidového řetězce schopné samostatného sbalování, tzv. subdomény. Jedná se o části větší než prvky sekundární struktury, ale menší než celé funkční domény. Například C-koncové části termolysinu se sbalují autonomně, jestliže mají velikost alespoň tří α -helixů. Tyto subdomény jsou kondenzované stavy polypeptidového řetězce, ve kterých ještě nedošlo k těsnému sbalení atomů hydrofobních aminokyselin. U jiných proteinů subdomény pozorovány nebyly.²

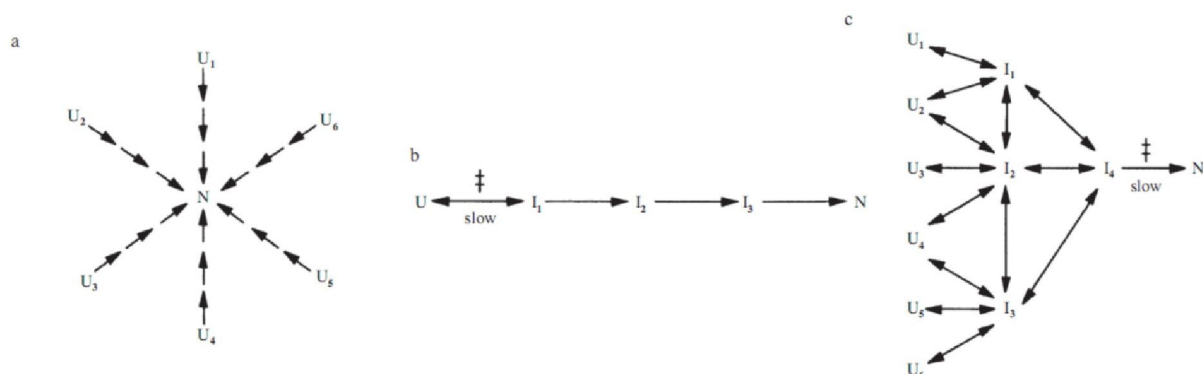
2.1.1. Modely sbalování proteinů

Je mnoho modelů sbalování proteinů, přičemž každý se opírá o experimentální důkazy ale každý má i své nedostatky. Kontroverzní je otázka, zda existuje jen jedna sbalovací cesta nebo je jich více. Jestliže má každá molekula na začátku jinou konformaci, následuje svoji vlastní cestu při sbalování a za předpokladu, že proces jde správným směrem, je výsledkem nativní protein. Tento model se nazývá dětská skládačka, nebo anglicky jigsaw puzzle (obr. 2a, další strana).

Modely, které vycházejí z unikátní konformace denaturovaného proteinu a vedou přes určitý počet meziproduktů, vystihují celý proces věrohodněji (obr. 2b, další strana). Prvním byl model propagace-nukleace, ve kterém díky fluktuaci dochází ke vzniku segmentů s α -helikální strukturou (nukleace). Ty pak fungují jako templát pro další sbalování (propagace).

Difúzně-kolizní-adhezní model předpokládá, že jednotlivé elementy sekundární struktury, jsou v denaturovaném stavu nestabilní a tedy přítomné jen s malou pravděpodobností. Při vhodných interakcích se ale mohou tyto struktury stabilizovat a vytvářet soudržnější útvary. Rychlostní konstanta pro vznik těchto útvarů je daná součinem rychlosti, se kterou se dané prvky mísí, a pravděpodobností vhodné orientace. Dynamika denaturovaného polypeptidového řetězce ukazuje, že se jeho různé části srážejí v důsledku difuze cca 10^5 krát za sekundu. Při pravděpodobnosti 10^{-5} jejich příznivé vzájemné orientace má rychlostní konstanta velikost 1 s^{-1} , ve shodě s pozorovanou hodnotou.

Další model je tzv. model hierarchického sbalování. V tomto modelu sbalování probíhá stupňovitě v závislosti na strukturní hierarchii, tedy že po nukleaci se tvoří sekundární struktury, které se spojují a dávají vzniknout supersekundárním strukturám, potom doménám a nakonec celému nativnímu proteinu. U oligomerního proteinu dochází v poslední fázi k spojení podjednotek.



Obrázek 2. Modely sbalování proteinů, jigsaw puzzle (a), lineární (b) a obecný (c). U – denaturovaný stav, N – nativní stav, I – meziprodukt. (Převzato z cit. 2)

Ve „frame work“ modelu se sbalování uskutečňuje sestavováním existujících elementů sekundární struktury, které přežívají denaturaci. Tyto elementy mají značnou stabilitu a nejobtížnější je jejich sestavení. Hlavní myšlenkou tohoto modelu tedy je, že prvky sekundární struktury se tvoří dřív než nativní terciární struktura.

Další možný způsob sbalování se opírá spíše o nspecifické hydrofobní interakce jako základní hnací sílu sbalování. Rozvinutý polypeptidový řetězec podstoupí rychlý „hydrofobní kolaps“ spočívající v tvorbě shluku hydrofobních aminokyselin – hydrofobního jádra. Po tomto (možná i v jeho průběhu) kroku se pak formují α -helixy a β -listy.

Obecný mechanismus sbalování je na obr. 2c (předchozí strana). V počáteční fázi se uplatní model dětské skládačky a vzniká heterogenní soubor neúplně sbalených meziproduktů, které jsou vzájemně v rovnováze – MG nebo pre-MG. Praktickým problémem studia počáteční fáze sbalování je nedostatečné časové rozlišení dostupných experimentálních technik. Ty mají rozlišení řádově v milisekundách. Ale již v tzv. mrtvé době experimentů probíhají procesy, kterým je nezbytné porozumět. Poté, pravděpodobně mechanismem podobným jako v difusně-kolizně-adhesivním nebo frame work modelu, dojde za pomoci hydrofobních a vodíkových vazeb ke stabilizaci elementů sekundární struktury. Formují se vazebná místa pro substrát nebo ligand. Sbalování je dokončeno utvořením nativní konformace a u enzymů se objeví aktivita. Dojde k přesnému uspořádání sekundárních struktur, správnému sbalení hydrofobního jádra, přeskupení disulfidových vazeb, vzájemné organizaci domén a k asociaci podjednotek. Krok, který omezuje rychlost sbalování, je izomerizace peptidové vazby před prolinem. Peptidová vazba vzhledem k částečnému dvojitému charakteru dává za vznik *cis/trans* izomerii. Preferovaný je *trans* izomer u aminokyselin, jen pro vazbu X-Pro je poměr přibližně 3:1. Na základě *in vitro* studií lze shrnout pravidla pro sbalování proteinů:

1. sbalování proteinu je v daném prostředí řízeno jeho primární strukturou (Anfinsenův postulát),
2. nativní struktura proteinu je pod termodynamickou kontrolou a odpovídá minimu Gibbsovy energie a
3. sbalování většiny proteinů provází vznik částečně sbalených meziproduktů, které jsou kontrolovány kineticky.

2.1.2. Sbalování proteinů *in vivo*

Dlouhou dobu se předpokládalo, že nově syntetizované proteiny se *in vivo* sbalují samy a stejným mechanismem, jako *in vitro*. Sbalování proteinů *in vivo* stejně jako skládání podjednotek při tvorbě oligomerních struktur ve skutečnosti vyžaduje asistenci jiných proteinů, nazvaných chaperony. Molekulové chaperony interagují se vznikajícími, destabilizovanými nebo přemísťovanými proteiny a zabraňují tak jejich nesprávnému sbalení. Nemohou interagovat s nativními proteiny ani nejsou schopny správně sbalit již jednou zformované sraženiny bílkovin. Chaperony také nenesou informaci, která by umožnila proteinu dosáhnout jinou konformaci, než je zakódovaná v jeho primární struktuře. Molekulové chaperony pouze zvyšují výtěžek reakce

sbalování. Některé chaperony interagují s meziproduktem v počáteční fázi sbalování. Na chaperony se tyto meziprodukty vážou přes své odkryté hydrofobní oblasti. K uvolnění proteinu je zapotřebí hydrolýzy ATP a získaná energie je použita k realizaci konformačních změn chaperony, které pak uvolní sbalený protein.

Základní úlohou chaperonů je tedy chránit proteiny před nevhodnými interakcemi a udržovat meziprodukty sbalování na „správné cestě“ k nativnímu stavu. Je možné, že pomáhají proteinům udržet si konformaci, která je vhodná k jejich transportu přes membrány. Také některé další proteiny asistují při sbalování. Jsou to enzymy proteindisulfidizomerasa a peptidyl-prolyl-*cis-trans*-izomerasa. Proteindisulfidizomerasa katalyzuje tvorbu disulfidových vazeb, druhý enzym izomerizaci peptidových vazeb před prolinem. Tyto proteiny urychlují proces sbalování, který může pomaleji proběhnout i bez nich. Přehled o chaperonech poskytuje článek od Finka.⁹

3. Význam molten globule

3.1. Molten globule jako meziprodukt sbalování

bílkovin

V sedmdesátých letech byla prokázána existence meziproduktů při denaturaci některých globulárních proteinů. Tyto meziprodukty mají několik společných znaků: prvky sekundární struktury s kompaktní molekulární velikostí, ale bez specifické terciární struktury. Ohgushi, Wada¹⁰ a Dolgikh¹¹ přišli s myšlenkou, že takové intermediáty patří ke společnému fyzikálnímu stavu globulárních proteinů a nazvali je MG. Ptitsyn¹² na základě studií se zpětným sbalováním bílkovin z denaturovaného stavu ztotožnil pozorované přechodně vznikající meziprodukty se stavem MG a ty se tak staly středobodem zájmu badatelů. Za posledních patnáct let navíc došlo k rozvoji experimentálních technik a k významnému pokroku ve výzkumu v této oblasti. Byly charakterizovány mnohé proteiny ve stavu MG. Zabývali se jí i teoretičtí chemici. Teoretické studie ale ukázaly, že experimentálně pozorované intermediáty při sbalování, mohou být kineticky zachycené špatně sbalené proteiny (kinetické pastě, anglicky kinetic traps). Podporou tohoto tvrzení jsou kinetické studie sbalování proteinů, u kterých se termodynamicky stabilní meziprodukty tvoří při mírných denaturačních podmínkách, ale při zpětném sbalení do nativního stavu se netvoří. Je proto nasnadě posuzovat jednotlivé známé stavy MG případ od případu.³

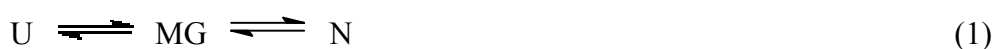
Některé, hlavně menší, proteiny vykazují kinetiku rozbalování, kterou můžeme dost dobře aproximovat pomocí dvoustavového přechodu. Jenže pozor, to neznamená, že přechodný stav u dané proměny nevznikne a znovu se rychle nepromění. U jiných proteinů tomu tak není. U nich můžeme za použití mírných denaturujících podmínek zaznamenat MG jako termodynamicky stabilní stav při daných podmínkách v systému. Stav MG má několik strukturních charakteristik:³

- 1) Přítomnost většiny prvků sekundární struktury
- 2) Absence specifické terciární struktury vzniklé těsnými kontakty postranních skupin aminokyselin
- 3) Kompaktnost molekuly, vyjádřitelná kvantitativně gyračním nebo stokesovským hydrodynamickým poloměrem, je porovnatelná s nativní bílkovinou

- 4) Přítomnost jen volně sbaleného hydrofobního jádra, čím se zvýší povrch, tvořený hydrofobními aminokyselinami, přístupný polárním rozpouštědlem

Nicméně struktura MG u různých proteinů (viz kapitola 3) se vyznačuje jistou mírou heterogenity. U některých proteinů byly popsány dvě i více konformačních stavů MG s odlišnými vlastnostmi. Mezi jednotlivými bílkovinami se MG mohou také značně lišit. U lysozymů C-typu se MG podobají nativnímu stavu, ale například u β -laktoglobulinu (v nativním stavu protein s převahou β -hřebenů) se tvoří při denaturaci nebo renaturaci kompaktní meziprodukt s výrazným zastoupením α -helixů. Model MG jako obecného meziproduktu jak to navrhl Ptitsyn¹² ale není obecně přijímána². Prostorová struktura bílkovin je určena pouze sekvencí aminokyselin, a tak obecný meziprodukt rozbalování a zpětného sbalování neexistuje. Každý protein tvoří při sbalování svůj specifický meziprodukt s jedinečnou strukturou.

Rozborem významu MG se zabývají Arai, Kuwajima³ a Ptitsyn.¹² Význam MG v kinetice sbalování a rozbalování nebyl dosud spolehlivě vysvětlen. Může jít pouze o nespécifický soubor konformací ležící mimo sbalovací cestu nebo meziprodukt v sbalování s již jistými definovanými prvky přítomnými také v nativní struktuře. Výsledky teoretických studií jsou ale v rozporu s experimentálními daty. Obecné rovnice pro třístavový přechod mezi nativním (N), denaturovaným (U) stavem a MG (MG) jsou:



V případě první reakce se jedná o specifický meziprodukt. V druhém případě je to nespécifický špatně sbalený meziprodukt „mimo“ sbalovací cesty. Výskyt lag fáze v přechodu z denaturovaného stavu do MG je důkaz platnosti první rovnice. Tato fáze je pozorovaná při sbalování interleukinu-1 β , stafylokokové nukleasy a apoMb. U apoMb se dočasně tvoří dva meziprodukty Ia, Ib a sbalovací cesta pro něj je:³



V případě karbonátanhydrasy bylo sestaveno jiné kinetické schéma:¹³

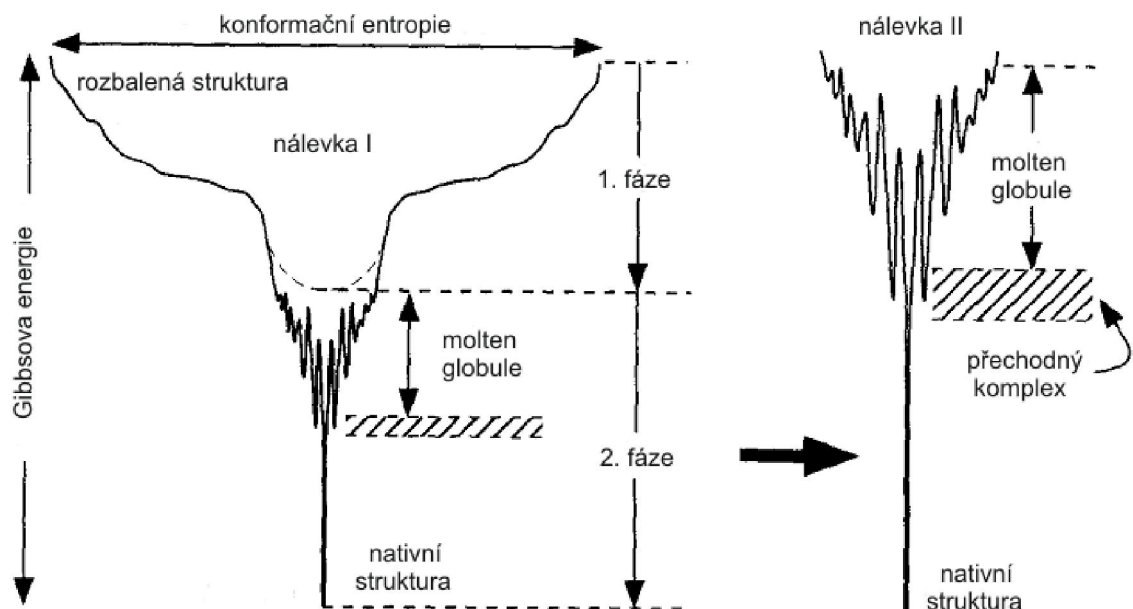


(4)

V jiných případech po rychlém zformování meziprojektu následuje pomalá fáze přechodu do nativního stavu. Vyhodnocení kinetických dat musí být pečlivé, protože kinetické údaje dost dobře vyhovují oběma rovnicím (1) a (2). Pečlivé vyhodnocení dat pro mnoho proteinů nasvědčuje, že MG je specifický meziprojekt na cestě k nativnímu stavu.

Kuwajima a Arai rozdělili proces sbalování do dvou fází:

1. Fáze – tvorba MG z plně denaturovaného stavu
2. Fáze – tvorba nativního stavu z MG



Obrázek 3. Schematická dvourozměrná prezentace sbalovací nálevky bílkovin s naznačeným významem MG. Podle cit. 3

V první fázi se v bílkovině zformují prvky sekundární struktury a molekula vytvoří kompaktní formu s foldem bez těsných interakcí postranních skupin. MG stabilizují především nespecifické hydrofobní interakce a také lokální nekovalentní interakce stabilizující helixy případně listy. V druhé fázi se uplatní zase specifické interakce stabilizující terciární strukturu – solné můstky, van der Waalsove síly atd.

Toto dělení implikuje dvě oblasti v sbalovací nálevce (obr. 3, předchozí strana): nálevka I představuje první fázi a nálevka II druhou fázi. Nálevka I je širší protože vytvořením kompaktní formy se zmenší počet stupňů volnosti mnohem víc než vytvořením specifických interakcí a nativní terciární struktury molekuly. V nálevce II jsou mnohé energetické bariéry, které je nutné překonat, aby se vytvořily specifické interakce. V případě malých proteinů (< 100 aminokyselin) jsou tyto bariéry příliš malé a v sbalování se pozoruje dvoustavový děj.

3.2. Fyziologický význam molten globule

Výborný přehled o fyziologickém významu MG stavů jsou statě od R. Santucciho nebo Dobsona.^{14, 15} V eukaryotických buňkách, mnohé syntetizované bílkoviny jsou určeny k sekreci do mimobuněčného prostoru. Sekrece probíhá přes ER a Golgiho aparát. V ER je k dispozici systém chaperonů pomáhající správnému sbalení bílkovin. Ještě před sekrecí projdou „kontrolou jakosti“ a špatně sbalené bílkoviny (anglicky misfolded proteins) jsou ubikvitinylovány a degradovány. Sbalování a rozbalování je způsob vzniku a modulace buněčných procesů – translokace přes membránu, transport, sekrece, imunitní odpověď nebo kontrola buněčného cyklu – a tyto procesy jsou závislé na správném sbalení a schopnosti bílkoviny zaujmout nativní stav. Chyba v sbalování a vznik nenativních konformací nebo třeba naopak setrvání v nativním stavu způsobuje chybné fungování procesu a z toho vyúsťující patologický stav organismu. U cytochromu *c* nebo α -laktalbuminu možno modulací jejich konformace „přepnout“ jejich biologickou funkci.

Bodové mutace mohou „zablokovat“ správné sbalení proteinu ve fázi stabilního meziprojektu s vlastnostmi podobnými MG. Bílkovina pak ztrácí svojí biologickou aktivitu nebo je její aktivita pozmeněna. Cystická fibróza vzniká delecí jedné aminokyseliny, Phe-508, v CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, protein typu ABC-transportéru). Wt-CFTR je syntetizován v ER, po rozsáhlé glykozylaci se sbalí za pomoci chaperonů (včetně Hsp70) a následně je transportován do buněčných kompartmentů. Mutantní CFTR se sbalí do stabilního kompaktního stavu, který potřebuje delší čas na sbalení do své nativní konformace. Není sekretován na cílová místa, ale je degradovaný ještě v ER.

