

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Adam Tesař

Spektroskopické studium interakce antibakteriálních peptidů s modelovými membránami

Fyzikální ústav UK

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2012

[Vzor: Vevázaný list – kopie podepsaného „Zadání bakalářské práce“. **Toto zadání NENÍ součástí elektronické verze práce NESKENOVAT.**]

Poděkování:

Rád bych poděkoval především panu RNDr. Vladimírovi Kopeckému Ph.D za pomoc při tvorbě této práce, za rady a vedení během měření. Stejně tak paní RNDr. Lucii Bednárové Csc. za konzultace korektury textu a pomoc s měřením Cirkulárního dichroismu a jeho interpretací. Můj dík patří také RNDr. Evě Kočišové Ph.D a Mgr. Markétě Pazderkové za pomoc při přípravě lipozomů. Všem také děkuji za jejich vstřícnost a trpělivost a příjemné prostředí, které mě v průběhu celé práce motivovalo. Závěrem bych rád poděkoval svým rodičům, sestřám a přítelkyni Šárce za podporu, trpělivost a pochopení.

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

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

V Praze dne 1. srpna 2012

Adam Tesař

Název práce: **Spektroskopické studium interakce antibakteriálních peptidů s modelovými membránami**

Autor: *Adam Tesař*

Katedra / Ústav: *Fyzikální ústav UK*

Vedoucí bakalářské práce: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D. (Fyzikální ústav UK)*

Abstrakt: Antimikrobiální peptidy (AMP) mají obrovský potenciál užití v medicíně a farmacii. Mechanismus účinku je dán interakcí s buněčnou stěnou, která vede k penetraci membrány. Způsob narušení buněčné membrány však není plně pochopen, proto jsme se v práci zaměřili na interakci AMP HAL-1, izolovaného z jedu vosy *Halictus sexctinctus*, s modelovou membránou 100nm lipozomů složených z fosfatidylcholinu a fosfatidylglycerolu. Cirkulární dichroismus a infračervená spektroskopie (FTIR) prokázaly změnu sekundární struktury z neuspořádané, u volného HAL-1, na α -helikální v interakci s membránou. Dalším krokem byla příprava lipidové dvojvrstvy na povrchu ATR hranolu, která by v budoucnu umožňovala užití polarizované FTIR spektroskopie ke studiu interakce AMP s modelovými membránami. Proto jsme pomocí ATR-FTIR spektroskopie, za použití faktorové analýzy, studovali dynamiku vysychání lipozomů a jejich opětovnou hydrataci, a to i za přidání HAL-1. Zaměřili jsme se na stabilizaci systému vzorku. Hydratace lipidové dvojvrstvy 2 μ l vzorku vykazovala stabilitu po desítky minut, přičemž ředěním lipozomů stabilita klesá až k minutám. Rovněž jsme pozorovali protektivní vliv peptidu na lipidovou dvojvrstvu a zpomalení vysychání systému, což by mohlo být způsobeno vznikem kobercové struktury na povrchu. Nicméně, systém není zcela stabilní a cyklicky prochází dehydratací/rehydratací. Stabilita je však dostatečná pro budoucí polarizovaná měření.

Klíčová slova: antimikrobiální peptidy, lipidy, infračervená spektroskopie, cirkulární dichroismus

Title: **Spectroscopic study of interaction of antimicrobial peptides with model membranes**

Author: *Adam Tesař*

Department: *Institute of Physics of Charles University*

Supervisor: *RNDr. Vladimír Kopecký Jr., Ph.D. (Institute of Physics of Charles University)*

Abstract: Antimicrobial peptides (AMP) have a great potential in medicine and pharmacy. Mechanism of their impact is an interaction with a cell membrane leading to the penetration of the membrane. The way of disruption of the cell membrane is not completely understood, therefore we focused on the interaction of AMP HAL-1, isolated from the venom of the bee *Halictus sexctinctus*, with a model membrane of 100 nm liposomes consisting of phosphatidylcholin and phosphatidylglycerol. Circular dichroism and infrared spectroscopy (FTIR) proved the change of the secondary structure from the random coil of free HAL-1 to α -helix in an interaction with the membrane. The next step was preparation of the lipid bilayer on the surface of ATR prism, which will enable usage of the polarized FTIR spectroscopy to study the interaction of AMP with model membranes in future. Therefore, the ATR-FTIR spectroscopy and factor analyses were applied to study dynamics of drying of the liposomes and their subsequent hydration also with an addition of HAL-1. We focused on the stabilization of the system. Hydratation of the lipid bilayer by 2 μ l sample showed stability for minutes, nevertheless after dilution the stabilization decay in minutes. The protective influence of the peptide on the lipid bilayer and slowing down of the drying out of the system was observed. This could be caused by origin of the carpet-like structure on the surface. Nevertheless, the system is not completely stable and oscillates between dehydration/hydratation. However, the stabilization is enough for a polarized measurements.

Keywords: antimicrobial peptides, lipids, infrared spectroscopy, circular dichroism

Obsah	
Úvod	01
1. Působení antimikrobiálních peptidů	02
1.1. Buněčná membrána	02
1.2. Antimikrobiální peptidy	04
1.3. Interakce membrána–peptid	06
2. Experimentální studium antimikrobiálních peptidů	07
2.1. Užití cirkulárního dichroismu	08
2.2. Užití infračervené spektroskopie	10
3. Použité materiály a metody	13
3.1. Antimikrobiální peptid HAL-1	13
3.2. Modelové liposomy	13
3.3. Elektronový cirkulární dichroismus	14
3.4. Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací	17
3.5. Faktorová analýza	24
4. Měření interakce peptidu HAL-1 s membránou	26
4.1. Referenční měření strukturního chování peptidu	26
4.2. Dynamika vysychání membrány pomocí FTIR spektroskopie	29
Diskuse a závěr	58
Seznam použité literatury	59
Seznam použitých zkratk	62

Úvod

Medicína, i přes neuvěřitelný rozvoj antibiotické léčby, stále zcela nevyřešila problém boje s infekčními chorobami. Naopak, nárůst rezistence mikrobiálních kmenů právě na antibiotika a vznik multirezistentních kmenů zvláště nebezpečných v nemocnicích (formou nozokomiální infekce jako multirezistentní kmeny *Staphylococca aurea*), váže značné úsilí výzkumu i náklady farmaceutických firem při výrobě stále nových a nových druhů antibiotik. Je to způsobeno rychlým výskytem mutovaných kmenů syntetizujících jak enzymy bránící působení antibiotika, tak i změnou fenotypu (vnějších znaků) daného mikrobiálního agens omezující imunitní odpověď napadeného organismu.

Nadějným řešením těchto problému se zdají být antimikrobiální peptidy (AMP). Jedná se pravděpodobně o evolučně starý obranný mechanismus buněk bránících se proti napadení infekcí tvorbou těchto peptidů, které způsobují smrt patogena bakteriálního, ale i virového původu. Vyskytuje se u nejjednodušších organismů (hmyz, rostliny), ale i u vyšších organismů jako je člověk, kde je součástí fyziologické obranné odpovědi (defensiny). Konkrétní způsob usmrcení patogena není vždy zcela jasný, AMP ale v tomto procesu jistě hrají důležitou roli. Je nepochybné, že AMP působí na buněčnou membránu mikroba a vzájemnou interakcí narušují podmínky jeho homeostázy a tím zapříčiňuje jeho usmrcení.

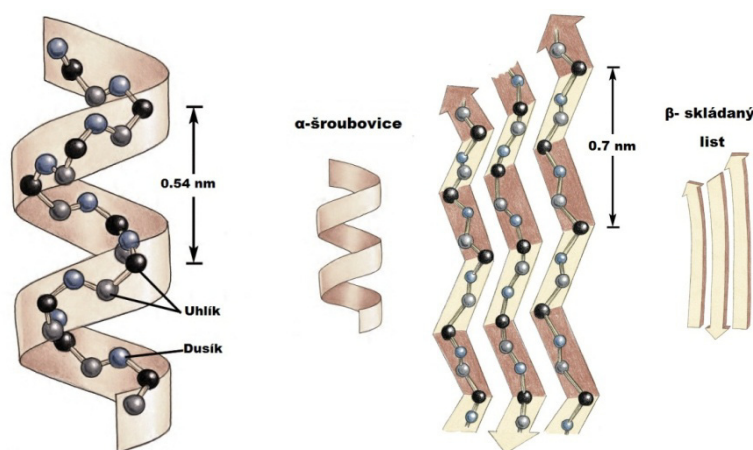
Spektrum užití i výzkumu AMP ale naprosto nekončí ve farmacii. V praxi se již užívají AMP k ochraně potravin a probíhají studie zabývající se využitím AMP k pokrytí umělých povrchů (Héquet *et al.*, 2011) používaných v transplantologii (chlopenních náhrad) a ošetřovatelství (katetry, cévky). Značné naděje jsou vkládány do protinádorového efektu některých AMP. Výzkum v oblasti identifikace a syntézy nových AMP má pomoci k vývoji různých druhů potravin i kmenových buněk odolných proti širšímu spektru patogenů. AMP lze využít díky jejich specifitě i k určení typu patogena (mykotická vs. bakteriální infekce) a dále se též ukazuje pozitivní vliv AMP na působení současné antibiotické terapie (Zasloff, 2002). Je mnoho studií zabývajících se zvýšením specifity i účinnosti konkrétních AMP (Fjell *et al.*, 2011)). Cela řada AMP je v současné době v klinických studiích. Bohužel se zatím nepodařilo dosáhnout jejich schválení AMP pro klinickou praxi.



Obrázek 1. 1. – Zmírnění rakovinného bujení po podávání AMP (převzato z Hoskin & Ramamoorthy, 2008)

1. Působení antimikrobiálních peptidů

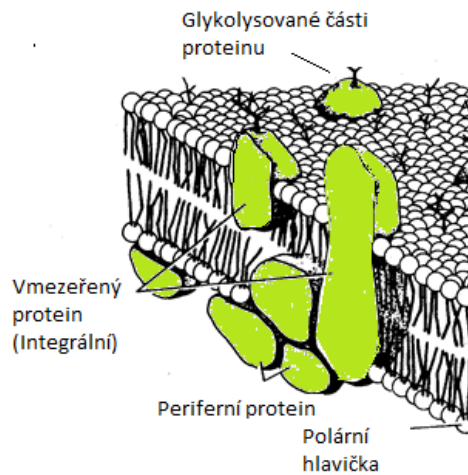
Největší výhodou AMP je jejich specifita pouze vůči některým organismům (zejména prokaryotním) a nízká toxicita vůči lidským (a obecněji eukaryotním) buňkám. Je známo, že funkce biomolekul (např. enzymů) v organismu je určena především jejich celkovou strukturou (primární, sekundární, terciární a vyšší). To platí i pro AMP s tím rozdílem, že pro jejich uplatnění je zásadní změna sekundární struktury při jejich interakci s membránou (viz obr. 1.2.). Jejich prostorové uspořádání mimo interakci s membránou není pro jejich biologickou aktivitu rozhodující. Další charakteristikou AMP je fakt, že o jejich aktivitě a specifitě nerozhoduje konkrétní primární struktura (tj. pořadí aminokyselinových zbytků), ale především celkové fyzikální vlastnosti molekuly jako je její náboj, hydrofobicita, amfipaticita a další. Ukazuje se však, že v interakci membrána–peptid hrají oba aktéři vyrovnané role, proto dále v krátkosti uvedu jejich podstatné vlastnosti.



Obrázek 1.2. – Sekundární struktury proteinů (upraveno dle Alberts *et al.*, 2008)

1.1. Buněčná membrána

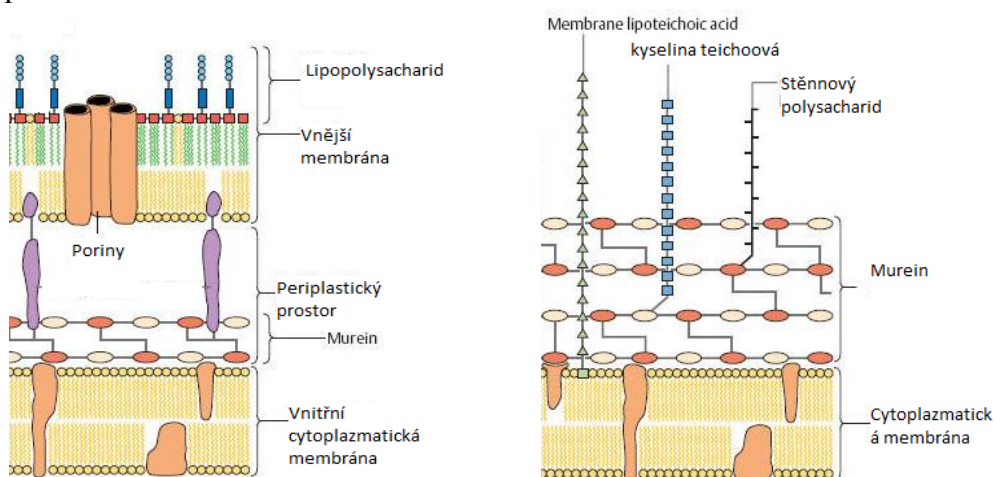
Buněčná membrána je komplexní struktura utvářená z lipidů, proteinů a sacharidů tvořící tzv. fluidně mozaikový model (Murray *et al.*, 1998, viz obr. 1.3.). Hlavní složkou jsou lipidy tvořící amfipatickou dvojvrstvu s polárními částmi na povrchu membrány a hydrofobními řetězci mastných kyselin uvnitř. To značně ovlivňuje permeabilitu membrány pro polární sloučeniny (např. vodu, ionty), různé fyzikální transportní mechanismy jako je osmóza (Moore, 1981; Brdička & Dvořák, 1971), difúze a umožňuje různé složení extra- a intracelulární tekutiny. Pokud je membrána někde neselektivně narušena (jinak než iontovým kanálem, nebo specifickým přenašečem zajišťujícím aktivní transport některých životně důležitých molekul) hrozí rozpad buňky. Specifita AMP v interakci s buněčnými membránami je závislá na chemickém složení membrán, ve kterém se právě eukaryotické buňky a prokaryotické patogeny liší (Zasloff, 2002). Závažnost této skutečnosti dokazuje případ cystické fibrózy onemocnění způsobené mutací chloridového kanálu v bronchiálním epitelu vedoucí ke změně vnějšího prostředí ovlivňující funkci AMP a vedoucí k následnému zvýšení senzitivity k respiračním infekcím.



Obrázek 1. 3. – Fluidní model buněčné membrány (dle Murray *et al.*, 1998)

Fosfolipidová membrána eukaryotů je tvořena především fosfatidylcholinem (PC), fosfatidylethanolaminem (PE) a (zejména v nervové tkáni) sfingomyelinem (SM). Pro fluiditu membrány zásadní roli hrají steroly (cholesterol nebo ergosterol u rostlin a hub), které se u prokaryotních organismů prakticky nevyskytují. Bylo ukázáno, že cholesterol také snižuje aktivitu AMP v interakci s membránou. Předpokládá se, že je to důsledek vyšší stability membrány, ale i možnou interakcí cholesterolu a peptidu (Zasloff, 2002;). Tyto lipidy jsou neutrálně nabitě molekuly.

Prokaryotní membrány patogenů jsou tvořeny především hydroxylovanými fosfolipidy, jako jsou fosfatidylglycerol (PG), kardiolipin a fosfatidyl serin (PS) nesoucí negativní náboj. Tato rozdílnost může být tedy rozhodující pro druhovou specifitu AMP (obr 1.4.). Podobné argumenty by mohly hrát roli pro eventuální účinnost AMP u nádorových buněk, které primárně obsahují kladně i záporně nabitě fosfolipidy, ale změněnou expresí některých genů pro tvorbu negativně nabitých molekul (např. právě PS) a zvětšením celkového povrchu vytváří ideální podmínky pro působení AMP.



Obrázek 1. 4. – Rozdíly ve stavbě grampozitivních a negativních bakterií, které mohou být důvodem specifity AMP vůči těmto mikroorganismům (dle Kayser *et al.*, 2004)

1.2. Antimikrobiální peptidy

Jak bylo již výše zmíněno, AMP jsou evolučně starým, a proto široce rozšířeným obranným mechanismem mnohobuněčných organismů proti patogenům (Zasloff, 2002). Byly izolovány jak u drozofil, afrických žab, tak i u vyšších živočichů. (Databázi doposud známých AMP lze najít na webové adrese vědecké skupiny z Univerzity Trieste – <http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/amsdb.html>.)

Základ aktivity AMP souvisí se změnou sekundární struktury peptidu v důsledku interakce s membránou. AMP, mají amfipatický charakter (obr. 1. 5.) – tedy polární část z kladně nabitých zbytků aminokyselin zajišťující interakci s negativně nabitými membránami patogenů a hydrofobní část. Celkový náboj AMP při neutrálním pH je +2 až 9 (Yeaman *et al.*, 2003). Právě náboj peptidu hraje značnou roli ve specifitě jejich interakce s membránami mikroorganismů. Negativní nabitý vnější list membrány gramnegativních bakterií, ale bohužel přispívá reakcí se záporně nabitými sialovými kyselinami membrány červených krvinek k hemolytické aktivitě některých AMP (Blondelle *et al.*, 1999). Zdá se, že jistý vliv na funkci peptidu má jeho celková délka (Blondelle *et al.*, 1999). Přes relativní nezávislost aktivity AMP na konkrétní primární struktuře, vyskytují se často AMP bohatší na jednu určitou aminokyselinu (např. prolin nebo tryptofan). Ukázalo se jako výhodné v syntetických analozích AMP nahradit L-aminokyseliny za uměle vytvořenými analogy (např. D-aminokyseliny (Won *et al.*, 2010)) a tím jim zajistit větší rezistenci vůči proteázám a delší účinnost AMP (Russel, 2011). Rovněž byl studován výskyt oligomerů s antimikrobiální aktivitou, pro které jednotlivé části neprojevovali cytolytickou aktivitu (Castellano, 2007).

Výhodou vůči soudobým antibiotikům je rychlost usmrcení patogena, která je téměř okamžitá (Blondelle *et al.*, 1999). Ukazuje se být rozumné použití AMP vůči gramnegativním bakteriím, u kterých při interakci peptidu a následném usmrcení buňky nedochází k uvolnění lipopolysacharidu (LPS) neboli endotoxinu, způsobující při normálně léčbě intoxikaci pacienta (Brandenburg, 2010). AMP také během své syntézy vznikají proteolytickým štěpením ze složitějších proteinů, které mohou plnit v buňce zcela odlišnou funkci (např. Buforin II z histonu 2A nebo laktofericin z laktoferinu (Zasloff, 2002; Castellano, 2007)). Právě původ buforinu z histonu 2A podporuje hypotézu, že AMP je evolučně starý mechanismus obrany. Značnou předností AMP je, že doposud nebyla vůči nim prokázána žádná získaná rezistence od jakéhokoliv mikroorganismu, přestože citlivost k nim se může značně lišit.

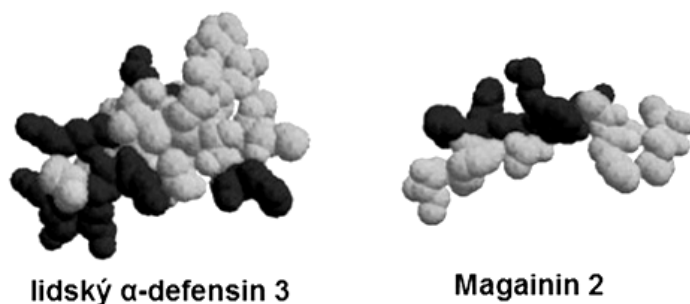
Nezávislost mechanismu interakce na konkrétní primární struktuře ukazuje, že proces mutací utvářel vlastní sadu AMP pro každý organismus, zajišťujících boj vůči mikrobům jeho niky, kdy aktivita AMP vedla pomocí přírodního výběru k přežití organismů s vhodným složením AMP (Zasloff, 2002). Tento enormní počet AMP je jedním z důvodů nízké rezistence mikrobiálních organismů na AMP. Dalšími faktory jsou: a) nutnost zachování složení membrány a jejich fyzikálních vlastností pro život patogena, faktory zajišťující specifitu interakce AMP a mikroba; b) spojení genů zvyšujících rezistenci na AMP s geny způsobující virulenci (mechanismus poškození napadeného organismu, kdy jejich mutace vede ke ztrátě patogenity). Podstatným

faktorem je nespecificita primární struktury AMP, která tak zabraňuje vzniku proteázy s epitopem odpovídajícím části peptidu (Zasloff, 2002).

Kromě nejasností ohledně procesu interakce AMP a membrány, zůstává také nejasný proces způsobující smrt buňky. Existuje mnoho hypotéz o smrtících účincích depolarizace membrány, aktivace hydroláz, narušení funkce membrány, narušení vnitřních struktur buňky nebo zahájení apoptózy skrze vnitřní cestu (Castellano, 2007). Jak bylo již zmíněno, síla AMP je v jejich značné specificitě vůči patogenům a nízké toxicitě vůči vlastním buňkám (k jejímu stanovení se určuje hemolytická aktivita AMP). Pro umocnění významu AMP v současném medicínském významu zmíním, že bylo provedeno několik studií s knockoutovými kmeny myši dokazujících extrémní závislost počtu infekcí a závažnosti jejich průběhu na některých AMP. Buňky epitelů pokožky i sliznice vylučují AMP anebo se pokrývají biofilmem s vysokým obsahem AMP, a tak se brání proti nebezpečným noxám (Zasloff, 2002). AMP také produkují buňky imunitního systému, jako podpůrný mechanismus při uplatnění imunity během napadení (Zasloff, 2002). Stále více nemocí se ukazuje mít možný důvod své patogeneze ve snížené exkreci AMP anebo jejich ovlivnění změnou fyzikálních vlastností okolního prostředí (např. časté průjmy po nákaze *Shigellou*), což vede k opakovanému podléhání chronickým infekcím.

AMP jsou v organismu často produkovány neustále při udržování konstantní hladiny, ale byly již popsány způsoby signalizace zejména pomocí rodiny tzv. *Toll-like* receptorů vedoucí ke zvýšené syntéze určitého peptidu (Zasloff, 2002). Podstatný vliv na udržení syntézy a rychlosti reakce na infekci má vystavení organismu působení mikroorganismů, které s ním žijí v symbióze (tzv. komenzálové) a jež zapřičiňují spuštění signalizační dráhy, ale na které dané AMP nepůsobí baktericidně (Zasloff, 2002).

Možnosti zavedení synteticky vyrobených nebo extrahovaných AMP prozatím bohužel brání nutnost vysoké koncentrace přibližující se hranici toxického prahu. Závěrem je nutno poznamenat, že přes obrovský potenciál AMP v medicínské terapii, některé peptidy prokazují v určité míře toxickou aktivitu vůči savcím buňkám (tj. napadání savčích erytrocytů), proto je u nich nutné pracovat na vhodnějších syntetických formách (Blondelle *et al.*, 1999). Ze studií takto vyrobených analogů plyne, že při poklesu amfipaticity dochází k snížení až ztrátě antimikrobiální aktivity. Vysoká hydrofobicita a helicitita zvyšují hemolytickou aktivitu (Blondelle *et al.*, 1999).



Obrázek 1. 5. – Časté AMP s vyznačením hydrofobních (světle) a hydrofilních (tmavě) aminokyselin (upraveno dle Zasloff, 2002)

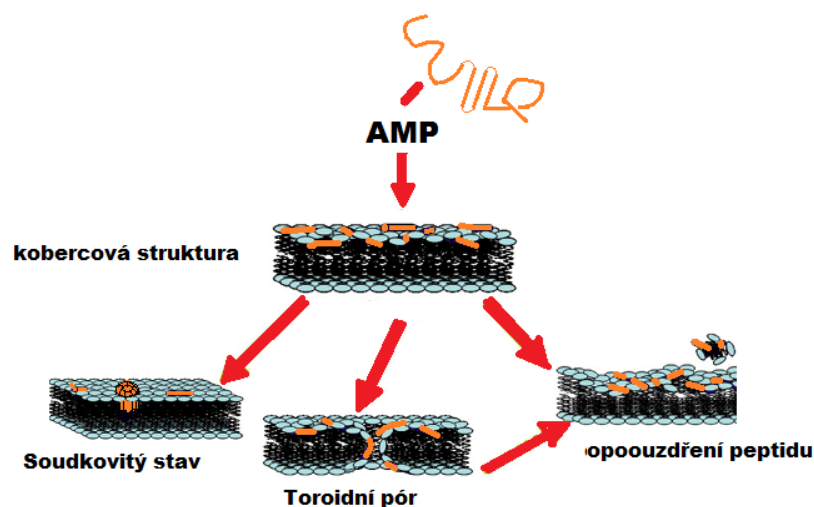
1.3. Interakce membrána–peptid

Proces narušení membrány v důsledku interakce s AMP lze rozdělit do tří částí.(Russel, 2010).

- 1) *Elektrostatická interakce mezi AMP a lipozomem*: Elektrostatická přitažlivá síla způsobí značný nárůst koncentrace AMP na povrchu fosfolipidové membrány. (Yin *et al.*, 2012).
- 2) *Navázání na povrch*: Postranní hydrofobní řetězce peptidu pronikají do vnitřku membrány a jednotlivé na membráně položené peptidy vytvářejí oligomery. Pohyb AMP do hydrofobního jádra může být popsán entropicky nebo entalpicky za přispění van der Waalsových sil.
- 3) Třetím krokem je *změna konformace AMP* způsobující narušení membrány.

Jak již bylo zmíněno, přes značné znalosti o vlastnostech a struktuře AMP, konkrétní způsob rozrušení membrány buňky zůstává nejasný. V současné době se prosazují zejména první čtyři níže uvedené hypotézy (viz obr. 1.6),

- 1) *Toroidní pór (toroidal pore)* – AMP způsobí vznik póru v lipidové dvojvrstvě za společné účasti peptidu i polárních hlaviček lipidů, čímž minimalizují odporové působení hydrofobní části membrány (Russel, 2010). Příkladem může být Maganin 2 (Nguyen, 2009)
- 2) *Soudkový stav (barrel state)* – AMP vytvoří strukturu zaujímající tvar soudku, která penetruje membránu (Russel, 2010). Příkladem jsou bacterocini druhé třídy, které ale mohou také využívat kobercovou strukturu (Castellano, 2007).
- 3) *Kobercová struktura (Carpet-like structure)* – AMP přilne k povrchu membrány a po překročení určitého počtu AMP dochází k prasknutí membrány.(La Rocca *et al.*,1999).
- 4) *Mechanismus tvorby micel* – předpokládá opouzdření peptidu membránou vedoucí ke ztrátě její integrity (Russel, 2010).



Obrázek 1.6. – Mechanismy interakce antimikrobiálních peptidů a buněčné membrány (upraveno dle Hoskin & Ramamoorthy, 2008)

2. Experimentální studium antimikrobiálních peptidů

Buněčná membrána je fyziologicky značně komplexní složitá struktura, jak bylo popsáno výše (Blondelle *et al.*, 1999), a tedy pro experimenty zabývající se interakcí peptidu s membránou je vhodné použít model buněčné membrány. Jako modelů se užívá fosfolipidové membrány složené ze dvou či více typů fosfolipidů (volba fosfolipidu dle toho, jaký typ membrány mají představovat). Používá se monovrstva na rozhraní voda vzduch, ale ve snaze přiblížit se co nejvíce reálné situaci se využívá spíše dvojvrstva či složitější struktury, jako jsou lipozomy nebo vezikuly.

Nejjednodušším modelem pro studium možné změny sekundární struktury peptidu jsou např. metanol, etanol, trifluorethanol – roztoky podporující tvorbu α -helikální konformace. Změna sekundární struktury v tomto případě není však tvořena intermolekulárními vazbami, ale intramolekulárními mezi peptidem a molekulami rozpouštědla. Rozpouštědlem napodobujícím přirozené změny sekundární struktury je dodecyl sulfát sodný (SDS), přičemž indukovaná struktura záleží na koncentraci SDS. Při koncentraci menší než je koncentrace, při které SDS tvoří micely (do 4 mM v závislosti na prostředí) může indukovat u peptidů strukturu β -skládaného listu, naopak při vyšší koncentraci SDS, často je pozorována α -helikální struktura (Blondelle *et al.*, 1999). Systém lépe vystihující komplexnost buněčné membrány jsou vezikuly, které dělíme do čtyř druhů: a) *malé unilamelární vezikuly* (SUV) (poloměr 25–50nm), b) *velké unilamelární vezikuly* s poloměrem kolem 100 nm (LUV), c) *multilamelární molekuly* (100–800nm) a *obrovské unilamelární vezikuly* (GUV) (>1 μ m). Jelikož u SUV je příliš vysoké zakřivení membrány neodrážející skutečnost je užití LUV vhodnější (Blondelle *et al.*, 1999).

Podstatné je, jak již bylo zmíněno i složení membrány. Pro lepší popis průběhu interakce mezi peptidem a membránou je vhodné použít orientované vrstvy lipidů (Blondelle *et al.*, 1999). Příprava různých typů membrán je podrobně popsána v přehledovém článku Tamm & Tatulian, 1997. Byly publikovány studie, které popisují vliv přítomnosti a koncentrace volného vápníku pro některé AMP. To souvisí se speciální strukturou vnějšího listu membrány gram-negativních bakterií, která obsahuje kationty magnesia navázané na liposacharidy, které jsou vápníkem vyvázané a tudíž je umožněna interakce AMP s membránou (Reder-Crist *et al.*, 2011). Mnohé studie popisují značný vliv koncentrace jak peptidů, tak membrány, resp. lipidů, a jejich poměru na pozorovaná data. (Tamm & Tatulian, 1997, Blondelle *et al.*, 1999).