Chronické jaterní a rozedmu plic má na svědomí mutantní α -1-antitrypsin, inhibitor serinových proteas. Syntetizují ho hepatocyty a v plicích má ochrannou funkci proti

účinkům neutrofilní elastasy (NE). Struktura α -1-antitrypsinu se skládá (mimo jiné) ze tří β -listů a smyčky, pomocí které se váže na proteasu. Mutace v smyčce způsobí konformační změny – nativní struktura inhibitoru přechází do flexibilnější a protein ztratí svou biologickou funkci. Existují dvě mutantní formy, S (Glu264Val) a Z (Glu342Lys). V obou případech se pozoruje nedostatečná aktivita inhibitoru. Mutant Z podléhá agregaci a akumulace agregátu pak způsobuje chronické onemocnění plic. Právě mutace Glu342Lys způsobuje stabilizaci částečně sbaleného stavu. Vzájemné interakce těchto stavů podobných MG vedou k polymerizacím a vytvoří se inkluzní tělíčka v ER hepatocytů.

Tzv. konformační choroby vznikají i jiným způsobem. Špatně sbalené proteiny mají tendenci agregovat a vytvářet nerozpustné agregáty a fibrilární struktury, amyloidní fibrily. U Alzheimerovy nemoci souvisí s tvorbou agregátů jejich „toxicita“ – agregáty jsou toxické pro buňky. Amyloidní fibrily se ukládají do amyloidních depozit (plaků) v cílových orgánech a jako symptom se vyskytují u diabetu II typu, amyloidózy a neurodegenerativních onemocnění jako Alzheimerova, Parkinsonova choroba a spongiformní encefalopatie (tab. 1, další strana). Součástí fibril jsou kromě hlavní složky i jiné proteiny a sacharidy. Je zajímavé, že cca. 20 proteinů identifikovaných jako hlavní stavební komponenty amyloidních fibril mají často úplně odlišnou strukturu a vlastnosti. Amyloidní fibrily mají naproti tomu mnoho společných znaků jako morfologie, fyzikální vlastnosti. Navíc schopnost tvořit fibrily není omezena jen na 20 proteinů, protože *in vitro* tvoří fibrily rovněž jiné bílkoviny a uměle syntetizované peptidy, u kterých nebyla prokázána spojitost s nemocí. I když je tato schopnost nejspíš obecná pro polypeptidový řetězec, sklon k tvorbě fibril v určitých podmínkách se liší a závisí od fyzikálně-chemických parametrů. Hydrofobicita povrchu a přístup k hydrofobním aminokyselinám se ukazuje jako jeden z nejdůležitějších faktorů. V nativním stavu jsou hydrofobní aminokyseliny pohřbené v kompaktní struktuře a nejsou tedy v kontaktu s okolním polárním prostředím. Sklon k tvorbě agregátů se zvyšuje, pokud jsou tyto hydrofobní aminokyseliny exponovány na povrchu, např. když je bílkovina v částečně rozbaleném stavu (MG) nebo fragmentována po proteolýze. Proto se předpokládá, že k agregaci bílkovin dochází ve stavu MG nebo jemu podobném.

Tabulka 1. Vybrané biologické efekty a onemocnění jako důsledek pozmeněného nebo špatného sbalování proteinů (podle cit. 14)

Protein	Strukturní mechanismus	Efekt/onemocnění
apolipoprotein E4	stabilizace MG	Alzheimerova choroba
α -laktalbumin	stabilizace MG interakcí s lipidy	apoptóza v tumorových buňkách
CFTR	misfolding, degradace v ER	cystická fibróza
α -1-antitrypsin	konformační změna, agregace	α -1-antitrypsin deficience/rozedma
prionový protein	misfolding, agregace	Creutzfeldt-Jacobsova choroba, kuru, BSE, scrapie
β -amyloid	misfolding, agregace	Alzheimerova choroba
cytochrom <i>c</i>	interakce s fosfolipidy a tvorba stavu s peroxidasovou aktivitou	apoptóza, Parkinsonova choroba, amyloidóza

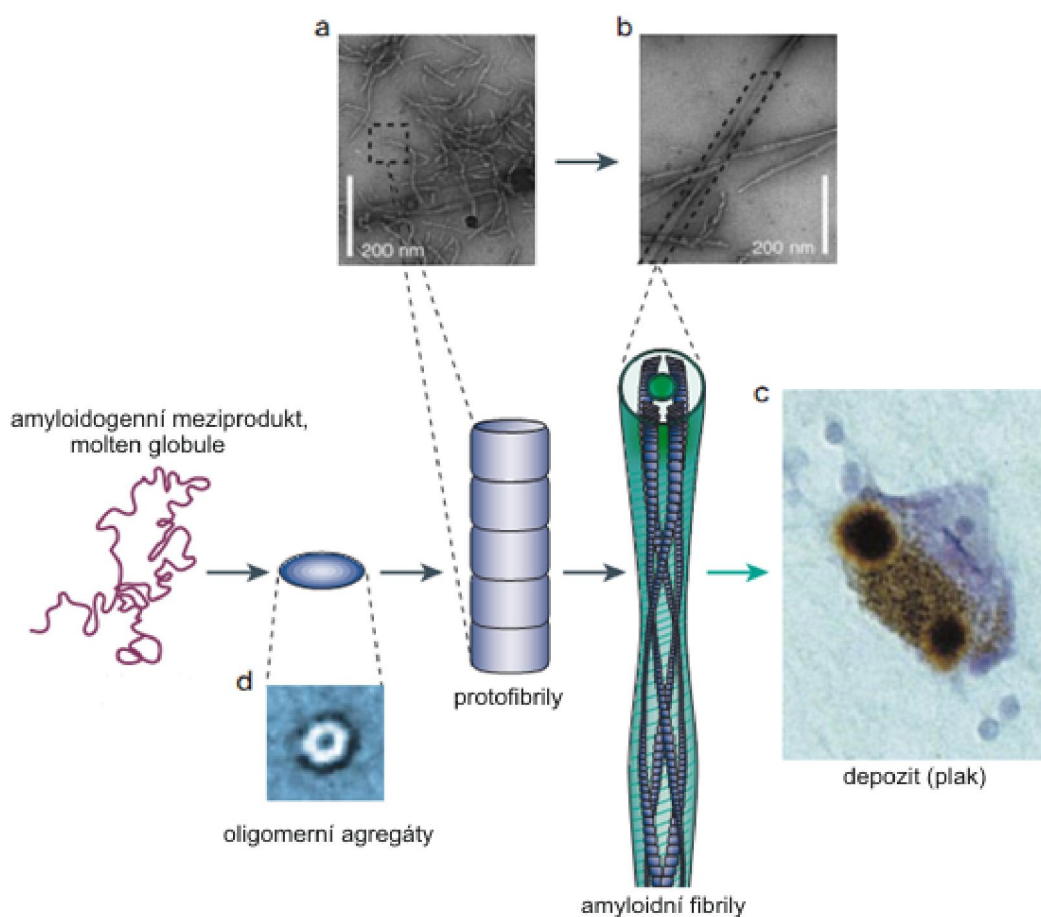
Amyloidní fibrily jsou dlouhé, nevětvené a struktury široké několik nanometrů. Skládají se z 2-6 protofilamentů, obtočených kolem sebe. Každý filament je polymer složený z mnoha podjednotek proteinu, které obsahují vysoký obsah β -hřebenů. Tyto β -hřebenů jsou uspořádány rovnoběžně s osou fibrily. Jádro fibrily je stabilizováno vodíkovými vazbami a interakce postranních skupin aminokyselin mají jen nepatrný význam. Je zářející jednotná strukturní podstata amyloidních fibril v kontrastu se širokým spektrem konformací globulárních bílkovin.

Polymerizace (obr. 4, další strana) podjednotek je dvoufázový proces a začíná lag (nukleační) fází, v průběhu které se tvoří jádra. Po ní následuje rychlá oligomerizace, kde se jednotlivé oligomery vážou na jádro. Oligomery nemají fibrilární tvar, jsou složeny z 3-6 podjednotek a jsou s nimi v rovnováze. Po dosažení jisté kritické hmotnosti oligomery asociují a vznikají protofibrily. Agregace je inhibována chaperony a degradačními procesy. Pokud se již jednou fibrily vytvoří, jsou nesmírně odolné vůči účinkům proteas. Navíc, jako je tomu u spongiformních encefalopatií, špatně sbalené formy proteinu indukují nebo spíš „vnucují“ tuto svojí konformaci správně sbaleným proteinům.

Vazba kyseliny olejové na α -laktalbumin *in vitro* indukuje přechod do stavu podobnému MG. Tento komplex se nazývá HAMLET (human α -laktalbumin made

lethal to tumor cells). HAMLET je schopný indukovat apoptózu v tumorových buňkách. *In vivo*, frakce z lidského mléka indukuje apoptózu v tumorových buňkách a analýzou se ukázalo, že jde o agregovaný α -laktalbumin. Podobný efekt vykazuje aj hovězí α -laktalbumin, sagregovaný nebo jako komplex, BAMLET, s kyselinou olejovou. Přitom α -laktalbumin, produkovaný v sekrečních buňkách mléčných žláz, je jedna ze dvou domén laktosasyntetasy a má tedy zcela jinou funkci.¹⁶⁻¹⁸

Cytochrom *c* je hemoprotein nacházející se v mitochondriích. Slouží jako mobilní přenašeč elektronů v mezi kotvenými komplexy III a IV – komplexem cytochromů *bc*₁ a cytochrom *c* oxidasou. Cytochrom *c* zprostředkuje transfer elektronů nenavázaná nebo navázaný na membránu a zaujímá při tom několik konformací.



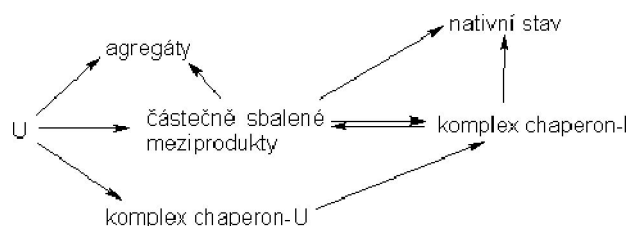
Obrázek 4. Schéma agregace a tvorby amyloidních fibril. Rozbalené, nebo jen částečně sbalené proteiny spolu asociují za vzniku oligomerů (d), které pak asociují do protofilament (a) a fibril (b). Fibrily pak často vytvářejí plaky jako Leviho tělíska při Parkinsonově nemoci (c). Použito z cit. 15, upraveno v Corel Photo-Paint X4.

Má funkci v apoptóze. Váže se na proteinový faktor Apaf-1 (apoptosis protease activation factor), vytváří s ním komplex apoptosom, který pak aktivuje prokaspasu-9. Následuje kaskáda reakcí vedoucí k apoptóze. K tvorbě apoptosomu je ještě nutná

vazba ATP nebo dATP. Cytochrom *c* navázaný na membránu se vyznačuje apoptotickou aktivitou a prezentuje faktor aktivující prokaspasu. V této formě dochází ke konformačním změnám, otevření přístupu k hemové skupině a disociaci axiálního ligandu železa, Met-80. Peroxidasová aktivita cytochromu *c* vázaného na membránu je důležitá pro jeho uvolnění do cytosolu. 25% mitochondriální membrány tvoří fosfolipid kardiolipin (CL) a právě jeho komplexe s cytochromem *c* hrají roli v indukci apoptózy. Podobně jako u α -laktalbuminu, změna struktury molekuly z nativního stavu do MG umožňuje přepnout na jinou, alternativní biologickou funkci bílkoviny.

Biologické systémy jsou nesmírně složité a průběh nejrůznějších chemických proměn a reakcí tvořících celé metabolické cesty ovlivňují pomocí enzymů. Je možné, že podobná regulace existuje již na úrovni sbalování bílkovin. Mezi tyto mechanismy kontrolující konformaci bílkovin patří jednak systém chaperonů, dalších enzymů napomáhajících sbalení a také proteasomový komplex sloužící k odbourávání špatně sbalených nebo nepotřebných bílkovin. A podobně jako odchýlné chování enzymu má za následek metabolickou poruchu, tak špatné fungování regulace sbalování má za následek konformační chorobu.

Další význam stavů MG je, že je rozeznávají některé chaperony. Hlavní třídy chaperonů jsou Hsp40 (40-kDa heat shock protein, u *E. coli* DnaJ), Hsp60 (GroEL u *E. coli*), Hsp70 (DnaK) a Hsp90. Hsp60 je velký oligomerní protein sudovitého tvaru, nazývaný chaperonin. U *Escherichia coli* se nazývá GroEL a jemu homologické proteiny se nacházejí v mitochondriích a chloroplastech. V cytosole eukaryotických buněk se nachází tzv. TCP-1. Do jeho centrální dutiny váže částečně sbalené proteiny a pomáhá jim správně se sbalit. Pravděpodobně umožňuje špatně sbaleným proteinům se rozbalit a znovu sbalit. K jeho správné funkci je u bakterií nutné ATP a protein GroES. Hsp70 se váže na nascentní polypeptidový řetězec a pomáhají mu v tom proteiny Hsp40. Obecné schéma funkce chaperonů je na obrázku 5.



Obrázek 5. Obecné schéma činnosti chaperonů, U = denaturovaný stav, I = meziprodukt, podle cit. 9

MG mají velkou tendenci agregovat a činnost proteinů Hsp60 a Hsp70 tuto agregaci potlačuje. *E. coli* s mutací v σ^{32} podjednotce RNA polymerasy, která rozlišuje promotor heat shock proteinů, není při zvýšené teplotě schopna syntetizovat chaperony a bílkoviny v buňce agregují.⁹

Bychkova a spol.¹⁹ přišli s hypotézou, že stav MG má význam v translokaci bílkovin přes membránu. Opřeli se o několik důkazů:

1. Stabilizace proteinu inhibuje translokaci
2. Translokovány jsou nenativní proteiny
3. Bílkoviny vázané na membránu mají nenativní strukturu
4. Vazba signálních sekvencí může způsobit pomalejší sbalení
5. Bílkoviny v denaturovaném stavu a MG se vážou na micely a membrány

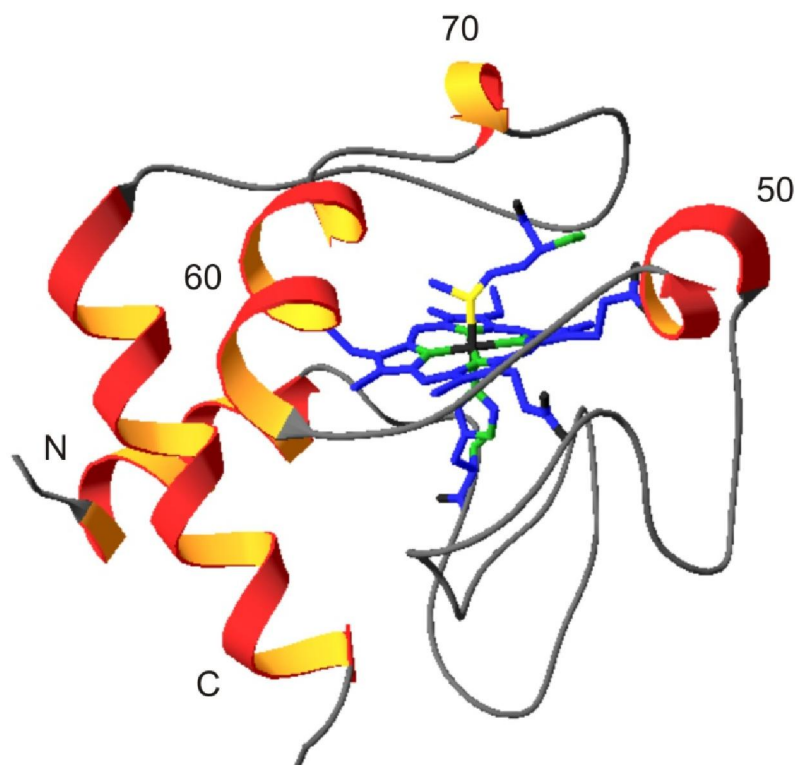
4. Výskyt molten globule

V této kapitole je uveden přehled konformačních stavů MG u některých bílkovin, za jakých laboratorních podmínek jsou pozorovány a jejich stručná charakteristika. Podle Ptitsyna³ byly, kromě proteinů uvedených v této kapitole, popsány MG u dalších 15 proteinů. MG nacházíme jak v proteinech s molekulární hmotností od 7000 (inhibitor trypsinu) do 91000 (kreatinasa). Jejich výskyt není nijak omezen ani jednotlivými strukturálními typy proteinů – čisté α nebo β , α/β nebo $\alpha+\beta$ typy bílkovin.

4.1. Cytochrom *c*

Jedním z oblíbených modelů pro studium MG je koňský cytochrom *c*. Je to hemoprotein složený ze 104 aminokyselin. Terciární strukturu (obr. 6) cytochromu tvoří 5 α -helixů označených podle jejich umístění v polypeptidovém řetězci:

- N-koncový helix (aminokyseliny 6-14)
- C-koncový helix (87-102)
- helixy 50 (49-54), 60 (60-69) a 70 (70-74)



Obrázek 6. Struktura cytochromu *c* z koňského srdce rozlišením 2,0 Å. Značení helixů je podle textu. Uprostřed je hemová skupina s Met-80 nad její rovinou a His-18 pod rovinou (PDB kód 1HRC, zpracováno ve Swiss-PDBViewer a CorelDraw X4)

Hemová skupina se na polypeptidový řetězec váže kovalentně thioetherovými vazbami přes vinylové skupiny na Cys-14 a Cys-17. Axiální ligandy atomu železa v hemové skupině jsou His-18 a Met-80.²⁰ Zatímco koordinační vazba histidinu je velice pevná a k jejímu přerušení dochází až v extrémních podmínkách, vazba methioninu je slabší a jeho výměna za jiný ligand je častá součást konformačních změn v molekule v důsledku vnějších vlivů. Cytochrom *c* se nachází mezi vnější a vnitřní mitochondriální membránou. Zprostředkovává přenos elektronů v dýchacím řetězci jako druhý mobilní přenašeč mezi komplexem cytochromů *bc₁* (komplex III) a cytochrom *c* oxidasou (komplex IV). Existuje ve 2 oxidačních stavech, jako redukovaný ferrocycyochrom *c*(Fe²⁺) a oxidovaný ferricytochrom *c*(Fe³⁺). Cytochrom *c* je téměř univerzální eukaryotní protein, který je evolučně značně konzervován. Nachází se ve všech organismech obsahující elektronový transportní řetězec – ten nemají jen některé striktně anaerobní bakterie. Elektronový transportní řetězec vznikl asi před 1,5-2 miliardami let a od té doby se příliš nezměnil. Struktura a funkce cytochromu *c* byla vysoce konzervována během celého vývoje. Cytochrom *c* z jakéhokoliv eukaryotního organismu reaguje *in vitro* s cytochrom *c* oxidasou jiného druhu.²¹ V molekule nalezneme variabilnější sekvence i pozice prakticky invariantní, v kterých by mutace způsobila strukturální nebo funkční změny.^{22, 23}

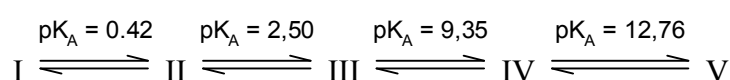
- Cys-14, Cys-17, His-18 a Met-80 jsou aminokyseliny tvořící vazbu s hemovou skupinou.
- 9 glycinových zbytků obsazuje v molekule cytochromu *c* pozice, kde by jinak jejich substituce za aminokyseliny s větší postranní skupinou vedla k strukturálním změnám.
- Cytochrom *c* obsahuje velký počet bazických aminokyselin. Lysinové zbytky v polohách 8, 13, 25, 27, 72, 73, 86 a 87 jsou umístěny v okolí hemové skupiny. Prostřednictvím nich se cytochrom *c* váže ke svým redoxním partnerům.
- Tyr-48, Tyr-67, Tyr-74 a Tyr-97 jsou velice důležité pro udržení nativní konformace cytochromu v blízkosti hemu.
- Phe-82 je další konzervovaná aminokyselina. Její aromatický kruh je umístěn rovnoběžně s protoporfyrinovým kruhem hemové skupiny a aktivně se zúčastňuje transferu elektronu. Mutace Phe-82 za jinou aminokyselinu podstatně snižuje efektivitu transferu elektronu.