Rozhodující vliv má také použité rozpouštědlo, které značně ovlivňuje strukturu AMP (pokud je hydrofilní AMP zaujímá strukturu vykřívající hydrofobní rezidua) (Blondelle *et al.*, 1999). Rozpouštědlo může ovlivnit i signál při interakci, pokud dochází k výměně atomů mezi sledovanou charakteristickou skupinou peptidu a prostředím (Blondelle *et al.*, 1999). Důležité je udržovat stabilní pH pomocí pufrů, jelikož při změně pH se značně mění náboj peptidů (Blondelle *et al.*, 1999). Protože během interakce jsou peptid a membrána rovnocennými partnery, závisí jejich interakce samozřejmě na složení buněčné membrány a na její fázi (Blondelle *et al.*, 1999), která je ovlivněna změnou teploty (Tamm & Tatulian, 1997).

Ke studiu struktury peptidů a jejich interakcí s modelovými membránami se užívá řada experimentálních technik. Především jde o techniky spektroskopické, zastoupené elektronovým (ECD) (Blondelle *et al.*, 1999) a vibračním cirkulárním dichroismem (VCD) (Shanmugam *et al.*, 2011), fluorescenční spektroskopii a obecně o různé techniky infračervené spektroskopie (FTIR, ATR-FTIR, ER-FTIR) (Blondelle *et al.*, 1999). Rovněž jsou využívány mikroskopické techniky jako je mikroskopie atomových sil (AFM) (Jass *et al.*, 2000), fluorescenční mikroskopie a transmisní elektronová mikroskopie (TEM) (Shanmugam *et al.*, 2011). Snahou je však uplatnit při studiu i techniky jak čistě chemické, jako je kapalná chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) (Blondelle *et al.*, 1999), tak i techniky s vysokým strukturním rozlišením jako je rentgenostrukturní analýza (Blondelle *et al.*, 1999) a nukleární magnetická rezonance (NMR) (Blondelle *et al.*, 1999).

2.1. Užití cirkulárního dichroismu

K určení konformace biomolekul se s výhodou používá cirkulární dichroismus (CD), metoda využívající rozdílné absorbance levotočivě a pravotočivě polarizovaného záření. Podle spektrálního oboru rozlišujeme *elektronový cirkulární dichroismus* (ECD) (CD v UV/VIS spektrálním oboru) a *vibrační cirkulární dichroismus* (VCD) (CD v IR spektrálním oboru – studuje vibrační strukturu molekul, Berova *et al.*, 2000). ECD spektroskopie je technika, užívaná standardně ke studiu chirálních (opticky aktivních) molekul a tedy také ke studiu sekundární, terciární a případně vyšších strukturních uspořádání biomolekul (peptidy, proteiny, nukleové kyseliny). VCD je relativně nová metoda, která se postupně etabluje v laboratořích. V současnosti není standardně využívána k charakterizaci chirálních molekul pro její experimentální náročnost (viz např. Shanmugam *et al.*, 2011).

Protože z ECD lze určit konformaci peptidů je užívána jako jedna ze základních metod ve většině studií zabývajících se mechanismem účinku AMP, a proto se dále zaměřím pouze na ni (dále už jen CD). Při interpretaci CD spekter lze postupovat čistě z teorie a provést teoretický rozbor struktury dané molekuly. To si ovšem žádá detailní propočítání elektronové struktury molekuly, nalezení jejích možných konformací a jejich rovnovážného zastoupení ve vzorku při daných experimentálních podmínkách. To lze ovšem dobře praktikovat pouze pro rigidní molekuly s malým počtem chromoforů. Alternativou je čistě empirický přístup, využívající spekter molekul o známé konformaci a pomocí srovnávání spekter dané molekuly a těchto spekter se snaží interpretovat její konformaci (nejčastěji se používá kombinace obojího). Empiricky a semiempiricky se určuje zejména konformace složitých biologických vzorků (proteiny, DNA, peptidy).

Předpokládá se, že základní bílkovinný řetězec zaujímá pouze omezený počet energeticky preferovaných konformací, kterým lze připsat charakteristickou CD křivku, jež byla získána měřením za stanovených podmínek polypeptidů známé sekundární struktury. Dále se předpokládá, že CD spektrum dané bílkoviny je lineární kombinací těchto standardních CD spekter $\vartheta_i(\lambda)$, kde i reprezentuje α -helix,

β -strukturu, β -ohyb nebo neuspořádanou strukturu. Poté lze stanovit koeficienty f_i vyjadřující zastoupeních jednotlivých konformací podle vzorce:

$$[\theta(\lambda)]_{\text{změřené}} = \sum_{i=1}^N f_i \vartheta_i(\lambda) \quad [\theta(\lambda)]_{\text{změřené}} = \sum_{i=1}^N f_i \vartheta_i(\lambda) \quad (2.1.)$$

(Berova *et al.*, 2000). Při studiu interakce s modelovými membránami je nevýhodou CD spektroskopie, oproti FTIR spektroskopii, rozptyl světla, který je parazitní zejména v krátkovlnné části spektra a je nutná jeho korekce (Prosser *et al.*, 1989). Tento efekt při špatně nastavených experimentálních podmínkách může výrazně ovlivnit určování struktury membránových proteinů, a proto je vhodné užít SUV resp. LUV do 100 nm s inkorporovaným proteinem. Široké užití má CD i v měření konformačních rovnováh v závislosti na teplotě, pH, iontové síle a dalších parametrech a stejně tak při měření interakce biomolekul a konformačních změn s tím souvisejících (Berova *et al.*, 2000).

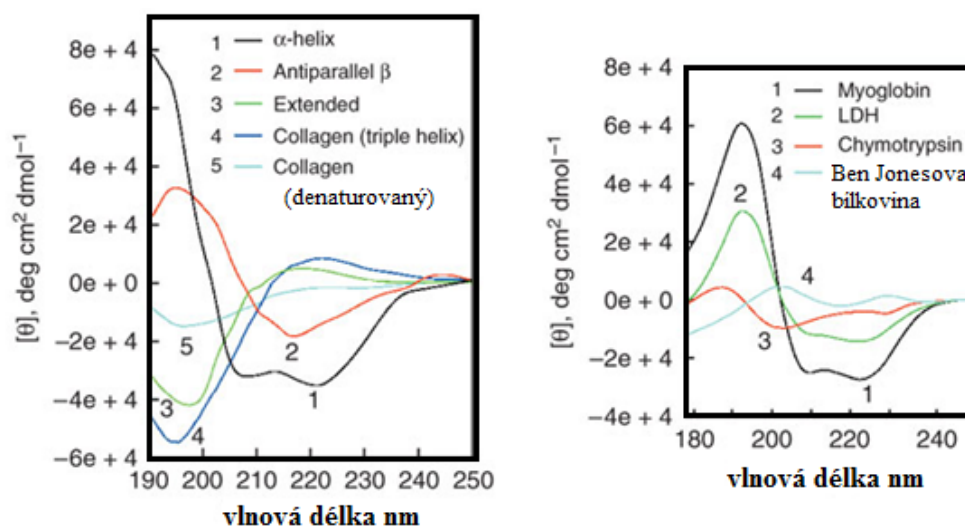
2.1.1. Charakteristická spektra

CD spektra odpovídající $n-\pi^*$ a $\pi-\pi^*$ přechodům amidových vazeb leží v oblasti 190–240 nm tedy tzv. vzdálené UV oblasti. (Následující zpracováno dle Berova *et al.*, 2000).

α -šroubovice. Pravotočivý α -helix je jednou ze sekundárních struktur v proteinech, vzniklou propojením vodíkových vazeb mezi peptidovými vazbami (viz obr. 1.2.). Pro CD spektra α -helixu jsou typická dvě negativní maxima při 222 nm (odpovídající $n \rightarrow \pi^*$ přechodu) a 208 nm (pro $\pi \rightarrow \pi^*$ přechod) (viz obr. 2.1.). Spektrum α -šroubovice je výrazné svojí značnou intenzitou, a proto je dobře identifikovatelné.

β -skládaný list. Struktura β -skládaného listu se vyskytuje ve dvou možných formách – s paralelním a antiparalelním uspořádáním řetězců – opět pospojovaných pomocí vodíkových můstků (obr. 1.2.). Pro CD spektrum je charakteristické negativní maximum kolem 216 nm a pozitivní přibližně při 195 nm malé intenzity (obr. 2.1). Díky nižší rozpustnosti skládaného listu v roztocích s dobrou UV propustností je jak experiment, tak i interpretace spekter obtížnější. Tyto struktury jsou hůře definované, protože oba β typy β -skládaného listu se mohou různě kombinovat. Interpretace se tak stává obtížnější nehledě na relativně nízkou intenzitu CD spektra této konformace ve srovnání s ostatními.

Neuspořádaná struktura. Neuspořádaná struktura („random coil“, neboli náhodné klubko) je v užším slova smyslu označení pro strukturu odpovídající denaturovanému peptidu, ale často bývá používáno k označení všech zbylých sekundárních struktur. Proto je těžké přesně definovat odpovídající CD spektrum, ale obvyklý je negativní signál do 200 nm a pozitivní vrchol při 218 nm. V některých systémech je popisován i slabý negativní vrchol při 235 nm.



Obrázek 2.1. – CD spektra jednotlivých sekundárních struktur a typických bílkovin (přepočováno dle Greenfield, 2007)

2.2. Užití infračervené spektroskopie

Ke studiu strukturálního uspořádání peptidů a proteinů se používá FTIR spektroskopie jak v modu transmisním tak v modu ATR (viz dále). Volba techniky závisí jak na studované problematice, tak i na materiálových možnostech (koncentrace, množství vzorku). Pro studium interakce AMP s modelovou membránou ve formě monovrstvy se nabízí právě technika ATR. Pro pochopení většiny technických aspektů interpretace ATR-FTIR spekter odkazují čtenáře na přehledový článek Goormaghtigha *et al.*, 1999, pro podrobné studium proteinů a peptidů s membránou doporučujeme přehledový článek Tamm & Tatulian, 1997.

Interpretace získaných dat umožňuje určení řady parametrů charakterizujících, monovrstvu modelové membrány, její stav, strukturu samotného proteinu a také i interakci membrány s peptidem (Neira *et al.*, 2010). Podstatný je výběr rozpouštědla, protože vibrační pás vody ($\sim 1645\text{ cm}^{-1}$) se překrývá s charakteristickými vibracemi peptidové páteře pásu amidu I (viz dále). Naopak použití D_2O překrývá druhou charakteristickou skupinu amidu II (Tamm & Tatulian, 1997). Prvním bodem interpretace spektra je již důkaz samotné interakce membrány a peptidu. K tomuto účelu se často užívá měření spekter dvojvrstvy při změně teploty (Castellano *et al.*, 2007). Při určité teplotě T dochází ke změně fáze membrány (z gelové na fázi tekutých krystalů, ale změna se týká pouze zbytků nenasyčených kyselin), pro kterou je typická hysterezní závislost. Po přidání AMP lze sledovat posun hysterezní křivky k nižším teplotám, což poukazuje na reakci AMP s membránou a následně na změnu termodynamických vlastností membrány. Již byly navrženy matematické modely vysvětlující jak hysterezní tvar, tak i závislost změny teploty T na koncentraci AMP pomocí závislosti parametrů vyšších řádů pro nelineární harmonický oscilátor (Stan *et al.*, 2006). Naopak byl popsán i vliv membrány na zvýšení termostability proteinu (Sukumaran *et al.*, 2005). Pro správnou interpretaci spekter často vycházíme charakteristických skupin jak kostry proteinu,

tak postranních řetězců, jejichž absorpční pásy lze dohledat v literatuře (Tamm & Tatulian, 1997). Pro představu a pro lepší interpretaci vlastních měření uvádím významné vibrace v tabulce 1 (Tamm & Tatulian, 1997). Všechny tzv. amidové skupiny nesou informaci o konformaci proteinu. Nejvíce se však v IR spektroskopii využívá oblast amidu I (viz tabulka 2.2.). Pro možný popis sekundární struktury na základě vibračních spekter odkazují na tabulku 2.3.

Tabulka 2.1. – Významné infračervené absorpční pásy pro membránové lipidy a pro protein (zjednodušeno z Tamm & Tatulian, 1997)

Vzorek	Typ vibrace	Přibližná hodnota maxima (cm ⁻¹)
Lipid	CH ₃ antisymetrická valenční	3038
	CH ₃ antisymetrická valenční	2956
	CH ₂ antisymetrická valenční	2920
	CH ₃ symetrická valenční	2870
	CH ₂ symetrická valenční	2850
	C=O valenční	1730
Protein	amid I	1600–1700
	amid II	1510–1580
	amid III	1200–1400
Lipid	PO ₂ ⁻ antisymetrická valenční	1228
	PO ₂ ⁻ symetrická valenční	1085

Tabulka 2.2. Korelace mezi obvyklou sekundární strukturou a vlnočtem v oblasti amidu I (zjednodušeno podle Tamm & Tatulian, 1997)

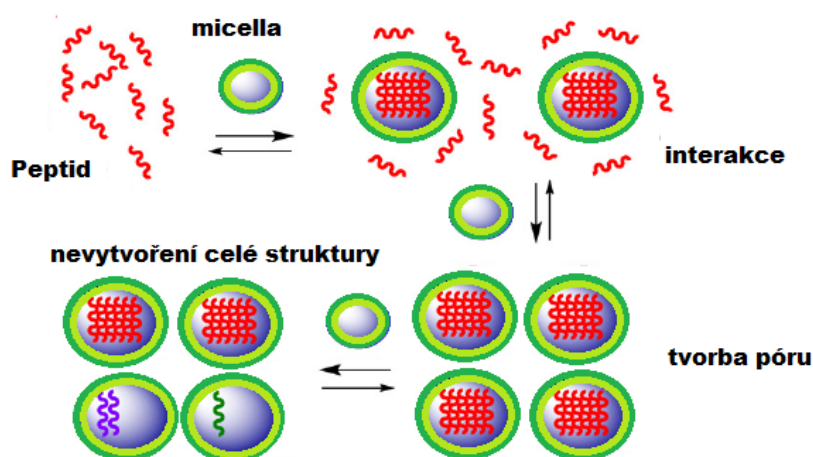
Sekundární struktura	Vlnočty maxima v oblasti amidu I (cm ⁻¹)
Antiparalelní β-skládaný list	1675–1695
β-otočka	1660–1685
Polyprolinový helix II	1660–1670
α-šroubovice	1648–1660
Neuspořádaná struktura	1652–1660 (denaturovaná 1640–1648)
β-skládaný list	1625–1640

Při popisu interakce Lactocinu 705 (oligomer o dvou podjednotkách) s membránou bylo využito různého umístění charakteristických vibračních skupin ve fosfolipidové dvojvrstvě. První podjednotka indukuje dehydrataci polární části dvojvrstvy a druhá proniká hydrofobní částí dvojvrstvy (Castellano *et al.*, 2007). Pro popis hydrofobní části membrány je vhodné volit symetrické i antisymetrické valenční vibrace methylenové skupiny (v oblasti ~2800 resp. ~3000 cm⁻¹) zbytků mastných kyselin. Efekt AMP na hydratovanou část membrány je vhodně popsán vibracemi polárních skupin, nejčastěji karbonylové skupiny (Tamm & Tatulian, 1997). Castellano *et al.*, 2007 využívá vibrací esterové vazby DPPC popsané dvěma překrývajícími se pásy o vlnočtech 1745 a 1730 cm⁻¹, kde byl v nepřítomnosti AMP popsán nárůst jejich intensity s rostoucí teplotou vysvětlovaný jako nárůst množství molekul vody blízkých esterovým skupinám kvůli nárůstu pronikání molekul vody k povrchové části membrány. Dále je pozorována podobná změna při interakci povrchové části oligomeru působící změnu teploty pro hydrofobní část membrány pomocí vibrace amidu I ~1650 cm⁻¹ (Castellano *et al.*, 2007).

Pro popis sekundární struktury peptidu/proteinu se nejčastěji volí absorpční pás označovaný jako amid I (~1650 cm⁻¹) (Barth, 2007). Je vhodné poznamenat, že v případě experimentu v D₂O v důsledku výměny H/D vlnočty amidu I poklesne

o $\sim 10 \text{ cm}^{-1}$. Pro spektrální oblast amidu II $\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$ může být pokles intenzity znakem reakce s vodným roztokem, odpovídající přístupu molekul rozpouštědla k amidové skupině, a tedy změně sekundární struktury (Taulian, 2003). Posun charakteristických vlnočtů po přidání lipidové dvojvrstvy může být interpretován jako tvoření slabých intermolekulárních vodíkových vazeb a záleží na fázi dvojvrstvy. Pro interpretaci strukturálních změn lze také využít vibrací postranních zbytků aminokyselin (Tamm & Tatulian, 1997). Nejčastěji je užívána vibrace tyrozinových zbytků ($\sim 1515 \text{ cm}^{-1}$), jsou-li obsaženy v primární struktuře peptidu. (Castellano *et al.*, 2007). Charakteristický vlnočet je ale značně ovlivněn lokálním prostředím podle toho, je-li vystaven vodnímu nebo hydrofobnímu prostředí, a tedy jejím prostřednictvím lze získat informace o konformaci peptidu.

Kromě porovnání rovnovážných spekter s případně teplotních závislostí je možné sledovat časovou závislost sbalování peptidu (Blondelle *et al.*, 1999). Lze tak stanovit i dobu potřebnou k ustanovení rovnováhy. Pomocí koncentrační závislosti, kdy je konstantní koncentrace peptidu s narůstajícím koncentrací lipozomů lze stanovit kritickou koncentraci, při které dochází k rozdělení peptidů mezi všechny lipidy (viz obr. 2.7.), a tedy ke vzniku kompletních póru (Russell, 2010).



Obrázek 2.2. – Vliv vzájemného poměru lipozom/peptid na tvorbu póru (upraveno dle Russel *et al.*, 2010)

Pomocí polarizovaných ATR-FTIR spekter lze určit orientaci peptidu v lipidové dvojvrstvě (Tatulian, 2003). Amfipatická struktura peptidu mu umožňuje v malé koncentraci ležet na membráně. Jeho orientace se odvíjí od hydratace a složení membrány. Při plné hydrataci zaujímá paralelní pozici. Analýzou absorpčního pásu Amidu I lze určit úhel mezi podélnou osou α -helixu a rovinou membrány. Pro takovéto kvantitativní určení byly vyvinuty především metody užívající *Sum Frequency Generation* (Nguen *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2010; Ye *et al.*, 2010). Polarizovaná ATR-FTIR spektroskopie tedy může být užita k určení orientace jak AMP, tak i buněčné dvojvrstvy (Tatulian, 2003; Blondelle *et al.*, 1999). K určení orientace peptidu lze také použít i absorpční pás amidu I tak i amidu II, které jsou paralelní respektive kolmé k dlouhé ose helixu. Podstatné pro sekundární strukturu je i povrchové napětí membrány (Blondelle *et al.*, 1999).

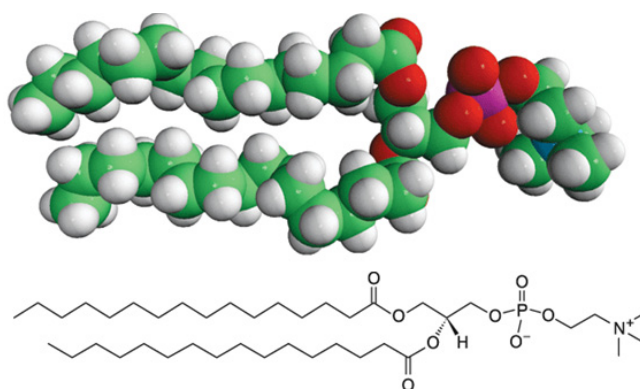
3. Použité materiály a metody

3.1. Antimikrobiální peptid HAL-1

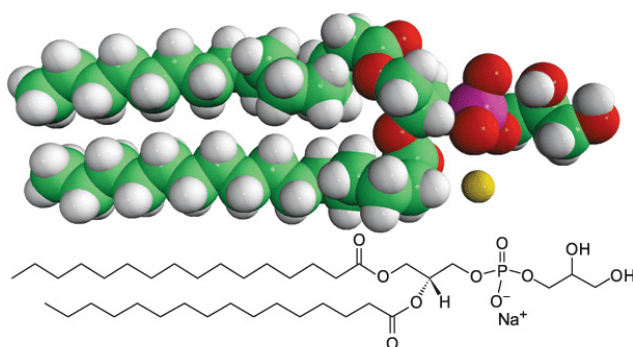
Pro naši studii jsme používali antimikrobiální peptid HAL-1 izolovaný z jedu pospolité včely *Halictus sexcinctus* (Monincová *et al.*, 2010). Jde o lineární dodekapeptid o molekulové hmotnosti 1425,7 Da a sekvenci Gly-Met-Trp-Ser-Lys-Ile-Leu-Gly-His-Leu-Ile-Arg-NH₂ (Monincová *et al.*, 2010). Vzorek byl pro naše účely chemicky syntetizován Dr. Miroslavou Blechovou na Ústavu organické chemie a biochemie Akademie věd České republiky. Pro měření FTIR jsme používali koncentraci peptidu 10 mg/ml, a to jak v destilované vodě, tak i ve vodném roztoku s 16 mM SDS, který indukoval helikální konformaci peptidu. V případě měření spekter ECD byla použita koncentrace pouze 0,12 mg/ml.

3.2. Modelové lipozomy

Jako modelové membrány jsme využívali 100 nm lipozomy složené ze směsi lipidů 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycer-3-fosfocholinu (PC) a 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycer-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (PG) v poměru PC/PG (20:80) (obr 3.1) (Avanti Lipids).



Obrázek 3.1. – A) 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycer-3-fosfocholinu



B) 1,2-dihexadecanoyl-*sn*-glycer-3-phospho-(1'-*rac*-glycerol) (převzato z <http://avantilipids.com>)

Lipozomy byly připraveny pomocí extrudéru (Avanti Lipids) skládající ho se z kovového bubínku (obr 3.2a) ve kterém jsou uloženy umělohmotné bloky

vyplňující jeho vnitřek, mezi nimiž je polykarbonová membrána o dané velikosti pórů (v našem případě 100 nm). Oba bloky jsou utěsněny na straně membrány o-kroužky. Jejich středem probíhá ústí 500μl pipet umístěných na obou stranách kovového bubínku (obr 3.2b).



Obrázek 3. 2. – A) Jednotlivé části extrudéru (vlevo); B) extrudér složený do finální podoby a připravený k použití (obrázek vpravo)

Lipozomy jsme připravili následujícím postupem: 1.) připravili jsme roztok PC/PG (20:80), přičemž díky hydrofobicitě lipidů je nutné rozpustit PG v směsi metanolu a chloroformu a PC pouze v chloroformu. 2.) Metanol a chloroform byly ze vzorku ve vakuované sušičce odpařeny. 3.) Vzorek byl hydratován destilovanou vodou k dosažení potřebné koncentrace. 4.) Je nutné udržet roztok lipidu nad teplotou fázového přechodu, proto jsme jak vzorek, tak i samotný extrudér zahřívali v pánvi na teplotu 60 °C. Po dostatečné hydrataci lipidů, byl roztok opatrně nasát, aby nedošlo k tvorbě bublin, do jedné ze skleněných pipet extrudéru. Následně byl 31× opakovaně protlačován, čímž se postupně vytvořili lipozomy požadované velikosti.

3.3. Elektronový cirkulární dichroismus

Chiralita neboli optická aktivita je vlastností většiny makromolekulárních látek a je dána asymetrií studované látky (nejvyšší prvek symetrie je rotační osa). V chemii je optická aktivita spojena s pojmem asymetrického uhlíku a optickou isomerií. Optické isomery tvoří takovou dvojici látek, které při interakci s polarizovaným světlem stáčí polarizační rovinu o stejně veliký úhel, ale s opačnou orientací. V případě spektroskopie CD studujeme diferenciální spektra, která jsou výsledkem rozdílu absorpce levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaného světla po průchodu vzorkem (viz obr. 3.3).



Obrázek 3.3. – Princip cirkulárního dichroismu (dle Roger & Ismail, 2004)

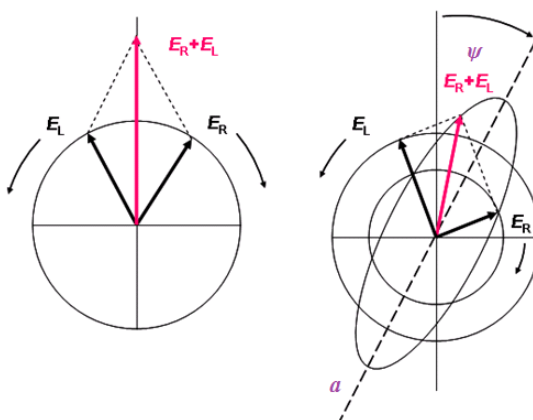
3.3.1. Teorie

V opticky aktivním prostředí se lineárně polarizované světlo rozbíjí na pravo- a levotočivou kruhově polarizovanou vlnu. (Následující zpracováno dle Prossera *et al.*, 1989.)

$$A_R = \sqrt{2}A_0(\vec{e}_1 - i\vec{e}_2)\exp[-i\omega(t - \frac{n_R \cdot \vec{k} \cdot \vec{r}}{c})] \quad (3.1a)$$

$$A_L = \sqrt{2}A_0(\vec{e}_1 + i\vec{e}_2)\exp[-i\omega(t - \frac{n_L \cdot \vec{k} \cdot \vec{r}}{c})] \quad (3.1b)$$

Obě vlny mají v takovém prostředí rozdílný index lomu (3.1), a proto i rozdílnou absorpci, a dochází tedy k poklesu amplitudy jedné z vln. Kvůli rozdílné rychlosti jednotlivých komponent dochází ke skládání obou komponent v jiné fázi, což se projeví stočením polarizační roviny o úhel ψ . Vzniká tak elipticky polarizované světlo (viz obr. 3.4).



Obrázek 3.4. – Elipticita – stočení polarizační roviny a změna lineárně polarizovaného světla na kruhově polarizované (upraveno dle Prosser *et al.*, 1989)

Jak bylo řečeno v úvodu cirkulární dichroismus odpovídá rozdílné absorpci ΔA levotočivě (A_L) a pravotočivě (A_p) kruhově polarizovaného světla.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.2)$$

Z klasické teorie víme (viz vibrační spektroskopie), že absorpce je úměrná oscilátorové síle, která je úměrná druhé mocnině elektrického tranzitního momentu μ . Lze ukázat, že cirkulární dichroismus je úměrná tzv. rotační síle R , která nezávisí pouze na μ , ale i magnetickém tranzitním momentu m podle rovnice (3.3), což právě obohacuje CD-spektra o novou prostorovou informaci.

$$R = \text{Im}(\vec{\mu} \vec{m}) \quad (3.3)$$

ΔA je tedy nenulová pouze v případě nenulovosti rotační síly. Pro rotační sílu všech elektronových přechodů i v molekule tedy platí podmínka:

$$\sum_i R^{(i)} = 0 \quad (3.4)$$

Achirální molekuly mají vždy μ nebo m na sebe kolmé či m nulové, a proto nevykazují signál CD. V chirální molekule naopak složky μ i m jsou paralelní. Experimentálně se rotační síla určuje jako plocha pod příslušným Cottonovým

efektem. Cottonovým efektem se označuje strmý přechod optické otáčivosti v závislosti na vlnové délce a pokračováním této křivky v poli s opačným znaménkem rotace. Pokud směrem ke krátkovlnné oblasti křivka nejprve stoupá anebo klesá, rozeznáváme pozitivní respektive negativní Cottonův efekt.

3.3.2. CD jednotky a spektra

V CD spektroskopii se používá několik různých jednotek, proto připojuji tento odstavec vysvětlující jejich původ a vzájemné vztahy. Rozdíl molárních absorpčních koeficientů ϵ pro vzorek o známé koncentraci se nazývá cirkulární dichroismus a udává se v jednotkách $[\text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}]$.

$$\Delta\epsilon = \epsilon_L - \epsilon_R \quad (3.5)$$

Při neznámé čistotě vzorku nebo jeho molekulové hmotnosti se vyjadřují CD spektra pomocí rozdílové absorbance levotočivě a pravotočivě polarizovaného světla.

$$\Delta A = A_L - A_R \quad (3.6)$$

V teoretických pracích nebo při neznámé koncentraci vzorku je vhodné tzv. g-číslo odpovídající poměru mezi cirkulárně dichroickou částí $\Delta\epsilon$ a izotropní ϵ .

$$g = \frac{\Delta\epsilon}{\epsilon} \quad (3.7)$$

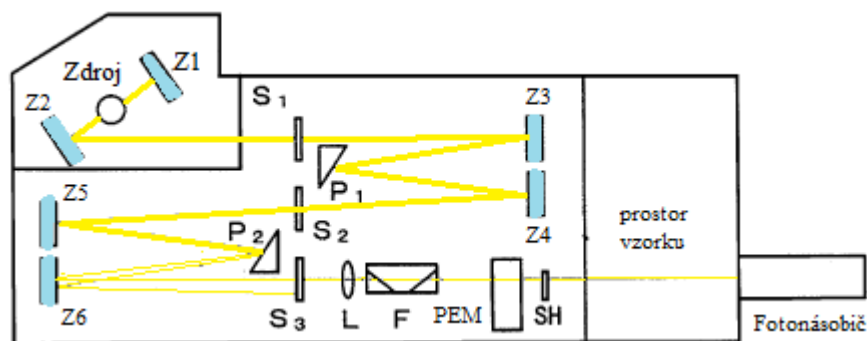
Tyto molekulární vlastnosti se převádějí na jednotky popisující pozorovanou změnu polarizačních parametrů. Užívá se veličina zvaná elipticita ψ , jejíž jednotkou v SI je [rad], jelikož jak je popsáno výše odpovídá úhlu stočení polarizační roviny a pro prezentaci CD spekter proteinů je obvykle užívána Molární elipticita $[\Theta]$ s rozměrem $\text{rad} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{mol}^{-1}$. K převodu mezi jednotlivými veličinami slouží vztahy (3.8) a (3.9):

$$\psi = \frac{180 \ln 10}{\pi \cdot 4} = 32,98 \Delta A \quad (3.8)$$

$$[\Theta] = \frac{18000 \ln 10}{\pi \cdot 4} = 3298,2 \Delta\epsilon \quad (3.9)$$

3.3.2. Experimentální uspořádání

Spektra ECD byla měřena na CD spektrometru *J-815* (Jasco Analytical Instruments). Jako zdroj UV záření byla použita vzduchem chlazená 150W xenonová lampa, přičemž měření mohou být prováděna v rozsahu vlnových délek 180–800 nm. Jak vzorkový tak přístrojový prostor byl profukován dusíkem, aby došlo k odstranění kyslíku, který by při kontaktu s ultrafialovým zářením produkoval ozón, jež poškozují optiku přístroje. Dalším, a pro měření stejně podstatným důvodem, je absorpce UV záření kyslíkem.