- Pro strukturu a funkci cytochromu *c* jsou důležité molekuly vody v určitých pozicích. Molekula vody W-1 se nachází v blízkosti Met-80 a tvoří vodíkové vazby s Asn-52, Tyr-67 a Thr-78.

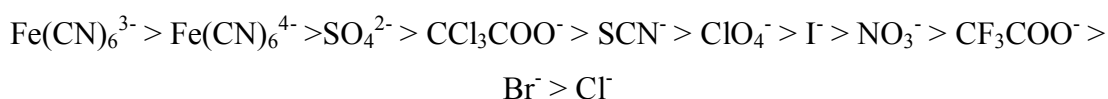
Jak již bylo připomněno v předchozí kapitole, cytochrom *c* má svoji roli také v apoptóze.²⁴

4.1.1. Molten globule cytochromu *c*

Závislost UV-VIS spekter na pH roztoku cytochromu je známá od roku 1941. Pět forem je pozorováno v rozmezí pH 0-14 a jsou očíslovány I-V.²⁵



Za fyziologických podmínek je dominantní stav III, tedy nativní stav. Pod pH 2,5 v prostředí HCl molekuly cytochrom *c* nesou velký kladný náboj (+27). Repulze nábojů způsobují destabilizaci terciární struktury molekuly a její následné rozbalení (vzniká stav označovaný II). Ale zvýšením iontové síly přidávkem $\approx 0,5M$ KCl nebo HCl dochází k stabilizaci struktury molekuly a tvorbě kompaktní MG. Zvýšení iontové síly vede k elektrostatickým interakcím aniontů a pozitivně nabitých skupin v proteinu a k odstínění zmiňovaných odpudivých sil. Schopnost chloridových a jiných aniontů stabilizovat v kyselém prostředí denaturovaný stav roste v pořadí:



Rozhodující roli má především velikost náboje a v případě iontů se stejným nábojem je jejich pořadí obrácenou Hofmeisterovou řadou. Kyselina sírová a chloristá indukují přechod do MG přímo. V odborné literatuře se uvádí pro tuto MG také název A-stav (A state, acid-induced state).^{26, 27} A-stav cytochromu *c* je poměrně dobře charakterizován. Studie resonančního Ramanova rozptylu²⁸ a výměny protonů²⁹ umožnila detailnější pohled na rozsah zachování jednotlivých helixů, terciární struktury a nekovalentních interakcí které strukturu stabilizují. U MG dochází k poklesu míry helicity z 37% na 27%. Tři helixy, N- a C-koncový a helix 60 jsou zachovány, zatímco dva kratší helixy 50 a 70 a dlouhé smyčky jsou flexibilní a rozbaleny. Stabilita uvedených helixů v MG spočívá v zachování určitých stabilizujících nekovalentních interakcí, které nalézáme i v nativním proteinu. Jedná se především o evolučně stabilní interakce mezi Gly-6/Phe-

10 a Leu-94 a patrové interakce mezi Phe-10 a Tyr-97. Na stabilitu MG mají vliv interakce a vazby mezi postranními řetězci aminokyselin a hemovou skupinou:

- koordinační vazba mezi His-18 a atomem železa
- van der Waalsovy interakce mezi Leu-94 a Leu-98 a methylovou skupinou B pyrrolového kruhu
- van der Waalsovy interakce mezi Leu-64 a Leu-68 a pyrrolovým kruhem
- van der Waalsovy interakce mezi Arg-91 a Met-65
- iontový pár Lys-99 a Glu-61
- kovalentní vazby s cysteinovými zbytky upevňující hemovou skupiny v hydrofobním jádru

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

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

Molekuly porfyrin-cytochromu *c* (bez atomu železa) a apocytochromu *c* (bez hemové skupiny), kde koordinační vazba His-18 chybí, jsou méně stabilní jako cytochrom *c*. Apocytochrom *c* je v rozsahu pH 2-9 denaturovaný a MG tvoří v roztoku s vysokou iontovou silou.^{3,30}

Soretův pás v hemoproteinech odráží spinový stav železa a je proto užitečný k sledování změn v jeho koordinaci a struktuře okolí. Vhodná metoda pro studium koordinace železa je i EPR. V nativním stavu se železo nachází v nízkospinovém stavu His-18-Fe-Met-80 a maximum Soretova pásu je při $\lambda = 410$ nm. Po denuraci kyselinou jsou oba axiální ligandy vytěsněny a nahrazeny úplně nebo částečně vodou. V denaturovaném stavu se pak železo nachází ve směsi vysokospinových stavů His-18-Fe-H₂O, H₂O-Fe-H₂O a pentakoordinovaného H₂O-Fe- a poloha maxima se posouvá k $\lambda = 394$ nm. V A-stavu je atom železa tvořen směsí stavů vysokospinového – His-18-Fe-H₂O, dvou nízkospinových – His-18-Fe-His, His-18-Fe-Met-80 a His-18-Fe- a pozice maxima je u 397-402 nm. His jako druhý ligand v nízkospinovém stavu je pravděpodobně His-26 nebo His-33.^{26,31-33}

Cytochrom *c* obsahuje jeden zbytek tryptofanu, v pozici 59. Tryptofan je přirozený fluorofor vyskytující se v proteinech. Nachází se poblíž N- konce helixu 60 a je v blízkosti hemové skupiny. V nativním stavu je jeho fluorescence úplně zhasána právě hemovou skupinou. Zvětšení vzdálenosti mezi Trp-59 a hemovou skupinou po denaturaci vede k nárůstu intenzity fluorescence. Po zvýšení iontové síly a přechodu do MG se tryptofan a hemová skupina dostávají opět do vzájemné blízkosti a intenzita fluorescence klesá. Kromě toho je na okolí tryptofanu citlivá poloha emisního maxima. U pohřbeného tryptofanu se nachází při $\lambda = 335$ nm. U odkrytého tryptofanu se pozoruje rudý posuv maxima až k $\lambda = 350$ nm.³⁴

Částečně sbalený stav podobný MG se akumuluje v roztoku 2 M Gdn-HCl nebo 4 M močoviny. Latypov a spol.³² charakterizovali tento stav cytochromu, označený jako I, pomocí 2D NMR, CD a UV-Vis a fluorescenční spektroskopie. Zjistili velkou podobnost s MG stabilizovanou anionty v kyselém prostředí, a to jak u WT-cytochromu *c* (wild type), tak u rekombinantního H33N. Pomocí tohoto experimentu potvrdili, že His-26 je jeden z ligandů nízkospinového stavu železa v MG a že His-33 nebo lysinové zbytky v okolí hemové skupiny se na koordinaci nezúčastňují.

Celkový tvar MG je kompaktní a globulární. Její gyrační poloměr je jen o 30% větší než poloměr molekuly v nativním stavu. Značně flexibilní terciární struktura si udržuje jistý fold podobný nativnímu proteinu.³⁵

4.1.2. Další výskyt molten globule u cytochromu *c*

Stabilizovat denaturovaný cytochrom *c* mohou i alkoholy³¹, glycerol, sacharidy nebo cukerné alkoholy.³⁶ Efekt alkoholů v roztoku trifluoroctové kyseliny s pH 2 stoupá v pořadí:

Butanol > propanol > ethanol > methanol.

Čím větší efekt, tím nižší koncentrace je potřebná k indukci přechodu do MG. Maximum Soretova pásu u MG stabilizovaných alkoholy resp. glycerol je při $\lambda = 398$ resp. 405 nm, což je mírně odlišná hodnota než u MG stabilizovaných solemi. V MG stabilizované alkoholy se železo nachází ve směsi nízkospinových a vysokospinových stavů, ale jen v nízkospinovém stavu je v MG stabilizované glycerolem. Odlišné chování od MG stabilizované solemi se projevuje také v schopnosti vázat ANS.

Vzhledem k těmto faktům Naeem a spol.³¹ označili MG stabilizovanou alkoholy v práci jako I₁. Výskyt této MG a A-stavu u cytochromu *c* je příkladem heterogenity MG.

Za nativních podmínek po malém přídavku denaturačního činidla se v roztoku cytochromu *c* tvoří částečně rozbalené konformace podobné MG. Molekula se rozbaluje vždy po jistých strukturních částech, což poukazuje na sekvenční model sbalování. Nejvíce rozbalený meziprodukt má zachovaný pouze N- a C- koncový helix a připomíná vlastnostmi meziprodukt v rané fázi sbalování.³⁷

Indukovat přechod do stavu podobného MG dokáže kyselina olejová i SDS.^{33, 38, 39} Spektrální změny detekované pomocí cyklické voltametrie, fluorescenčních, CD, UV-VIS spektroskopických technik a rezonančního Ramanova rozptylu potvrdily změny v terciární struktuře v komplexu s kyselinou olejovou při neutrálním pH. K vazbě mastné kyseliny dochází v blízkosti tunelu vedoucího od hemové skupiny na povrch. K této vazbě přispívají elektrostatické interakce disociované karboxylové skupiny s bazickou aminokyselinou Lys-72 a interakce hydrofobního řetězce kyseliny s ještě neidentifikovaným shlukem hydrofobních aminokyselin. Potenciální vazební oblasti jsou sekvence 43-46 nebo 81-85. Koordinační vazba Met-80-Fe je přerušena a železo se váže na nový ligand, podle autorů studie pravděpodobně Lys-73. Nedochozí ke změně spinového stavu železa. Přídavek ATP nebo dATP k tomuto komplexu indukuje zpětný přechod do nativního stavu.⁴⁰ Podobný efekt má kyselina olejová i na α -laktalbumin a její komplex s proteinem v tumorových buňkách indukuje apoptózu.¹⁶⁻¹⁸ Indukce apoptózy je u cytochromu *c* spojována s jeho vazbou na mitochondriální membránu a zahrnuje perturbaci terciární struktury a přechod do stavu podobnému MG. Elektrostatické interakce hrají zásadní roli ve vazbě cytochromu na své redoxní partnery a záporně nabitý povrch membrány. Vazební místo v komplexu bc₁ se skládá z 8 zbytků kyseliny glutamové uspořádaných za sebou. Badatelé se pokoušejí *in vitro* imitovat mikroprostředí vazebních míst pomocí negativně nabitých povrchů – liposomů obsahujících záporně nabitě fosfolipidy³⁹, anorganické, organické polyanionty nebo syntetické polypeptidy.⁴¹ Polyvinylsulfát při pH menším než 4 indukuje konformační změny v molekule cytochromu a její přechod do stavu podobného MG. Polyanionty:

- Destabilizují strukturu cytochromu *c*.
- Zmenšují T_m tepelného přechodu.
- S cytochromem *c* v kyselém pH interagují ireverzibilně.

Obecně, polyanionty mohou mít stabilizující i destabilizující efekt na strukturu bílkoviny. V prvním případě to způsobuje špatné sbalení proteinu (anglicky misfolding). Destabilizace špatně sbalených proteinů vede k částečně sbaleným stavům a následnému správnému sbalení, ale také třeba k agregaci proteinu skrze interakce exponovaných hydrofobních aminokyselin a tvorbě amyloidů. Efekt polyaniontů souvisí jak s elektrostatickými interakcemi polárních skupin, tak s hydrofobními interakcemi. Na druhé straně, zvýšená stabilita proteinu kvůli vazbě na polyaniont zrychluje sbalování bílkoviny. Zesílené mezimolekulární interakce mezi bílkovinami mohou vyústit do progresu amyloidózy. Závisí to pouze na konkrétní bílkovině a polyaniontu, která varianta nastane.^{42, 43}

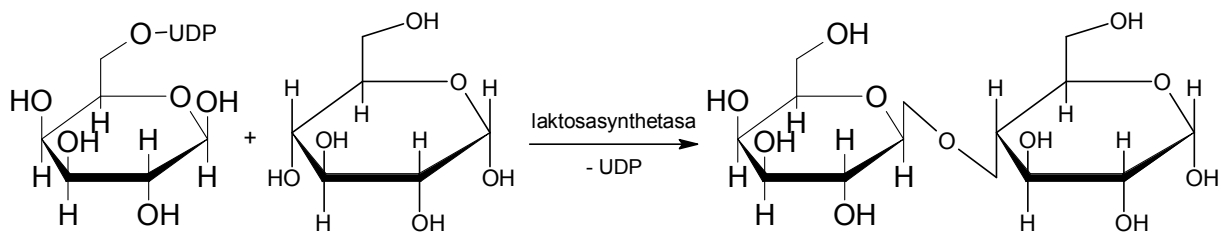
4.2. α -laktalbumin a lysozym

Lysozym a α -LA jsou malé bílkoviny složené ze 129/130 (kuřecí lysozym) resp. 123 (α -LA) aminokyselin.^{3, 44} Jsou navzájem homologické a mají jednotný původ – mluvíme zde o tzv. α -laktalbuminové-lysozymové rodině proteinů. Ta je dělena do třech skupin - α -LA, lysozym C-typu (vážou Ca^{2+}) a ostatní lysozymy (nevážou Ca^{2+}).³

Strukturně se α -LA skládá z dvou domén, α a β . Doménu α tvoří čtyři α -helixy A-D a tři krátké 3_{10} -helixy:

- A, aminokyseliny 5-11
- B, 23-34
- C, 86-99
- D, 105-109
- 3_{10} -helixy 12-16, 101-104 a 115-119

Doména β je tvořena třemi antiparalelními β -hřebeny, jednoho 3_{10} -helixu a dlouhými nepravidelnými úseky. V molekule α -LA jsou 4 disulfidové vazby, dvě z nich drží domény spolu. V oblasti mezi doménami se nachází vazebné místo pro atom vápníku v oblasti mezi doménami. Toto místo pozůstává ze tří zbytků Asp (82,83 a 88 resp. 85,90 a 91) a dvou atomů karbonylového kyslíku peptidové vazby (79 a 84). α -LA je produkován sekrečními buňkami v bradavkách savců a funguje jako modifikátor specifity pro enzym galaktosyltransferasu, se kterou tvoří enzym laktosynthetasu. Tento enzym syntetizuje v Golgiho aparátu sekrečních buněk laktosu.⁴⁵



V průběhu reakce se tvoří $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidová vazba. Oligomerní α -LA/ α -LA v spojení s kyselinou olejovou se vyznačuje cytotoxickou aktivitou, indukuje apoptózu v tumorových buňkách a má baktericidní účinky.¹⁶⁻¹⁸

Lysozomy mají podobnou strukturu jako α -LA. Skládají se rovněž z dvou domén a lysozomy C-typu vážou atom vápníku. Slepičí lysozym, který Ca^{2+} neváže, nemá zbytky kyseliny asparagové důležité pro vazbu vápníku. Lysozomy $\beta 1 \rightarrow 4$ glykosidovou vazbu na rozdíl α -LA štěpí - mezi N-acetylmuramovou kyselinou a N-acetylglukosaminom, složkami peptidoglykánů z buněčné stěny bakterií. Hlavní funkcí lysozomu je ochrana před mikroorganismy. Lysozym je produkován epitelovými buňkami, makrofágy a neutrofily.⁴⁶

4.2.1. Molten globule u α -laktalbuminu

U hovězího α -LA vzniká MG při různých experimentálních podmínkách – rovnovážný meziprodukt při rozbalení proteinu vlivem přidavku 2 M Gdn-HCl nebo 3 M močoviny, částečně sbalený stav v roztoku HCl o $\text{pH} \leq 3$ (A-stav), v neutrálním prostředí po odstranění atomu vápníku z molekuly (apo- α -LA) a teplotě > 42 °C a při teplotě > 80 °C a neutrálním pH. Rozbalení za zvýšené teploty je reverzibilní kooperativní proces probíhající bez jiných meziproduktů. Vzniká v 0,1 M ekvimolární směsi 4-chloro-1-butanolu a TFE. Všechny tyto stavy jsou si podobné a mají společný znak – atom vápníku z molekuly disociuje.^{11, 35, 47} V 0,5 M roztoku HFIP při pH 7,0 vzniká MG s větším poměrem helicity a větší rigiditou struktury než je MG v kyselém roztoku.⁴⁸ MG je identická s meziproduktem při sbalování α -laktalbuminu. Autoři navrhli kinetické schéma sbalování α -LA:



Prvním krokem je rychlý hydrofobní kolaps a tvorba stabilních sekundárních struktur. MG se tvoří do 15 ms. V druhém pomalejším krok vznikají specifické nekovalentní nativní interakce postranních skupin aminokyselin.⁴⁹

Poměrně zajímavá je funkce a vznik stavu HAMLET. Tento komplex vzniká *in vitro* asociací apo- α -LA s nenasycenou mastnou kyselinou specificky na chromatografické koloně, a to hlavně s kyselinou olejovou. Aktivní komplex nevznikne smícháním kyseliny olejové s roztokem α -LA, anebo když se v experimentu použije α -LA s navázaným atomem Ca. Tento komplex indukuje apoptózu v tumorových buňkách. HAMLET má podobné strukturní vlastnosti jako MG. Helixy v α doméně jsou relativně stabilní, ale amidové skupiny β -listů poměrně ochotně v roztoku mění protony. Podobně jako apo- α -LA podléhá HAMLET částečné proteolyse pomocí subtilisinu, chymotrypsinu, trypsinu a proteas V8 a Asp-N. Rychlosti štěpení HAMLET a apo- α -LA jednotlivými proteasami jsou trochu odlišné.¹⁶ Protože svým chováním za zvýšené teploty připomíná spíše apo- α -LA než A-stav, nejedná se o pravou MG. V porovnání s α -LA je HAMLET méně odolný proti denaturujícím podmínkám (močovina). Denaturace není vratná a autoři se domnívají^{17, 18}, že se jedná o kineticky zachycený konformační stav α -LA ve spojení s kyselinou olejovou. Kyselina olejová v tomto případě funguje jako „partner“ umožňující zaujmout vhodný konformační stav.

Limitovaná proteolýza je nástroj užitečný k mapování konformačních vlastností bílkoviny. K proteolýze dojde, jen když proteasa dokáže vázat polypeptidový řetězec se specifickou sekvencí aminokyselin. Proteasy atakují hlavně úplně nebo částečně rozbalené proteiny, protože kvůli dynamické struktuře u nich dochází ke zpřístupnění specifických sekvencí, které proteasy rozeznávají. Nativní proteiny jsou proto do velké míry proti proteasám rezistentní. Pepsin štěpí MG a komplex HAMLET na dvou místech mezi zbytky v pozicích 40-41, 52-53 a následně 103-104. První dvě pozice se nacházejí v β doméně a třetí na rozhraní obou domén. Byla ověřena flexibilita β domény v souladu s ostatními fyzikálními metodami. Rekombinantní protein des β - α -LA bez β domény je proti hydrolýze mnohem odolnější.⁵⁰

Pomocí metody CD se ukázalo stejné zastoupení sekundárních struktur v MG jako v nativním proteinu.³ Studie HX-NMR⁵¹ ukázala, že ve struktuře MG jsou relativně stabilní helixy A, B, C, D a 3_{10} -helix, všechno elementy α domény. Oproti nativnímu stavu mají uvedené helixy dynamický charakter. Tvorba nativních helikálních prvků v MG α -LA znamená přetrvávání stabilizujících interakcí mezi nimi, protože izolované polypeptidové sekvence netvoří stabilní helixy. Zachování foldu při přechodu z nativního stavu do MG se badatelé snažili prokázat pomocí pokusů v redukčním prostředí, které umožňuje isomerisaci disulfidových vazeb. Výsledky byly trochu

nejasné a protichůdné. Creighton a Ewbank⁵² pracovali s α -LA se selektivně redukovanou vazbou Cys-6-Cys-120, který rovněž tvoří MG. V molekule tohoto laktalbuminu dochází k přeskupování disulfidových vazeb a tvorbě množství isomerů s podobnými spektroskopickými vlastnostmi. Usoudili, že výsledek experimentu napovídá, že MG neudrží nativní topologii polypeptidového řetězce, ale spíše se nachází v stavu sbaleného náhodného klubka. Kim a spol.³ pracovali s rekombinantním proteinem složeným jen z aminokyselin 1-39 a 81-123, teda aminokyselin α domény. V této bílkovině se v redukčním prostředí tvoří disulfidové vazby charakteristické pro kompletní nativní protein. Mutantní proteiny se selektivně nahrazenými cysteiny buď v α doméně nebo jen v β doméně přinesly zajímavý výsledek. V α doméně se preferenčně tvoří nativní disulfidové vazby ale nikoliv v β doméně. Výsledek by měl být důsledkem existence nativního foldu α domény. Že se fold bílkoviny při přechodu do stavu MG zásadně nemění, ukázala metoda SAXS.³⁵

Pro stabilitu MG je významné jedno ze dvou hydrofobních jader vyskytujících se v nativním stavu. Tento shluk je tvořen skupinami helixů A, B a C-koncového 3_{10} helixu. Druhé hydrofobní jádro, tzv. hydrofobní box, se v MG nezachovává. Studie NOE NMR ale prokázala existenci jiného hydrofobního shluku aminokyselin v MG, který se v nativním proteinu nevyskytuje. I tento shluk je důležitý pro stabilitu MG.⁵³

Hovězí α -LA má 4 tryptofanové zbytky a lidský 3 – Trp-60, Trp-104 a Trp-118 jsou společné a hovězí má navíc Trp v pozici 26. Trp-60 je v oblasti mezi doménami a je vhodný ke studiu strukturních změn β domény. Trp-104 a Trp-118 se nachází v α doméně, jsou v nativním stavu pohřbené a s jinými aminokyselinami tvoří hydrofobní shluky. Jsou vhodné na studium kompaktnosti hydrofobního jádra. Trp-60 v MG lidského α -LA je přístupnější rozpouštědлу v důsledku neuspořádané β domény. Trp-104 ve shluku hydrofobních aminokyselin je jen o málo přístupnější rozpouštědлу než v nativním proteinu. Trp-118 je naopak v MG nepřístupnější a v pohřbené pozici. V MG je dost terciárních interakcí potlačujících subnanosekundové rotace tryptofanových zbytků oproti plně rozbalenému stavu. Struktura MG je dost relaxovaná a umožňuje pomalejší fluktuace segmentů sekundární struktury.⁵⁴ V hovězím nativním proteinu jsou všechny tryptofanové zbytky pohřbené v hydrofobním jádru, v MG jsou 2 zbytky na povrchu proteinu v kontaktu s rozpouštědlem.⁵⁵

Velikost a kompaktnost MG byla studována metodou SAXS. Zjištěný gyrační poloměr R_g je o 10% větší u MG (17,2 Å) oproti nativnímu proteinu (15,6 Å). Gyrační poloměr plně denaturovaného proteinu v roztoku 8 M močoviny má hodnotu 30,0 Å. MG má globulární sférický tvar. Méně organizovaná β doména teda ještě není plně rozbalená a molekula jako celek zůstává kompaktní.³⁵ Struktura MG α -LA se nedá vystihnout jedinou unikátní strukturou, nýbrž je tvořena mnoha rychle proměnlivými konformacemi. Je jasné, že MG α -LA je vysoce dynamický a flexibilní útvar.³

4.2.2. Molten globule u lysozymů

Na rozdíl od α -LA je denaturace slepičího nebo lidského lysozymu vlivem teploty, močoviny nebo Gdn-HCl vysoce kooperativní. K denaturaci dochází při 80 °C, v 5M močovíně, 4 M Gdn-HCl a v methanolu/ethanolu v koncentraci 50% při pH 2,0. Oba stavy se liší, denaturovaný stav vlivem metanolu má neobvykle vysoký obsah α -helixů. Přesto NMR spektra, SAXS a měření intenzity fluorescence pomocí sondy ANS prokázalo, že se o kompaktní stav nejedná. Bez přídavku metanolu/etanolu nedochází k nárůstu podílu α -helixu. Podobný růst α -helicity nastal při renaturaci v čase ≤ 10 ms.⁵⁶

Na začátku devadesátých let publikovali Buck a spol.⁵⁷ několik studií, v kterých prokázali a charakterizovali MG u slepičího lysozymu v roztoku TFE. Má, jako α -LA, obojakou strukturu - helikální prvky α domény jsou zachovalé a β doména je kompaktní, ale značně flexibilní. Podobně vzniká MG i v 25% roztoku hexafluoropropan-2,2- diolu (HFA). TFA a HFA mají silný stabilizační účinek na proteiny ve vodném roztoku.^{58, 59} Fyziologicky významná je schopnost lysozymu tvořit oligomery a v delším časovém úseku agregovat do fibrilárních struktur s vysokým obsahem β -listů. Podmínkou oligomerizace a agregace je destabilizování lysozymu. Slepičí a lidský lysozym tvoří *in vitro* fibrily při pH 2,0 a $T \approx 60$ °C v průběhu dvou dní. Zvýšením pH na hodnotu 3,0 se zvýší doba nutná k tvorbě fibril. Při pH 4,0 se fibrily netvoří, protože i při zahřátí je lysozym v nativním stavu. Tvorbě agregátu předchází částečné rozbalení lysozymu a expozice hydrofobních aminokyselin na povrchu. Jinou možností destabilizace lysozymu jsou mutace. S tímto mechanismem agregace je spojovaná úloha lysozymu u některých amyloidóz.

Lysozym z koňského mléka je lysozym C-typu a tvoří MG jako stály meziprodukt při rozbalování proteinu vplyvem Gdn-HCl, v kyselém prostředí jako částečně rozbalený stav a při rozbalení proteinu vplyvem zvýšené teploty. Nevzniká v 0,1 M ekvimolární

směsi 4-chloro-1-butanolu a trifluoroethanolu. U této MG se v mnohem větším měřítku než u cytochromu *c* a α -LA vyskytují specifické interakce aromatických postranních skupin a jsou zodpovědné za kooperativu procesu teplotní denaturace. Stabilnější a víc podobná nativnímu proteinu je MG lysozymu ze psího mléka. α -LA a lysozym C typu vážou vápník, ten ale není determinantou tvorby MG. Holubičí lysozym (z vaječného bílku) je lysozym C typu a nepozoruje se žádný meziproduct při denaturaci.³

4.3. Apomyoglobin

Myoglobin je monomerní hemoprotein složený 154 aminokyselin. Jeho terciární strukturu tvoří 8 α -helixů A-H a ty tvoří tzv. globinový fold. Vyskytuje se ve svalech, kde reverzibilně váže O₂ pomocí hemové skupiny a transportuje ho do mitochondrií. Slouží i jako jeho rezervoár v svalech při hypoxygenických stavech. Odstraněním hemové skupiny z molekuly myoglobinu dostaneme apomyoglobin (dále apoMb).⁶⁰ Při neutrálním pH apomyoglobin tvoří strukturu podobné nativní struktuře myoglobinu, jen struktura sekvencí, tvořící helix D, část helixu E, EF smyčka a helix F, je ve větší míře neuspořádaná.⁶¹ ApoMb tvoří dva stavy MG – jeden v roztoku při pH kolem 4 a druhý při ještě nižším pH při vysoké iontové síle roztoku.

4.3.1. Molten globule při pH 4

Při neutrálním pH apomyoglobin tvoří strukturu podobné nativní struktuře myoglobinu. Při snižování pH v roztocích s malým množstvím soli se pozorují dvě změny hydrodynamického poloměru objemu apoMb jako funkce pH. První přechod je mezi pH 5,0-4,5 a druhý mezi 4,0-3,5. Dle CD spekter, v oblasti pH 4,0-4,5 existuje apoMb v stave MG (I₁), charakterizované přítomností prvků sekundární struktury, kompaktní molekulou a ztráta specifické terciární struktury. Další pokles pH pod hodnotu 3,5 vede k úplné denaturaci. V MG jsou zachovány helixy A, G, H; helix F a jiné helixy jsou nestabilní. Studie HX-NMR poukazuje na mnohem dynamičtější strukturu MG oproti nativnímu stavu.⁶² Studium FRET mezi tryptofanovým donorem v helixe A a tyrosinovým akceptorem v H helixe prokázal blízký kontakt uvedených helixů. Předpokládá se, že tyto helixy interagují hydrofobními interakcemi a tvoří kompaktní jádro v MG.³

Studie SAXS ukázala, že gyrační poloměr R_g je o 30% a Stokesův poloměr R_s o 20% větší jako u nativního proteinu. Poměr R_g/R_s je citlivý ukazatel kompaktnosti molekuly a jmenuje se p-faktor. Pro kompaktní molekulu globulárního proteinu vychází hodnota

asi 0,8 a pro náhodné polypeptidové klubko 1,51. apoMb má hodnotu p-faktoru 0,93. MG apoMb je teda kompaktní molekula.³⁵

4.3.2. Stabilizace denaturovaného apoMb solemi

ApoMb je při pH 2 již kompletně denaturovaný. Přídavkem aniontu ve formě soli nebo kyseliny se polypeptidové řetězce složí do stavu MG. Princip stabilizace, vazby aniontů na bazické aminokyseliny, je podobný jako u cytochromu *c* nebo α -laktalbuminu. MG stabilizovaná chloridy MG(Cl) je podobná MG v roztoku s pH 4. MG stabilizovaná pomocí trichloroctové kyseliny MG(TCA) má odlišné vlastnosti.³⁴ Spolu s helixy A, G, H tvoří čtvrtý helix B. Je kompaktnější a má menší sklon k agregaci než pH 4 MG.³ Kataoka se spolupracovníky³⁵ studovali MG(Cl) pomocí techniky SAXS. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 2. Z hodnot gyračních poloměrů vyplývá, že TCA-MG je velice kompaktní. HCl-MG má velkou tendenci k agregaci a získaná hodnota gyračního poloměru je tím značně ovlivněna. TCA-MG jsou sice globulární ale nesférického tvaru, spíše protáhlého tvaru s kompaktním jádrem na jedné straně molekuly a flexibilním koncem na druhé straně.

Tabulka 2. Hodnoty gyračních poloměrů, tvar molekuly a zastoupení α -helixů v apoMb (převzato z cit. 35)

Stav	R_g (Å)	Tvar	α -helix (%)
apoMb nativní stav	19,7±0,6	globulární	55
MG(TCA)	23,1±1,3	globulární	45
MG(Cl)	44,8	-	28
Denaturovaný stav (Gdn-HCl)	35,8±1,0	řetězec	0

4.4. Ribonukleasa HI

Ribonukleasa HI (RNasa HI, EC 3.1.26.4) z *Escherichia coli* je α + β protein složený ze 155 aminokyselin. Je to člen rodiny RNas H štěpící specificky RNA z hybridní molekuly RNA-DNA. Molekulu tvoří jedna doména a neobsahuje žádné disulfidové vazby. Terciární struktura RNasy H tvoří tzv. polynukleotidtransferasový fold. Funkce v bakteriích není přesně známá. Virové RNasy H jsou jako doména součástí reversní transkriptasy.

MG RNasy HI popsali v roce 1994 Dabora a Marqusee.⁶² Použili rekombinantní protein, ve kterém nahradili 3 cysteiny v molekule alaninem. Monitorovali CD signál

($\lambda = 222 \text{ nm}$) RNasy HI v závislosti na pH. Z titrační křivky je vidět změna signálu při pH 2. Podle hodnot elipticity není protein pod pH 2 denaturovaný, ale existuje v stave MG se zachovalými prvky sekundární struktury. Pomocí fluorescenční sondy ANS prokázali, že v molekule jsou přístupné shluky hydrofobních aminokyselin a tedy terciární struktura proteinu není tak rigidní jako v nativním stavu. ANS se váže na přístupné klastry postranních řetězců aminokyselin v nativním stavu tak v MG. V denaturovaných proteinech se ANS na tyto shluky sice taky váže, ale fluorescence je zhasána okolními molekulami rozpouštědla. Ze sedimentačních experimentů vyplynulo, že MG je kompaktní podobně jako nativní stav, na rozdíl od denaturovaného. MG RNasy HI neagreguje ani při vyšších koncentracích proteinu.

Struktura popsané MG je podobná jako u meziprojektu v počáteční fázi sbalování proteinu. Struktura MG zahrnuje flexibilní helixy A a B tvořící hydrofobní jádro. Ostatní prvky sekundární struktury jsou méně stabilní. Výměna protonů v helikálních strukturách ukázala značné rozdíly indukující nekooperativní strukturu MG RNasy HI.³

4.5. β -laktoglobulin

Hovězí β -laktoglobulin (dále jen β -LG) je protein složený ze 162 aminokyselin. Při fyziologickém pH tvoří dimer. V své molekule obsahuje 2 disulfidové vazby. Molekulu tvoří 9 antiparalelních β -hřebenů A-I a jeden α -helix. V dutině, kterou uzavírají listy A-D z jedné strany a listy E-H z druhé, se nachází vazebné místo. Tento fold proteinu se nazývá β -škeble. Patří do široké proteinové rodiny lipokalinů. Lipokaliny vážou malé hydrofobní ligandy a slouží tak jako jejich transportéry. β -laktoglobulin se vyskytuje v mléku přežvýkavců, ale ne u všech druhů. Chybí např. u člověka, křavy nebo zajícovců. Jeho přesná funkce, jako je to u jiného proteinu z mléka α -laktalbuminu, není známá. Dobře váže retinol, mastné kyseliny a cholesterol.⁶³

MG koňského β -LG vzniká okyselením roztoku pod pH 2, pK_A přechodu je 2,3. Podle CD a NMR spekter se sekundární struktury zachovávají, ale nezachovává se pevná terciární struktura.³ Podle hodnot hydrodynamických poloměrů je MG kompaktní podobně jako nativní stav (tab. 3, další strana). Má tendenci zvolna agregovat v důsledku interakcí odkrytých hydrofobních aminokyselin nebo tvorbou intermolekulárních disulfidových vazeb. Je zajímavá v porovnání s MG jiných proteinů přítomností mnoha helikálních struktur které v nativním proteinu nenajdeme.

MG koňského β -LG se pozoruje taky v roztocích o pH 3,2 s přidavkem denaturačního činidla.⁶⁴

Tabulka 3. Podíl sekundárních struktur v různých stavech β -laktoglobulinu a jejich hydrodynamické poloměry

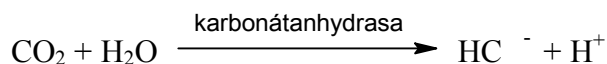
stav	α -helix (%)	β -list (%)	R_s (Å)
nativní stav	9	41	17,5
A-stav	20	28	22,6
nativní stav (X-Ray)	6	44	-

Rozbalování hovězího β -LG je pochod jednostupňový a meziprodukty jsou velmi nestálé. Je možné je stabilizovat pomocí TFE nebo snížením teploty. Hydrofobní jádro v MG je pravděpodobně tvořeno 4 stabilnějšími hřebeny A, F, G a H. Polypeptidové řetězce tvořící 3 listy C, D a částečně A mají tendenci v nenativní terciární struktuře tvořit místo listů helixy. Jelikož se v průběhu renaturace β -LG z koncentrovaného roztoku Gdn-HCl podařilo prokázat meziprodukt s rovněž neobvykle vysokým podílem α -helikálních struktur, MG lze ztotožnit s tímto meziproduktem. Proto je β -LG dobrým modelem pro vysvětlení proměny α - do β -struktur, která hraje roli u některých chorob.³

Zvýšení podílu α -struktur indukují alkoholy, organická rozpouštědla, fosfolipidové dvojvrstvy a micely. Kanijal a spol.⁶⁵ studovali efekt tří alkoholů na β -LG v prostředí HCl (pH 2) a laboratorní teploty. Systémy studovali pomocí fluorescence, CD spekter a ultrazvuku. V roztoku 20% propan-2-olu, 14% TFE, 4% HFIP přechází β -LG do stavu MG. Při těchto koncentracích alkoholů je maximum pozorované fluorescence ANS a změna kompresibility proteinu. Syntetické micely spontánně formované v roztoku povrchově aktivní látky DDAB-DTAC indukují proměnu $\beta \rightarrow \alpha$ v hovězím β -LG a stabilizují neúplně sbalený stav - MG.^{66, 67}

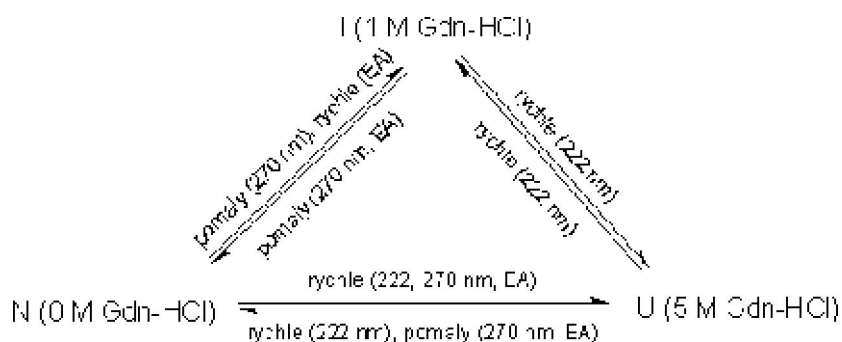
4.6. Karbonátanhydrasa

Savčí karbonátanhydrasa (EC 4.2.1.1) je monomerní metaloenzym obsahující ve svém aktivním místě zinek. 11 isoform tohoto enzymu v organismech savců tvoří α -třidu. Rostlinné enzymy patří do třídy β a mají zcela jinou strukturu a funkci. Katalyzuje reverzibilní hydrataci oxidu uhličitého:



Vyznačují se i esterasovou aktivitou čehož se využívá při stanovení její aktivity. Hlavní funkcí u savců je udržovat fyziologické pH pomocí tzv. hydrogenuhličitanového pufru.⁶⁸

Z CD spekter v daleké UV oblasti je v molekule savčí karbonátanhydrasy 35% podíl β -listů. Podle ORD a CD spekter v blízké a daleké UV oblasti, je karbonátanhydrasa B, lidská i hovězí, v stavu MG v roztoku HClO_4 o pH mezi 1,5-3,6. Z titrační křivky vyplývá pK_A tohoto přechodu hodnota 4.⁶⁹ MG vzniká při neutrálním pH a laboratorní teplotě v 0,5-2 M Gdn-HCl. Zvýšením koncentrace Gdn-HCl na 5 M dochází k úplné denaturaci.⁷⁰ MG při kyselém pH a v přítomnosti Gdn-HCl jsou si podobná, jak vyplývá ze spekter CD. V obou případech enzym úplně ztratil svoji aktivitu. MG získáme z denaturovaného stavu v 8 M močovíně při pH 2 dialýzou proti roztoku kyseliny chloristé. Přímý pokus o renaturaci zředěním končí agregací proteinu. Popsané MG jsou podobné s meziproductem tvořeným při sbalování proteinu z 5-6 M Gdn-HCl roztoku.¹³ Měření kinetiky denaturace a následné renaturace pomocí CD v UV oblasti a enzymové aktivity bylo sestaveno kinetické schéma platné pro karbonátanhydrasu:



Obrázek 7. Schéma denaturace a renaturace karbonátanhydrasy měřená pomocí metody CD při 222 a 270 nm, N = nativní stav, U = denaturovaný stav, I = MG, EA = esterasou aktivita (převzato z cit. 13)

Studium denaturace proteinu za nižších teplot ukázalo zajímavý fakt. Za laboratorní teploty denaturace karbonátanhydrasy pomocí Gdn-HCl dvoustupňový děj z MG jako meziproductem. Uverskému a Ptitsynovi⁷¹ se podařilo pomocí metod FPLC a měření fluorescence při 4 °C rozlišit při rozbíjení proteinu dva meziproducty s odlišnými vlastnostmi. Jeden z těchto stavů nazvali „pre-MG“. Uversky a Ptitsyn vypočítali zastoupení jednotlivých stavů proteinu a koncentraci denaturačního činidla, u které je

zastoupení jednotlivých forem maximální. Použitá chromatografická metoda umožnila odhad Stokesova hydrodynamického poloměru (tab. 4).