Obrázek 3.5. – Schéma uspořádání CD spektrometru pro model Jasco *J-810*. Světlo ze zdroje prochází skrze krystaly P1 a P2 a sérii zrcadel Z a štěrbin S a dělí se na mimořádný paprsek, který je pohlcen černou destičkou a řádný paprsek jež je fokusován a pak prochází PEM a vzorkem dle obr. 3.2 (dle Kelly *et al.*, 2005).

CD spektrometr (obr. 3.5), stejně jako standardní absorpční spektrometr, má monochromátor, který pomocí mřížky vymezuje vlnovou délku užitého světla. Nutné je přitom zvážit poměr signál/šum, který roste se šířkou svazku, s níž naopak klesá rozlišení. V případě CD spektrometru se však používá polarizační monochromátor, kde se původně nepolarizované světlo lineárně polarizuje. Transformaci lineárně polarizovaného světla v levo- a pravotočivě kruhově polarizovanou komponentu zajišťuje fotoelastický modulátor (PEM). Jedná se o blok taveného křemene umístěný v piezoelektrické objímce, na kterou je přiváděn periodický napěťový signál. Změny objemu následně vyvolávají pravidelné změny indexu lomu v optické ose křemene. Díky tomu se polarizace monochromatické vlny periodicky mění z levo- na pravotočivě kruhově polarizované světlo. Obě komponenty dále vstupují do vzorkového prostoru, kde ve vzorku dochází k rozdílné absorpenci různě polarizovaných svazků a vzniku cirkulárního dichroismu. Vzorek je přitom umístěn v křemenné kyvetě (v našem případě o optické dráze 0,1 cm (Hellma)). Vystupující světelný svazek je detekován pomocí fotonásobiče.

3.3.3. Zpracování spekter

Spektra byla zpracována pomocí softwaru přístroje standardním způsobem (odečtení pozadí, přepočet). Pro výpočet procentuálního zastoupení sekundárních struktur bylo využito programu DICHROWEB (Whitemore & Wallace, 2004).

3.4. Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie (IR) stejně jako spektroskopie Ramanova rozptylu studuje vibrační přechody látek. Klasické použití IR spektroskopie je v infračervené spektrální oblasti $200\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ používané např. k chemické charakterizaci látek, neboť v této spektrální oblasti jednotlivé funkční skupiny mají charakteristické vibrace. (V daleké oblasti IR $10\text{--}200\text{ cm}^{-1}$ lze studovat např. rotační strukturu molekul nebo vibrace molekul obsahující kovy.) Standardně se používají různé typy technik:

a) *Transmisní* – přímé měření absorpčních spekter s minimálním vlivem způsobu přípravy vzorku na kvalitu spektra.

b) *Reflexní* – 1) *Metoda zeslabené totální reflexe* (ATR – attenuated total reflectance): vhodná pro silně absorbující vzorky. Principem je totální vnitřní reflexe infračerveného záření po průchodu hranolem s velkým indexem lomu. Na rozhraní vzorku a hranolu vzniká evanescentní vlna, která penetruje do vzorku, kde dochází k její absorpci.

2) *Metoda difúzní reflexe* (DRIFTS – diffuse reflectance infrared Fourier Transform spectroscopy) je ideální pro práškové a pevné vzorky a

3) *Spekulární reflexe*, která je vhodná pro povrchy, nátěry, gumy, polymerní vrstvy a polovodiče.

V současné době se ke studiu IR spekter používají téměř výhradně spektrometry s Fourierovou transformací, které výrazně urychlily experiment, ale také ve srovnání s disperzními spektrometry používanými dříve mají vyšší citlivost. Právě jejich rychlost a citlivost umožnila vývoj nových technik. FTIR je také často kombinována s dalšími spektroskopickými technikami (např. CD pro studium např. konformace biomolekul), nebo jinými analytickými metodami (kapalná a plynná chromatografie, NMR, MS), či mikroskopickými metodami k poskytnutí komplexního pohledu na zkoumaný vzorek. Umožňuje rovněž sledovat dynamické změny vzorku např. chemické reakce.

3.4.1. Teorie vibrační spektroskopie

Infračervená spektroskopie studuje absorpci elektromagnetického záření vzorkem. Absorpce v tomto spektrálním oboru změni vibrační stav molekuly, což lze si představit jako periodické změny mezijaderných vzdáleností. Ve zjednodušeném případě se můžeme na biatomickou molekulu dívat jako na harmonický oscilátor. Pro harmonický oscilátor v kvantově mechanickém popisu vychází diskrétní spektrum energetických hladin (vypracováno dle Griffiths & de Haseth, 2007):

$$E_{\text{vib}} = hv \left(n + \frac{1}{2} \right) \quad (3.10)$$

Kde n je energetické kvantové číslo a v frekvence vibrací oscilátoru. Z výběrových pravidel vychází možnost přechodů pouze $\Delta n = 1$. Reálná molekula, ale projevuje jistou aharmonicitou, a tudíž jsou povoleny i vyšší harmonické přechody. Dvouatomová molekula vykonává i rotační pohyb, kterému při aproximaci tuhým rotátorem odpovídá energie:

$$E_{\text{rot}} = \frac{L^2}{2I} \quad (3.11)$$

Kde L je moment hybnosti molekuly a I je momentem setrvačnosti molekuly. Pro danou atomovou molekulu platí:

$$I = \mu r_0^2 \quad (3.12a)$$

$$L = \hbar \sqrt{J(J+1)} \quad (3.12b)$$

J je vedlejší kvantové číslo a r_0 poloměr molekuly. Pro celkovou energii platí vztah:

$$E_{\text{vib+rot}} = hv \left(n + \frac{1}{2} \right) + hBJ(J + 1) \quad (3.13)$$

Konstana B se nazývá rotační konstantou a lze ji vyjádřit ze vztahu (3.11) a (3.12). Anharmonicitá molekuly narušuje ekvidistantnost jednotlivých energetických hladin a pro rotující molekulu se vlivem odstředivé síly mění poloměr r_0 , proto je nutné zahrnout koeficienty aharmonicity. Obsazení jednotlivých hladin je v rovnovážné teplotě dáno Boltzmanovým rozdělením. Zatímco vibrace jsou většinou v základním stavu, jsou rotační stavy většinou ve vyšších hladinách.

Pro víceatomovou molekulu existuje $3N-6$ vibračních stupňů volnosti (pro lineární molekulu $3N-5$). Kdy vibrace se rozumí změna jedné vnitřní délky vazby anebo úhlu vazeb. Opět lze použít modelu harmonických oscilátorů reprezentující jednotlivé vibrace, kterým připisujeme jednotlivé normální souřadnice q_i . Nelze je však zcela ztotožnit s reálnými vnitřními souřadnicemi dané molekuly. Každou souřadnici q_i můžeme vyjádřit jako kombinaci reálných vnitřních souřadnic molekuly. Pro frekvenci biatomové molekuly platí:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{\mu}} \quad (3.14)$$

kde k je konstanta tuhosti vazby (silová konstanta) a μ je redukovaná hmotnost:

$$\mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \mu = \frac{m_A m_B}{m_A + m_B} \quad (3.15)$$

Z předchozích vztahů vyplývá, že nejvíce se budou vzájemně ovlivňovat jednotlivé vázané lineární harmonické oscilátory s blízkou hmotností spojených atomů a silovou konstantou vazby. Dalším podstatným prvkem je symetrie molekuly, z níž vyplývá možnost spřažení pouze pro kmity stejných symetrických vlastností. Proto máme-li molekulu, nesoucí charakteristické skupiny značně odlišné hmotností svých atomů, silovými konstantami svých vazeb i symetrii můžeme těmto jednotlivým skupinám připsat charakteristické frekvence vibrací. S ohledem na tuto vlastnost vibračních spekter byl vybudován užitečný empirický model založený na připisování charakteristických frekvencí strukturním skupinám (maximálně kmitajícím právě při dané frekvenci resp. vlnočtu). Nesmíme, ale zapomenout, že se jedná o idealizaci problému a ve skutečnosti jsou i tyto charakteristické skupiny ovlivněny svým okolím (změny elektronové struktury mění sílu vazby). To může vést k posunům až v stovkách cm^{-1} , ale naopak toho lze také využít ke studiu intramolekulárních vazeb. Výsledné spektrum je jedinečné pro danou molekulu a v jistém smyslu se jedná se o její „otisk prstu“. Stejně jako v případě dvouatomové molekuly i pro víceatomové molekuly komplikuje reálnou situaci anharmonicitá vibrací. Jejím důsledkem se objevení ve spektru pásy odpovídající násobným a součtovým frekvencím, kombinačním pásů (mnoho násobně slabších než základní, ale může dojít k tzv. Fermiho rezonanci, tedy štěpení pásů bez opodstatnění ze symetrie při shodě základní a kombinační frekvence). Stejně jako v případě vlivu okolí na charakteristické skupiny i tohoto jevu lze využít k analýze.

U každého pásu určíme vlnočty maxima (vlnočty pásu). Struktura pásů je dána překryvem pásů od jednotlivých vibrací. Měříme-li absorpci záření ve vzorku

v závislosti na jeho dráze z ve vzorku. Zjišťujeme, že pokles intenzity je úměrný intenzitě v daném místě:

$$\frac{dI}{dz} = -aI \quad (3.16)$$

Tedy pro intenzitu záření může psát:

$$I(z) = I(0)\exp(-az) \quad (3.17)$$

Konstanta a odpovídá absorpčnímu koeficientu a závisí na tloušťce vzorku l a koncentraci vzorku c podle Lambert-Bérova zákona:

$$A = c\epsilon l \quad (3.18)$$

Konstanta ϵ se nazývá molární absorpční koeficient.

3.4.2. Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací

Spektrometr využívá počítačové analýzy signálu vznikajícího v interferometru. Při průchodu monochromatické vlny vzniká díky pohybu jednoho ze zrcadel interferometru a vzájemné interferenci koherentních vln vzniklých na děliči záření, majících rozdílnou dráhu, interferenční vlna. Zahrneme-li charakteristické vlastnosti zářiče (zářivý tok), děliče paprsků i detektoru do veličiny $B(\nu)$, a označíme-li dráhový rozdíl paprsků δ , můžeme intenzitu vystupující vlny vyjádřit:

$$I(\delta) = B(\nu) \cos(2\pi\delta\nu) \quad (3.19)$$

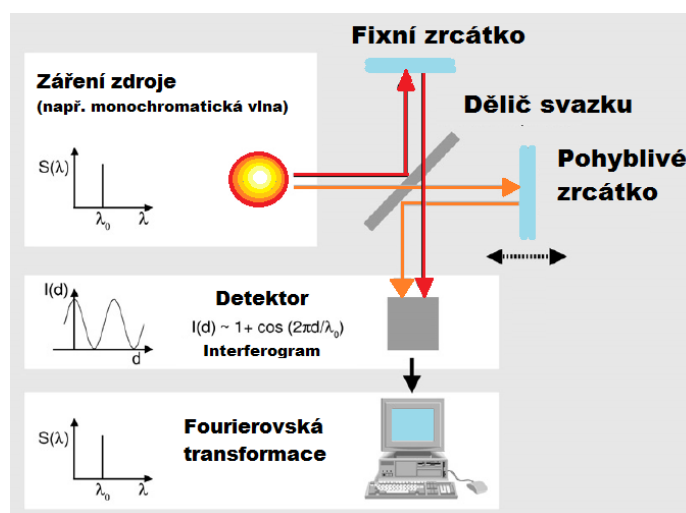
Použijeme-li záření polychromatického s nekoherentními vlnami jednotlivých frekvencí (aby docházelo k interferenci jen pro danou frekvenci), což dobře splňuje záření tepelného zdroje, můžeme celkovou intenzitu výstupního signálu psát:

$$I(\delta) = \int_0^{+\infty} B(\nu) \cos(2\pi\delta\nu) d\nu \quad (3.20)$$

Funkci $I(\delta)$ nazýváme interferogramem. Vidíme, že měřený interferogram je právě Fourierovou transformací funkce $B(\nu)$. Proto užitím zpětné transformace dostáváme:

$$B(\nu) = \int_0^{+\infty} I(\delta) \cos(2\pi\delta\nu) d\delta \quad (3.21)$$

Tento základní princip FTIR-spektroskopie je schematicky prezentován na obr. 3.6.



Obrázek. 3. 6. – Princip infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací, (upraveno dle Barth, 2007)

Tento případ je ale ideální a v praktické aplikaci nenastává. Vždy měříme závislost $I(\delta)$ pouze v určitém omezeném intervalu pohybu zrcátka pro $\delta \in [0, 2L]$, kde L je vzdálenost krajních poloh zrcátka. To vede ke vzniku značných postranních maxim a narušení Fourierova obrazu. Proto byly vyvinuty metody, jak tuto komplikaci odstranit. K tomu se užívá tzv. apozidace, tedy vynásobení interferogramu apozidační funkcí $A(\delta)$ (která monotónně klesá na krajích a odstraňuje tak vedlejší maxima. Užívá se mnoho typů apozidačních funkcí. Další komplikací je velikost vstupní apertury, transformující kulové vlny zdroje na rovinné vlny. Pro záření mimo optickou osu je kvůli nenulovému úhlu ϑ s optickou osou dráhový rozdíl tohoto záření δ_s je menší než pro záření ve směru osy. To výrazně omezuje rozlišení spektroskopu, jelikož nemá smysl zaznamenávat větší dráhové rozdíly než ty, pro které příspěvky vln z okrajů apertury budou opačné příspěvku záření z centra. Přístrojovou funkci $B(\nu)$ učijeme pomocí transformace ideálního interferogramu spočteného na základě zahrnutí příspěvků z jednotlivých částí zdroje.

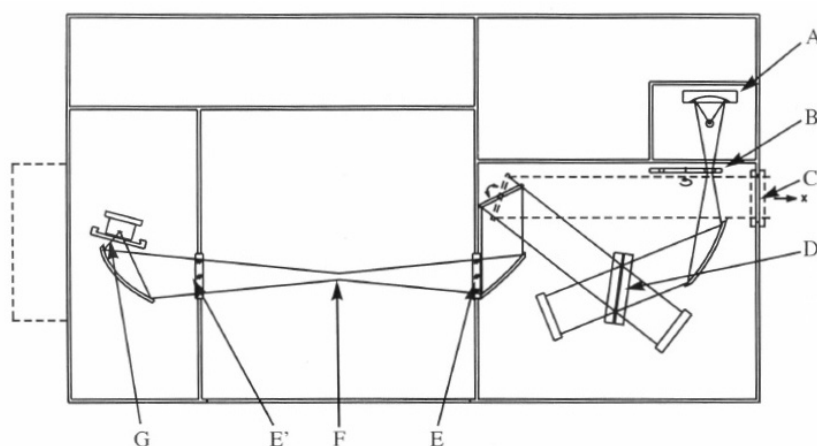
Z důvodu nepřesnosti určení nulového dráhového rozdílu, neekvivalentnosti pohybu zrcátka oběma směry, či fázovému posunu v detektoru a zesilovači, nebývá interferogram symetrický. Pak nelze použít pouze cosinovou část Fourierovy transformace a FTIR-spektrometry tedy měří i část interferogramu $\delta < 0$ a používají komplexní tvar transformace. Část interferogramu symetrická v oboru δ je počítačem užita k vypočtení fázové korekce. Pomocí které je opraven naměřený interferogram a poté Fourierovsky transformován a nebo opraven až Fourierův obraz celého spektra.

Kromě těchto komplikací má FTIR řadu výhod První je tzv. výhoda světelnosti neboli *Jacquinetova*, FTIR spektrometry totiž propouštějí velká kvanta energie při vysokém rozlišení. Je to způsobeno kruhovou symetrií optického svazku, který není třeba omezovat úzkou šterbinou, které je úměrná energie dopadající na detektor. Vynikající vlastností FTIR spektrometrů je měření celého spektra v průběhu jedné periody pohybu zrcadla interferometru, zatímco u disperzních spektrometrů jsou různé vlnové délky proměřovány postupně. Tato výhoda se nazývá *Multiplexová (Felgettova)* a umožňuje měření časového vývoje systému a společně s *Jacquinetovou výhodou* podstatně zvyšuje poměr signál/šum (hlavně u detektoru, jejichž šum nezávisí na detekovaném signálu). Pro měření je podstatná i možnost jednoduché a stálé kalibrace, ke které postačuje laserový paprsek procházející interferometrem a snímáný diodou, který pak při znalosti vlnové délky záření přesně určuje polohu pohybujícího zrcátka. Tato výhoda se nazývá *výhoda jednoduché kalibrace (Connesové)*.

3.4.2. Experimentální uspořádání

Transmisní měření infračervených spekter bylo prováděno na FTIR spektrometru *Vektor 33* (Bruker), viz obr. 3.7. Jádrem přístroje je interferometr (jde o variaci klasického Michelsonův interferometru, kde je jedno statické a jedno pohyblivé zrcadlo s děličem svazku pod úhlem 45°). V našem přístroji bylo užito robustního systému *Rocksolid™*, který zahrnuje dvě pohyblivá zrcadla zabudovaná v jedné

kolíbce a dělič svazku pod menším úhlem. Výhodou je potlačení polarizačních efektů a posílení propustnosti. Určujícím pro dráhový rozdíl svazků je podobně jako v klasickém interferometru typ použitého laseru, respektive jeho vlnová délka. Námí užitá přístroj obsahoval He-Ne laser (638 nm/1 mW). Zdrojem infračerveného záření byl globar (tj. tyčinka SiC) žhavený na vzduchu k teplotě kolem 1000 °C. Paprsek následně procházel aperturou (nastavenou na 1,4 mm) a vstupoval do výše zmíněného interferometru, kde bylo jako děliče užito KBr s vrstvou germania. Následně paprsek procházel vzorkovým prostorem a dopadal na pyroelektrický detektor MCT (mercury-cadmium tellurid). Měření na průchod bylo prováděno v CaF₂ kyvetě s optickou dráhou 8 μm plněné 0,8 μl vzorku. Spektra byla snímána pomocí softwaru Opus (Broker) 5000× v rozsahu 600–4000 cm⁻¹, byla provedena fázová korekce podle Mertze a apodizace Blackmann-Harrisova 3-term.



Obrázek 3.7. – Schéma FTIR spektrometru Vektor 33 (A – zdroj záření, B – karusel s aperturami, C – okénko pro vstup externího svazku, D – dělič svazku záření, E, E' – okénka vzorkového prostoru, F – ohnisko, kde je umístěn držák vzorku, G – detektor (upraveno dle manuálu k spektrometru Vektor 33)

Pro měření ATR modu byl užit ATR nástavec ATR-MIRacle™ (Pike Technologies) s jednodrazovým diamantovým hranolem v horizontálním uspořádání. Principem ATR je absorpce evanescentní vlny vzniklé při totálním odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (ATR hranolu) o indexu lomu n_1 s prostředím opticky řidším (vzorek) s indexem lomu n_2 . (upraveno podle Griffiths & de Haseth, 2007), proto musí být splněna podmínka totálního odrazu vycházející z modifikovaného Snellova zákona:

$$\sin\theta_m = \frac{n_2}{n_1} \quad (3.22)$$

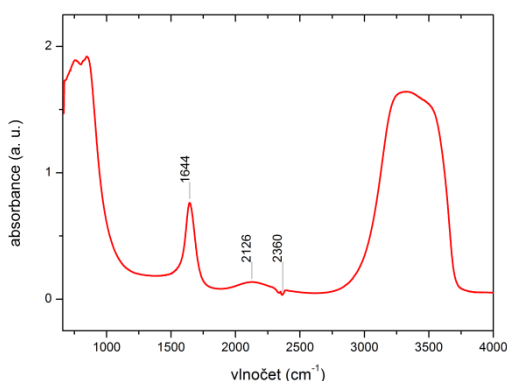
Kde úhel θ_m se nazývá mezní úhel. Proto je ATR hranol vyráběn z materiálu o vysokém indexu lomu (obvykle více jak 2,2). Na rozhraní vzniká evanescentní vlna, což je tlumená nehomogenní vlna, která proniká do vzorku, kde se zčásti odrazí zpět k hranolu a zčásti je absorbována vzorkem. Absorpce se projeví snížením intenzity odražené vlny (proto zeslabená totální reflexe). Evanescentní vlna při šíření ve vzorku exponenciálně klesá její penetrační schopnost je udávána pomocí hloubky průniku d_p :

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - \left(\frac{n_2}{n_1}\right)^2}} \quad (3.23)$$

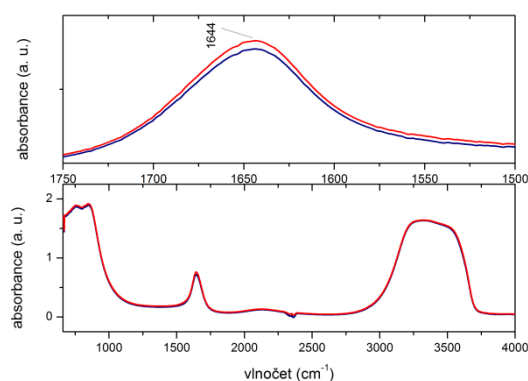
Velikost λ je vlnová délka a θ je úhel dopadu. Hloubka průniku dosahuje řádově několika mikrometrů (0,2–0,6 μm (Taulian, 2003)) a tedy ATR nezávisí na tloušťce vzorku, jelikož tato vzdálenost přesahuje rozměry sledovaných látek a jak bylo zmíněno, může být použita i pro silně absorbující látky. Absorpce vody je při ATR-FTIR také značně zredukována, což umožňuje lepší interpretaci spekter. Ze vztahu (3.23) plyne závislost hloubky průniku, na vlnové délce dopadajícího záření. To způsobuje, že relativní intenzity pásů v ATR spektru klesají se vzrůstajícím vlnočtem ve srovnání s transmisním spektrem téhož vzorku. Má-li být tedy spektrum ATR srovnáváno se spektrem propustnosti, je nutné provést tzv. ATR-korekci vůči vlnové délce. Komerční FTIR spektrometry jsou dnes, ale již běžně vybaveny programy umožňujícími tuto matematickou korekci provést automaticky. Stejně tak tomu bylo v našem případě.

3.4.3. Zpracování spekter

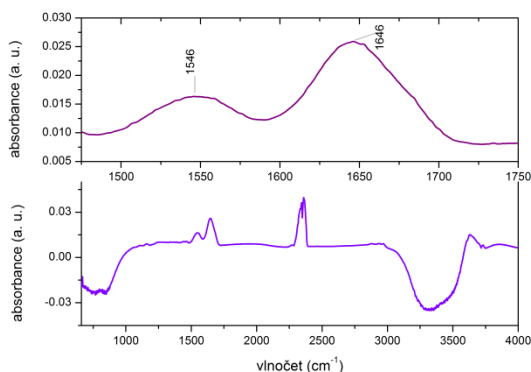
IR-spektra biologických vzorků bývají značně komplikovaná a sousední pásy se často překrývají, proto musí být spektra podrobně zpracována. Spektra byla upravena v programu *Grams* (Thermo Galactic). Na původním spektru lze identifikovat široký pás vody ($\sim 3400 \text{ cm}^{-1}$) a pás absorpce CO_2 ($\sim 2364 \text{ cm}^{-1}$) (viz obr. 3.8). Další absorpční pás vody překrývá pás amidu I (viz obr. 3.9, pás na 1644 cm^{-1}), a proto je nutno jej odečíst. K tomu byl použit široký pás vody ($\sim 2160 \text{ cm}^{-1}$) a aplikován postup dle Dousseau *et al.*, 1989. Spektrum vody tedy bylo odečteno pro oblast $2250\text{--}1750 \text{ cm}^{-1}$ za použití polynomiální funkce druhého řádu pomocí metody nejmenších čtverců. Vhodnost dané oblasti je dána tím, že se v ní nevyskytují prakticky žádné vibrace biomolekul, zejména proteinů. Po odečtení spektra vody (obr. 3.9) se odkryje v rozdílovém spektru již vlastní pás odpovídající amidu I ($\sim 1646 \text{ cm}^{-1}$). Pro získání hladší křivky je následně odečteno spektrum vodních par (obr. 3.10 a 3.11) a spektrum posunuto na nulu pro hodnotu 1750 cm^{-1} a případně normalizováno na pás odpovídající amidu I ($\sim 1644 \text{ cm}^{-1}$). Posledním krokem bylo provedení druhé derivace pro získání lepšího rozlišení spektrálních pásů.



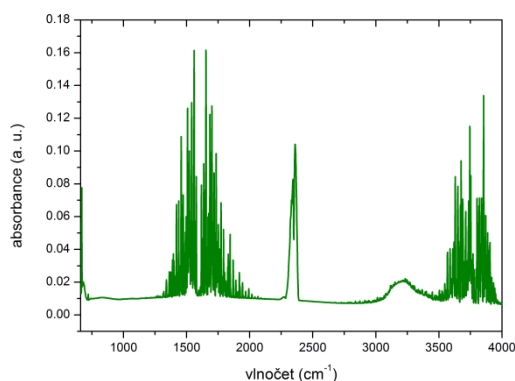
Obrázek 3.8. – Naměřené FTIR spektrum peptidu HAL-1 ve vodě



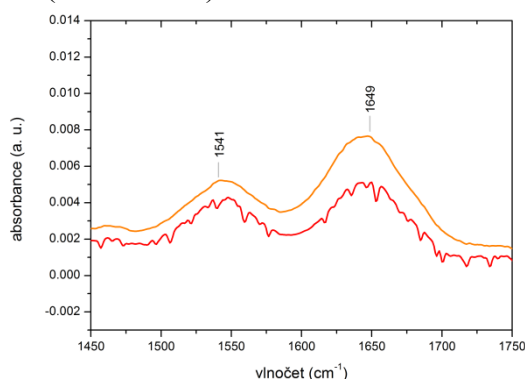
Obrázek 3.9 – Porovnání naměřeného FTIR spektra HAL-1 a spektra vody



Obrázek 3.10. – FTIR spektrum peptidu HAL-1 po odečtu spektra vody se zaměřením na pás amid I ($\sim 1646 \text{ cm}^{-1}$)



Obrázek 3.11. – FTIR spektrum vodních par



Obrázek 3.12. – Porovnání FTIR spekter peptidu HAL-1 po (oranžově) a před odečtením vodních par (červená křivka)

3.5. Faktorová analýza

K vyhodnocení výsledků dynamiky vysychání i vlastní interakce s povrchovou vrstvou byla užita vícerozměrná statistická metoda -faktorová analýza. Jedná se o metodu, jež se zaměřuje na rozbor vzájemných závislostí proměnných určených pomocí jistého menšího počtu neměřitelných veličin označovaných jako *společné faktory*. Faktorová analýza umožní objasnit souvislosti pozorovaných veličin pomocí souboru společných faktorů. Tato metoda vznikla v psychologii a obecně je za jejího zakladatele považován CH. Spearman, který ji použil roku 1904 odvození obecného inteligenčního kvocientu IQ z korelace mezi výsledky různých inteligenčních testů (Hebák 1987).

Faktorovou analýzu lze aplikovat na jakýkoliv soubor dat, u něhož očekáváme vnitřní strukturu na měřená spektra. Další výklad metody uvádíme s ohledem na námi naměřená data. (Následující je upraveno na základě Hebák & Hustopecký 1987 a Kopecký 1998.)

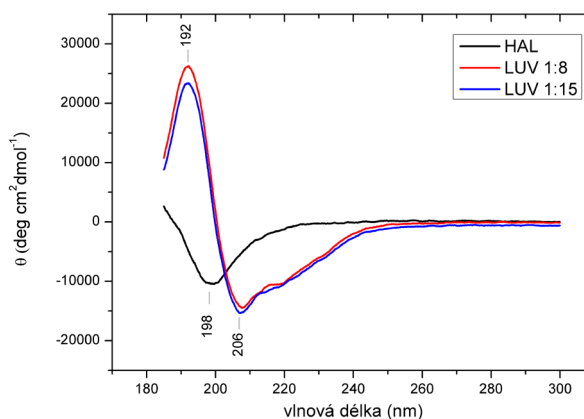
Označme naměřená spektra lišící se dobou od zahájení dynamiky $X_j(\nu)$, $j=1,2,\dots,p$. Ty pak tvoří matici $p \times n$, přičemž n je závislé na frekvenci ν . Zavedeme dále společná subspektra $S_i(\nu)$, $i=1,2,\dots,m$, kde $m < p$. Dále předpokládejme existenci dalších tzv. specifických faktorů ε_j , které jsou nezávislé na společných subspektrech

4. Měření interakce peptidu HAL-1 s membránou

4.1. Referenční měření strukturního chování peptidu

Nejprve jsme se zaměřili na detailní popis změny struktury peptidu HAL-1 při interakci s modelovou membránou. Měřili jsme CD, FTIR a ATR-FTIR spektra pro peptid ve vodě, v 16 mM SDS a v připravených lipozomech. Tato měření nám měla umožnit snadnější interpretaci spekter změřených na orientované dvojvrstvě a sloužit jako reference.