Tabulka 4. Charakteristiky karbonátanhydrasy při různých koncentracích c_M Gdn-HCl. R_S - hydrodynamický poloměr. (převzato z cit. 71)

c (Gdn-HCl, M)	0	1,32	1,74	6
R_S	23,0 (=R _{SN})	26,4	30,7	52,4
R_S/R_{SN}	1,00	1,15	1,33	2,28
stav	nativní	MG	pre-MG	rozbalený

Oba stavy splňují definici MG, jen „pre-MG“ je objemnější než první stav. „Pre-MG“ se ztotožňuje s meziproduktem v počáteční fázi sbalování a mění se v MG.

4.7. Stafylokoková nukleasa

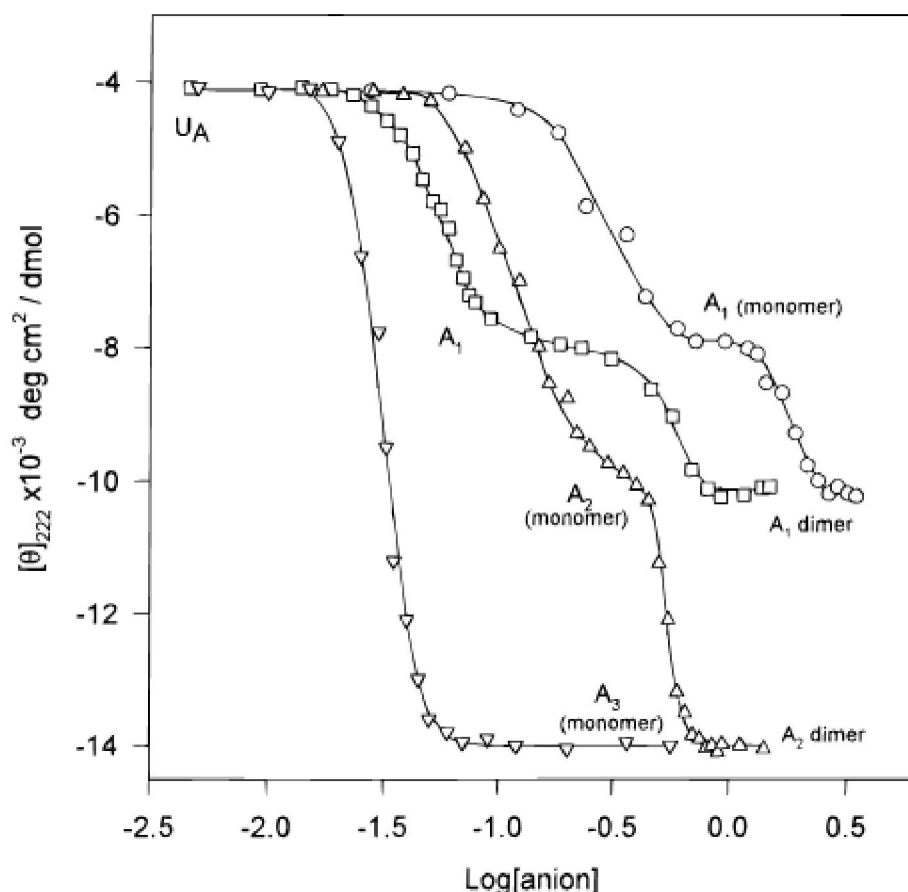
Stafylokoková nukleasa (SNasa, EC 3.1.4.7) je protein z bakterie *Staphylococcus aureus* složený se 149 aminokyselin. Jako kofaktor je na enzymu navázaný atom vápníku. Je to zásaditý protein s isoelektrickým bodem $9,62 \pm 0,08$.^{72, 73} Při titraci HCl se chová podobně jako cytochrom *c*. Kyselina enzym denaturuje a v této formě se také nachází při pH 2. Další přidavek HCl nebo KCl – obecně zvýšení iontové síly – indukuje přechod SNasy do stavu MG. Chloridový anion má tedy na molekulu SNasy stabilizující účinek. I v případě SNasy se MG v kyselém prostředí nazývá A-stav. Ze spekter CD v daleké UV oblasti lze usoudit, že v A-stavu existuje vysoký podíl sekundárních struktur, ale tvarem spektra v blízké UV oblasti připomíná denaturovaný stav. Podíl sekundárních struktur ověřili experimentátoři pomocí FT-IR. Pro nativní stav dostali hodnoty v dobrém souhlasu s hodnotami, které pro protein poskytuje rentgenová krystalografie. V MG dochází k poklesu podílu helikálních struktur a nárůstu podílu β -listů (tab. 5).

Tabulka 5. Zastoupení sekundárních struktur v různých stavech stafylokokové nukleasy. R_S - hydrodynamický poloměr (převzato z cit. 74)

	α -helix (%)	β -list (%)	β -otočka (%)	R_S (Å)
nativní stav	25	44	17	18
A-stav	16	53	17	25
nativní stav (X-Ray)	27	39	15	-

MG silně fluoreskuje v roztoku společně s ANS, takže molekulám ANS jsou přístupné shluky hydrofobních aminokyselin. Přechod možno indukovat i pomocí jiných aniontů. Jejich efekty se liší. Hexakynoželezitan způsobuje již v relativně malých koncentracích 0,3 mM agregaci. Proč mají anionty různý efekt není úplně jasné. Je to možná výsledek specifických vazebných míst pro záporně nabitě anionty v molekule proteinu. Nejasný je i samotný stav a konformace proteinu. Rozdíl v podílu nativní sekundární struktury lze vysvětlit: (1) rozdílnými konformacemi proteinu nebo (2) přítomností rovnovážné směsi denaturovaného stavu a MG. Různý anion pak posouvá tuto rovnováhu na jednu nebo druhou stranu. Kompaktnost struktury se ověřila pomocí FPLC chromatografie. Hydrodynamické poloměry pro nativní a MG jsou podobné a odlišné od denaturovaného stavu (40 Å).⁷⁴

Uversky⁷⁵ prokázal, že při kyselém pH se tvoří ve skutečnosti 3 stavy podle přidaného stabilizujícího aniontu a označil je A₁, A₂ a A₃. Tyto stavy se navzájem mezi sebou liší obsahem sekundárních struktur. A₁ vzniká po přidavku KCl do koncentrace 0,6M nebo Na₂SO₄ do koncentrace 0,1M. Je to nejméně kompaktní a uspořádaný stav. Stav A₂ vzniká po přidavku trifluoroctanu sodného a je kompaktní s vysokým podílem sekundárních struktur (70%). V přítomnosti 50 mM trichloroctanu sodného vzniká stav A₃, velmi podobný nativnímu stavu. Zvýšení intenzity fluorescence po navázání ANS sondou signalizuje, že všechny tři stavy jsou částečně sbalené. Navíc, dalším přidavkem solí se indukují dimerizace až oligomerizace a následná precipitace bílkoviny (obr. 5, další strana). Podle FT-IR spekter se s tvorbou dimerů a oligomerů v molekule SNasy zvyšuje podíl sekundárních struktur a dochází tak k stabilizacím molekuly.



Obrázek 8. Průběh molárních elipticit při 222 nm u stafylokokové nukleasy (převzato z cit. 75)

4.8. β -laktamasa

Některé bakterie mají schopnost syntetizovat β -laktamasu (EC 3.5.2.6). Enzym z kmene PC1 *Staphylococcus aureus* je protein obsahující 257 aminokyselin. Ve své struktuře neobsahuje žádné disulfidové vazby. Štěpí kruh v β -laktamových antibiotikech a její funkce je tedy ochranná. Je několik tříd β -laktamas. Třída B jsou metaloproteiny s atomem zinku, třída A jsou enzymy se serinem v aktivním místě.⁷⁶ Robson a Pain⁷⁷ studovali β -laktamasu pomocí diferenčních UV-VIS a ORD spekter, viskozity a enzymové aktivity. V roztoku 0,8 M Gdn-HCl pozorovali stav podobný MG, který nazvali stav H. Stav H má shodný podíl α -helikálních struktur jako nativní protein, je expandovaný oproti nativnímu stavu a všechny tyrosinové zbytky jsou přístupné rozpouštědлу. Goto a spol.³⁴ zkoumali tvorbu MG u β -laktamasy 1 z bakterie *Bacillus cereus*. Ta je v prostředí HCl s pH 2 denaturovaná. Zvýšením iontové síly přidavkem HCl do roztoku indukuje změnu rozbaleného klubka do A-stavu, podobně jako u cytochromu *c* a apomyoglobinu. Chloridový anion má stabilizující účinek. A-stav β -

laktamasy, na základě hodnot hydrodynamických poloměrů, má kompaktní strukturu. MG má o 10% a denaturovaný stav o 113% větší hydrodynamický poloměr jako nativní stav. Podobně lze přechod indukovat i s KCl, Hodnoty pK_A přechodu pro HCl i KCl je 1,6. Stav B vzniká zvýšením iontové síly přidavkem KCl při pH 12,2. Flexibilní uspořádání terciární struktury stavů A a B potvrdila velká intenzita fluorescence s použitím ANS jako sondy.^{34, 78}

5. UV/VIS spektrofotometrie

Při spektrofotometrických měřeních studujeme absorpci resp. emisi elektromagnetického záření látkou. Ve své práci jsem pracoval s absorpcí látkou v ultrafialové a viditelné oblasti spektra. Popis spektrofotometrických technik lze najít v mnoha monografiích a skriptech, já jsem vycházel z knihy Kodíčka a Karpenka¹ a skript Anzenbachera a Kováře.⁷⁹

Ultrafialová (UV) a viditelná (VIS) oblast elektromagnetického spektra je rozmezí vlnových délek 100- 750 nm. Klíčový význam pro absorpci v ultrafialové a viditelné oblasti spektra mají přechody elektronů ze základního stavu do excitovaného. Kvůli kvantování energie jednotlivých hladin může látka pohlit jen ty fotony, jejíž energie odpovídá rozdílu energií hladin:

$$E = h \cdot \nu \quad (1)$$

Kde h je Planckova konstanta a ν je frekvence elektromagnetického záření. Ve spektrofotometrii častěji pracujeme s vlnovou délkou λ nebo vlnočtem. Elektronové přechody provázejí přechody mezi vibračními a rotačně-vibračními hladinami, takže celková energie je složena z příspěvků:

$$E = E_e + E_v + E_r \quad (2)$$

Velikosti jednotlivých příspěvků jsou následující:

$$E_e > E_v > E_r \quad (3)$$

Proto elektronová spektra netvoří soubor několika ostrých linií, ale soubor pásů, které jsou obálkou jemné struktury pásu dané (v rámci jednoho elektronového přechodu) řadou vibračních a rotačních přechodů. Jemná struktura spekter se zvyrazňuje při nižší teplotě. V kondenzovaném stavu jsou jednotlivé molekuly ovlivněny vzájemnými srážkami a solvatací. Tyto srážky a solvatace ovlivňují energetické hladiny. Protože každá molekula je ovlivněna jinak, vytvářejí navzájem posunutá individuální spektra vlastně kontinuální spektrum. Tvar a intenzita spekter molekul závisí na prostředí, v němž se molekuly vyskytují.

Absorpce záření v UV/VIS oblasti jsou způsobena přechody z π vazebních orbitalů do nevazebních – $\pi \rightarrow \pi^*$, které jsou nejintenzivnější. Tyto přechody jsou charakteristické

pro molekuly s násobnou vazbou. Další významné přechody jsou z nevázebních orbitalů $n \rightarrow \pi^*$ a $n \rightarrow \sigma^*$. Ty mohou nastat u molekul obsahující heteroatom (kyslík, síra, dusík). Přechody z vázebních σ orbitalů významné nejsou, protože se nacházejí ve vakuové UV oblasti, kde absorbuje molekulový kyslík i anorganické ionty.

Všechny přechody se týkají molekuly jako celku. Přesto lze na makroskopické úrovni přiřadit přechody několika atomům nebo skupinám atomů tvořící tzv. chromofory. V biologických makromolekulách existuje několik typických chromoforů. Peptidová vazba absorbuje v oblasti 200-225 nm, báze nukleových kyselin přibližně při 260 nm, aromatické aminokyseliny v oblasti okolo 280 nm. Při 340 absorbuje NAD(P)H a v oblasti mezi 400-420 nm hemoprotein (Soretův pás). Ve spektru fenylalaninu se vyskytují absorpční maxima při 188, 206 a 261 nm. Absorpční spektrum tryptofanu obsahují několik maxim, nejvýznamnější jsou maxima při 280 a 286 nm. Poloha maxim tyrosinu závisí od pH. Maxima nedisociovaného tyrosinu leží při 193, 222 a 275 nm. Při disociaci hydroxylové skupiny dojde ke zvýšení intenzity a k posunu maxim k vyšším vlnovým délkám 200, 240 a 293 nm. Minoritní příspěvky v absorpčních spektrech pochází od histidinu a aminokyselin obsahujících síru. Ostatní příspěvky jsou překryty silněji absorbujícími chromofory, hlavně aromatickými aminokyselinami a peptidovou vazbou. Kromě aminokyselinových zbytků a peptidové vazby mohou v UV/VIS spektrech absorbovat i jiné součásti proteinů např. kofaktory a prostetické skupiny.

Výsledné UV/VIS absorpční spektrum nelze nahradit sumou příspěvků jednotlivých chromoforů. Reálná spektra bílkovin odrážejí nejen její složení, ale i její konformační stav. Jelikož poloha absorpčních pásů je pro daný chromofor citlivá na polaritu prostředí, je studium změn poloh a intenzit pásů velice zajímavý. K zpřístupnění informace z UV/VIS se používají techniky diferenční a derivační spektrofotometrie.

5.1. Derivační spektrofotometrie

Derivační spektrofotometrie je obecně používanou metodou pro zvýraznění detailů průběhu záznamu, přesné určení polohy maxima absorpční křivky, analýzu multikomponentních směsí či k zvýraznění překrývajících se píků. Výchozím bodem je Lambertův-Beerův zákon:

$$A = \epsilon \cdot c \cdot l \tag{4}$$

Derivací vztahu (4) podle v vlnové délky λ získáme:

$$\frac{dA}{d\lambda} = c l \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (5)$$

Pro obecně n -tou derivaci dostaneme:

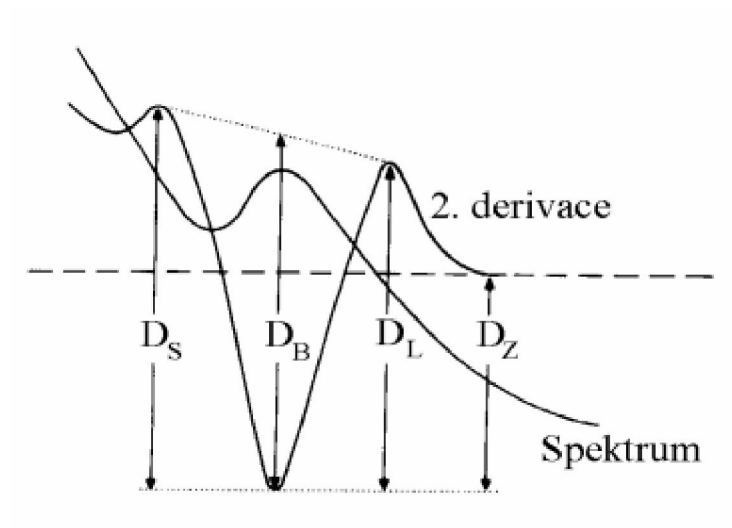
$$\frac{d^n A}{d\lambda^n} = c l \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n} \quad (6)$$

Společnou vlastností derivací absorpčních spekter je jejich lineární závislost na koncentraci. Základní vlastnosti derivačních spekter jsou:

- 1) Maximum na základní křivce odpovídá u spekter lichých řádů průsečíku s nulovou linií a u spekter sudých řádů extrému funkce
- 2) Inflexní bod na základní křivce odpovídá extrému u spekter lichých řádů a průsečíku s nulovou linií u spekter sudých řádů
- 3) S rostoucím řádem derivace přibývají další extrémy
- 4) S rostoucím řádem derivace jsou pásy ostřejší

Derivační záznam spektra je dnes získáván elektronicky, použitím derivačních členů u klasických registračních spektrofotometrů. V tomto případě se derivace podle vlnové délky nahrazuje derivace podle času. Musí být splněna podmínka, že časový posun vlnových délek je konstantní. Druhou možností je numerický výpočet podle vlnové délky pomocí příslušného programu. Tomu předchází záznam spektra.

Pro kvantitativní analýzu vzorku se používá druhá nebo čtvrtá derivace. Na osu y je možné vynášet výšku derivačního píku vzhledem k nulové linii (DZ), výšku postranního maxima při nižší vlnové délce (DS), výšku postranního maxima při vyšší vlnové délce (DL) nebo k průměru výšek obou maxim (DB, obr. 9, další strana).



Obrázek 9. Kvantitativní vyhodnocení derivačních spekter (převzato z materiálů prof. Hudečka)

6. Materiál a metody

6.1. Použité chemikálie

Cytochrom *c* (z koňského srdce) od firmy Loba Feinchemie jsem použil bez dalších úprav a čistících postupů. NaCl a NaH₂PO₄·12H₂O byly od firmy Lachema (ČR) čistoty p.a. Aceton od firmy Lach-Ner (ČR) byl čistoty p.a.

6.2. Laboratorní přístroje

Spektrofotometr HP 8453, Agilent Technologies (USA)

Automatické pipety, Nichiryo (Japonsko)

Analytické váhy Ohaus Discovery, Schoeller (Švýcarsko)

pH metr model 370, ATI Orion (USA), kalibrovaný standardními pufrů výrobce

magnetická míchačka Variomag Monotherm (Německo)

6.3. Metody

6.3.1. Příprava pufrů a roztoků

1. Připravil jsem 4 základní pufráční roztoky 5 mM fosfátu rozpuštěním krystalického NaH₂PO₄·12H₂O v destilované vodě, ze kterých jsem vycházel. Roztoky jsem dotitroval 2 M roztokem HCl do konečné hodnoty pH podle tabulky č. 8 a doplnil do objemu 1000 ml.

Tabulka 6. Příprava 5 mM pufráčních roztoků s různým pH

pH	Navážka NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O (g)	Objem 2 M HCl (ml)
1,90	1,7905	15,0
2,10	1,7905	8,0
2,30	1,7905	5,2
2,60	1,7905	3,2

2. Pro studium efektu iontové síly na konformaci cytochromu *c* pro 4 hodnoty pH jsem do 500 ml každého ze 4 pufráčních roztoků z předchozího bodu přidal 14,61 g NaCl (do koncentrace 0,5 M). Spektra cytochromu *c* v těchto pufrích jsem porovnával v mojí práci se spektry cytochromu *c* v pufrích bez přídavku NaCl.

3. Spektra jsem měřil při dvou koncentracích cytochromu c – 0,5 mg/ml a 0,05 mg/ml.

6.3.2. Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra jsem měřil na diode-array spektrofotometru HP 8453 s následujícím nastavením:

2. Rozsah vlnových délek 190-1100 nm – ovládací program Chemstation sice umožňuje omezení rozsahu vlnových délek, ale to se týká jenom výstupních dat. Přístroj ve skutečnosti vždy měří celý dostupný rozsah vlnových délek.
3. Integrační čas 5 s.
4. Spektra jsem měřil v křemenné kyvetě s optickou délkou 1 cm.
5. Každý vzorek jsem měřil třikrát a získaná data jsou aritmetickým průměrem z těchto měření.

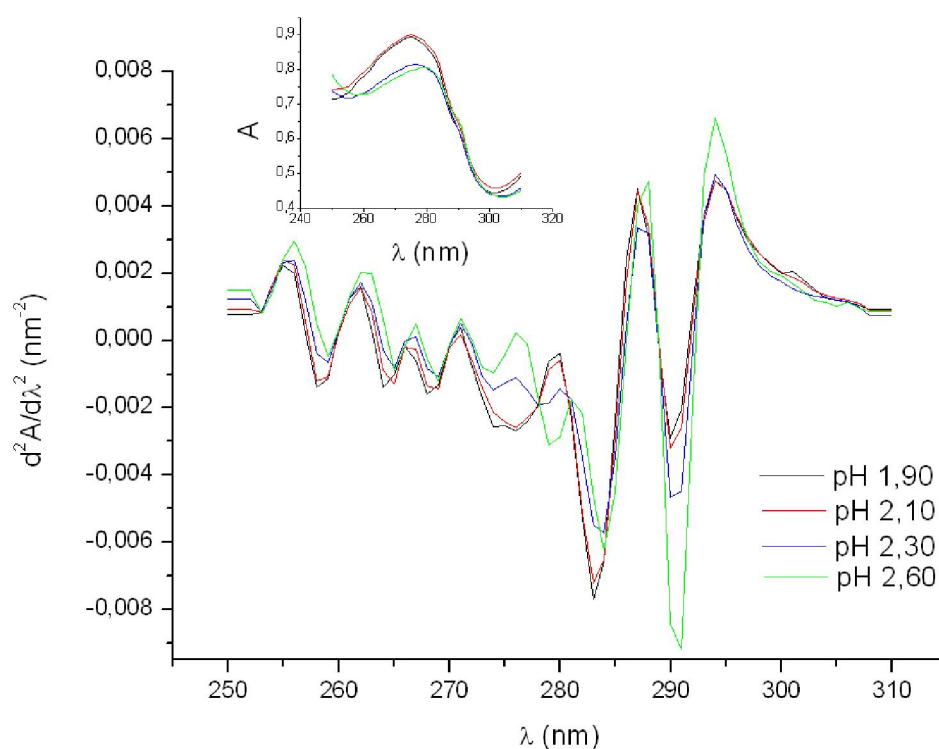
6.3.3. Zpracování experimentálních dat

Naměřená data jsem exportoval v ovládacím programu Chemstation do souborů *.csv. Dále jsem je zpracovával v programu Origin (verze 8.0 s patchem SR5). Pro výpočet derivačních spekter jsem označil příslušný sloupec hodnot, vybral v roletce Analysis - Mathematics možnost Differentiate. Nastavil jsem příslušný řád derivace (Derivative Order) a zaškrtnul vyhlazení podle Savitzkého a Golaye⁸⁰ s nastavením Polynomial Order 2, Points of Window 5.

7. Výsledky

7.1. Vliv pH na konformaci cytochromu *c*

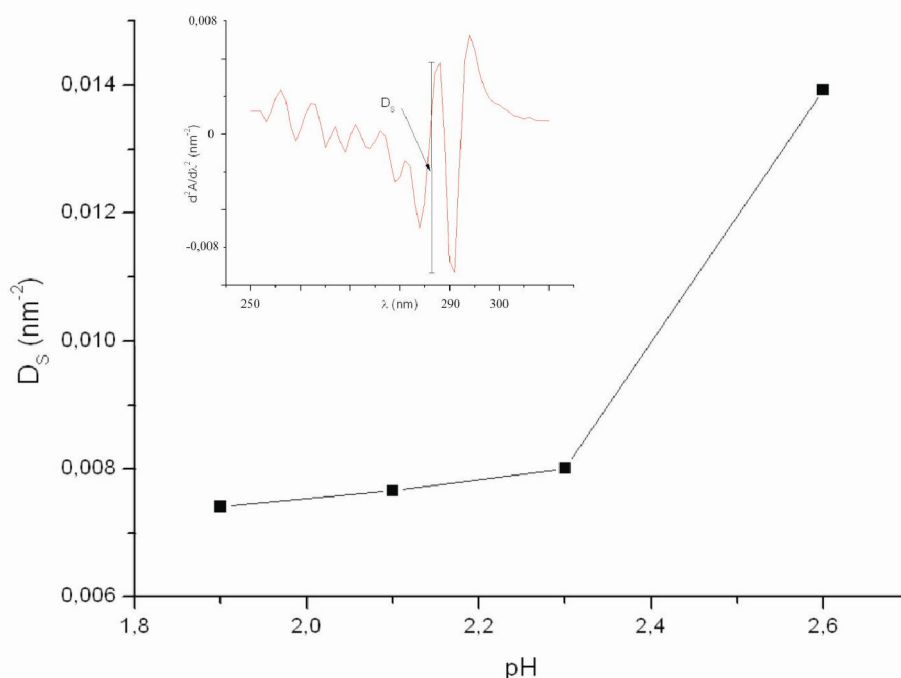
Na obrázku 10 jsou ve vloženém grafu znázorněna absorpční spektra ferricytochromu *c* v oblasti absorpce aromatických aminokyselin. Cytochrom *c* obsahuje čtyři zbytky fenylalaninu a tyrosinu a jeden zbytek tryptofanu.²⁰ Z obrázku je vidět, že s klesajícím pH se posouvá absorpční maximum mírně k nižší vlnové délce od 279 nm pro pH 2,60 k 276 nm pro pH 1,90 a roste intenzita absorpce. Ze spekter ovšem nelze rozlišit příspěvky aromatických aminokyselin.



Obrázek 10. Absorpční spektra cytochromu *c* (v malém vloženém grafu) a jejich druhé derivace v oblasti vlnových délek 250-310 nm (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

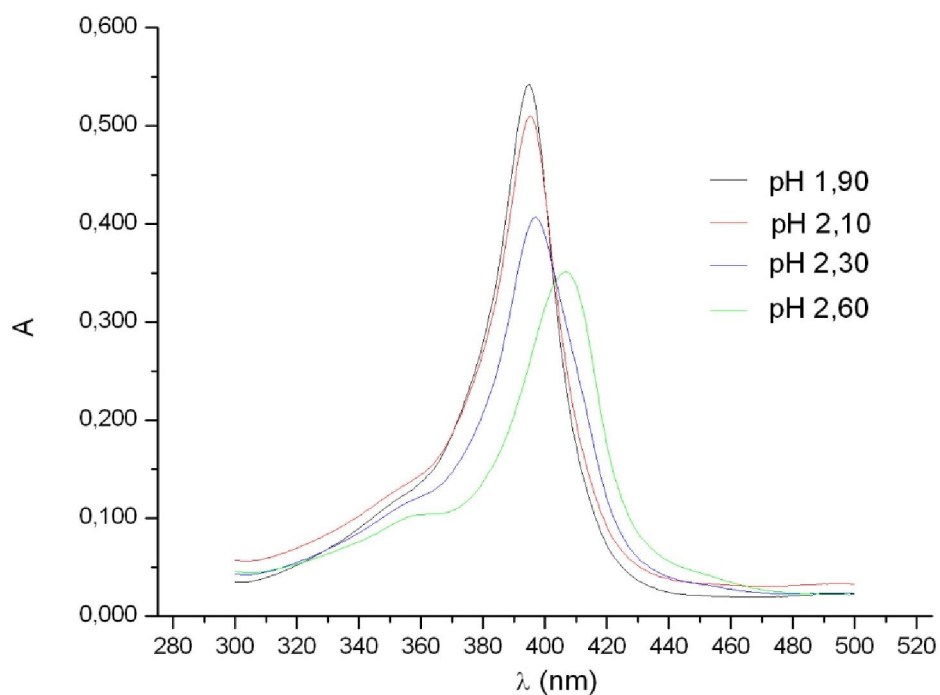
Lepší možnost rozlišit příspěvky jednotlivých aromatických aminokyselin poskytuje křivky druhé derivace. Jejich průběh v oblasti absorpce fenylalaninu (250-275 nm) je podobný, dochází pouze k jejich posunu k nižším vlnovým délkám se snižujícím se pH. V oblasti 275-285 nm se jednotlivá spektra liší. Derivační spektra pro pH 2,60 a 2,30 mají v této oblasti dvě minima a dvě maxima. Naproti tomu křivky pro pH 2,10 a 1,90 obsahují v této oblasti dvě minima a jedno maximum. Při vlnové délce 291 nm je zřetelné minimum pro všechny pH, jehož intenzita se liší (obr. 10). Intenzitu tohoto

extrému jsem kvantitativně vyhodnotil pomocí parametru D_S , který jsem vynesl do grafu jako funkci pH. Význam parametru D_S je naznačen ve vloženém obrázku (obr. 11). Z obrázku je patrné že při poklesu pH z hodnoty 2,60 na 2,30 dochází k změně průběhu závislosti parametru D_S na pH. Další snížení pH již k výrazným změnám nevede. Při těchto vlnových délkách absorbují hlavně tryptofan a tyrosin a pozorovaná změna může být výsledkem změny polarizace v jejich okolí v důsledku denaturace.

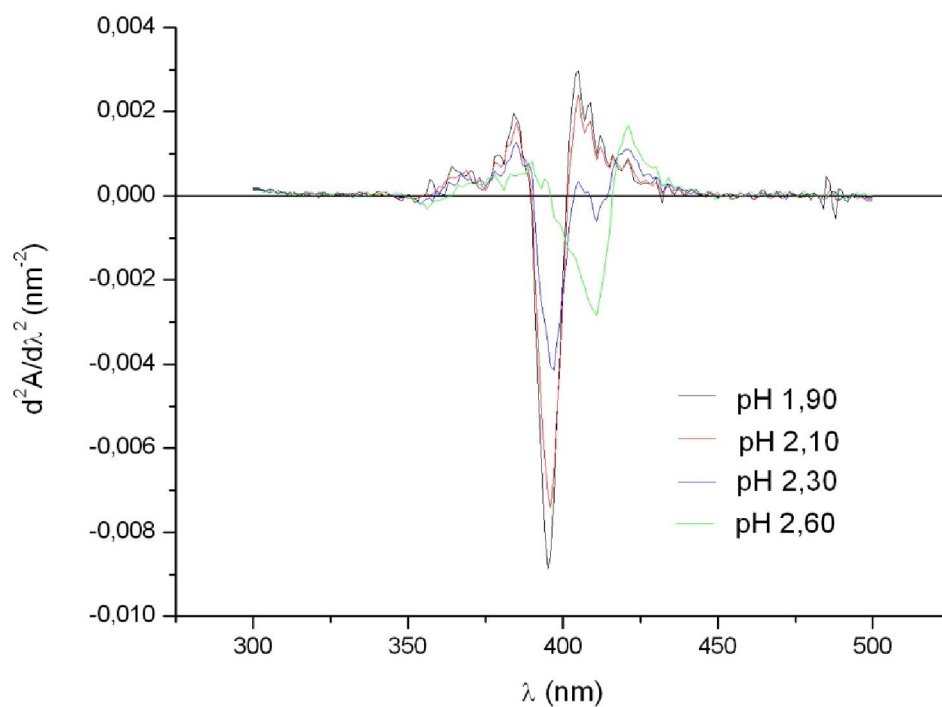


Obrázek 11. Hodnoty parametru D_S zjištěných z minima při 291 nm z křivek druhé derivace pro jednotlivé hodnoty pH. Ve vloženém grafu je význam parametru D_S (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

Další studovanou oblastí je oblast Soretova pásu v oblasti kolem 400 nm (obr. 12, další strana). S klesajícím pH můžeme pozorovat modrý posuv maxima Soretova pásu od 407 nm (pro pH 2,60) k 395 nm (pH 2,10 a 1,90) a zároveň zvětšení intenzity absorpce. V křivkách druhých derivací, přes značný podíl šumu, lze vidět příspěvek dvou extrémů při 395 a 411 nm. Snižováním pH minimum při 411 nm postupně zaniká a vzniká nová minima při 395 nm pro pH 2,10 a 1,90 (obr. 13, další strana). I pro tuto oblast jsem vynesl závislost parametru D_S na pH do grafu (obr. 14, str. 51). Je z něho patrná změna mezi pH 2,30 a 2,10. Protože Soretův pás poskytuje informace o hemové skupině, jejím okolí a o spinových stavech železa, je pozorovaná změna pravděpodobně důsledek změn v okolí hemové skupiny.

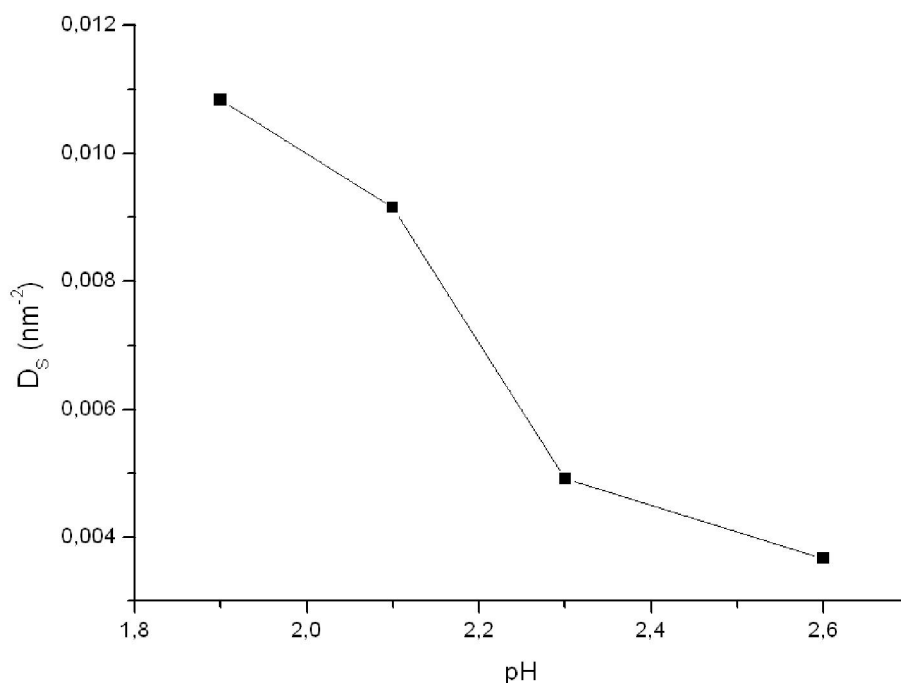


Obrázek 12. Absorpční spektra cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé hodnoty pH - Soretův pás (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,05$ mg/ml).

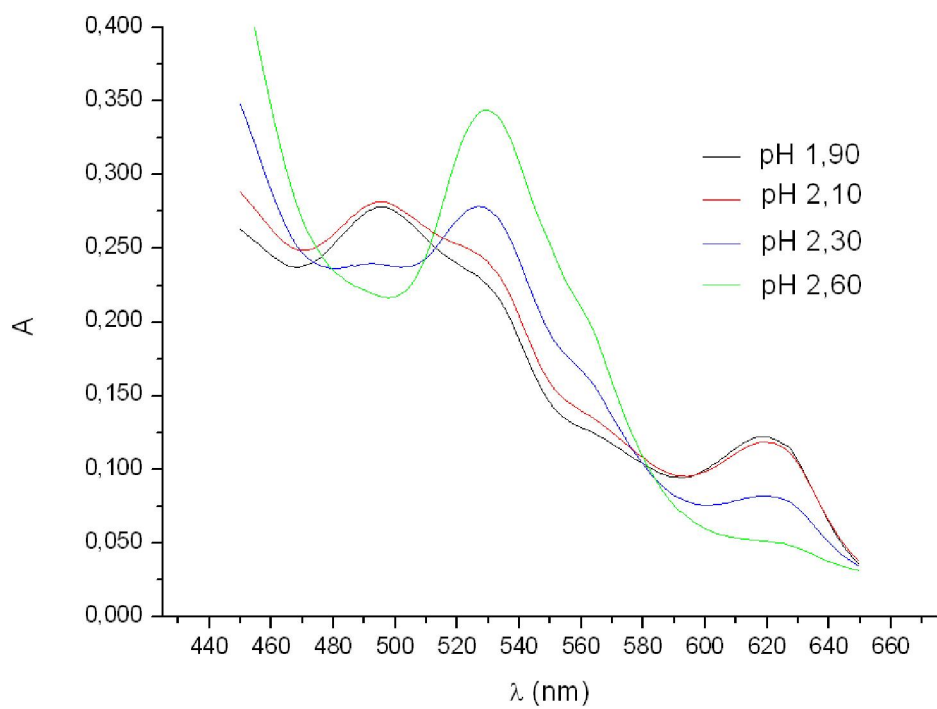


Obrázek 13. Druhá derivace absorpčních spekter cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé hodnoty pH - Soretův pás (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,05$ mg/ml).