Nejprve jsme měřili spektroskopii CD, jelikož je tato metoda standardní pro určování zastoupení sekundárních struktur u proteinů (viz kapitola 2.1). Spektrum peptidu s vodou (obr. 4.1) vykazovalo silný negativní pás při ~199 nm a slabý pozitivní pás při 256 nm, tedy odpovídalo spektru neuspořádané struktury (viz kapitola 2.1.1). Zastoupení jednotlivých skupin sekundární struktury (viz kapitola 2.1), stanovené pomocí neuronálních sítí (Whitemore & Wallace, 2004), bylo v tomto případě odhadnuto na 41 % antiparalelní a 8 % paralelní β -skládaný list, 16 % β -otočka, 11 % α -šroubovice a 24 % odpovídalo neuspořádané struktuře. Jelikož peptid HAL-1 má pouze 12 aminokyselin je nutné zdůraznit, že jednotlivé typy sekundárních struktur jsou pro něj nepřesně definovány. Vždyť pouze jedna otočka α -šroubovice se skládá zhruba ze 3 aminokyselin a tvoří tedy 40 % sekundární struktury. Jde tedy spíše o hrubý odhad nejvíce zastoupené sekundární struktury. Navíc je třeba poznamenat, že stanovení β -skládaného listu je ve spektroskopii CD zatíženo největší chybou. Proto můžeme nahlížet na strukturu HAL-1 ve vodě jako na neuspořádanou, případně jako na nestabilní β -skládaný list.



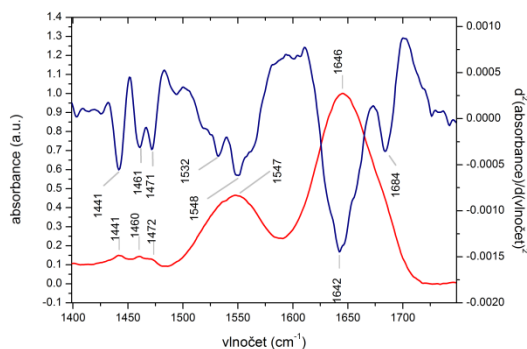
Obrázek 4.1. – Spektra CD peptidu HAL-1 ve vodě (značeno jako HAL) a s přidáním lipozomů (LUV) v poměru 1:8 a 1:15

Spektrum CD peptidu HAL-1 v 16 mM SDS bylo publikováno již dříve (Pazderková *et al.*, 2012), a proto jsme již měření neopakovali. Pro tuto koncentraci byl popsán přechod ka -šroubovici, jejíž zastoupení tvořilo 53% (Pazderková *et al.*, 2012). Spektrum vykazovalo výrazné negativní maximum při ~ 208nm a slabé při 220nm, což odpovídá -šroubovici (viz kapitola 2.1.1). Byl popsán také výskyt polyprolinové II konformace.

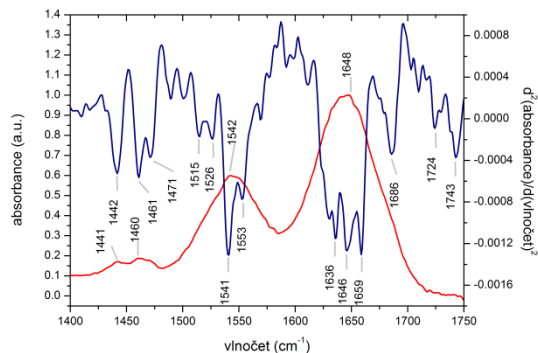
Po přidání lipozomů v koncentračním poměru peptid:lipid 1:8 a 1:15 jsme pozorovali spektra s negativním pásem při 209 nm odpovídající struktuře α -helixu (obr. 4.1), což potvrdil i propočet zastoupení jednotlivých struktur. Pro koncentrační poměr 1:8 odpovídalo α -šroubovici 44%, antiparalelnímu β -skládaný listu 7%, β -otočce 17% a neuspořádané struktuře 26%. Pro koncentrační poměr 1:15 vycházelo zastoupení sekundárních struktur na 43% α -helixu, 7% antiparalelního a 7% paralelního β -skládaného listu, 18% na β -otočku a neuspořádaná struktura zaujímala 25%. Lze tedy s jistotou říci, že jak SDS tak i směs námi použitých lipozomů indukuje u peptidu přechod k α -šroubovici a dále je zřejmé, že jednotlivé koncentrační poměry peptid:lipid příliš nemění výslednou konformaci HAL-1 (viz obr. 4.1.), a proto jsme se dále rozhodli měřit pouze s koncentračním poměrem 1:8.

Když jsme měli nezávislou technikou CD potvrzeno strukturní chování peptidu HAL-1, mohli jsme přikročit k dalším referenčním měřením FTIR a ATR-FTIR spekter peptidu ve vodě, v 16mM SDS a s lipozomy. Porovnáním spektra peptidu HAL-1 ve vodě (obr. 4.2a,b) a SDS (obr. 4.3a,b) lze opravdu odečíst posun pásu amidu I z 1646 cm^{-1} (resp. 1648 cm^{-1} pro ATR-FTIR spektrum) na 1655 cm^{-1} (resp. 1656 cm^{-1} pro ATR-FTIR spektrum), což odpovídá přechodu z neuspořádané struktury, ke struktuře α -šroubovice (viz kapitola 2.2). Vidíme také jednoznačné zúžení původních pásů amidu, což odpovídá přechodu z neuspořádané struktury v uspořádanější. Pro lepší identifikaci jednotlivých pásů jsme spočetli pro jednotlivá spektra druhé derivace, kde negativní minima odpovídají pozitivním maximám z původních spekter. Druhá derivace pro ATR-FTIR spektrum HAL ve vodě je špatně odečitatelná kvůli šumu z vodních par (obr. 4.2a). Naopak druhá derivace FTIR spekter HAL v 16mM SDS (obr. 4.3a) přináší informaci o pásu $\sim 1634\text{ cm}^{-1}$ odpovídajícímu β -struktuře, který ale není identifikovatelný na ATR-FTIR spektru (obr. 4.3b). Také frekvence amidu I v spektrech druhé derivace pro peptid s PC/PG lipozomy (obr. 4.4b) naznačuje pás β -skládaného listu ($\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ resp. pro ATR-FTIR $\sim 1636\text{ cm}^{-1}$) a umožňuje nám také stanovit přesnou hodnotu amidu I ($\sim 1658\text{ cm}^{-1}$ resp. pro ATR-FTIR $\sim 1653\text{ cm}^{-1}$), které jsou ve shodě se spektry v SDS a tedy odpovídají také přechodu v α -šroubovici. Spektra peptidu s lipidem také obsahují pásy $\sim 1730\text{ cm}^{-1}$ odpovídající karbonylové skupině a $\sim 1467\text{ cm}^{-1}$ pro CH_2 vibrace.

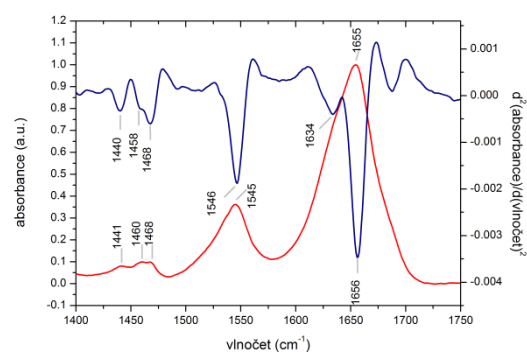
Referenční měření nám dala konkrétní představu o chování peptidu v jednotlivých prostředích. Očekávané chování peptidu s lipozomy PC/PG, v poměru 1:4, bylo klíčové pro možnou následující interpretaci spekter na orientované dvojvrstvě, včetně možnosti měření s polarizovaným zářením.



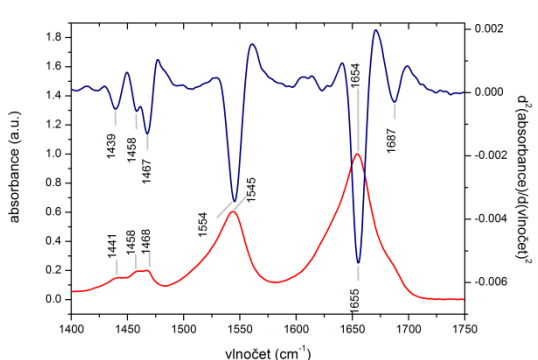
Obrázek 4.2a – FTIR spektrum peptidu HAL-1 ve vodě (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 17 bodů



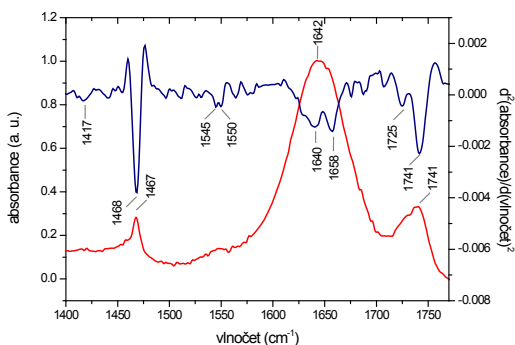
Obrázek 4.2a – ATR-FTIR spektrum peptidu HAL-1 ve vodě (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 21 bodů



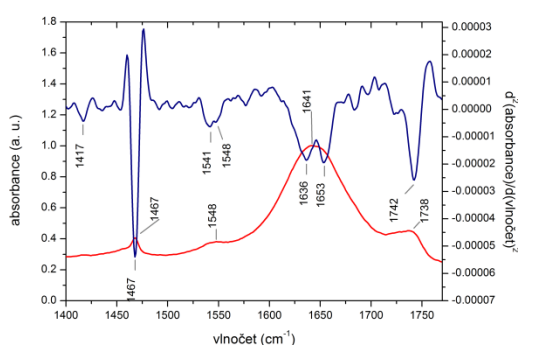
Obrázek 4.3a – FTIR spektrum HAL-1 v 16 mM SDS (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 17 bodů



Obrázek 4.3b – ATR-FTIR spektrum HAL-1 v 16 mM SDS (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 17 bodů



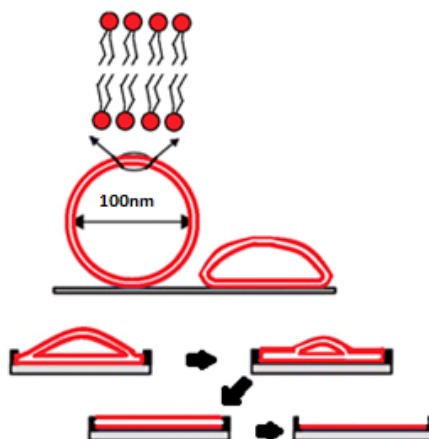
Obrázek 4.4a – FTIR spektrum HAL-1 s lipozomy PC/PG v koncentračním poměru 1:8 (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 17 bodů



Obrázek 4.4b – FTIR spektrum HAL-1 s lipozomy PC/PG v koncentračním poměru 1:8 (červená křivka) a jeho druhá derivace (modrá křivka) s vyhlazením přes 17 bodů

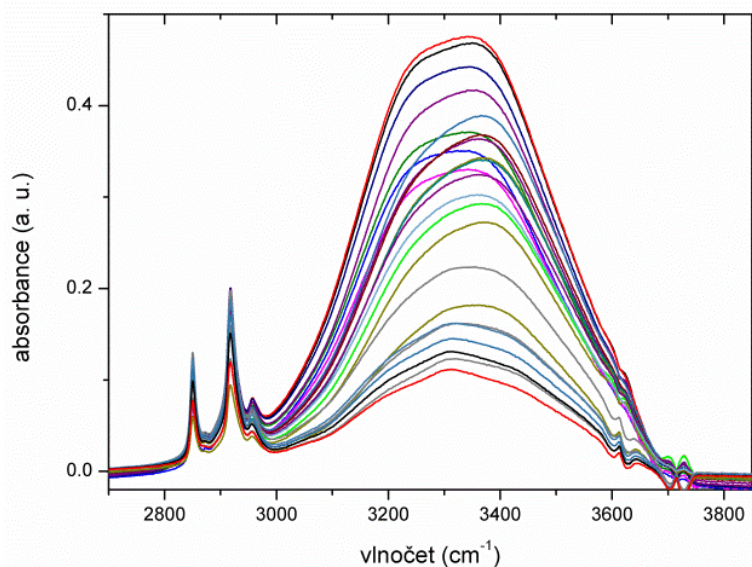
4.2. Dynamika vysychání lipidové membrány

Cílem měření bylo simulovat buněčnou membránu pomocí orientované vrstvy vzniklé vyschnutím roztoku lipozomů na povrchu diamantu ATR soupravy a pozorovat změny ATR-FTIR spekter po přidání roztoku proteinu. Daný model je samozřejmě hrubou aproximací skutečnosti, jelikož vyschlá vrstva lipozomů nevytvoří přesnou dvojvrstvu. Nicméně podobnou metodu nezávisle na našich měřeních popsal Litwinczuk *et al.*, 2012, kde byly použity SUV (viz obr. 4.5) a tvorba dvojvrstvy byla již dříve podrobně popsána pomocí AFM. Přičemž bylo popsáno vysychání vezikul od krajů do středu. Následně se vzniklé dva listy lipidové dvojvrstvy naléhající na sebe, buď pomocí sklouznutí, nebo rolování, odlučují a vzniká dvojvrstva (Jass *et al.*, 2000). V našem případě se ale s největší pravděpodobností vytváří více dvojvrstev nad sebou. Podstatné však je, že takto získáme orientovanou lipidovou vrstvu, která může sloužit pro další polarizovaná ATR-FTIR měření, při kterých by bylo možno precizně zkoumat orientaci peptidu HAL-1 vůči modelové membráně.



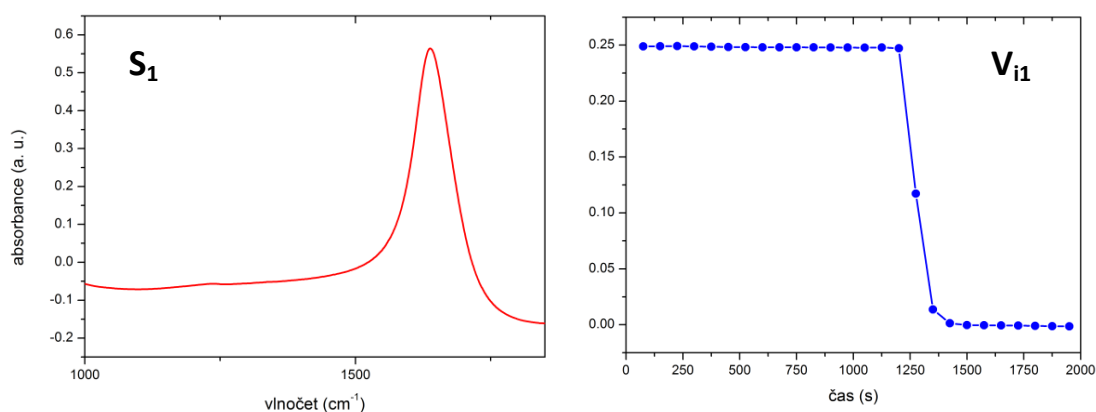
Obrázek 4.5. – Předpokládaný mechanismus vysychání LUV na povrchu ATR hranolu (upraveno dle Litwinczuk *et al.*, 2012)

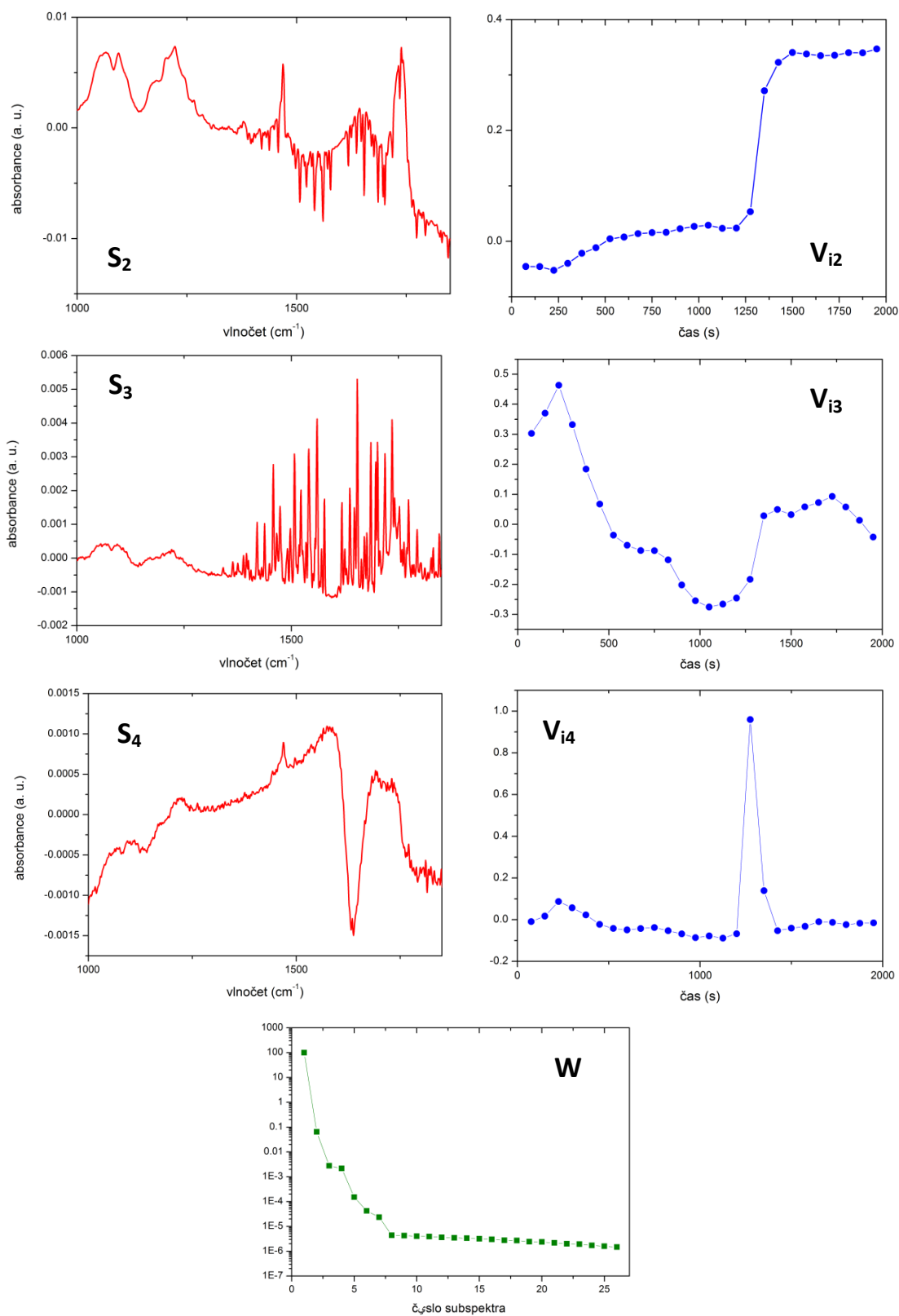
Prvním úkolem bylo zjistit dobu vysychání lipidu a reprodukovatelně celý proces popsat. K tomuto účelu jsme využili opakovaného měření vzorku sériemi o 120 skenech, které trvaly 1 minutu + 15 sekund mrtvý chod daný zpracováním spektra počítačem. K sledování vysychání a kvalitativnímu srovnání při jednotlivých měření jsme využili absorpční pásy vody (3400 cm^{-1} a $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$), viz obrázek 4.6, které by se měly podle Lambert-Beerova zákona (viz rovnice 3.18) s poklesem koncentrace vody ve vzorku úměrně zmenšovat a lipidu (viz kapitola 2.2), jejichž intenzita by měla relativně narůstat. Na oblasti mezi $930\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$ a $2700\text{--}3850\text{ cm}^{-1}$ byla tudíž aplikována faktorová analýza (viz kapitola 3.5). Tyto oblasti byly výhodné, protože obsahují všechny významné pásy proteinu i lipidu a zároveň nám umožnili se vyhnout parazitnímu signálu CO_2 , jehož obsah ve spektru v průběhu měření fluktoval.



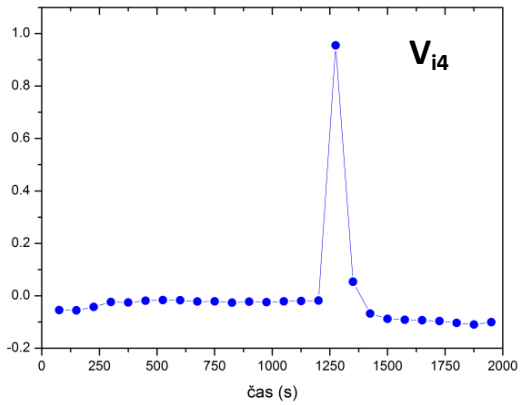
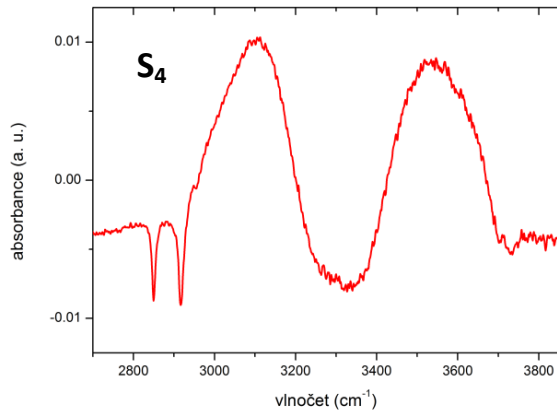
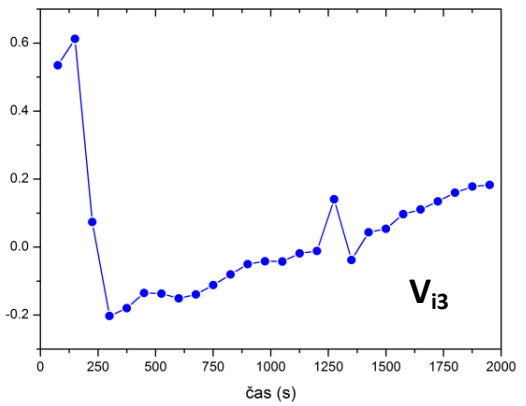
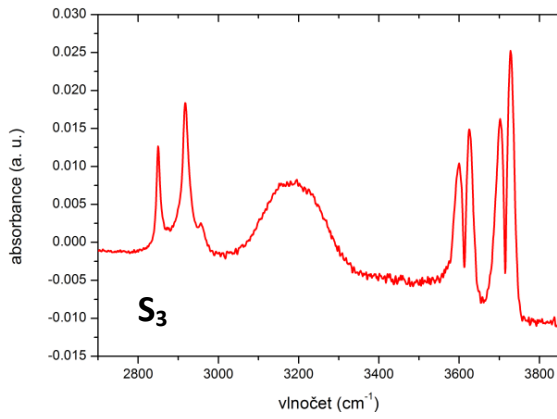
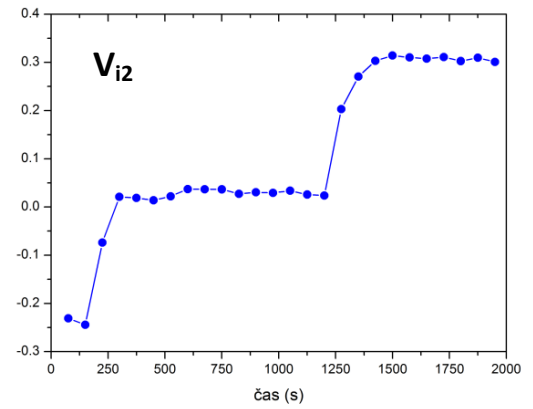
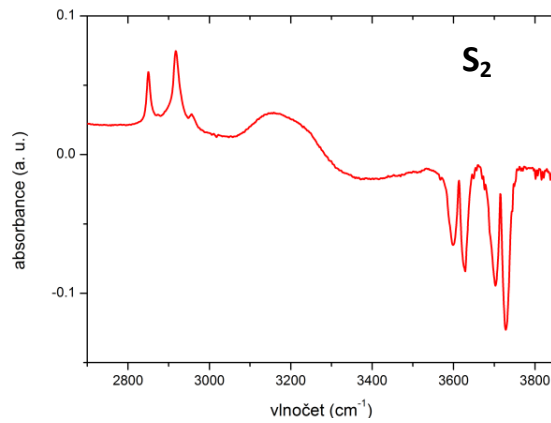
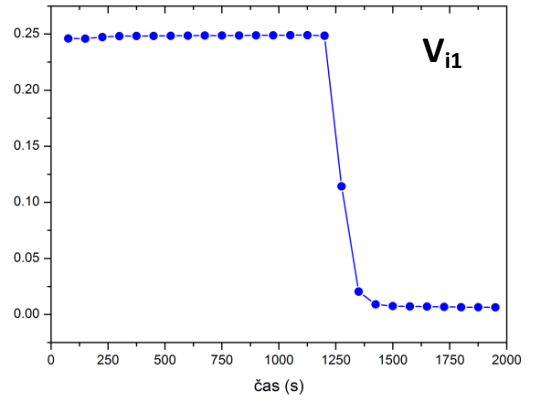
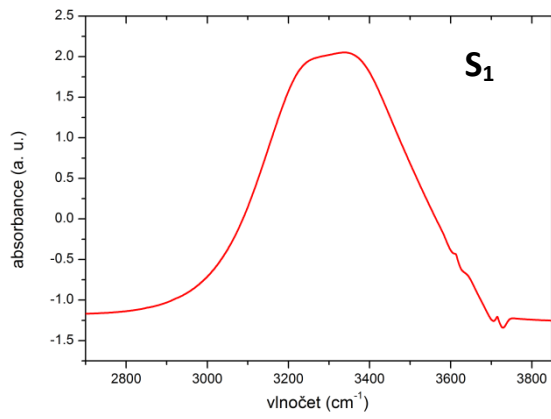
Obrázek 4.6. – Dynamika po přidání 2 μl peptidu HAL-1 na $10\times$ ředěné lipidové dvojvrstvě. Na spektru znatelný pokles pásu vody a nárůst vibrací lipidů.

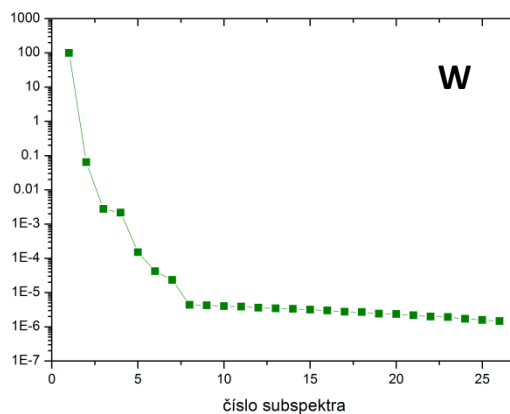
Nejprve jsme sledovali dynamiku vysychání destilované vody (obr. 4.7), abychom ověřili reprodukovatelnost měření. Z faktorové analýzy spekter vyplívá rychlý pokles intenzity spektra vody (subspektrum S_1 s pásem $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ a pásu $\sim 3400\text{ cm}^{-1}$) po 17 minutách a naprosté vyschnutí po 24 minutách. Pozorujeme také nárůst subspektra S_2 připadajícího nejspíše na signál lipidových nečistot, jehož dynamika je právě opačná. Třetí subspektrum odpovídá vodním páram a jeho dynamika je značně nepravidelná. Naopak čtvrté subspektrum jež se výrazněji projevuje jen v momentu poklesu subspektra vody svým negativním vrcholem o $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ resp. 3300 cm^{-1} odpovídá nejspíše vodě vázané na dané nečistoty a uvolněné v průběhu dvou skenů (tj. 2,5 minuty) monitorujících vyschnutí. Jak vyplívá z obrázku 4.7a a 4.7b je více vlastních čísel W pro dané dynamiky signifikantních než pouze první čtyři, ale jim příslušející subspektra nebyla spektroskopicky význačná a jednalo se převážně o variaci pozadí a vodních par, a tak pro všechny následující dynamiky vynášíme pouze spektroskopicky podstatná subspektra a jím odpovídající faktory.





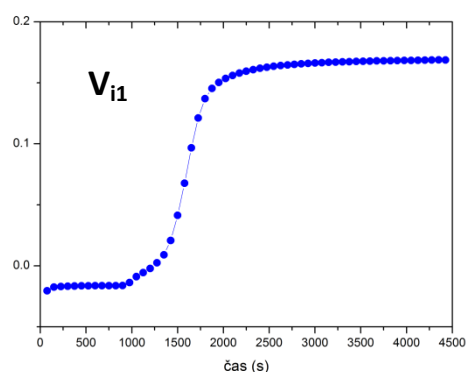
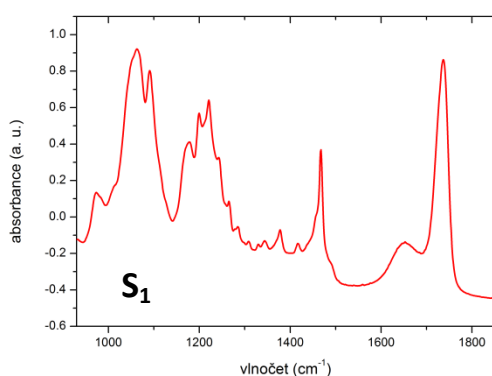
Obrázek 4.7a – Faktorová analýza spekter vysychání vody pro spektrální oblast 1000–1850 cm⁻¹. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

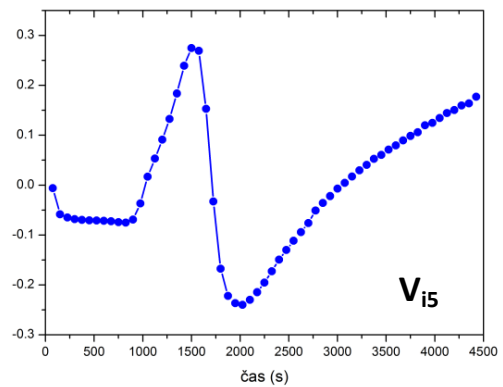
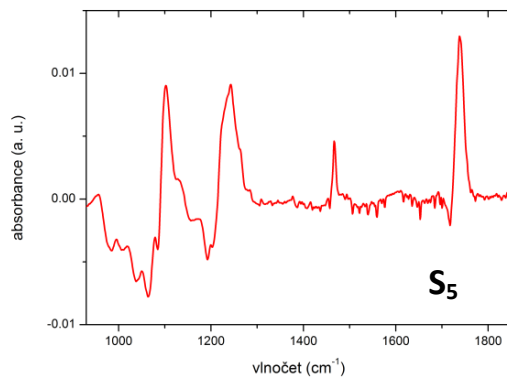
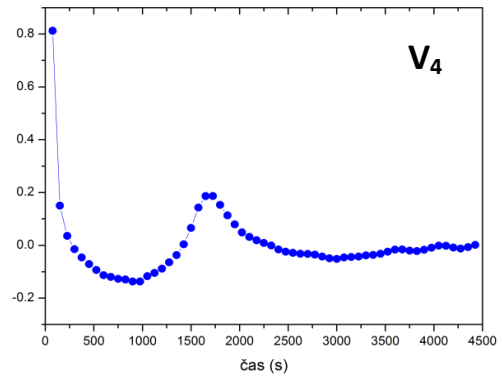
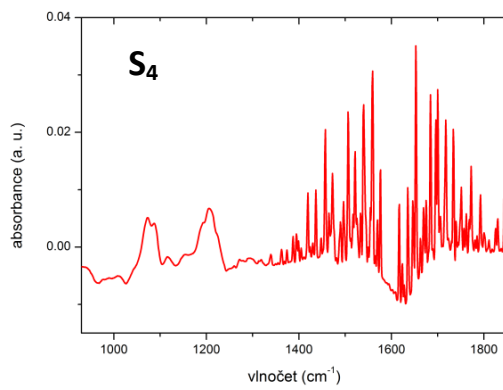
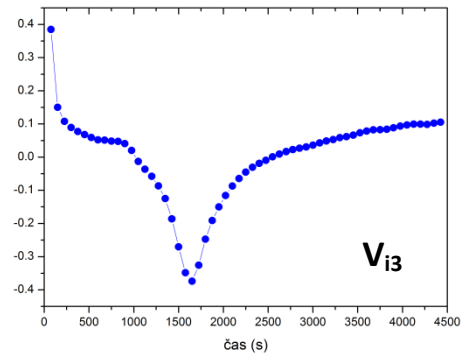
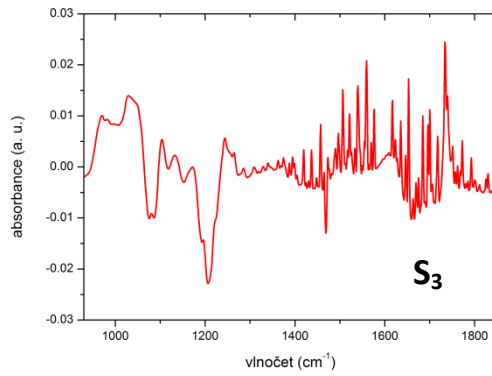
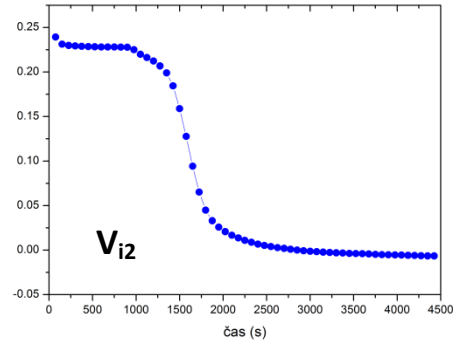
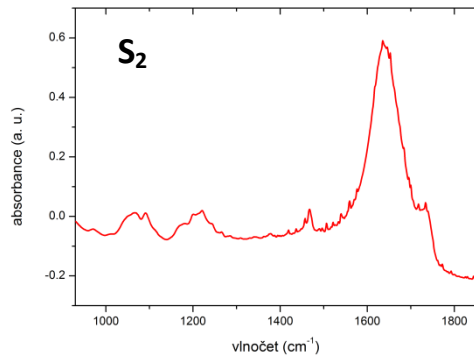


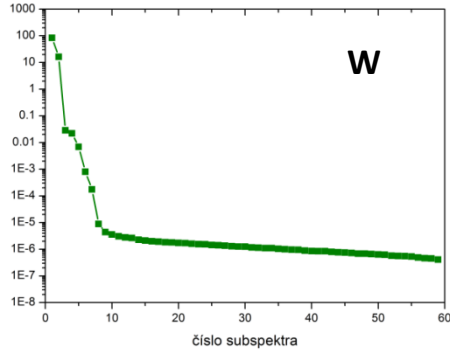


Obrázek 4.7b – Faktorová analýza spekter vysychání vody pro spektrální oblast 2700–3850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

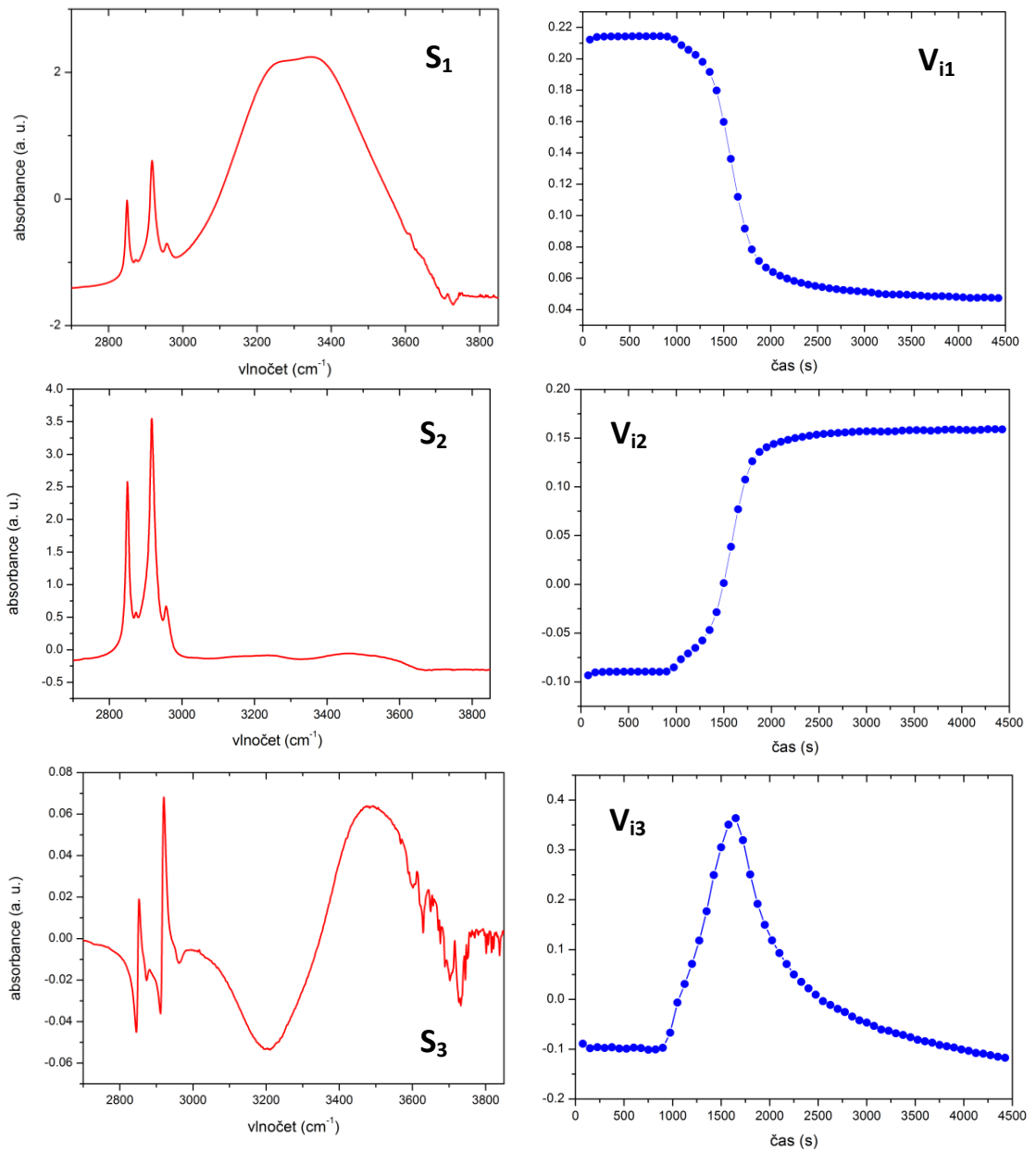
Poté jsme teprve měření opakovali s roztokem PC/PG lipozomů. Jejich dynamika vysychání (obr 4.8a a 4.8b) odpovídala nejprve poklesu zmíněných absorpčních pásů vody (subspektrum S_2 pro nižší oblast a subspektrum S_1 pro vyšší oblast vlnočtu), který se po jisté době zastavil a dále již výrazněji neklesal. Takováto změna spekter je vysvětlitelná poklesem lipozomů na dno nádržky a odpařením většiny vody, ve které byly rozpuštěny. Zbytkové absorpční pásy vody odpovídají pravděpodobně vodě vázané uvnitř lipozomů, resp. na lipidovou dvojvrstvu. Na druhou stranu byl pozorován nárůst pásu odpovídající signálu lipidu – antisymetrická vibrace $\text{CH}_2 \sim 2920 \text{ cm}^{-1}$, symetrická vibrace $\text{CH}_3 \sim 2850 \text{ cm}^{-1}$ vibrace v subspektru S_2 a karbonylu $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$, asymetrické a symetrické vibrace $\text{PO}_2 \sim 1228$ resp. 1085 cm^{-1} v subspektru S_1 nižší oblasti (Tamm & Tatulian, 1997), jelikož jeho koncentrace s vypařováním vody rostla. Opět rozeznáme subspektra odpovídající vodním parám (subspektrum S_3 a S_4 u nižší a subspektrum S_5 vyšší oblasti vlnočtů).

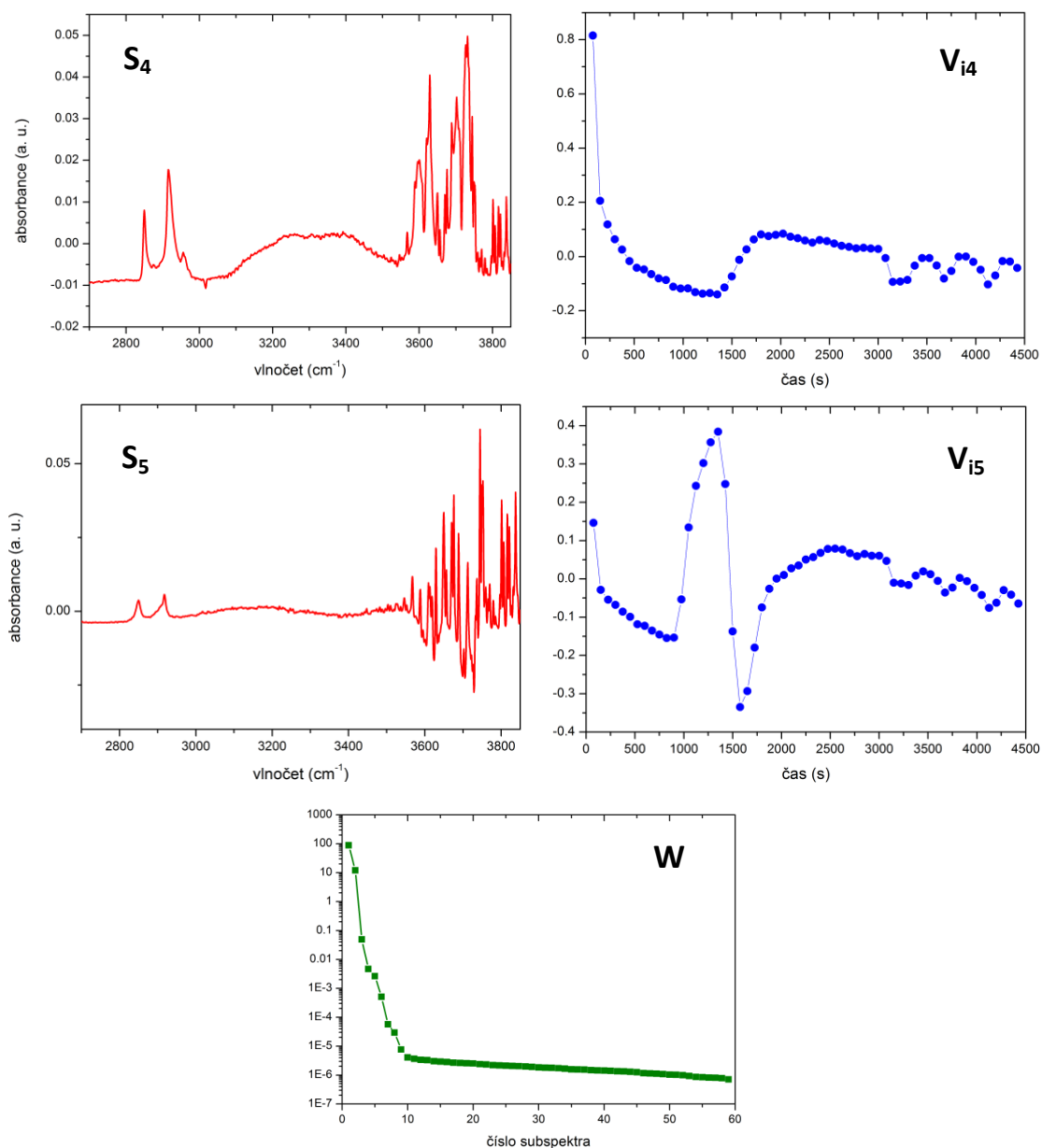






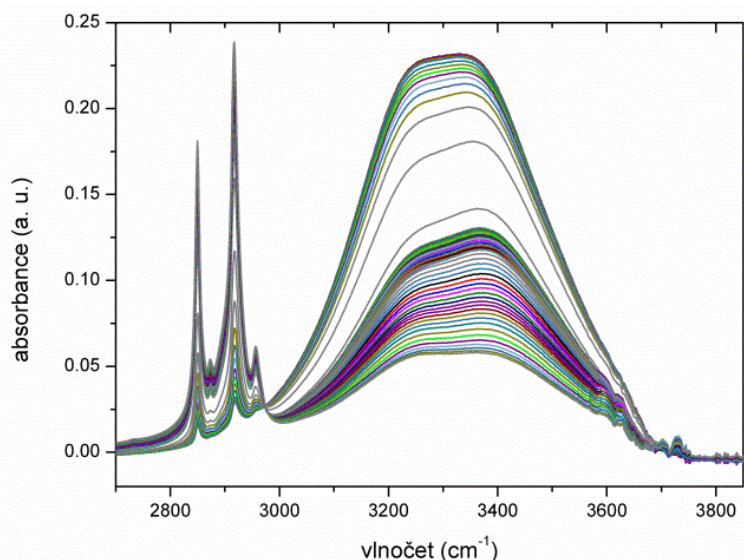
Obrázek 4.8a – Faktorová analýza spekter vysychání PC/PG lipidu pro spektrální oblast $930\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .





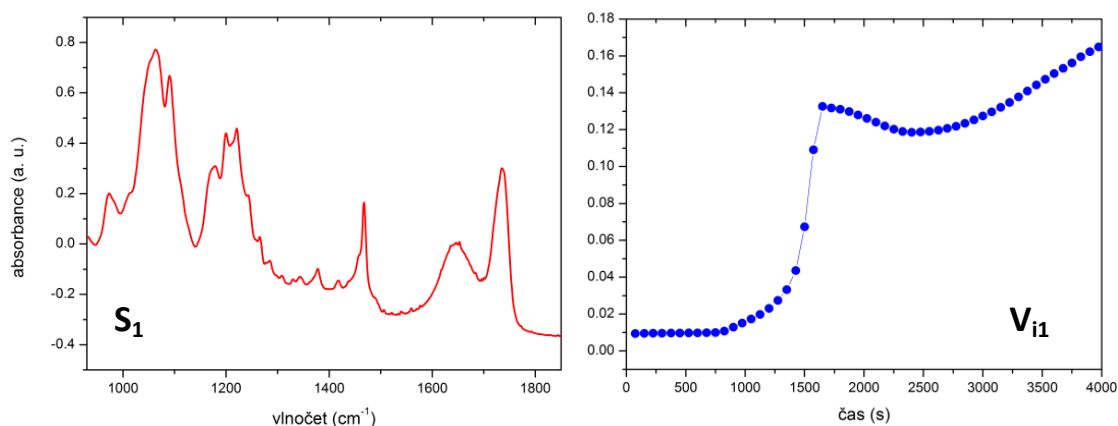
Obrázek 4.8b – Faktorová analýza spekter vysychání PC/PG lipidu pro spektrální oblast $2700\text{--}3850\text{ cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

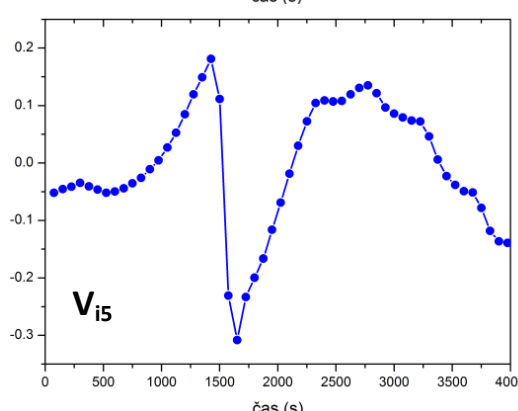
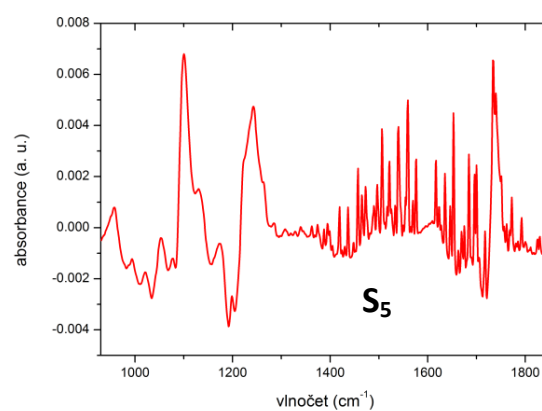
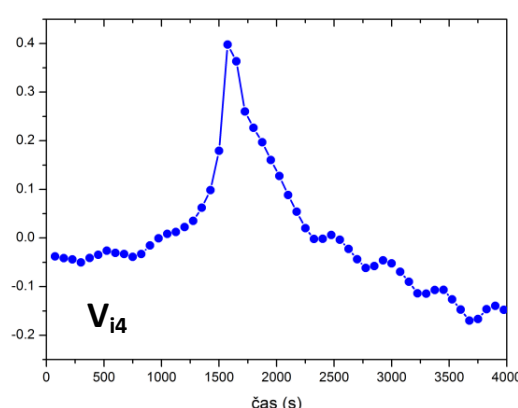
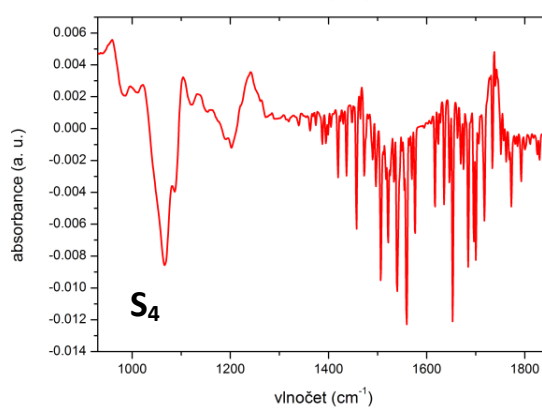
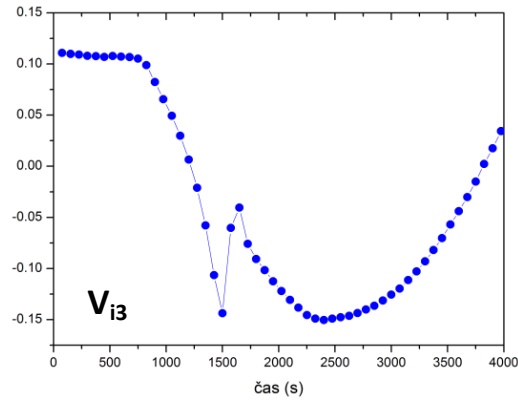
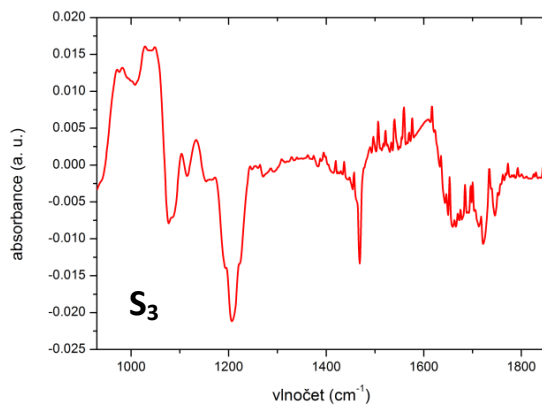
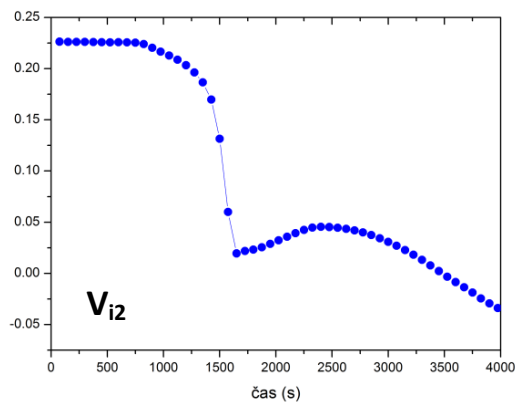
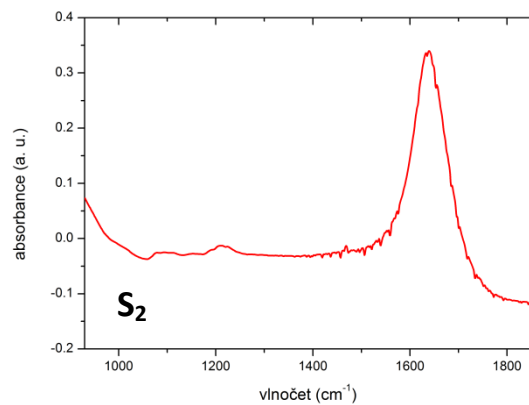
Dále jsme se zaměřili na možnost zastavení procesu vysychání lipozomů (obr. 4.9), abychom mohli provádět delší, a tudíž preciznější měření na orientované lipidové dvojvrstvě. K tomuto účelu jsme vzorkový prostor zakryli příslušnou kovovou krytkou po 26 minutách vysychání. Vysychání se zastavilo v průběhu následujících 2 minut, což lze vysvětlit nasycením vodních par v prostoru mezi vzorkem a krytkou a bylo stabilní zhruba po dalších 15 minut, což bylo dáno částečnou hydratací a následnou dehydratací (viz subspektrum S_1 pro oblast vyšších vlnočtů), viz obr. 4.10a a 4.10b.

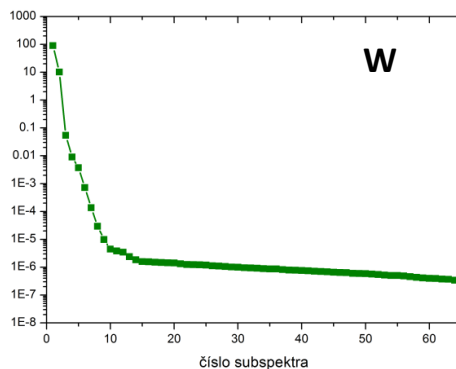


Obrázek 4.9. – Přerušené vysychání PC/PG lipozomů. V sérii spekter je znatelný pokles pásu vody, před přiložením krytky a pomalý pokles po přidání krytky.

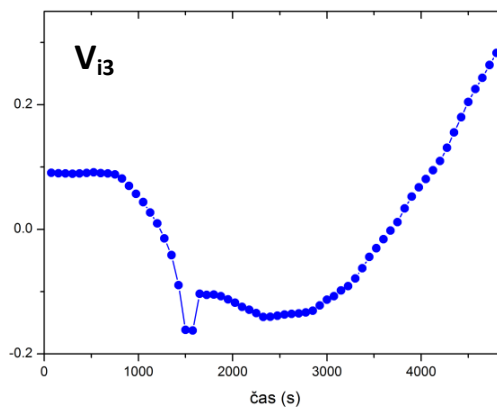
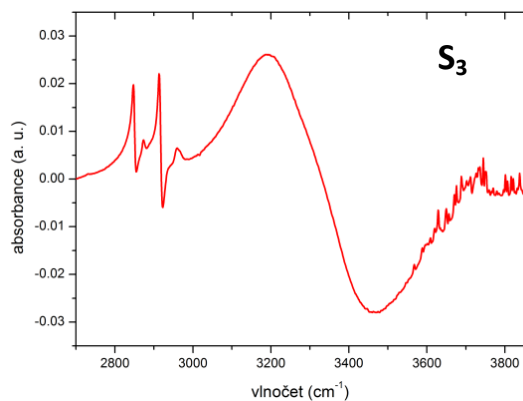
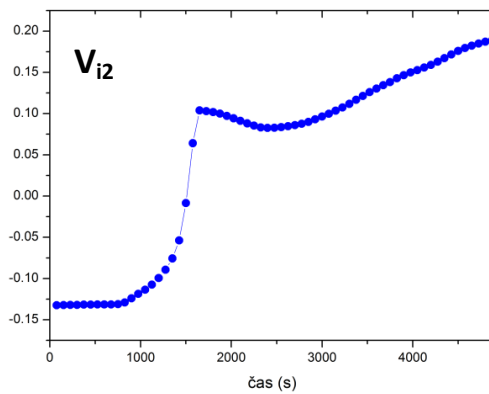
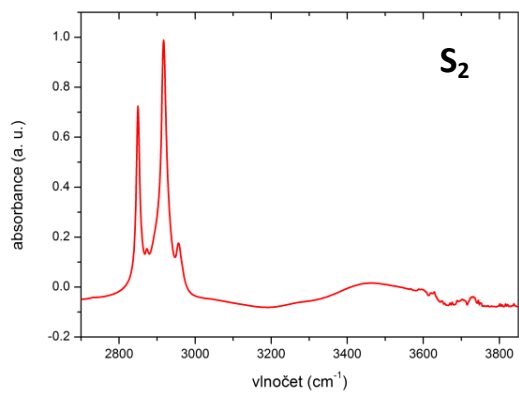
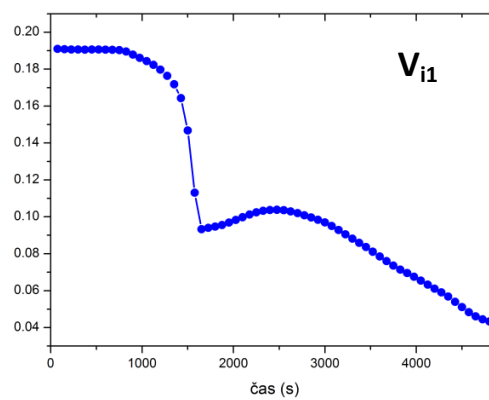
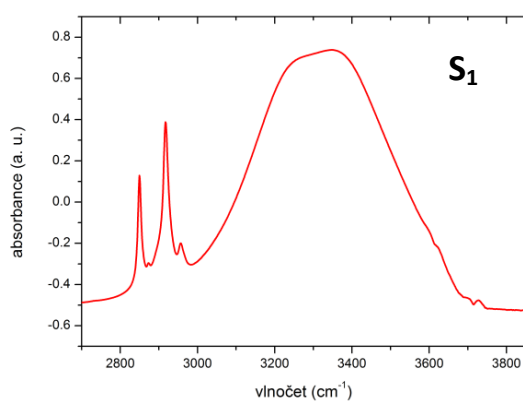
Toto značné zpomalení umožnilo setrvání vzorku v určitém stadiu hydratace po delší dobu, což skutečně umožňuje delší FTIR měření na definovaném lipidovém vzorku. Pro lipidy byla dynamika, dle očekávání, naprosto opačná (subspektrum S_2 v oblasti vyšších vlnočtů). Subspektra S_4 a S_5 opět nesou informaci o pásech vodních par které pro oblast $930\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$ jsou překryty vibracemi PO_2 skupin lipidů. Tyto vykazují oscilaci v průběhu ustálení. Představují tak cyklickou výměnu vodních par mezi lipidem a vzorkovým prostorem. Ukázali jsme, že vysychání lze zakrytím vzorkového prostoru výrazně zpomalit, ale nikoli zastavit, přičemž vzorek PC/PG lipidové multivrstvy prodělává postupně cyklickou hydrataci a dehydrataci, jejíž signál je však řádově slabší a tudíž je možné během této fáze provádět další spektroskopická měření, např. polarizovaná ATR-FTIR.