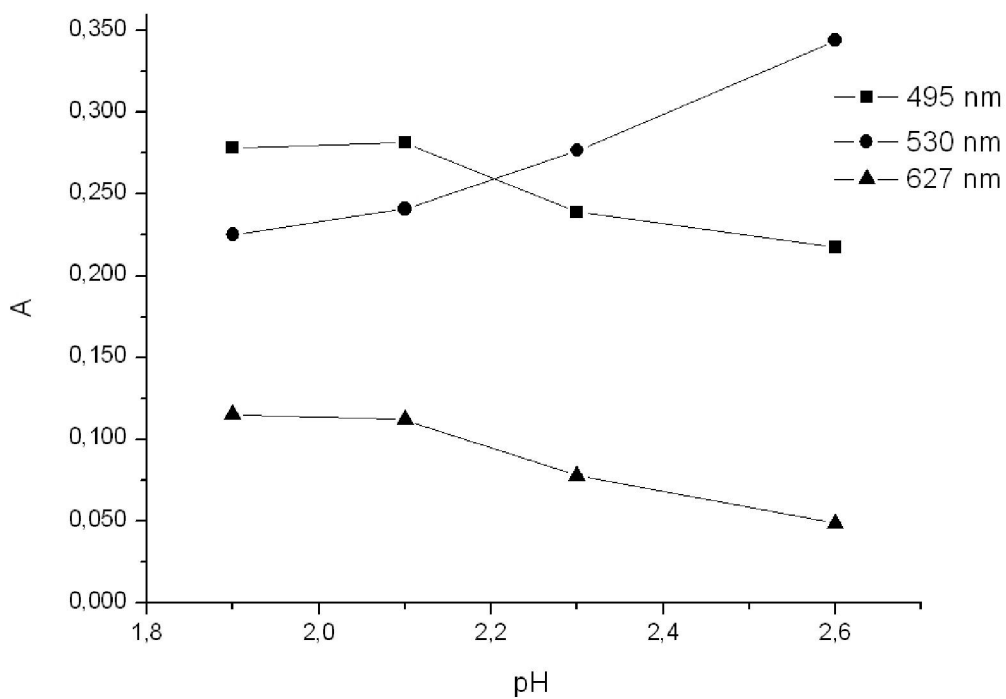
Ve viditelné oblasti spektra v rozmezí vlnových délek 450-650 nm - tzv. Q pás - dochází také k změnám. Můžeme vidět postupné snižování intenzity maxima při 530 nm a vznik dvou nových maxim při 495 a 627 nm (obr. 15, další strana). Pro tyto tři maxima platí, že se nemění jejich poloha, dochází jen ke změně jejich intenzity. Při 560 nm lze vidět malé „raménko“ příslušející absorpci redukované formy cytochromu *c*. Q pás, podobně jako Soretův pás, vypovídá o ligaci železa a o jeho spinovém stavu. Pro tuto oblast sem vynesl do grafu absorbance v závislosti na pH pro několik vybraných vlnových délek (obr. 16, další strana). Na průběhu křivek jsou patrně změny kolem pH 2,10, pravděpodobně v důsledku změn v okolí hemové skupiny a (nebo) dochází k změně spinového stavu železa – to přechází z nízkospinového do vysokospinového při snižování pH a postupné denaturaci cytochromu *c*.



Obrázek 14. Hodnoty parametrů D_S zjištěných z minim kolem 400 nm z křivek druhé derivace pro jednotlivé hodnoty pH (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

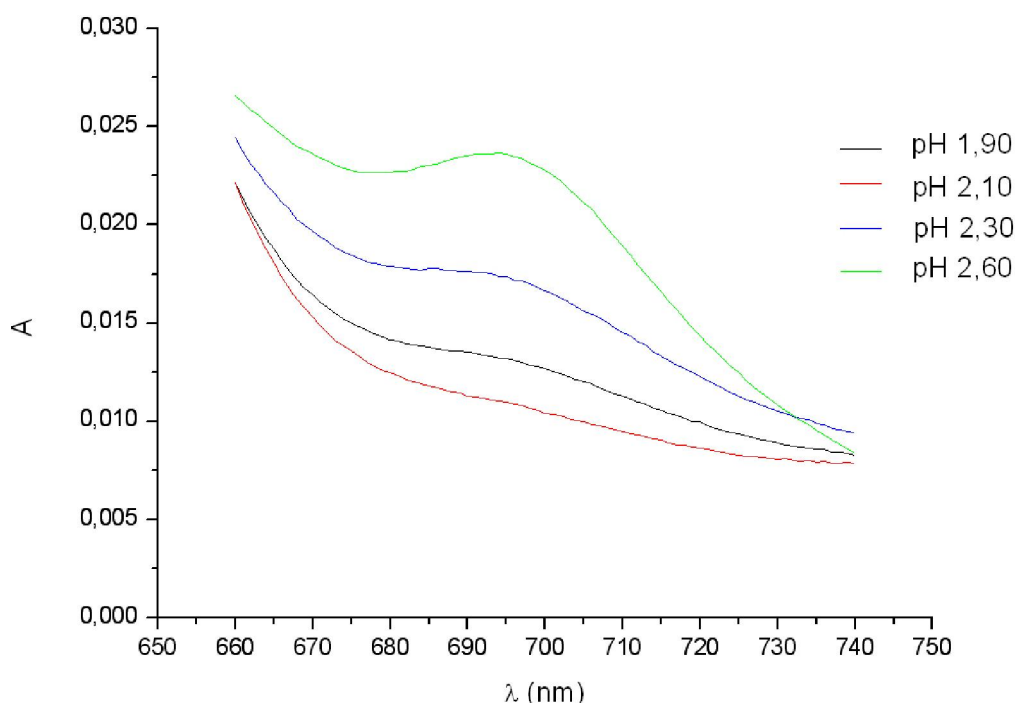


Obrázek 15. Absorpční spektra cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 450-650 nm pro jednotlivé hodnoty pH – Q pás (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).



Obrázek 16. Průběh závislosti intenzit absorpce na pH při vybraných vlnových délkách cytochromu *c* v oblasti Q pásu (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

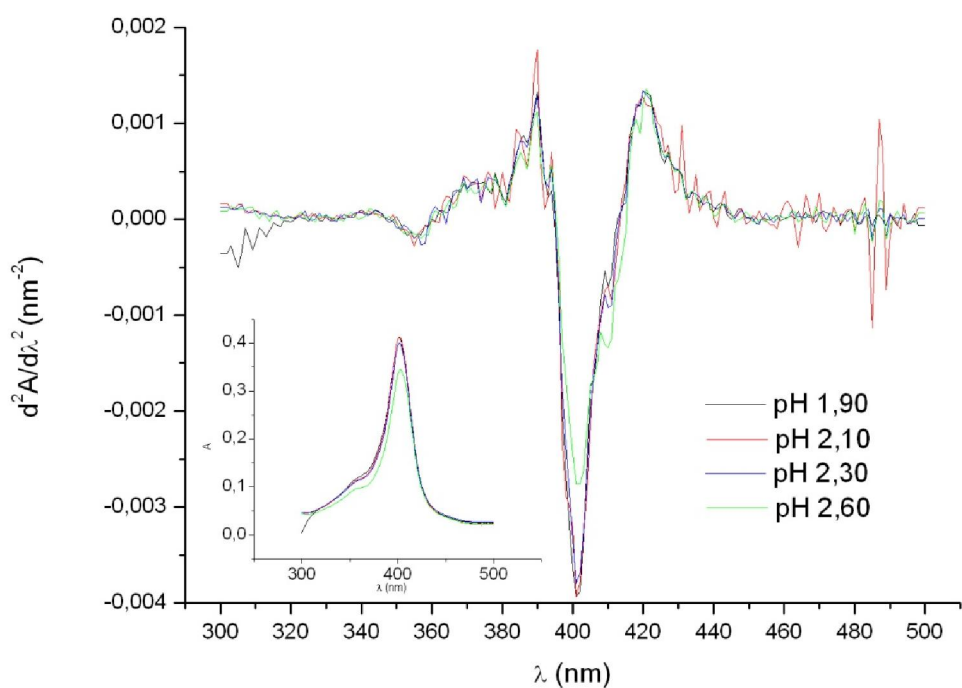
Obrázek 17 zobrazuje ve čtvrté sledované oblasti zánik slabě absorbujícího píku při 695 nm se snižujícím se pH. Jedná se o pík vznikající elektronovými přechody typu „charge transfer“ (proto se nazývá CT pás) mezi p-orbitaly síry Met-80 a d-orbitaly železa. Druhé derivace pásů Q i CT jsou již značně zatíženy šumem v důsledku nízkých absorpčních koeficientů a nelze je použít k spolehlivému vyhodnocení konformačních změn v molekule cytochromu *c*.



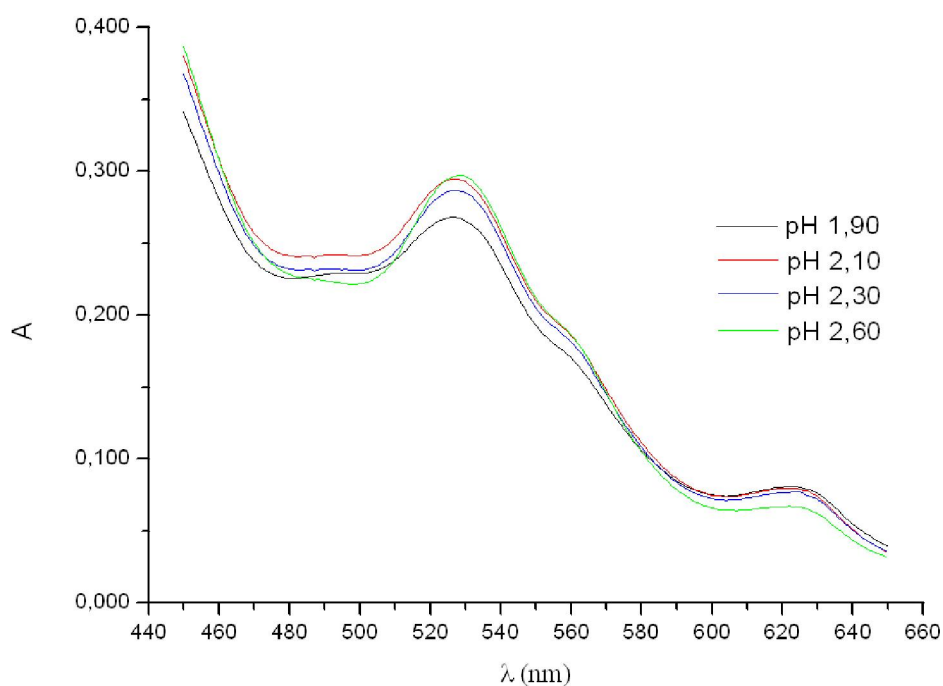
Obrázek 17. Absorpční spektra cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 660-740 nm pro jednotlivé hodnoty pH – CT pás (5 mM fosfát, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

7.2. Vliv zvýšené iontové síly na konformaci cytochromu *c*

Byl zkoumán vliv zvýšené iontové síly na konformaci cytochromu *c* v jeho roztocích v oblasti pH 1,90-2,60 s přidavkem NaCl (koncentrace 0,5 M). V oblasti Soretova pásu můžeme pozorovat navzájem podobná spektra s maximem při 401 nm pro všechny 4 hodnoty pH (vložený graf na obr. 18, další strana). Dochází pouze k nepatrnému zvýšení intenzity absorpce se snižováním pH. Na křivkách druhých derivací je vidět minimum při 401 nm a taky nepatrné lokální minimum při 411 nm. Intenzita minima při 401 nm stoupá při snižujícím se pH (obr. 18, další strana).

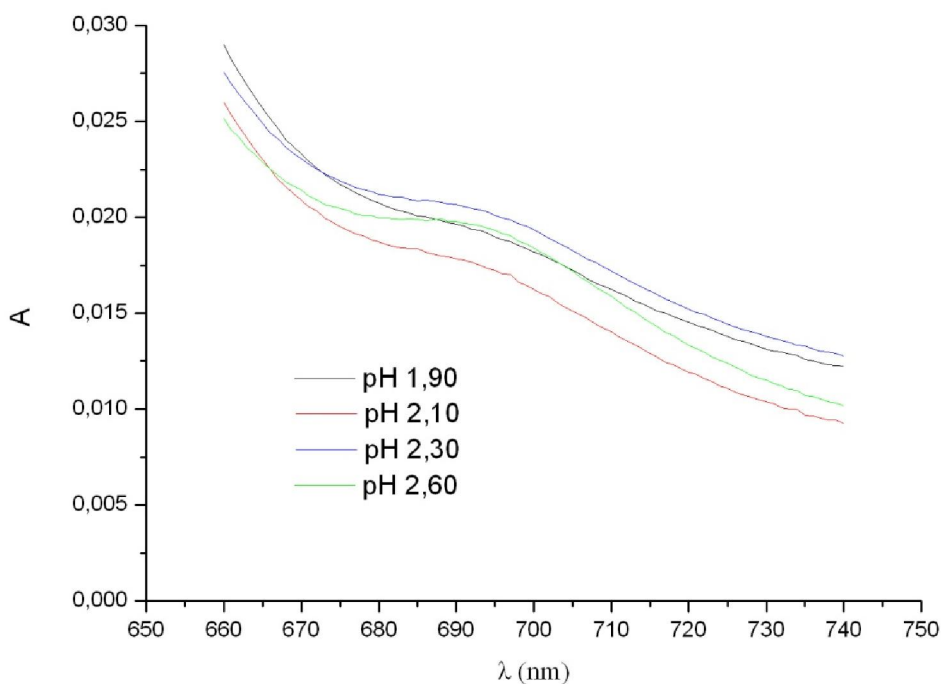


Obrázek 18. Absorpční spektra cytochromu *c* (v malém vloženém grafu) a jejich druhé derivace oblasti vlnových délek 300-500 nm pro jednotlivé hodnoty pH - Soretův pás (5 mM fosfát, 0,5 M NaCl, $c_{\text{cyt}} = 0,05$ mg/ml).



Obrázek 19. Absorpční spektra cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 450-650 nm pro jednotlivé hodnoty pH - Q pás (5 mM fosfát, 0,5 M NaCl, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

V oblasti Q pásu 450-650 nm (obr. 19, další strana) je taky patrné, že pH nemá vliv na průběh spekter. V této oblasti mají spektra dvě maxima, jedno při 532 a druhé přibližně při 625 nm. Spektra pro jednotlivé hodnoty pH se mírně liší v intenzitách absorpce v maximech. Velmi podobný průběh absorpčních spekter pro jednotlivé hodnoty pH je patrný také v oblasti CT pásu (obr. 20). Je možno konstatovat, že přidavek NaCl v koncentraci 0,5 M stabilizuje výchozí konformační stav (pozorovaný při pH 2,60) a další snižování již nemá na tuto konformaci vliv.



Obrázek 20. Absorpční spektra cytochromu *c* v oblasti vlnových délek 660-740 nm pro jednotlivé hodnoty pH – CT pás (5 mM fosfát, 0,5 M NaCl, $c_{\text{cyt}} = 0,5$ mg/ml).

8. Diskuse

Pro cytochrom *c* ve své nativní konformaci je charakteristické maximum intenzity absorpce pro Soretův pás při 408 nm. V oblasti Q pásu se nachází výrazné maximum při 527 nm (β -pás) a někdy i nevýrazné bočné ramínko kolem 550-560 (α -pás) odpovídající přítomnosti malého množství redukované formy cytochromu *c*. Taky tyto údaje jsou charakteristické pro nízkospinovou konfiguraci železa v nativní konformaci cytochromu *c*.

Snížení pH a denaturace proteinu kolem pH 2,50 provází modrý posun Soretova a β -pásu, vymizení CT pásu a vznik nového maxima v oblasti kolem 630 nm. Změny Soretova pásu také provází hyperchromní efekt. Maximum Soretova pásu při 394 nm a maxima v Q-pásu při 495 a 627 nm jsou charakteristické pro vysokospinovou konfiguraci železa v cytochromu *c*. Změřená spektra v této práci jsou tedy v dobré shodě s literaturou.⁸¹ Dle spekter nativnímu stavu odpovídá konformace při pH 2,60 bez přídavku NaCl. V oblasti aromatických aminokyselin lze pomocí metody druhé derivace spekter a výnosu parametru D_S pozorovat změnu konformačního stavu mezi pH 2,60-2,30. Můžeme předpokládat, že se jedná o změnu polaritu v okolí tyrosinových a tryptofanových zbytků v důsledku denaturace. Polohy a intenzity maxim v Soretově a Q pásu zase vypovídají o ligaci a spinovém stavu železa v hemové skupině. CT pás při 695 nm je indikátor koordinace hemového železa atomem síry. V spektrech a v jejich derivacích pro tyto oblasti jsem v mém experimentu pozoroval změny při pH 2,30-2,10. Dochází pravděpodobně k tvorbě vysokospinových stavů železa v hemové skupině a možná i změny v okolí hemové skupiny.

Pro studium efektu pH jsem použil metodu druhé derivace a proti pH jsem vynesl parametr D_S odečtený z minima při 291 nm v křivkách druhé derivace. Z průběhu tohoto výnosu je patrné že mezi pH 2,60 a 2,30 dochází k jasné změně intenzity druhé derivace. Příčinou změny je pravděpodobně denaturace cytochromu *c*. Analogická závislost parametru D_S odečteného z minima v Soretově pásu ukazuje změnu intenzity absorpce při 2,10 a 2,30. Rovněž již samotná poloha Soretova pásu při 395 nm při pH 2,10 a 1,90 odpovídá tomu, že při pH 2,10 a nižším v této práci byl již cytochrom *c* denaturován. Průběh druhých derivací spekter v oblasti absorpce aromatických aminokyselin je ve shodě s výsledky, které zjistila ve své diplomové práci Hana Kratochvílová.⁸²

V literatuře^{10, 26, 34} je dobře popsán vznik konformačního stavu MG. Vzniká v kyselých roztocích s vyšší iontovou silou a závisí od použité druhy aniontu. V oblasti Soretova pásu se projeví maximum při 397-400 nm v závislosti na podmínkách experimentu. Jedná se o rovnováhu několika nízkospinových a vysokospinových stavů atomu železa a jako dva axiální ligandy v MG jsou buď Met-80, His-18, nebo molekuly vody nebo jejich kombinace. Dále studie ukazují částečné obnovení CT pásu. I v tomto případě jsou moje výsledky v dobré shodě s literaturou. Maximum Soretova pásu se v mých experimentech výrazně nemění a nachází se při 401 nm. Tento poznatek poukazuje, vzhledem k provedení mého experimentu, že nejspíš v celém měřeném rozsahu pH se cytochrom *c* za přítomnosti 0,5 M NaCl již nachází v konformačních stavu MG.