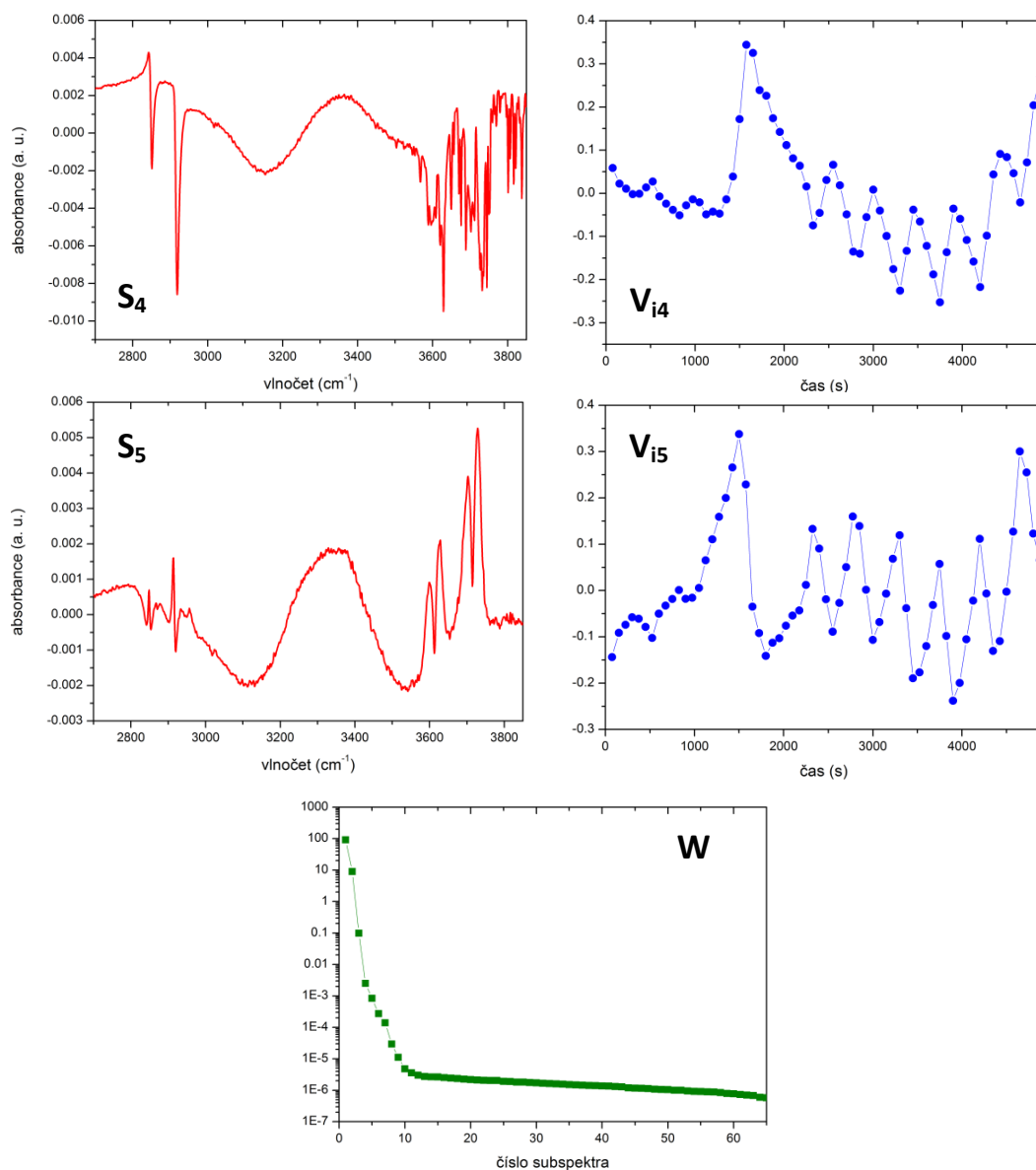






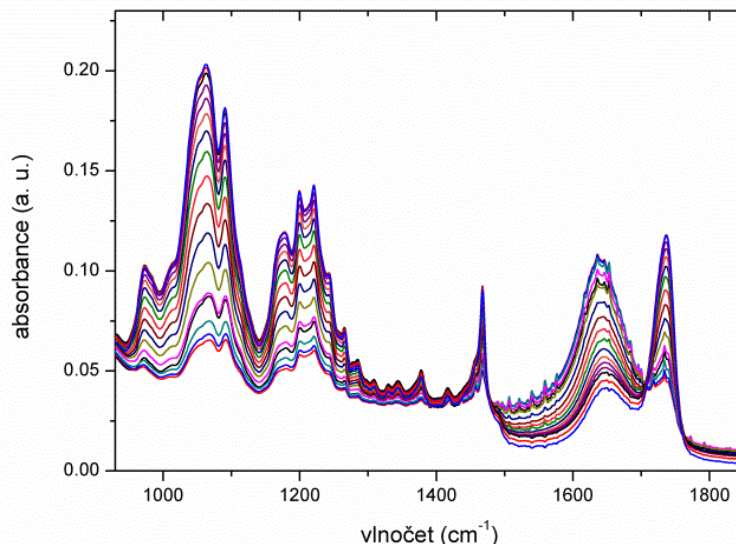
Obrázek 4.10a – Faktorová analýza spekter přerušného vysychání PC/PG lipidu pro spektrální oblast $930\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .





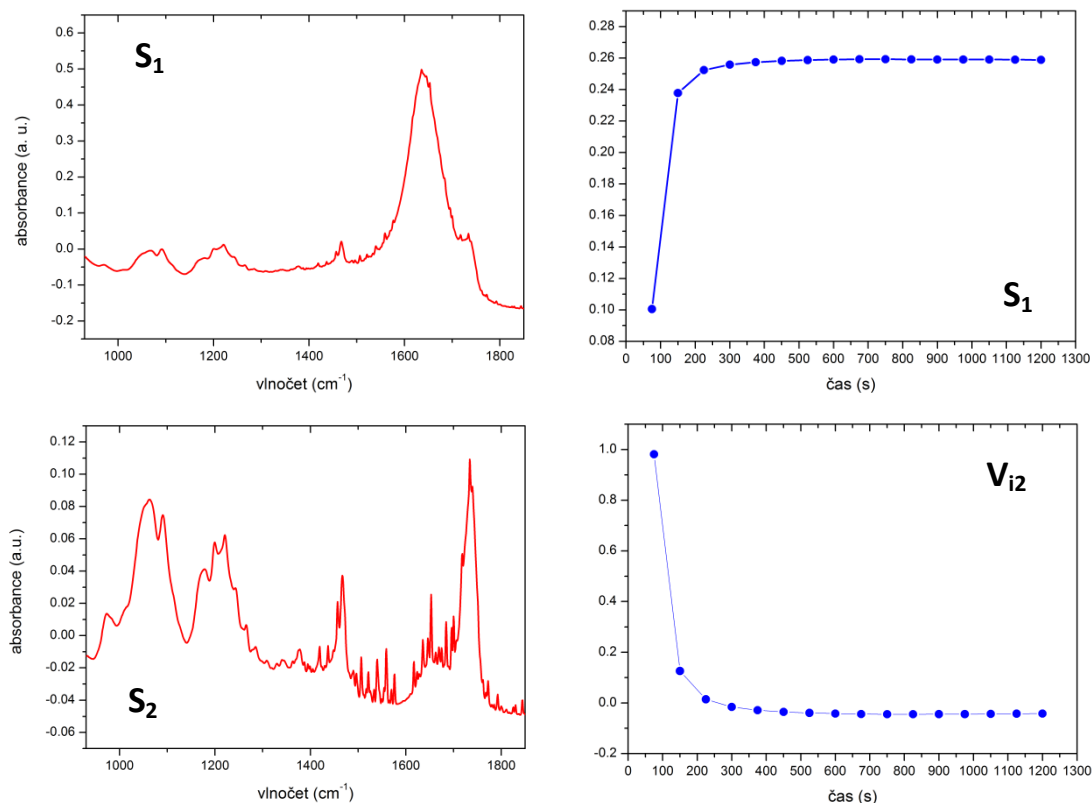
Obrázek 4.10b – Faktorová analýza spekter přerušného vysychání PC/PG pro spektrální oblast $2700\text{--}3850\text{cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

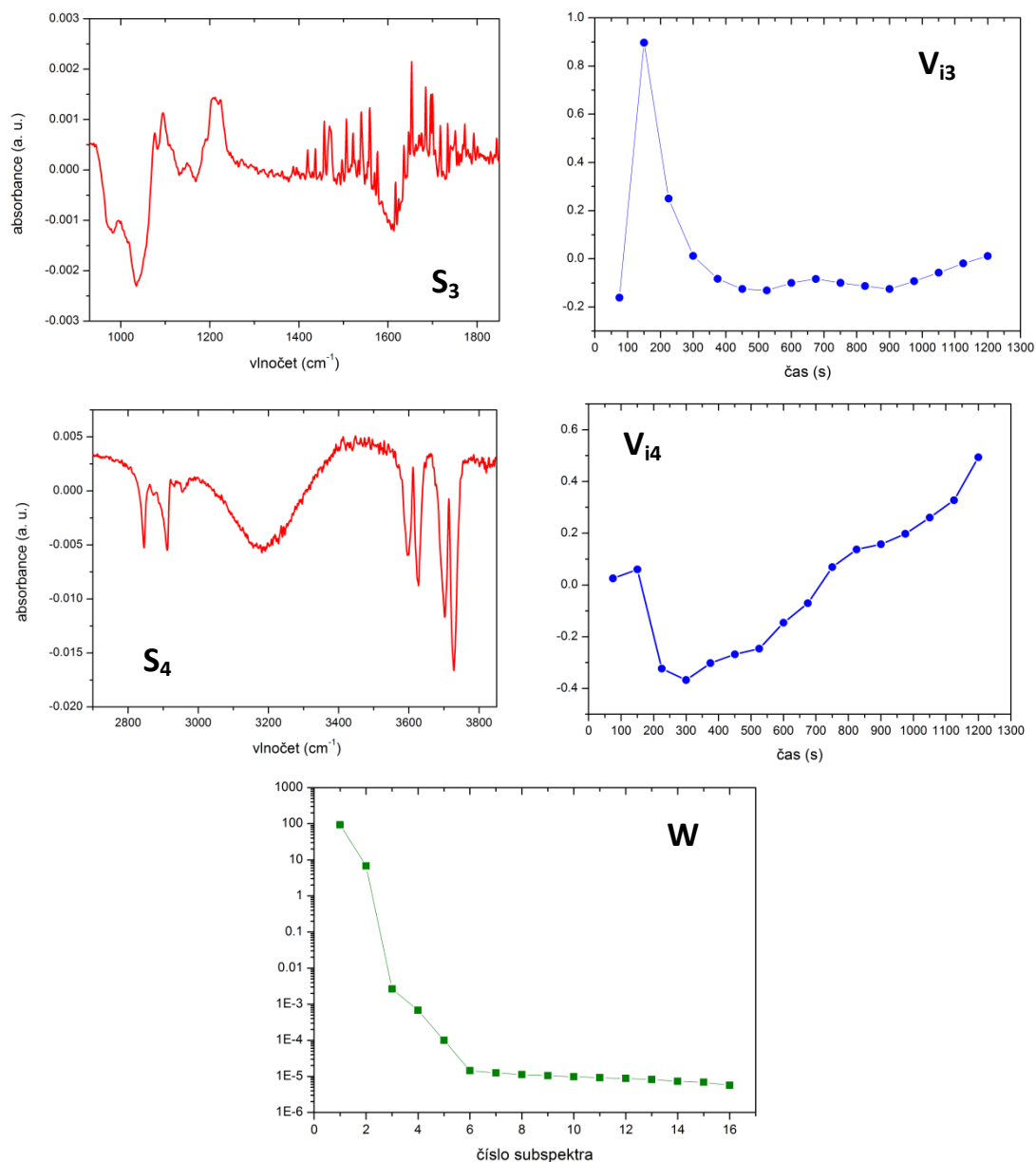
Jelikož přidání $10\ \mu\text{l}$ vody k vyschlému vzorku značně snižovalo výše zmíněné vibrace absorpčních pásů pro LUV (viz subspektrum S_2) (obr. 4.11a a 4.11b) a naopak zvyšovalo intenzitu vibrace vody (subspektrum S_1), tedy pravděpodobně výrazně narušovalo strukturu vzniklé dvojvrstvy či multivrstvy. Proto jsme se zaměřili na hledání maximálního množství vzorku, jež nenaruší výrazně signál dvojvrstvy, ale zajistí dostatečnou koncentraci přidaného vzorku peptidu, aby byl pozorovatelný jeho signál v ATR-FTIR spektroskopii. Zkoušeli jsme vzorky o objemu 1, 2, 4 a $10\ \mu\text{l}$. Signál lipidu stoupal dle očekávání s poklesem objemu přidávaného vzorku peptidu (tedy i vody obsažené ve vzorku), viz obr. 4.12.



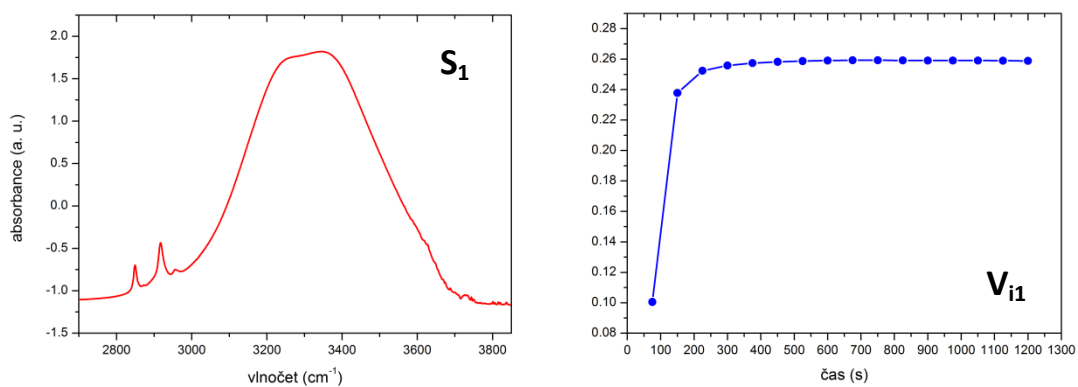
Obrázek 4.12. – Dynamika nakápnutí 1 μl vody na lipidovou dvojvrstvu. Na sérii spekter je znatelný výrazný nárůst pásů PO_2 a karbonylu a pokles pásu vody.

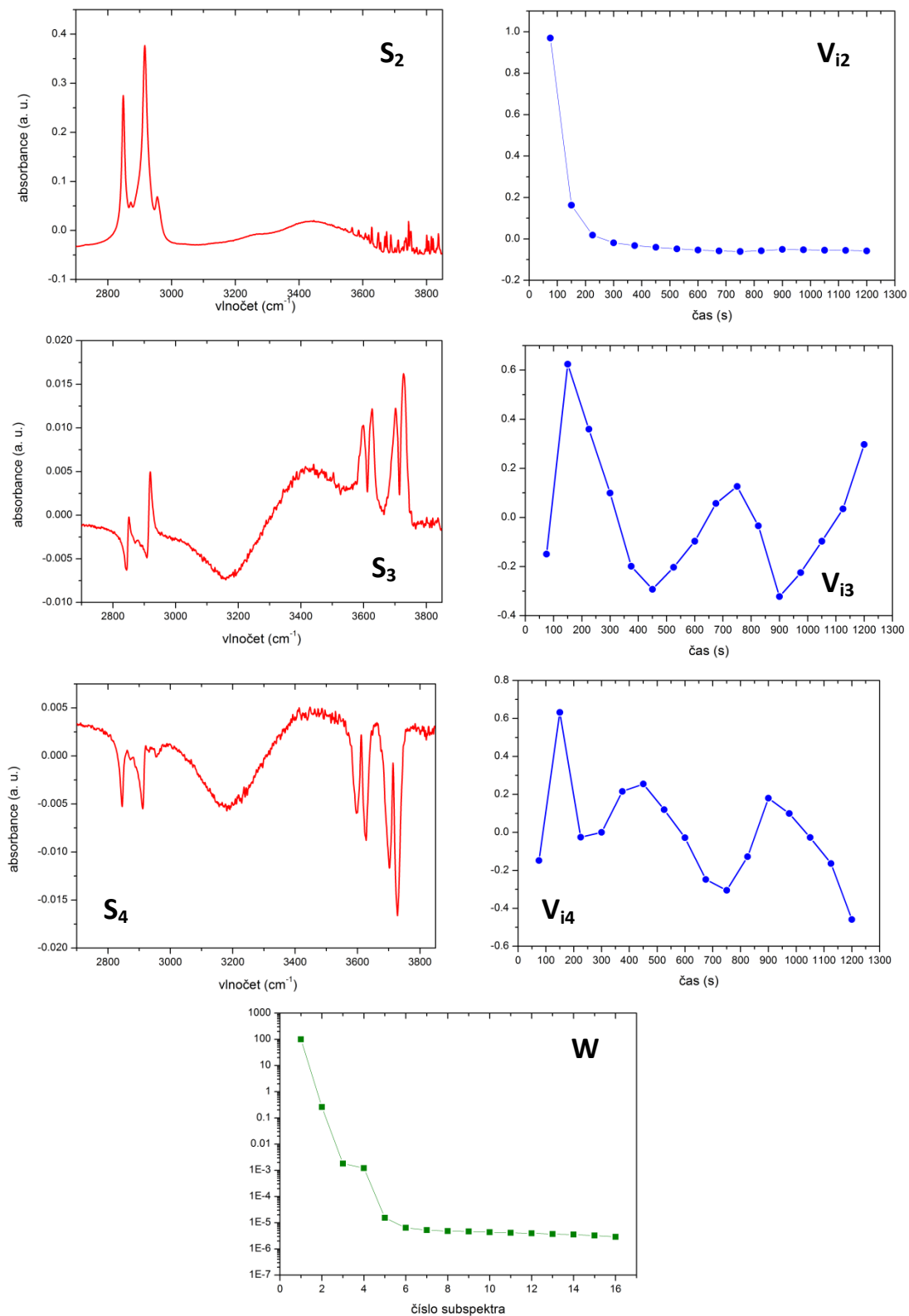
Pro dané koncentrace jsme opakovali měření dynamik po přidání 2 μl vody. Signál lipidu byl vždy silnější pro vzorek peptidu než vzorek vody o stejném objemu. Podle výše uvedených kritérií se jeví jako nejvhodnější měření s vzorkem peptidu o objemu 2 μl , kdy byl po celou dobu měření výrazný signál spektra lipidu a zároveň nám umožnil aplikovat větší množství proteinu než 1 μl vzorek.





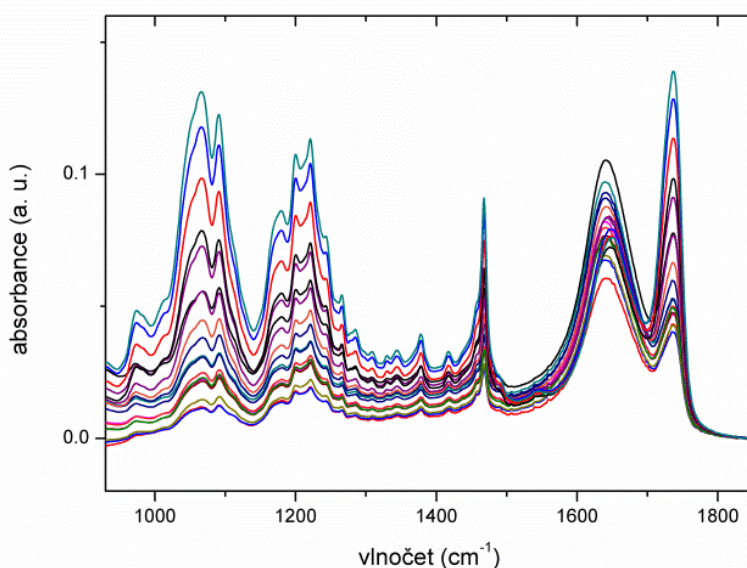
Obrázek 4.11a – Faktorová analýza spekter LUV po přidání 10 μl vody pro spektrální oblast 930–1850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .





Obrázek 4.11b – Faktorová analýza spekter LUV po přidání 10 μl vody pro spektrální oblast 2700–3850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

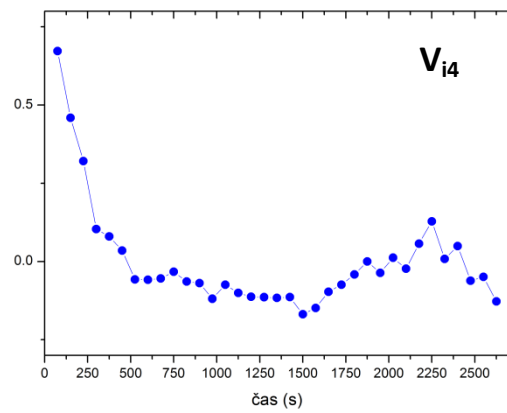
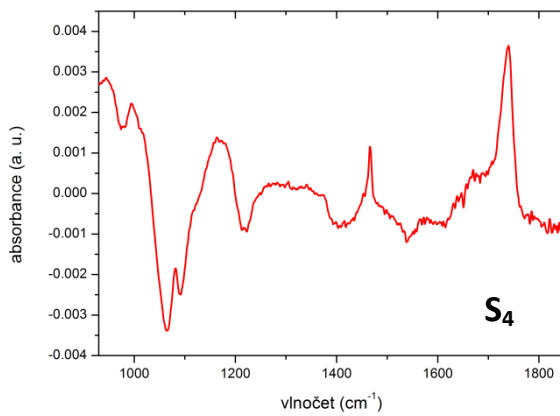
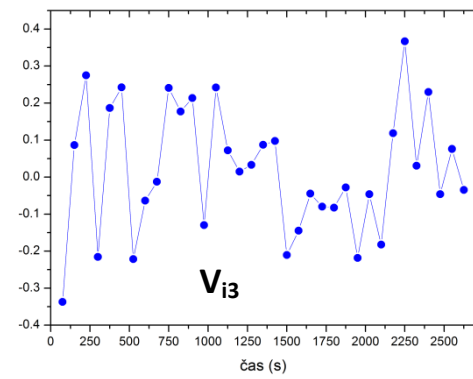
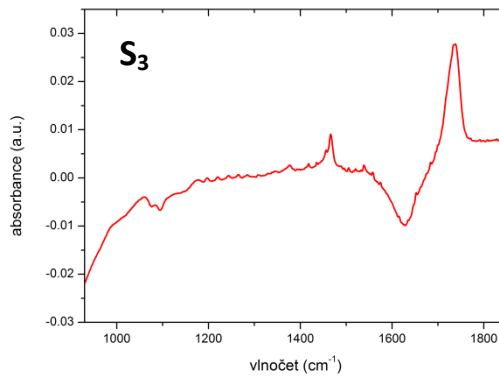
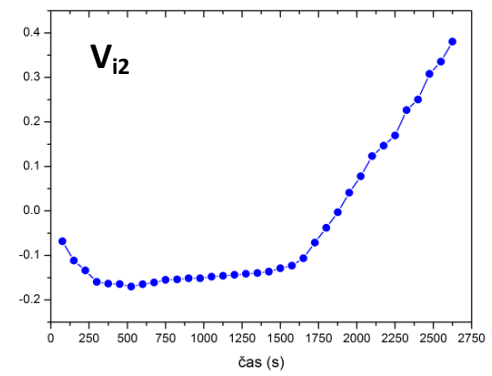
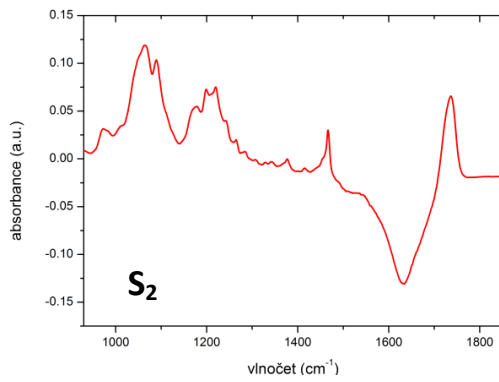
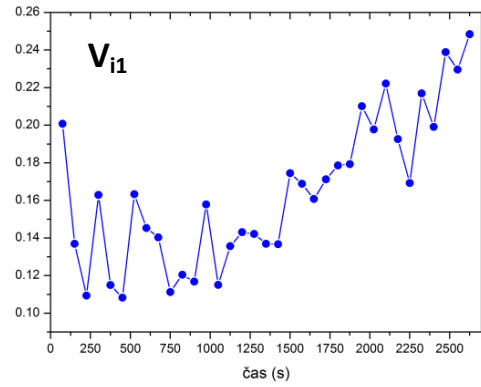
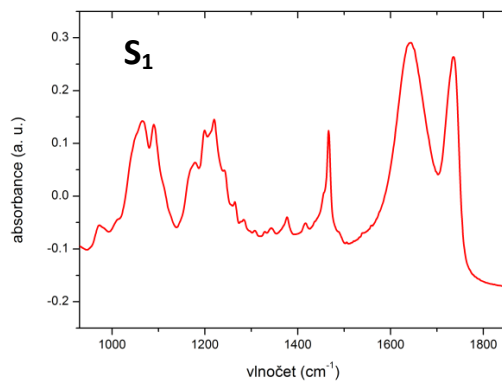
Dále jsme měřili spektra po aplikaci 2 μl vzorku peptidu. Soustava se jevila stabilní po 2,5 minutách. Maximální hydratace bylo dosaženo po 7 minutách a stabilní zůstala do 21 minuty od počátku měření. Nejlépe popsatelné je toto na subspektech S_2 obou zkoumaných oblastí, kde signál lipidů klesne po přidání vzorku a roste jen velice pozvolna a stejné dehydratace docílí ve 24 minutě. Při porovnávání spekter pro stejné množství peptidu a vody jsme pozorovali nárůst intenzity pásů lipidů po aplikaci vzorku peptidu. Toto by mohlo být následkem zpevnění dvojvrstvy nasedáním peptidu kobercovým mechanismem (viz interakce peptidu s membránou v kapitole 1.3.). Rovněž jsme pozorovali také nárůst intenzity pásů vody (3400 cm^{-1} a $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$). To může být způsobeno vazbou molekul vody na peptid. Abychom ověřili protektivní vliv HALu na signál lipidů, snižovali jsme koncentraci lipidů jeho postupným ředěním. Počáteční množství jsme ředili $10\times$ a $100\times$. Ředění vyvolalo pokles intenzity všech signálů lipidů, ale neodpovídali desetině původní hodnoty, jak by odpovídalo poklesu koncentrace. Domníváme se, že je to vyvoláno proporcionálně nižším poklesem množství LUV v oblasti penetrace evanescentní vlny, což podporuje hypotézu vzniku tenké dvojvrstvy. Poté jsme dělali pro jednotlivá spektra dynamik s peptidem odečet spekter s vodou a sesadili jsme spektra pro vlnočty 1850 cm^{-1} na nulu (obr. 4.13).

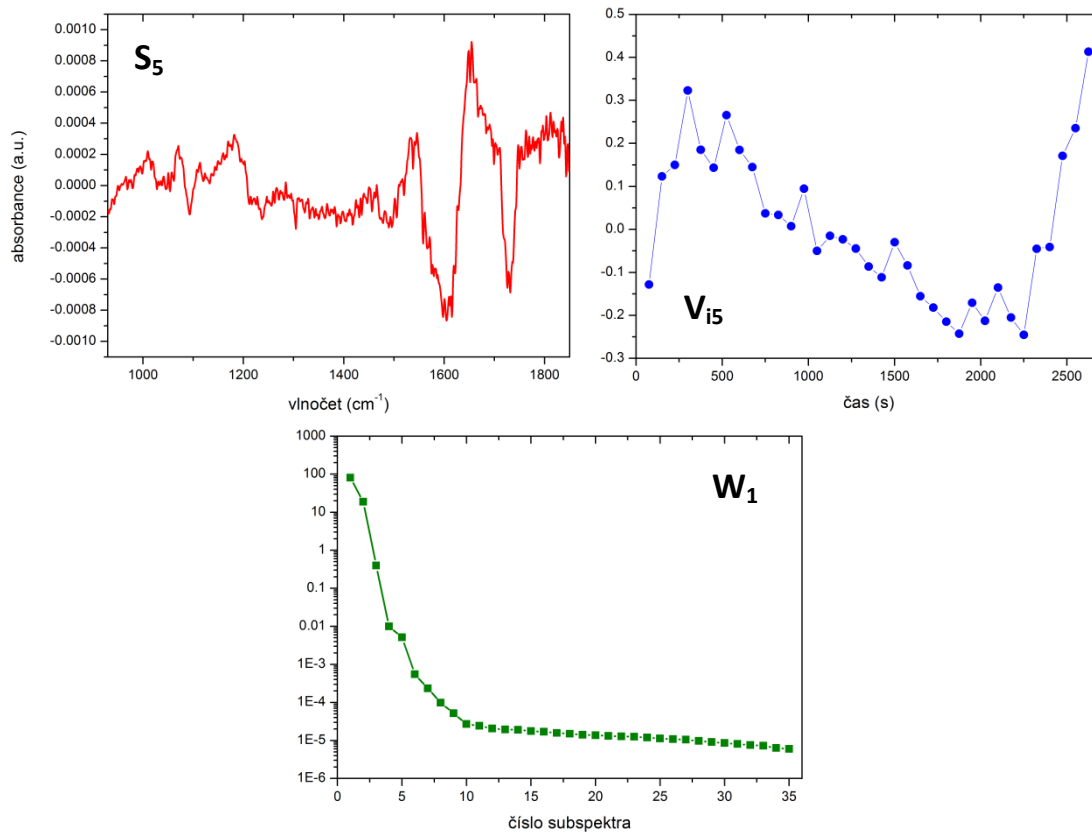


Obrázek 4.13. – Dynamika 2 μl peptidu HAL na lipidové dvojvrstvě. Na spektru znatelný nárůst vibrací PO_2 a karbonylu a pokles pásu amidu I.

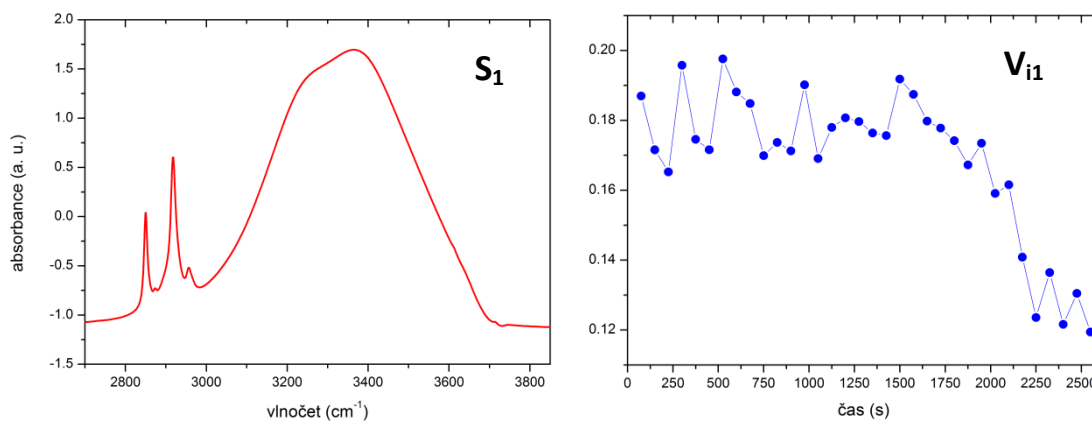
Naopak faktorové analýzy uvádíme pro nezpracovaná spektra, jelikož zpracování komplikuje interpretaci dynamik jednotlivých subspekter. Jak lze vidět srovnáním obr. 4.14a, 1.14b a 4.15a a 4.15b. V rozdílových spektrech pro neředěný lipid se kromě dříve popsaných pásů lipidů objevil znatelný posun pásu $\sim 1640\text{ cm}^{-1}$ na 1655 cm^{-1} což by mohlo odpovídat skládání peptidu do α -šroubovice, tak jak bylo pozorováno v referenčních spektrech peptidu HAL-1 (viz obr. 4.4a,b). Faktorová analýza popisuje nárůst lipidů a pokles pásu vody (subspektrum S_2 pro oblast nižších

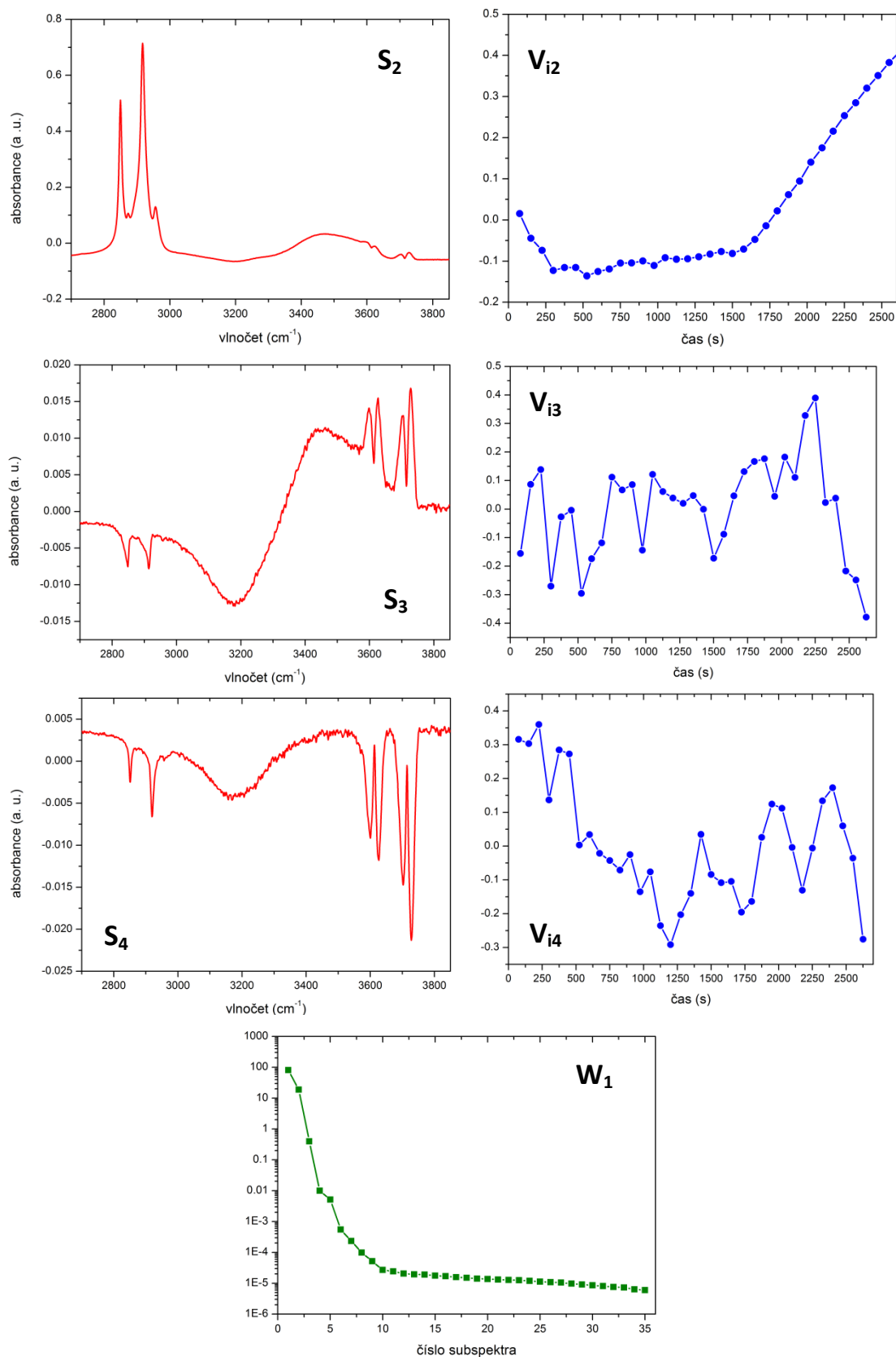
vlnočtů) a první subspektrum odpovídá výše popsanému signálu lipidu s dalším pásem při $\sim 1466 \text{ cm}^{-1}$ a pásu $\sim 1646 \text{ cm}^{-1}$, který může být připsán peptidu.



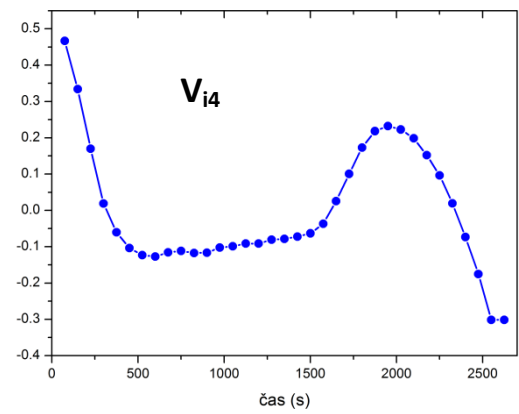
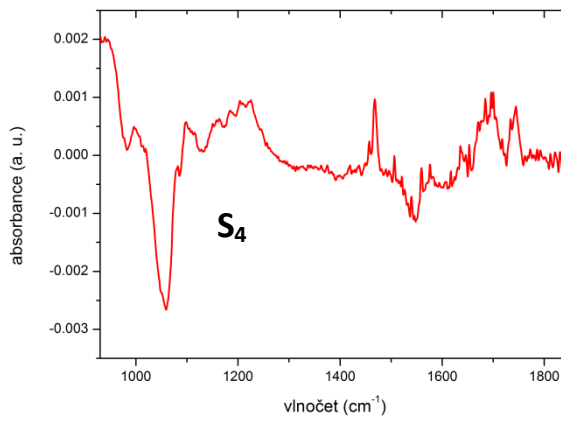
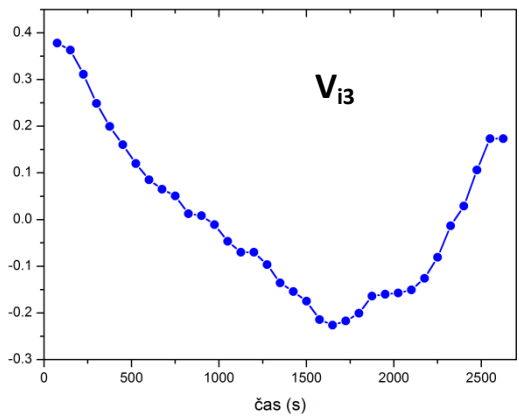
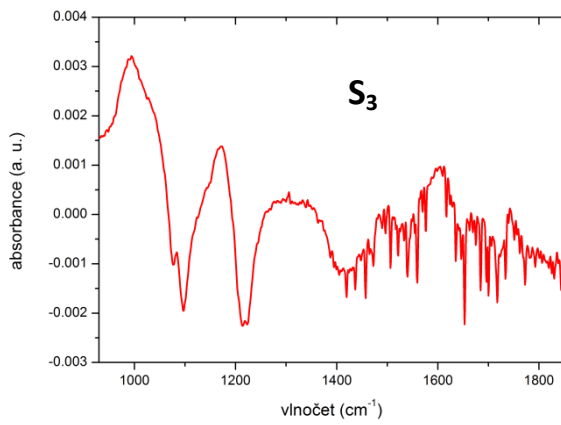
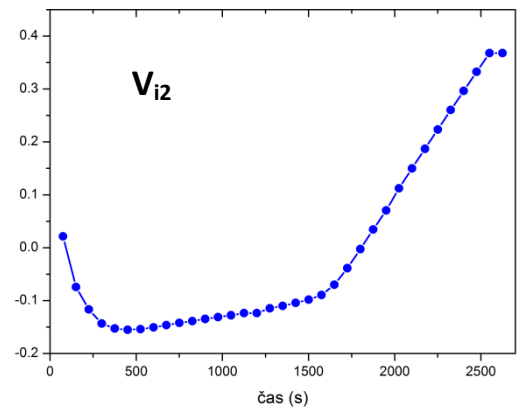
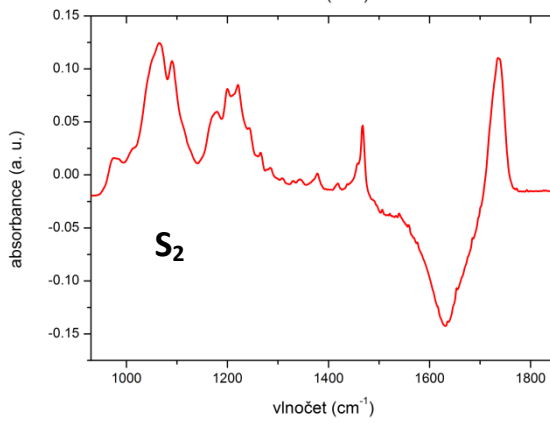
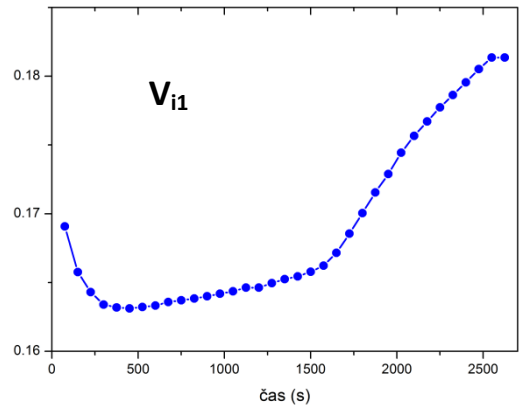
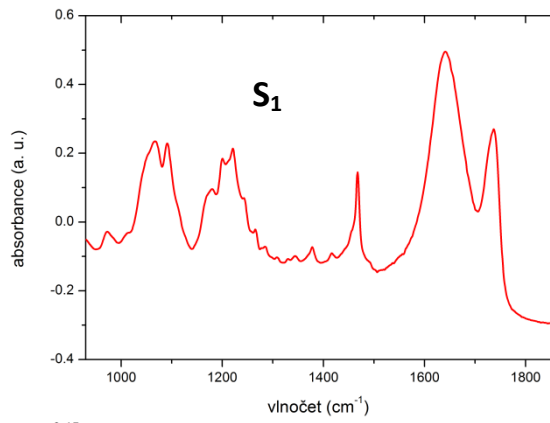


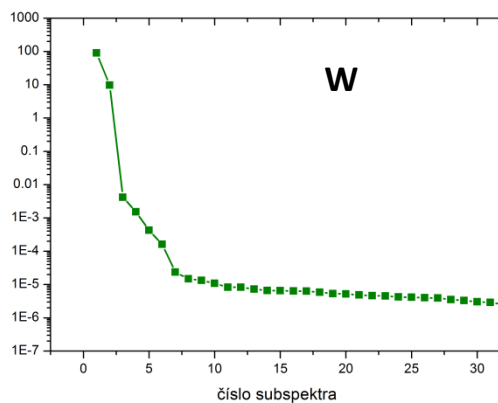
Obrázek 4.14a – Faktorová analýza zpracovaných spekter interakce peptidu HAL-1 2 μl a lipidové vrstvy pro spektrální oblast 930–1850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .



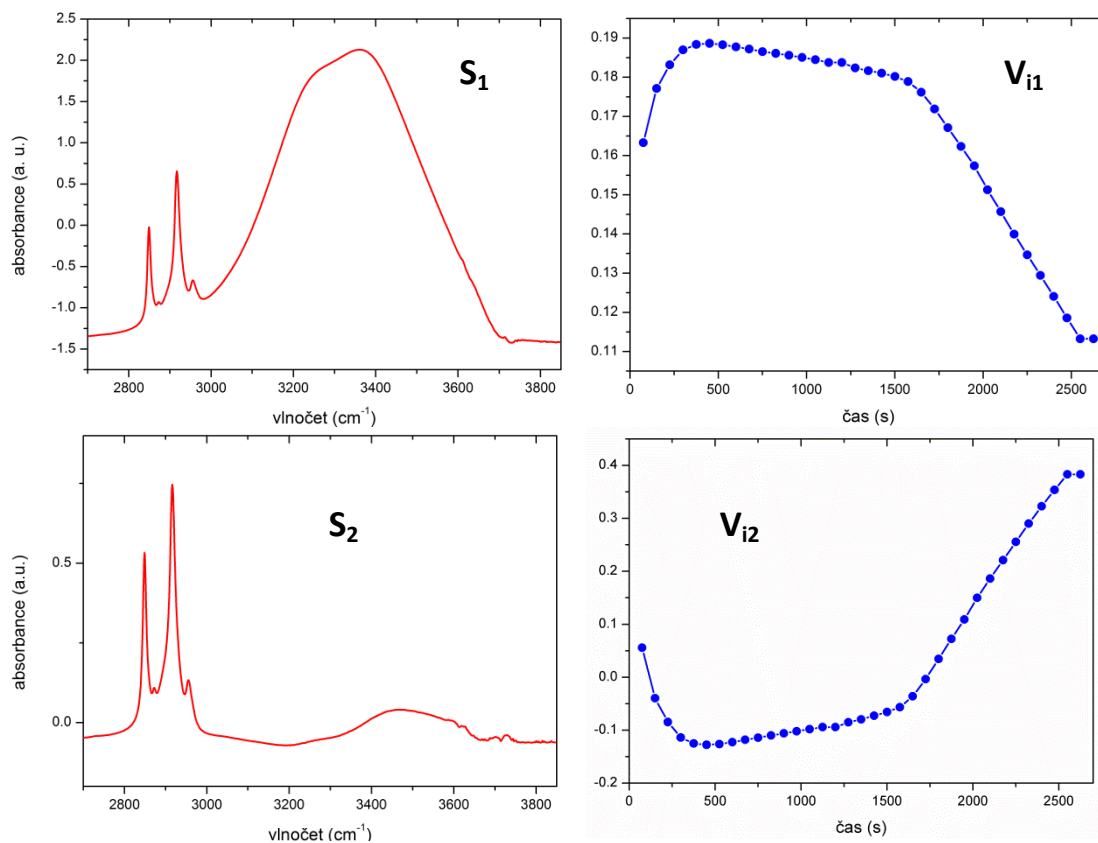


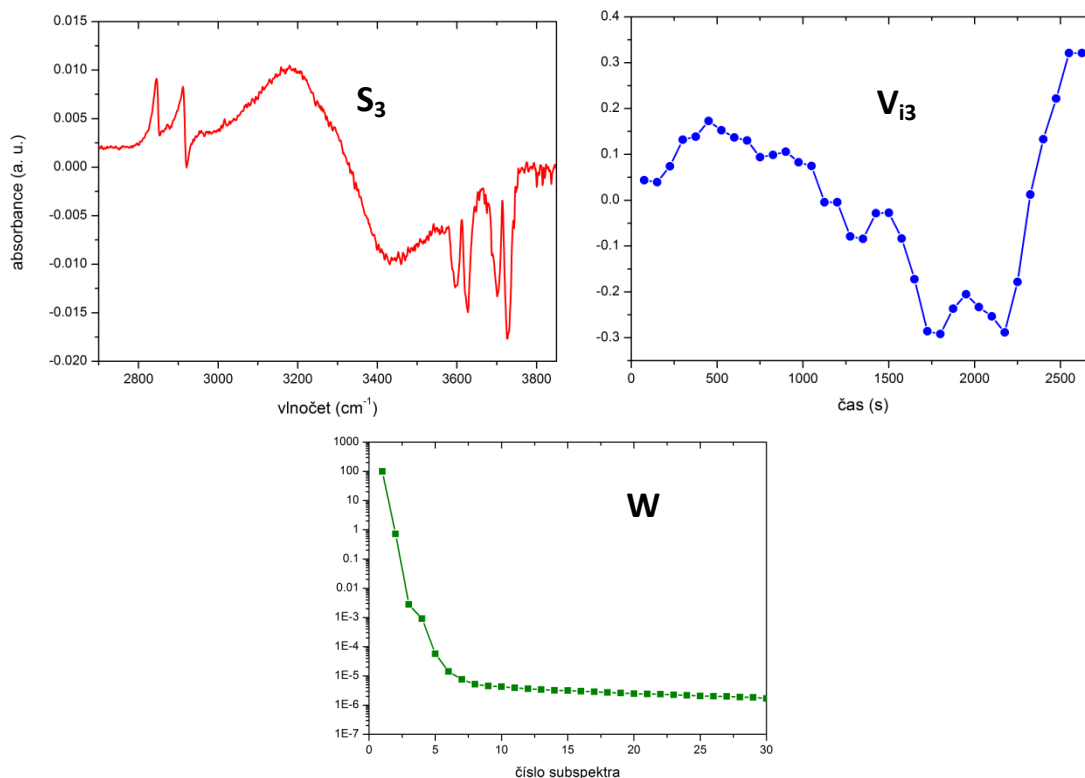
Obrázek 4.14b – Faktorová analýza zpracovaných spekter interakce 2 µl peptidu HAL-1 a lipidové vrstvy pro spektrální oblast 2700–3850 cm⁻¹. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j, kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W.





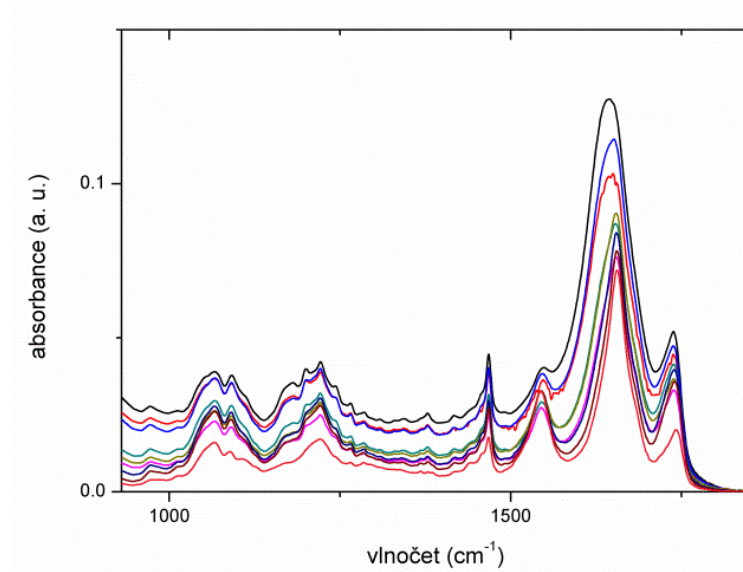
Obrázek 4.15a – Faktorová analýza spekter interakce 2 μl peptidu HAL a lipidové vrstvy pro spektrální oblast $930\text{--}1850\text{ cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .



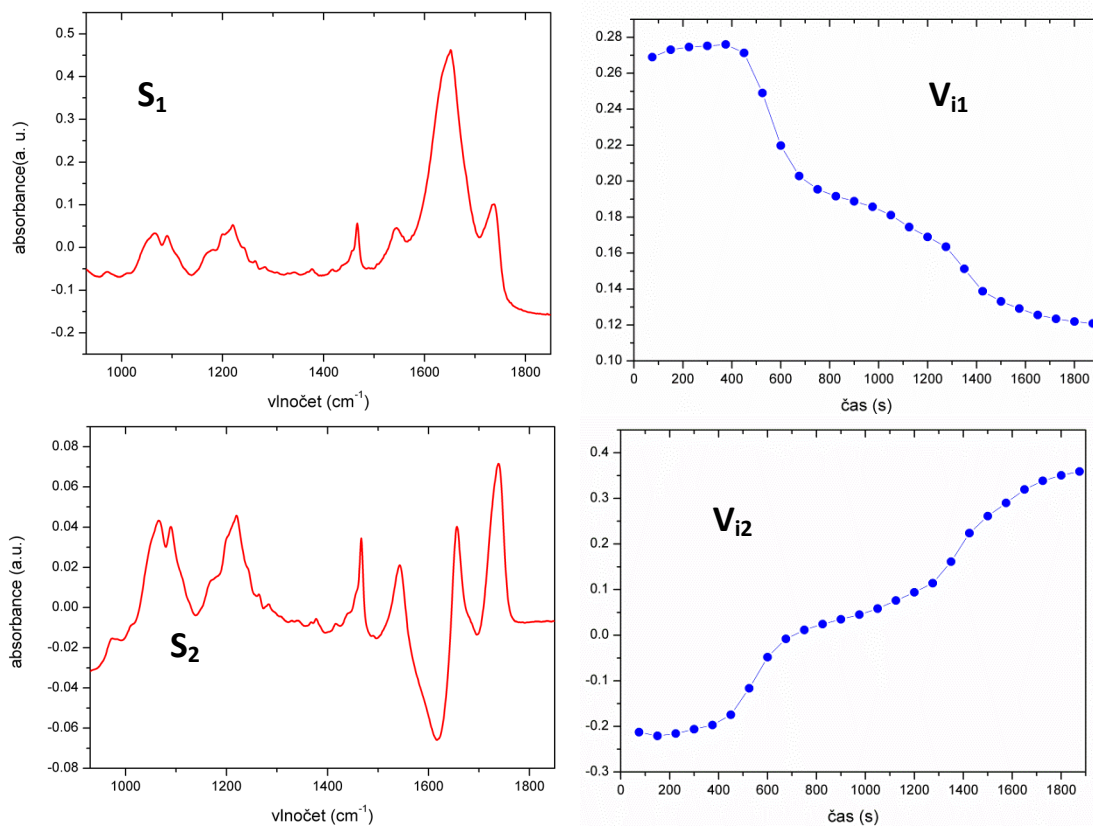


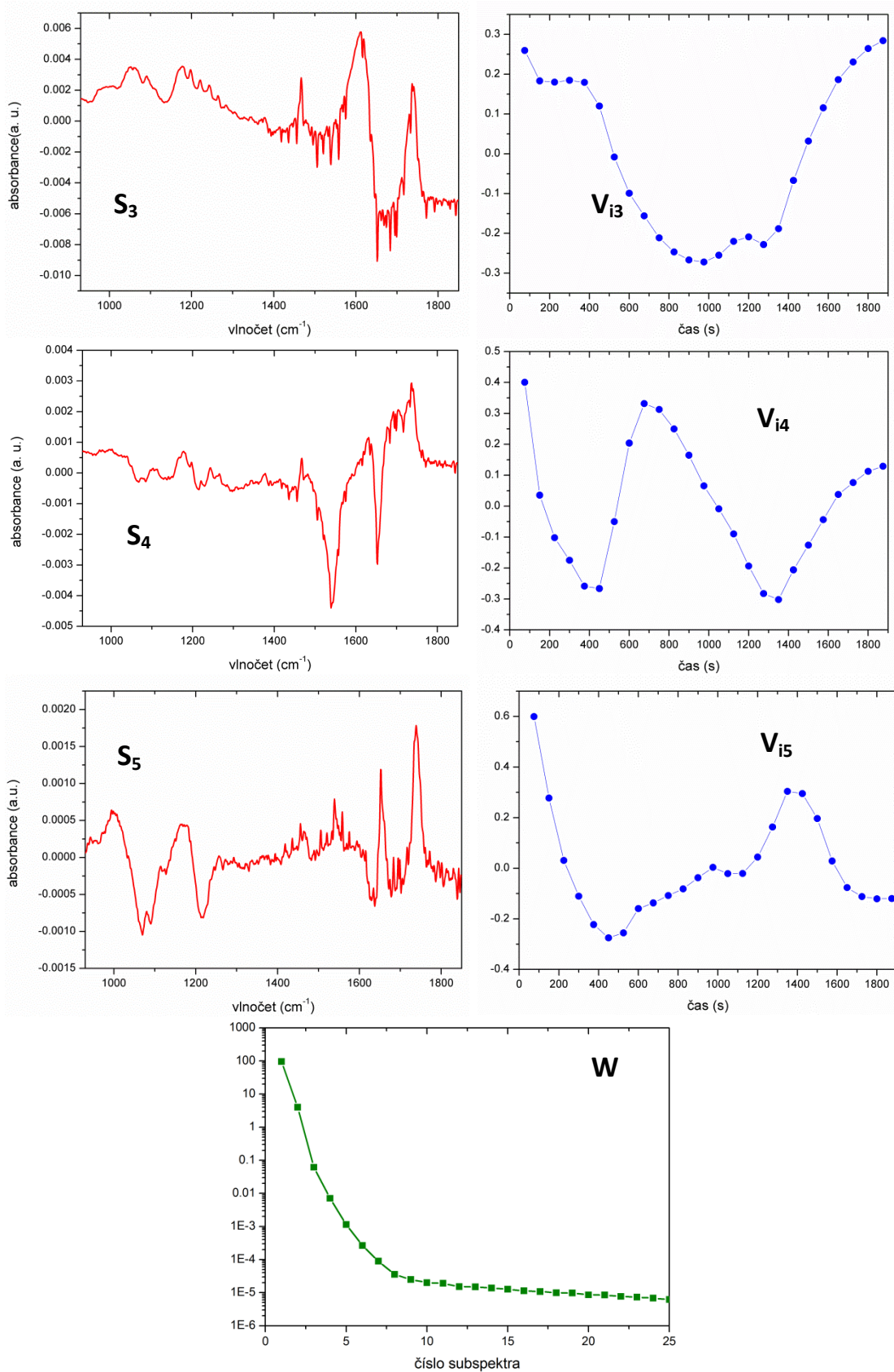
Obrázek 4.15b – Faktorová analýza spekter interakce 2 μl peptidu HAL-1 a lipidové vrstvy pro spektrální oblast 2700–3850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

Pro 10 \times ředěný LUV je v rozdílových spektrech znatelný posuv pásu $\sim 1645 \text{ cm}^{-1}$ na 1655 cm^{-1} , který připisujeme opět změně konformace v α -šroubovici, což odpovídá jak změně pro neředěný LUV (obr. 4.16). Systém byl stabilní od počátku měření zhruba po 9 minut. Výrazněji se zde projevil i pás LUV o 295 cm^{-1} odpovídající antisymetrické vibraci methylové skupiny. V první subspektru pro oblast nižších vlnočtů jsou identifikovatelné pásy amid I na 1651 cm^{-1} a amidu II na 1546 cm^{-1} odpovídající (4.17a). Váha tohoto spektra dvoufázově s časem klesá. Naopak druhé subspektrum opět dvoufázově roste a vidíme na něm negativní pás na $\sim 1623 \text{ cm}^{-1}$ odpovídající vibracím karboxylové skupiny, signál amidu I na 1657 cm^{-1} a amidu II na 1543 cm^{-1} (4.17b).

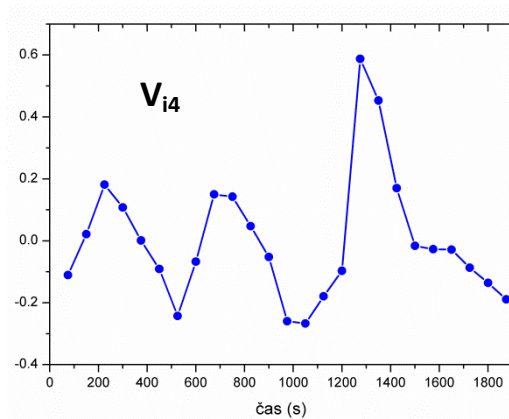
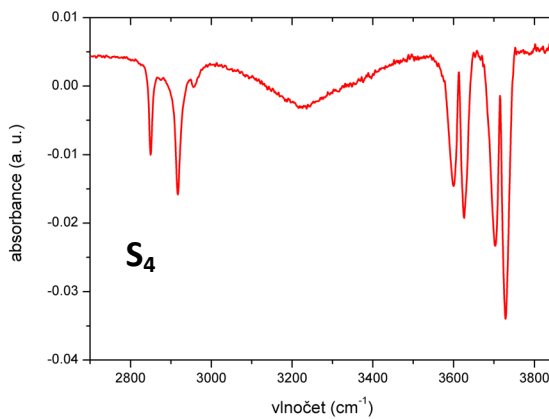
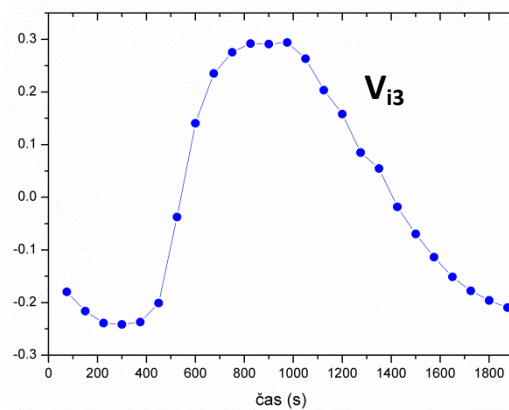
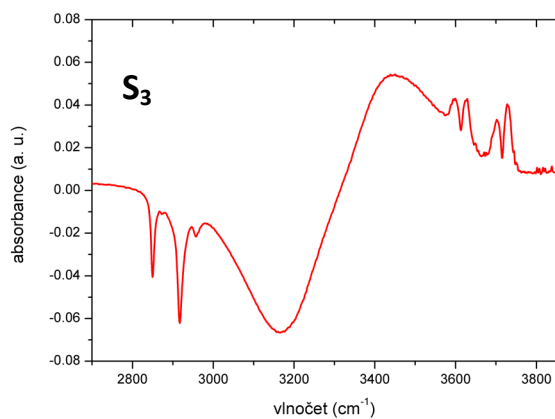
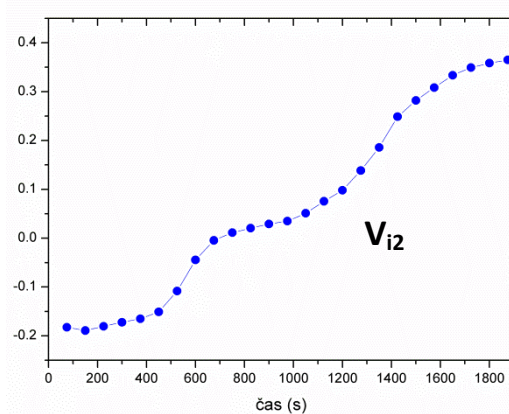
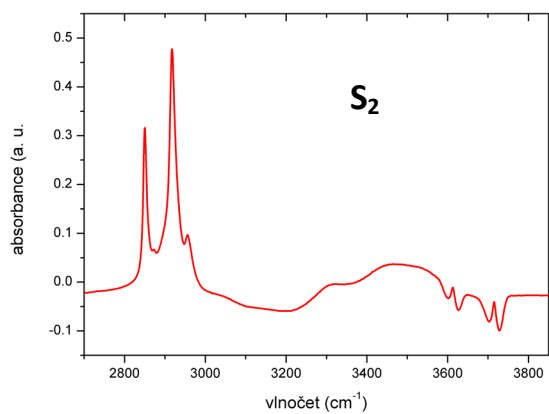
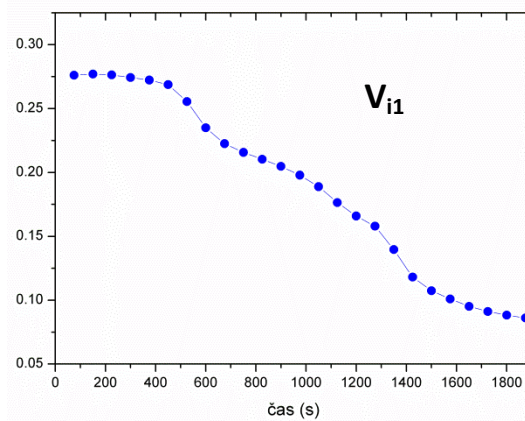
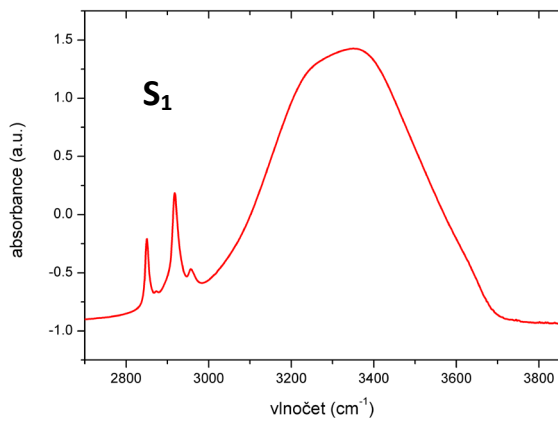


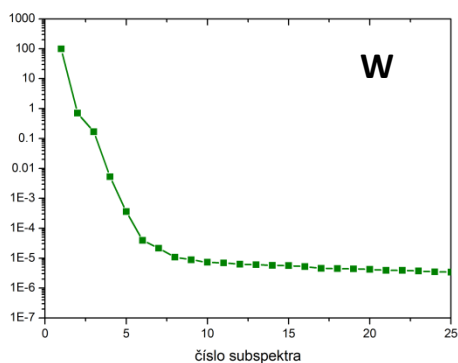
Obrázek 4.16. – Dynamika přidání 2 μl peptidu HAL na $10\times$ ředěné lipidové dvojvrstvě. Ve spektrální sérii je dobře pozorovatelný posun pásu amidu I.





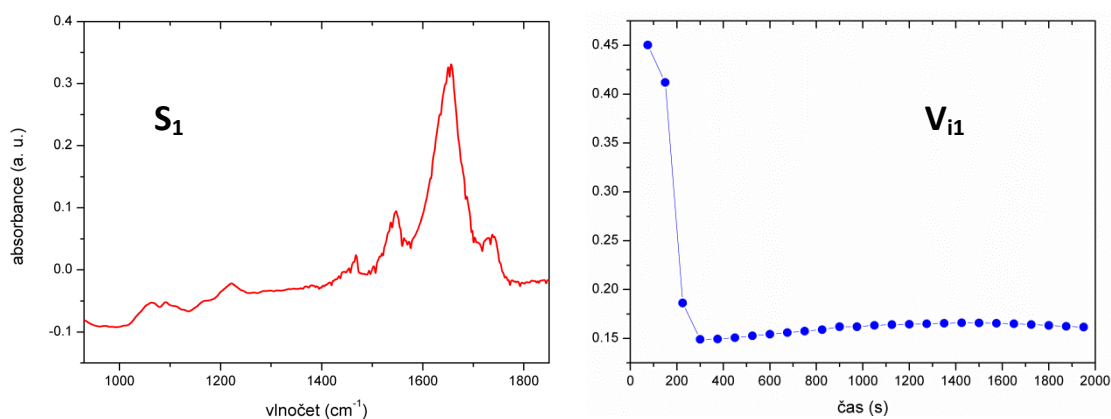
Obrázek 4.17a – Faktorová analýza spekter interakce 2 μl peptidu HAL-1 a 10× ředěné lipidové vrstvy pro spektrální oblast 930–1850 cm⁻¹. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j, kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W.

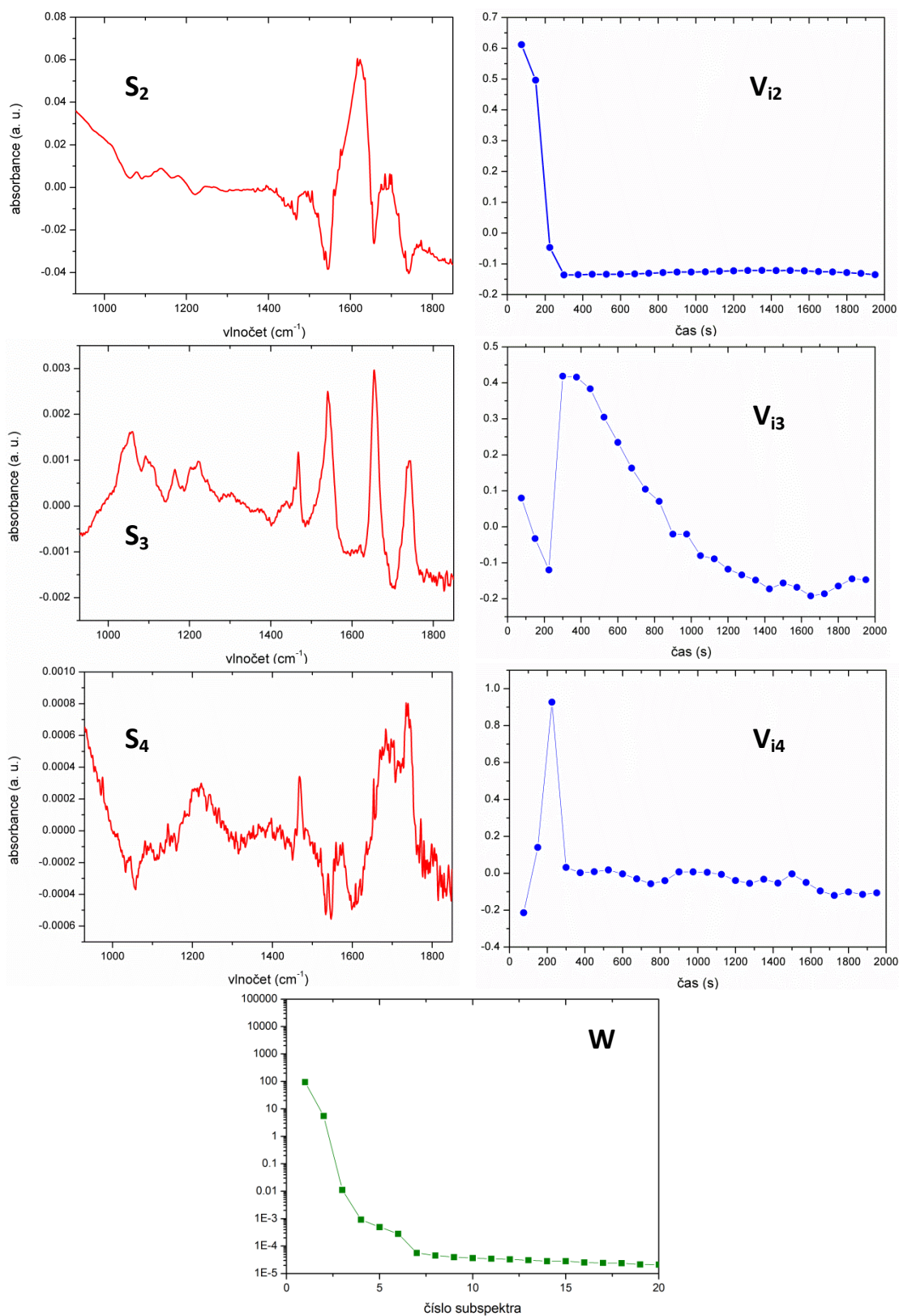




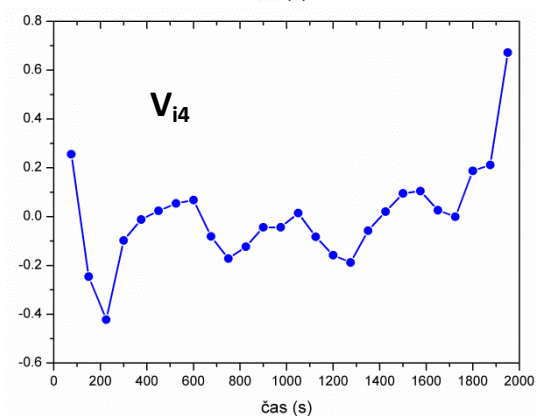
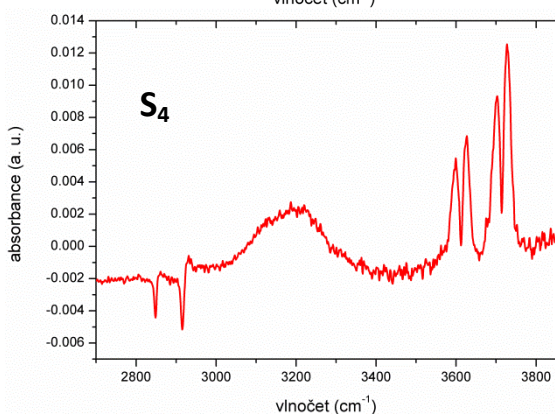
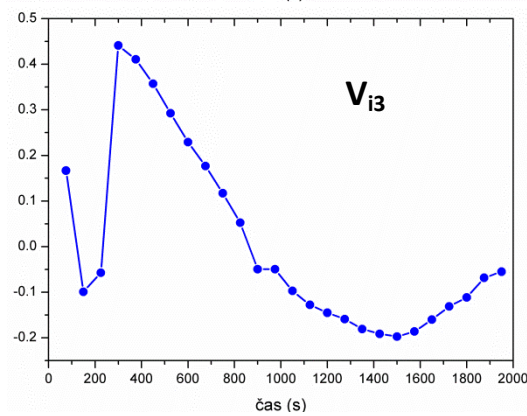
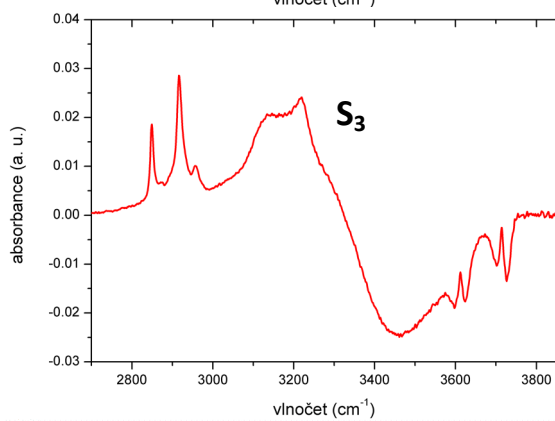
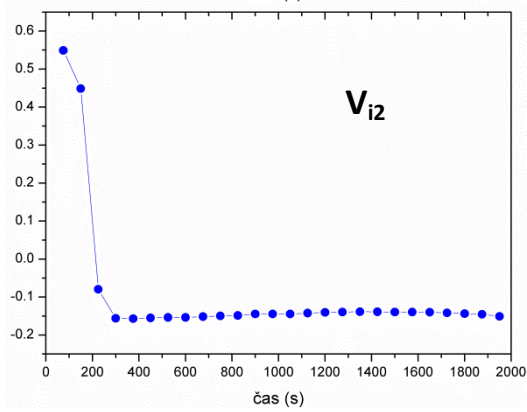
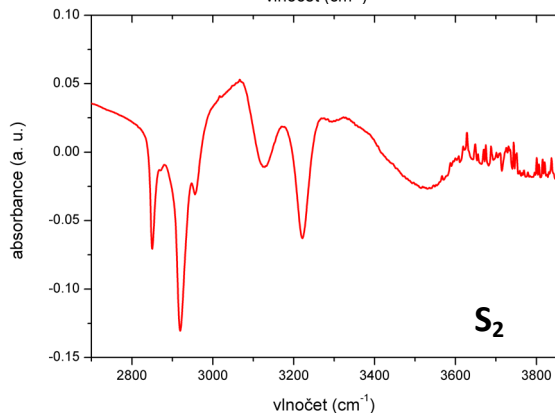
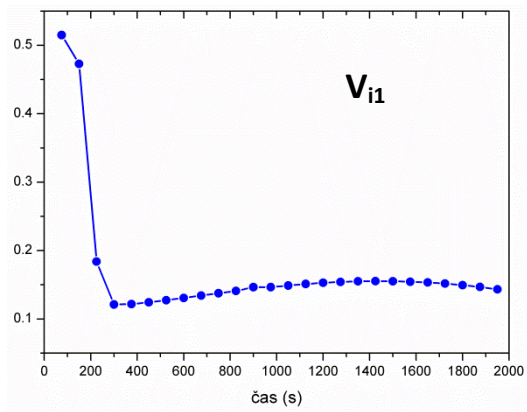
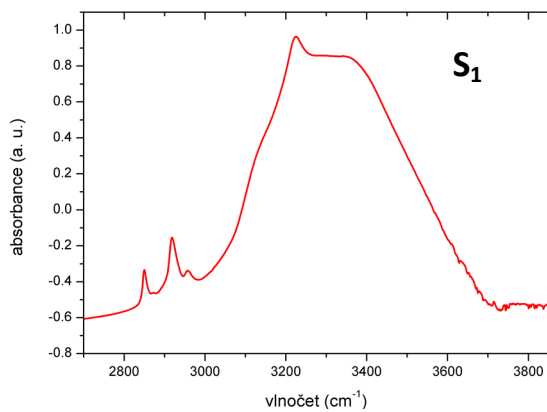
Obrázek 4.17b – Faktorová analýza spekter interakce 2 μl peptidu HAL-1 a 10 \times ředěné lipidové vrstvy pro spektrální oblast 2700–3850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

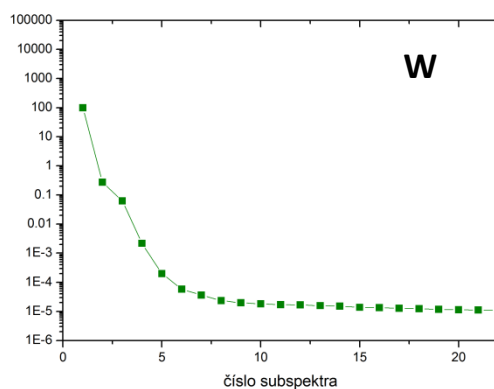
Pro 100 \times ředěný LUV jsou v diferenciálních spektrech dobře identifikovatelné pásy amidu I (1656 cm^{-1}) i amidu II (1543 cm^{-1}). To je důsledkem výrazně vyšší koncentrace peptidu ve srovnání s lipidem (4.18a). Druhé subspektrum pro nižší oblast odpovídá poklesu pásu o 1627 cm^{-1} , který odpovídá β -skládanému list, který by měl při přechodu v α -šroubovici ubývat (viz referenční měření v 4.1 CD spektra na obr. 4.1). Naopak třetí subspektrum (pro oblast nižších vlnočtů) odpovídá poklesu spektra lipidu, což je pravděpodobně způsobeno jednak částečnou rehydratací vzorku a jednak nasedáním značného množství peptidu na lipid ve vzdálenosti penetrace evanescentní vlny. Pro vyšší oblast vlnočtů je znatelný nárůst prvního subspektra (4.18b) vody na 3226 cm^{-1} . Z porovnání spekter po přidání 2 μl peptidu se 100 \times ředěným LUV a s přidáním 2 μl vody vyplívá zajímavý fakt. Totiž, zatímco vzorek s peptidem je stabilní již po 5 minutách a vydržel tak až dokonce měření vzorek s vodou byl nestabilní. Překvapující je také, že vzorek s vodou za stejnou dobu vyschl natolik, že signál lipidu byl silnější než pro vzorek s proteinem.





Obrázek 4.18a – Faktorová analýza spekter interakce 2 μl peptidu HAL-1 a 100 \times ředěné lipidové vrstvy pro spektrální oblast 930–1850 cm^{-1} . Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .





Obrázek 4.18b – Faktorová analýza spekter peptidu 2 μl HAL-1 a $100\times$ ředěné lipidové vrstvy pro spektrální oblast $2700\text{--}3850\text{cm}^{-1}$. Vynesena jsou jednotlivá subspektra značena S_j , kde j značí číslo daného subspektra, faktorové váhy V_{ij} a vlastní čísla W .

Diskuse a závěr

Cílem našich měření bylo zajistit podmínky vzniku a udržení lipidové dvojvrstvy na povrchu ATR hranolu a zjistit za jakých podmínek je systém stabilní a po jak dlouhou dobu, aby bylo možné provést ATR-FTIR měření v polarizovaném světle v dostatečné kvalitě a rozlišení.

Námi navržený způsob detekce vysychání vody i lipidu se následným užitím faktorové analýzy ukázal být vhodným pro určování vyschnutí dvojvrstvy. Zajímavý byl obzvláště možný fázový přechod lipidové vrstvy v průběhu jejího vysychání, který nejspíše odpovídá navázání a uvolnění určitého množství vody na lipidové řetězce. Značný vliv rehydratace vodou obsaženou ve vzorku jsme odstranili porovnáním rehydratace a poklesu pásů lipidu pro různé objemy vzorku, jak bylo popsáno výše. S uvážením zachování co nejvyššího množství peptidu se jeví jako nejvhodnější objem přidávaného vzorku peptidu 2 μ l, přičemž během celého měření jsme zachovávali koncentraci peptidu 10mg/ml. Dále jsme ředili LUV právě k dosažení co nejvýraznějšího signálu peptidu. Vynikající výsledky přináší 10 \times ředěný lipid, který zachovává silný signál lipidu, ale v diferenciálních spektrech odhaluje pásy jak pro amid I, tak i pro amid II. Nevýhodou této koncentrace je, ale kratší stabilita \sim 9 minut v porovnání se 100 \times ředěným vzorkem jež je stabilní až po 12 minut při zakrytí vzorkového prostoru. Lipid v obou koncentracích je stabilní prakticky okamžitě a i pro 10 \times ředěný LUV je znatelně stabilnější systém se vzorkem peptidu, nežli se vzorkem vody o stejném objemu (8 minut). Může to být vysvětleno vznikem ochranné vrstvy peptidu na povrchu vzorku, která zpomaluje vysychání systému. To odpovídá tzv. „cheerios efektu“, kdy jsou kapilárními silami přitahovány peptidy na povrch vysychající kapky a tvoří zde film zabraňující vysychání (Vermant, 2011). Pro studium interakce peptidu s membránou je podstatné zjištění protektivního vlivu peptidu na spektrum lipidu, jež může být vysvětlen stabilizací membrány interakcí typu kobercové struktury. Jelikož faktorová analýza i diferenciální spektra pro ředěný lipid nabízí možnost sledovat vibrace amidu I a II, je dalším podstatným jevem pozorování změny struktury, které lze v tomto případě popsat jako přechod peptidu do α -šroubovice, což odpovídá referenčním měřením a ukazuje na zachování mechanismu interakce HAL-1 s lipidem i v případě tvorby definované lipidové vrstvy na ATR hranolu.

Ukázali jsme tedy, že lze dosáhnout vzniku dvojvrstvy imitující buněčnou membránu, která po přidání vzorku tvoří dostatečně dlouho stabilní systém, aby mohla být naměřena polarizovaná spektra a určena orientace peptidu v membráně. Naznačili jsme vhodný způsob detekce vyschnutí i účelnost ředění pro lepší odečet signálu peptidu. Vzhledem k značnému množství informací získaných z našich měření přinese dozajista polarizované měření řadu zajímavých údajů o interakci AMP a membrány a umožní nám snad tak alespoň trochu pochopit její podstatu.

Seznam použité literatury

- Alberts B., Johnson A., Lewis J. *et al* (2008): *The Cell*, Garland Science, New York.
- Barth A. (2007): Infrared spectroscopy of proteins; *Biochimica et Biophysica Acta* **1767**, 1073–1101.
- Berova N., Nakanishi K. Woody R.W. *et al* (2000): *Circular dichroism Principles and Applications*, John Wiley & Sons, New Jersey
- Blondelle S. E., Lohner K., Aguilar M.-I. (1999): Lipid-induced conformation and lipid-binding properties of cytolytic and antimicrobial peptides: determination and biological specificity. *Biochimica et Biophysica Acta* **1462**, 89–108.
- Brandenburg K., Garidel P., Fukuoka S. *et al.*(2010): Molecular basis for endotoxin neutralization by amphipathic peptides derived from the α -helical cationic core-region of NK-lysin. *Biophysical chemistry*, **150**, 80–87.
- Brdička R., Dvořák J. (1971): *Základy fyzikální chemie*. Academia, Praha.
- Castellano P., Vignolo G., Fariás R. N. *et al.* (2007): Molecular view by Fourier transform infrared spectroscopy of the relationship between Lactocin 705 and membranes: Speculations on antimicrobial mechanism. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 415–420.
- Dousseau F., Therrien M., Pézolet M. (1989): On the spectral subtraction of water from the FT-IR spectra of aqueous solutions of proteins. *Applied Spectroscopy* **43**, 538–542.
- Fjell C. D. , Hiss J. A. , Hancock R. E. *et al.* (2011): Designing antimicrobial peptides: form follows function. *Nature Review Drug Discovery* **11**, 37–51.
- Goormaghtigh E., Raussens V., Ruyschaert J.-M. (1999): Attenuated total reflection infrared spectroscopy of proteins and lipids in biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1422**, 105–185.
- Greenfield N. J. (2007): Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure, *Nature protocols* **1**, 2876–2890.
- Griffiths P. R., de Haseth J. A. (2007): *Fourier Transform Infrared Spectrometry*, John Wiley & Sons, New Jersey.
- Hebák P. & Hustopecký J. (1987): *Vícerozměrné statistické metody s aplikacemi*. SNTL/ALFA, Praha.
- Héquet A., Humblot V., Berjeaud J.-M., Pradier C.-M. (2011): Optimized grafting of antimicrobial peptides on stainless steel surface and biofilm resistance tests. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **84**, 301–309.
- Hoskin D. W., Ramamoorthy A. (2008): Studies on anticancer activities of microbial peptides. *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**, 357–375.
- Jass J., Tjärnhage T, Puu G (2000): From Liposomes to Supported, Planar Bilayer Structures on Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces: An Atomic Force Microscopy Study. *Biophysical Journal* **79**, 3153–3163

- Kayser F. H., Bienz K. A., Eckert J., *et al.* (2004): Medical Microbiology, Thieme, Zurich
- Kelly S. M., Jess T. J., Price N.C., (2005): How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta* **1751**, 119-139.
- Kopecký V. (1998): *Fyzika molekulárních a biologických systémů*. Diplomová práce na MFF, Praha
- La Rocca P., Shai Y., Sansom M. S. P. (1999): Peptide-bilayer interactions: simulations of dermaseptin B, an antimicrobial peptide. *Biophysical Chemistry* **76**, 145–159.
- Litwińczuk A., Petrus J., Czarnik-Matusiewicz B. (2012): Orientation of solid supported lipid bilayers examined by β v-correlation analysis. *Vibrational Spectroscopy* **60**, 173–179.
- Monincová L., Budešínský M., Slaninová J., *et al.* (2010): Novel antimicrobial peptides from the venom of the eusocial bee *Halictus sexcinctus* (Hymenoptera: Halictidae) and their analogs. *Amino Acids* **39**, 763–775.
- Moore W. J. (1981): *Fyzikální chemie*. SNTL, Praha.
- Murray R. K., Granner D. K., Mayes P.A. *et al.* (1998): *Harperova Biochemie*. H&H, Jinočany.
- Neira J. L., Contreras L. M., Ruiz de los Paños *et al.* (2010): Structural characterisation of the natively unfolded enterocin EJ97; *Protein Engineering, Design & Selection* **23**, 507–518.
- Nguyen K., Le Clair S. V., Ye S., Chen Z. (2009): Molecular interaction between Magainin 2 and model membranes *in situ*; *Journal of Physical Chemistry B*. **113**, 12358–12363.
- Nguyen K. T., King J. T., Chen Z. (2010): Orientation determination of interfacial β -sheet structures *in situ*. *Journal of Physical Chemistry B* **114**, 8291–8300.
- Pazderková M., Kočišová E., Pazderka T. *et al.* (2012) Antimicrobial peptide from the eusocial bee *Halictus sexcinctus* interacting with model membranes. *Spectroscopy: An International Journal* **27**, 497–502.
- Prosser V., Bakule R., Balgavý P. *et al.* (1989) *Experimentální metody biofyziky*. Academia, Praha.
- Reder-Christ K., Falkenstein-Paul H., Klocek G *et al.* (2011): Model membrane approaches to determine the role of calcium for the antimicrobial activity of friulimicin. *International Journal of Antimicrobial Agents* **37**, 256–260.
- Roger A., Ismail M. A. (2000): Introduction to circular dichroism. V Gore M. G. (Ed.) *Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach*, John Wiley & Sons, New Jersey.
- Russell A. L., Kennedy A. M., Spuches A. M. *et al.* (2010): Spectroscopic and thermodynamic evidence for antimicrobial peptide membrane selectivity. *Chemistry and Physics of Lipids* **163**, 488–497.
- Russell A. L., Kennedy A. M., Spuches A. M. *et al.* (2011): Determining the effect of the incorporation of unnatural amino acids into antimicrobial peptides on the

- interactions with zwitterionic and anionic membrane model systems. *Chemistry and Physics of Lipids* **164**, 740–758.
- Russell A. L., Spuches A. M., Williams B. C. *et al.* (2011): The effect of the placement and total charge of the basic amino acid clusters on antibacterial organism selectivity and potency. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **19**, 7008–7022.
- Shanmugam G., Phambu N., Polavarapu P. L. (2011): Unusual structural transition of antimicrobial VP1 peptide. *Biophysical Chemistry* **155**, 104–108.
- Stan C., Severcan F., Dorohoi D. (2006): Effect of gramicidin S on the dipalmitoylphosphatidylglycerol thermotropic phase transition in DPPG/GS systems: A mathematical approach. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* **457**, 27–41.
- Sukumaran S., Hauser K., Rausher A., *et al.* (2005): Thermal stability of outer membrane protein porin from *Paracoccus denitrificans*: FT-IR as a spectroscopic tool to study lipid-protein interaction. *FEBS Letters* **579**, 2546–2550
- Tamm L. K. & Tatulian S. A. (1997): Infrared spectroscopy of proteins and peptides in lipid bilayers; *Quarterly Reviews of Biophysics* **30**, 365–429.
- Tatulian S. (2003): Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A method of choice for studying membrane proteins and lipids. *Biochemistry*, **42**, 11898–11907.
- Vermant J. (2011): When shapes matters, *Nature*, **476**, 286–287 Whitmore L. and Wallace B. A. (2004): DICHROWEB: an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data. *Nucleic Acids Research* **32**, 668–673.
- Won A., Kan M, Gustin S. *et al.* (2011): Investigating the effects of L- to D-amino acid substitution and deamidation on the activity and membrane interactions of antimicrobial peptide anoplin. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**, 1592–1600.
- Ye S., Nguyen K. T., Chen Z. (2010): Interactions of Alamethicin with model cell membranes investigated using sum frequency generation vibrational spectroscopy in real time *in situ*. *Journal of Physical Chemistry B*. **114**, 3334–3340.
- Yeaman M. R & Yount N. A, (2003): Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacology. Reviews* **55**, 28–55.
- Yin L. M., Edwards M. A., Li J., Yip C. M. Deber C. M. (2012): Roles of hydrophobicity and charge distribution of cationic antimicrobial peptides in peptide–membrane interactions. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 7738–7745.
- Zasloff M. (2002): Antimicrobial peptides of multicellular organisms; *Nature* **415**, 389–395.

Seznam použitých zkratk

AMP – antimikrobiální peptidy

ATR – zeslabená totální reflexe (attenuated total reflection)

CD – (elektronový) cirkulární dichroismus

DRIFTS – Metoda difúzní reflexe (diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy)

ECD – elektronový cirkulární dichroismus

FTIR – infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (Fourier-transform infrared)

PC – 1,2-dipalmitoyl-sn.glycer-3.fosfocholin

PE – fosfatidylethanolamin

PG – 1,2-dipalmitoyl.sn-glycerol

PS – fosfatidyl serin

SDS – dodecylsulfát sodný

SM – sfingomyelin

VCD – vibrační cirkulární dichroismus

LUV– velké unilamelární vesikuly (large unilamellar vesicle)

SUV– malé unilamelární vesikuly (small unilamellar vesicle)