9. Souhrn

1. V této práci jsem změřil absorpční spektra cytochromu *c* z mitochondrií koňského srdečního svalu v rozmezí vlnových délek 190 až 1000 nm v roztocích s 4 hodnotami pH 1,9-2,6 bez a s přidavkem NaCl (0,5 M).
2. Zkoumal jsem chování spekter v oblasti absorpce aromatických aminokyselin (250-300 nm), Soretova pásu (kolem 400 nm), Q pásu (480-640 nm) a CT pásu (slabý pík při 695 nm).
3. Pro lepší rozpoznání detailů jsem použil techniku druhé derivace spektra a proti pH v roztocích bez přidavku NaCl jsem vynesl parametry D_S .
4. Hyperchromní posun maxima Soretova pásu od 407 nm k 394 nm, změny v Q pásu a vymizení CT píku naznačují denaturaci cytochromu *c*.
5. Charakter změn poukazuje, že k denaturaci dochází mezi pH 2,60 a 2,30 podle výnosu D_S . Průběh absorpcí pro vybrané vlnové délky poukazují na změnu mezi hodnotami pH 2,10 a 2,30.
6. V roztocích s vyšší iontovou silou nejsou patrné výrazné změny. Nejspíš v celém rozsahu pH se cytochrom *c* nachází v konformačním stavu MG.

10. Seznam použité literatury

1. Kodíček, M.; Karpenko, V. *Biofyzikální chemie*, 2nd ed.; Akademie věd České republiky: Praha, 2002.
2. Švec, M.; Vondrášek, J. Sbalování proteinů: stav problematiky na konci tisíciletí. *Chem. Listy* **2000**, *94*, 494–500.
3. Arai, M.; Kuwajima, K. Role of the molten globule state in protein folding. *Adv. Protein Chem.* **2000**, *53*, 209–282.
- X. Creighton, T. E. Protein folding. *Biochemistry* **1990**, *270*, 1–16.
4. Anfinsen, C. B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1973**, *181*, 223–230.
5. Zwanzig, R.; Szabo, A.; Bagchi, B. Levinthal's paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1992**, *89* (1), 20–22.
6. Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* **1968**, *65* (1), 44–45.
7. Wolynes, P.; Onuchic, J.; Thirumalai, D. Navigating the folding routes. *Science (Washington, DC, U. S.)* **1995**, *267* (5204), 1619–1620.
8. Dill, K. A. Polymer principles and protein folding. *Protein Sci.* **1999**, *8* (6), 1166–1180.
9. Fink, A. L. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* **1999**, *79* (2), 425–449.
10. Ohgushi, M.; Wada, A. 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains. *FEBS Lett.* **1983**, *164* (1), 21–24.
11. Dolgikh, D.; Gilmanshin, R. I.; Brazhnikov E. V.; Bychkova V. E.; Semisotnov G. V.; Venyaminov S. Y.; Ptitsyn O. B. α -lactalbumin: compact state with fluctuating structure? *FEBS Lett.* **1981**, *136*, 311–315.
12. Ptitsyn, O. B.; Pain R. H.; Semisotnov G. V.; Zerovnik E.; Razgulayev O. I. Evidence for a molten globule state as a general intermediate in a protein folding. *FEBS Lett.* **1990**, *262* (1), 20–24.
13. Dolgikh, D. A.; Kolomiet, A. P.; Bolotina, I. A.; Ptitsyn, O. B. 'Molten-globule' state accumulates in carbonic anhydrase folding. *FEBS Lett.* **1984**, *165* (1), 88–92.
14. Santucci, R.; Sinibaldi, F.; Fiorucci, L. Protein folding, unfolding and misfolding: role played by intermediate states. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **2008**, *8*, 57–62.
15. Dobson, C. M. Protein folding and misfolding. *Nature* **2003**, *426*, 884–890.

16. Svensson, M.; Mossberg, A. K.; Pettersson, J.; Linse, S.; Svanborg, C. Lipids as cofactors in protein folding: stereo-specific lipid-protein interactions are required to form HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). *Protein Sci.* **2003**, *12* (12), 2805–2814.
17. Casbarra, A.; Birolo, L.; Infusini, G.; Dal Piaz, F.; Svensson, M.; Pucci, P.; Svanborg, C.; Marino, G. Conformational analysis of HAMLET, the folding variant of human α -lactalbumin associated with apoptosis. *Protein Sci.* **2004**, *13* (5), 1322–1330.
18. Fast, J.; Mossberg, A. K.; Svanborg, C.; Linse, S. Stability of HAMLET - a kinetically trapped α -lactalbumin oleic acid complex. *Protein Sci.* **2005**, *14* (2), 329–340.
19. Bychkova, V. E.; Pain, R. H.; Ptitsyn, O. B. The ‘molten globule’ state is involved in the translocation of proteins across membranes?. *FEBS Lett.* **1988**, *238* (2), 231–234.
20. Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214* (2), 585–595.
21. Margoliash, E.; Schejter, A. Cytochrom *c*. *Adv. Protein Chem.* **1966**, *21*, 113–286.
22. Stryer, L.; Berg, J. M.; Tymoczko, J. L. *Biochemistry*, 5th ed.; W.H. Freeman & Co Ltd: New York, 2002.
23. Voet, D.; Voet, J. G. *Biochemistry*, 3rd ed.; John Wiley & Sons: USA, 2004.
24. Liu, X.; Kim C. N.; Yang J.; Jemmerson R.; Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell (Cambridge, MA, U. S.)* **1996**, *86* (1), 147–157.
25. Theorell, H.; Åkesson, Å. Studies on cytochrome *c*. III. Titration curves. *J. Am. Chem. Soc.* **1941**, *63* (7), 1818–1820.
26. Stupák, M.; Bágelřová, J.; Fedunová, D.; Antalík, M. Conformational transitions of ferricytochrome *c* in strong inorganic acids. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2006**, *71* (11-12), 1627–1641.
27. Goto, Y.; Takahashi, N.; Fink, A. L. Mechanism of acid-induced folding of proteins. *Biochemistry* **1990**, *29* (14), 3480–3488.
28. Jordan, T.; Eads J C.; Spiro T. G. Secondary and tertiary structure of the A-state of cytochrome *c* from resonance Raman spectroscopy. *Protein Sci.* **1995**, *4* (4), 716–728.
29. Jeng, M. F.; Englander S. W.; Elove G. A.; Roder H.; Wand, J. A. Structural description of acid-denatured cytochrome *c* by hydrogen exchange and 2D NMR. *Biochemistry* **1990**, *29* (46), 10433–10437.

30. Fisher, W. R.; Taniuchi H.; Anfinsen C. B. On the role of heme in the formation of the structure of cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (9), 3188–3195.
31. Naeem, A.; Akram M.; Khan R. H. Conformational states of trifluoroacetic acid–treated cytochrome *c* in the presence of salts and alcohols. *Protein J.* **2004**, *23* (3), 185–195.
32. Latypov, R. F.; Cheng, H.; Roder, N. A.; Zhang, J.; Roder H. Structural characterization of an equilibrium unfolding intermediate in cytochrome *c*. *J. Mol. Biol.* **2006**, *357* (3), 1009–1025.
33. Oellerich, S.; Wackerbarth, H.; Hildebrandt, P. Spectroscopic characterization of nonnative conformational states of cytochrome *c*. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106* (25), 6566–6580.
34. Goto, Y.; Calciano L. J.; Fink A. L. Acid-induced folding of proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1990**, *87* (2), 573–577.
35. Kataoka, M.; Tokunaga, F.; Kuwajima, K.; Goto Y. Structural characterization of the molten globule of α -lactalbumin by solution X-ray scattering. *Protein Sci.* **1997**, *6*, 422–430.
36. Bongiovanni, C.; Sinibaldi, F.; Ferri, T.; Santucci R. Glycerol-induced formation of the molten globule from acid-denatured cytochrome *c*: implication for hierarchical folding. *J. Protein Chem.* **2002**, *21* (1), 35–41.
37. Roder, H.; Elove, G. A.; Englander, S. W. Structural characterization of folding intermediates in cytochrome *c* by H-exchange labelling and proton NMR. *Nature (London, U. K.)* **1988**, *335*, 700–704.
38. Moosavi-Movahedi, A. A.; Chamani, J.; Ghourchian, H.; Shafiey, H.; Sorenson, C. M.; Sheibani, N. Electrochemical evidence for the molten globule states of cytochrome *c* induced by N-alkyl sulfates at low concentrations. *J. Protein Chem.* **2003**, *22* (1), 23–30.
39. Tuominen, E. K. J.; Wallace, C. J. A.; Kinnunen, P. K. J. Phospholipid-cytochrome *c* interaction. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (11), 8822–8826.
40. Sinibaldi, F.; Mei, G.; Polticelli, F.; Piro, M. C.; Howes, B. D.; Smulevich, G.; Santucci, R.; Ascoli, F.; Fiorucci, L. ATP specifically drives refolding of non-native conformations of cytochrome *c*. *Protein Sci.* **1995**, *14* (4), 1049–1058.
41. Antalík, M.; Bágel'ová, J.; Gažová, Z.; Musatov, A.; Fedunová, D. Effect of varying polyglutamate chain length on the structure and stability of ferricytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta, Proteins Proteomics* **2003**, *1646* (1-2), 11–20.

42. Sedlák, E. Characterization of the polyanion-induced molten globule-like state of cytochrome *c*. *Biopolymers* **2007**, *86* (2), 119–126.
43. Sedlák, E.; Antalík, M. Molten globule-like state of cytochrome *c* induced by polyanion-poly(vinylsulfate) in slightly acidic pH. *Biochim. Biophys. Acta, Protein Structure Enzymology* **1999**, *1434*, 347–355.
44. Brew, K.; Vanaman, T. C.; Hill, R. L. Comparison of the amino acid sequence of bovine α -lactalbumin and hens egg white lysozyme. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (16), 3747–3748.
45. Permyakov, E.; Berliner, L. α -lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett.* **2000**, *473* (3), 269–274.
46. Skerrett, S. J. Lysozyme in pulmonary host defense. *American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine* **2004**, *169*, 435–436.
47. Thoppil, A. A.; Kishore, N. Equimolar mixture of 2,2,2-trifluoroethanol and 4-chloro-1-butanol is a stronger inducer of molten globule state: isothermal titration calorimetric and spectroscopic studies. *The Protein Journal* **2007**, *26*, 507–516.
48. Kundu, A.; Kishore, N. 1,1,1,3,3,3-hexafluoroisopropanol induced thermal unfolding and molten globule state of bovine α -lactalbumin: calorimetric and spectroscopic studies. *Biopolymers* **2004**, *73*, 405–420.
49. Arai, M.; Kuwajima, K. Rapid formation of a molten globule intermediate in refolding of α -lactalbumin. *Folding & Design* **1996**, *1* (4), 275–287.
50. Fontana, A.; de Laureto, P. P.; Spolaore, B.; Frare, E.; Picotti, P.; Zambonin, M. Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim. Pol.* **2004**, *51* (2), 299–321.
51. Chyan, Ch.; Wormald, C.; Dobson, C. M.; Evans, P. A.; Baum, J. Structure and stability of the molten globule state of guinea-pig α -lactalbumin: a hydrogen exchange study. *Biochemistry* **1993**, *32* (21), 5681–5691.
52. Creighton, T. E.; Ewbank, J. J. Disulfide-rearranged molten globule state of α -lactalbumin. *Biochemistry* **1994**, *33* (6), 1534–1538.
53. Demarest, S.; Boice, J. A.; Fairman, R.; Raleigh, D. P. Defining the core structure of the α -lactalbumin molten globule state. *J. Mol. Biol.* **1999**, *294*, 213–221.
54. Chakraborty, S.; Ittah, V.; Bai, P.; Luo, L.; Haas, E.; Peng, Z. Structure and dynamics of the α -lactalbumin molten globule: fluorescence studies using proteins containing a single tryptophan residue. *Biochemistry* **2001**, *40*, 7228–7238.

55. Lala, A. K.; Kaul, P. Increased exposure of hydrophobic surface in molten globule state of α -lactalbumin. Fluorescence and hydrophobic photolabeling studies. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267* (28), 19914–19918.
56. Kamatari, Y. O.; Konno, T.; Kataoka, M.; Akasaka, K. The methanol-induced transition and the expanded helical conformation in hen lysozyme. *Protein Sci.* **1998**, *7* (3), 681–688.
57. Buck, M.; Schwalbe, H.; Dobson, C. M. Characterization of conformational preferences in a partly folded protein by heteronuclear NMR spectroscopy: assignment and secondary structure analysis of hen egg-white lysozyme in trifluoroethanol. *Biochemistry* **1995**, *34* (40), 13219–13232
58. Bhattacharjya, S.; Balaram, P. Hexafluoroacetone hydrate as a structure modifier in proteins: characterization of a molten globule state of hen egg-white lysozym. *Protein Sci.* **1997**, *6* (5), 1065–1073.
59. Frare, E.; Mossuto, M. F.; de Laureto, P. P.; Tolin, S.; Menzer, L.; Dumoulin, M.; Dobson, C. M.; Fontana, A. Characterization of oligomeric species on the aggregation pathway of human lysozyme. *J. Mol. Biol.* **2009**, *387* (1), 17–27.
60. Ordway, G. A.; Garry, D. J. Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J. Exp. Biol.* **2004**, *207*, 3441–3446.
61. Cocco, M. J.; Lecomte, J. T. The native state of apomyoglobin described by proton NMR spectroscopy: interaction with the paramagnetic probe HyTEMPO and the fluorescent dye ANS. *Protein Sci.* **1994**, *3* (2), 267–281.
62. Hughson, F. M.; Wright, P. E.; Baldwin, R. L. Structural characterization of a partly folded apomyoglobin intermediate. *Science* **1990**, *249* (4976), 1544–1548.
62. Dabora, J. M.; Marqusee, S. Equilibrium unfolding of *Escherichia coli* ribonuclease H: characterization of a partially folded state. *Protein Sci.* **1994**, *3* (9), 1401–1408.
63. Kontopidis, G.; Holt, C.; Sawyer, L. Invited review: β -lactoglobulin: binding properties, structure, and function. *J. Dairy Sci.* **2004**, *87*, 785–796.
64. Ikeguchi, M.; Kato, S.; Shimizu, A.; Sugai, S. Molten globule state of equine β -lactoglobulin. *Proteins: Struct., Funct., Genet.* **1997**, *27*, 567–575.
65. Kanijal, S.; Taulier, N.; Le Hu  rou, J. Y.; Gindre, M.; Urbach, W.; Waks, M. Ultrasonic studies of alcohol-induced transconformation in β -lactoglobulin: the intermediate state. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 3928–3934.

66. Viseu, M. I.; Mělo, E. P.; Carvalho, T. I.; Correia, R. F.; Costa, S. M. Unfolding kinetics of β -lactoglobulin induced by surfactant and denaturant: a stopped-flow/fluorescence study. *Biophys. J.* **2007**, *93* (10), 3601–3612.
67. Brown, E. M. Interactions of β -lactoglobulin and α -lactalbumin with lipids: a review. *J. Dairy Sci.* **1984**, *67*, 713–722.
68. Tripp, B. C.; Smith, K.; Ferry, J. G. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (52), 48615–48618.
69. Wong, K.; Hamlin, L. M. Acid denaturation of bovine carbonic anhydrase B. *Biochemistry* **1974**, *13* (13), 2678–2683.
70. Wong, K.; Tanford, Ch. Denaturation of bovine carbonic anhydrase B by guanidine hydrochloride. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248* (24), 8518–8523.
71. Uversky, V. N.; Ptitsyn, O. B. Further evidence on the equilibrium “pre-molten globule state”: four-state guanidinium chloride-induced unfolding of carbonic anhydrase B at low temperature. *J. Mol. Biol.* **1996**, *255* (1), 215–228.
72. Taniuchi, H.; Anfinsen, C. B.; Sodja, A. The amino acid sequence of an extracellular nuclease of *Staphylococcus aureus*. 3. Complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (20), 4752–4758.
73. Heins, J. N.; Suriano, J. R.; Taniuchi, H.; Anfinsen C. B. Characterization of a nuclease produced by *Staphylococcus aureus*. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242* (5), 1016–1020.
74. Fink, A. L.; Calciano, L. J.; Goto, Y.; Nishimura, M.; Swedberg, S. A. Characterization of the stable, acid-induced, molten globule-like state of staphylococcal nuclease. *Protein Sci.* **1993**, *2* (7), 1155–1160.
75. Uversky, V. N.; Karnoup, A. S.; Khurana, R.; Segel, D. J.; Doniach, S.; Fink, A. L. Association of partially-folded intermediates of staphylococcal nuclease induces structure and stability. *Protein Sci.* **1999**, *8* (1), 161–173.
76. Moulton, J.; Sawyer, L.; Herzberg, O.; Jones, C. L.; Coulson, A. F.; Green, D. W.; Harding, M. M.; Ambler R. P. The crystal structure of β -lactamase from *Staphylococcus aureus* at 0.5 nm resolution. *Biochem. J.* **1985**, *225* (1), 167–176.
77. Robson, B.; Pain, R. H. The mechanism of folding of globular proteins. Equilibria and kinetics of conformational transitions of penicillinase from *Staphylococcus aureus* involving a state of intermediate conformation. *Biochem. J.* **1976**, *155* (2), 331–344.
78. Goto, Y.; Fink, L. Conformational states in β -lactamase: molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry* **1989**, *28* (3), 945–952.

79. Anzenbacher, P.; Kovář, P. *Metody ke zjišťování prostorové struktury biomolekul a jejich změn*, 1st ed.; Ministerstvo školství ČSR: Praha, 1986.
80. Savitzki, A.; Golay, M. J. E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal. Chem.* **1964**, 36 (8), 1627–1639.
81. Drew, H. R.; Dickerson, R. E. The unfolding of the cytochromes *c* in methanol and acid. *J. Biol. Chem.* **1978**, 253 (23), 8420–8427.
82. Kratochvílová, H. Vliv pH a iontové síly na strukturu a stabilitu cytochromu *c*. Diplomová práce, Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2009.

Abstract

One part of my work focus on literature review on molten globule theme. This conformational state is generally formed in solution of some proteins under mild denaturation conditions as a thermodynamically stable state. Molten globule-like intermediate is also transiently formed during refolding of proteins. It is assumed and even it was proved for some proteins that kinetic (refolding) intermediate and equilibrium unfolding molten globule is identical.

The second part of my work presents conformational study of horse heart ferricytochrome *c* under acidic conditions in low and high ionic strength (addition of 0,5 M sodium chloride). Cytochrome *c* is a mitochondrial protein which mediates electron transfer in respiratory chain. These conformational changes were monitored by UV/VIS and derivative spectrophotometry in four wavelength ranges of absorption spectra – aromatic amino acids absorption range, Soret band, Q-band and CT band. Under high ionic strength probably a molten globule state is stabilized in the pH range 1,90-2,60. However, under low ionic strength, changes in polarity of tryptophane and tyrosine residues vicinity (between pH 2,60 and 2,30) and in spin state of iron atom (around pH 2,10) were observed due to putative denaturation of the protein.

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka