

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



VLIV METHANOLU NA STRUKTURU LYSOZYMU

Influence of methanol on lysozyme structure

Bakalářská práce
studijního programu Klinická a toxikologická analýza

UNIVERZITA KARLOVA v Praze
Přírodovědecká fakulta
Oborová knihovna chemie
Albertov 6, 128 43 Praha 2
IČO: 00216208, DIČ: CZ00216208
UK 21

stud

pr.č.: 137 b / 08 (brock)

Klíčová slova: stabilita bílkovin
struktura lysozymu
vliv methanolu
absorpční spektrofotometrie

Předmětová hesla: UV-VIS spektrofotometrie
diferenční spektrofotometrie
derivační spektrofotometrie

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. 9. 2008

Kateřina Toupalová
.....
podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc při vypracování mé bakalářské práce. Rovněž bych chtěla poděkovat všem členům katedry biochemie za pomoc a příjemné prostředí, které mi poskytovali v průběhu celé mé práce. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia.

Seznam použitých symbolů a zkratk

A	absorbance
AMK	aminokyselina/y
CD	cirkulární dichroismus
G	Gibsova energie
G ⁻	gram-negativní
G ⁺	gram-pozitivní
H	entalpie
HEWL	slepičí lysozym z vaječného bílku
IR	infračervená oblast
NAG	N-acetyl-D-glukosamin
NAM	N-acetylmuramová kyselina
NMR	nukleární magnetická rezonance
pK _a	záporný dekadický logaritmus aciditní disociační konstanty
S	entropie
s	sekunda
SDS	dodecylsulfát sodný
SPDS	perturbační diferenční spektrofotometrie pomocí rozpouštědla
T	teplota
TPDS	teplotně perturbační diferenční spektrofotometrie
UV	ultrafialová oblast
V	objem
VIS	viditelná oblast
ε	extinkční koeficient
λ	vlnová délka

Obsah

Seznam použitých symbolů a zkratk.....	4
1 Přehled literatury.....	7
1.1 Prostorové uspořádání a stabilita bílkovin	7
1.2 Denaturace proteinů.....	9
1.3 Lysozym	10
1.3.1 Vlastnosti lysozymu	10
1.3.2 Struktura a prostorové uspořádání slepičího lysozymu z vaječného bílku.....	11
1.3.3 Další typy lysozymu	12
1.3.4 Stabilita, inaktivace a denaturace lysozymu.....	14
1.3.5 Porovnání lysozymu a α -laktalbuminu	14
1.4 Spektrofotometrické metody pro studium bílkovin	15
1.4.1 Vznik absorpčních spekter bílkovin	16
1.4.2 Absorpční spektra bílkovin.....	16
1.5 Diferenční spektrofotometrie.....	17
1.5.1 Vznik diferenčního spektra.....	17
1.5.2 Perturbace spekter bílkovin.....	19
1.5.3 Měření diferenčního spektra	21
1.6 Derivační spektrofotometrie	22
1.6.1 Pojem derivační spektrum	22
1.6.2 Získání derivačních spekter	23
1.6.3 Využití derivačních spekter	25
1.6.4 Derivační spektra lysozymu	26
2 Cíl práce.....	27
3 Experimentální část.....	28
3.1 Materiál a přístroje.....	28
3.1.1 Použité chemikálie.....	28
3.1.2 Použité laboratorní přístroje	28
3.2 Postup	28
3.3 Metody	29
3.3.1 Měření absorpčních spekter	29
3.3.2 Zpracování experimentálních dat	29

4 Výsledky a diskuse.....	31
4.1 Vliv pH.....	31
4.1.1 Absorpční spektra	31
4.1.2 Spektra první derivace	31
4.1.3 Spektra druhé derivace	32
4.2 Vliv methanolu při pH 3,08.....	33
4.2.1 Absorpční spektra	33
4.2.2 Spektra první derivace	34
4.2.3 Spektra druhé derivace	35
4.2.4 Diferenční spektra.....	37
4.3 Vliv methanolu při pH 1,87.....	37
4.3.1 Absorpční spektra	37
4.3.2 Spektra první derivace	38
4.3.3 Spektra druhé derivace	40
4.3.4 Diferenční spektra.....	41
4.4 Vyhodnocení vlivu methanolu pomocí parametru d	42
5 Závěr	45
6 Použitá literatura	46

1 Přehled literatury

1.1 Prostorové uspořádání a stabilita bílkovin

Globulární bílkoviny zaujímají mezi ostatními přírodními i syntetickými polymery zvláštní postavení, protože vytvářejí poměrně definovanou prostorovou strukturu. Tato nativní struktura zůstává i ve vodném roztoku kompaktní a do jejího nitra nepronikají molekuly rozpouštědla. Celkovou energetickou bilanci vytvoření nativní struktury molekuly lze napsat v symbolickém tvaru (1).

$$\Delta G_{celk} = \Delta H_{mol} + \Delta H_{rozp} - T\Delta S_{mol} - T\Delta S_{rozp} \quad (1)$$

Hodnota Gibsovy energie (ΔG_{celk}) rozhoduje o stabilitě nativní struktury, vyjadřuje tedy schopnost, se kterou bude bílkovina odolávat denaturaci. Jednotlivé členy na pravé straně rovnice symbolizují příspěvek vazebné energie intramolekulárních interakcí (ΔH_{mol}), entalpický zisk interakce s rozpouštědlem (ΔH_{rozp}), entropickou ztrátu řetězce, která je dána vzrůstem jeho uspořádanosti v nativní struktuře (ΔS_{mol}) a entropickou bilanci interakce s rozpouštědlem (ΔS_{rozp}), T označuje teplotu.^{1,2}

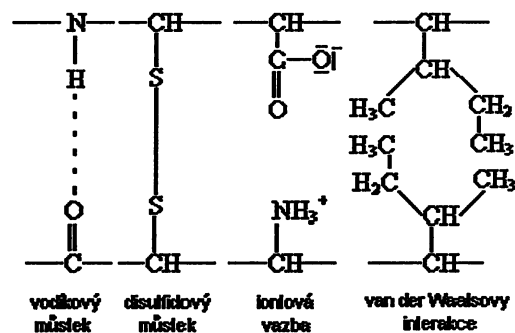
Na stabilizaci nativní struktury se podílejí různé typy intramolekulárních interakcí (obr. 1).²⁻⁴ Vedle disperzních sil jsou to různé typy elektrostatického působení, kovalentní a koordinačně-kovalentní vazby, především s nebílkovinnými složkami molekuly. Významnou roli mají také interakce s rozpouštědlem.

Z kovalentních vazeb mezi postranními řetězci aminokyselin se uplatňují zejména disulfidové můstky. Ty vznikají oxidací thiolových skupin postranního řetězce cysteinu. Formují se obvykle až po vytvoření celkové struktury molekuly a přispívají tedy ke stabilizaci již vytvořených struktur nebo modifikují jejich mechanické vlastnosti.

Výzkum kovalentních a koordinačně kovalentních vazeb mezi postranními řetězci a prostetickými skupinami, resp. ionty, pro stabilizaci a tvorbu struktury není dosud plně objasněn. Tyto interakce se mohou významně podílet na stabilizaci a tvorbě terciární struktury příslušných postranních řetězců, ale i struktury přilehlých segmentů hlavního řetězce.

Asymetrické rozložení valenčních elektronů v heteronukleárních vazbách způsobuje nerovnoměrné rozložení náboje v molekule. Molekula bílkoviny představuje složitou soustavu nábojů a elektrostatické interakce mezi nimi jsou významným faktorem pro stabilitu a tvorbu prostorové struktury. Příkladem elektrostatické interakce je iontový pár (obr. 1). Nejvýznamnější iontové páry jsou tvořeny ionizovatelnými postranními řetězci. Hodnoty pK_a těchto skupin velmi závisí na jejich bezprostředním okolí v molekule. Iontové páry se podílejí na stabilizaci terciární struktury a jejich působení je ještě výraznější v nepolárním prostředí. Energie elektrostatické interakce mezi dipóly je řádově menší, avšak její příspěvek ke stabilizaci celkové struktury může být znásoben pravidelným uspořádáním dipólů jako je tomu např. ve struktuře α -helixu.

Jako zvláštní případ elektrostatické interakce mezi dipóly lze považovat vodíkové vazby (obr. 1). Jejich význam v rozpustných proteinech se projevil o něco menší, než se původně soudilo. Hrají významnou roli při utváření struktury v oblasti s nízkou relativní permitivitou. Pravidelné sekundární struktury jsou právě výsledkem existence pravidelných systémů vodíkových vazeb. Tím tedy poukazují na význam tohoto typu interakce pro vytváření nativní struktury i pro její stabilitu.^{2,4}



Obr. 1: Schéma vodíkového a disulfidového můstku, iontové vazby (solný můstek) a van der Waalsovy interakce.

V zásadě elektrostatické povahy jsou také tzv. van der Waalsovy interakce (obr. 1), které se uplatňují mezi dvojicemi zcela nepolárních atomů. Vznik těchto sil lze přisuzovat vzájemnému přitahování dočasných dipólů, které se vytvářejí v důsledku asymetrického rozložení elektronů. Van der Waalsovy interakce mají přes svou poměrně malou energii značný význam pro strukturu bílkovin. Vzhledem k velkému počtu atomů a kontaktů mezi nimi je jejich celkový energetický efekt dosti velký.

V neposlední řadě má vliv na strukturu bílkovin tzv. hydrofobní efekt.²⁻⁴ V dnešní době je tomuto jevu připisován rozhodující význam pro stabilizaci a tvorbu struktury bílkovin. Tímto pojmem se označuje tendence nepolárních látek ve vodném prostředí ke vzájemné asociaci. Jeho podstatou je spíše absence vazby mezi rozpuštěnou látkou a vodou, nežli existence nějakých specifických interakcí mezi nepolárními molekulami. Molekuly bílkoviny mají snahu zaujmout strukturu s co nejmenším povrchem a jejich nepolární postranní řetězce mají tendenci se vzájemně seskupovat a vytvářet tak nepolární jádro molekuly.

1.2 Denaturace proteinů

Nízká stabilita nativní konformace proteinů umožňuje jejich denaturaci změnou rovnováhy slabých nevalebných sil, které je zachovávají v nativní konformaci. Vlivů, které způsobují denaturaci, je mnoho.^{3,4}

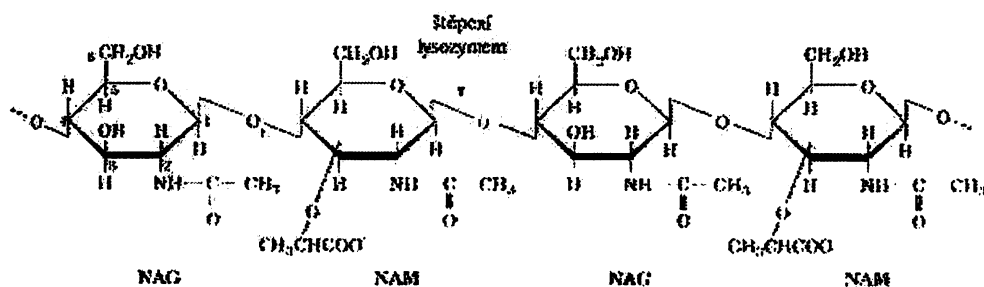
- Zvýšení teploty způsobuje změnu vlastností závislých na konformaci (optická rotace, viskozita a absorpce UV), vlastnosti se náhle mění v úzkém teplotním rozmezí, tyto nespojitě změny naznačují, že nativní struktura proteinu se rozvíjí kooperativně - jakékoliv částečné rozvinutí struktury destabilizuje zbytek struktury.
- Změny pH mění ionizaci postranních řetězců aminokyselin, důsledkem toho se mění rozložení náboje proteinu.
- Některé detergenty nebo také vysoké koncentrace organických látek rozpustných ve vodě (alifatické alkoholy) narušují hydrofobní efekt a tím i nativní strukturu proteinu.
- Vliv solí, resp. iontů je rozmanitější. Ionty se sklonem k denaturaci proteinů se nazývají chaotropní. Tyto činidla zvyšují rozpustnost nepolárních látek ve vodě, jejich účinnost jako denaturačních činidel je důsledek jejich schopnosti narušit hydrofobní efekt. Látky, které stabilizují proteiny, zvyšují hydrofobní efekt, a tím zvyšují schopnost vody proteiny vytlačovat.

1.3 Lysozym

V roce 1922 Alexandr Fleming objevil enzym způsobující rozpad určitých bakterií. Tento enzym byl pojmenován lysozym. Jedná se o protein, který se hojně vyskytuje v přírodě. U člověka byl zjištěn v slzách, nosním sekretu, slinách, krevním séru a plazmě, ale nalezen byl také ve tkáních a sekretech různých druhů živočichů (obratlovců i bezobratlých) a u rostlin. Rozpoznán byl rovněž u některých bakterií. Přítomnost všech těchto enzymů byla odhalena díky lytickému působení na gram-pozitivní koky, izolované Flemingem a pojmenované *Micrococcus lysodeikticus*.⁵

1.3.1 Vlastnosti lysozymu

Lysozym je glykosidasa, která hydrolyzuje N-acetylhexosaminovou vazbu v chitinu a β -1,4-glykosidickou vazbu mezi N-acetyl-D-glukosaminem (NAG) a N-acetylmuramovou kyselinou (NAM) v buněčných stěnách bakterií (obr. 2).⁶



Obr. 2: Struktura β -1,4-glykosidické vazby mezi jednotkami NAG a NAM v bakteriální stěně. (podle³, upraveno)

Tento enzym je znám především svou baktericidní aktivitou na gram-pozitivní (G^+) bakterie. Některé studie však prokázaly, že při určité úpravě a za určitých podmínek má baktericidní účinky i na gram-negativní (G^-) bakterie. Touto úpravou může být lipofilizace lysozymu mastnými kyselinami, která způsobuje snazší průnik skrze ochrannou bariéru a tím i rozpad peptidoglykanové vrstvy u G^- bakterií. Také glykosylace v kombinaci s touto metodou projevuje stejné účinky.^{7,8}

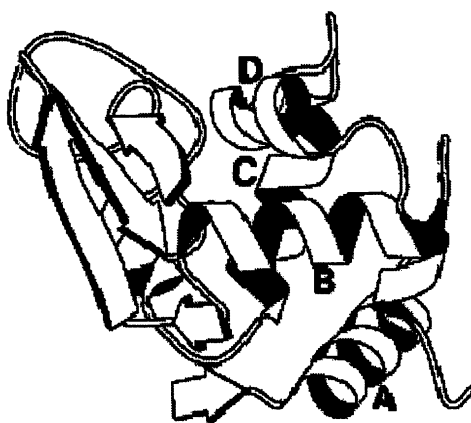
Lysozym se osvědčil také jako konzervační činidlo rozmanitých potravin, například čerstvého ovoce, zeleniny, masa, mořských plodů a vína.⁹

Vlastnosti lysozymu závisí především na typu lysozymu, tedy z jakého zdroje byl izolován. Společnou vlastností je právě působení na β -1,4-glykosidickou vazbu

mezi NAG a NAM. Molekulová hmotnost je poměrně nízká, pohybuje se okolo 14700, výjimku tvoří rostlinný lysozym s molekulovou hmotností kolem 25000. Slepíčí lysozym z vaječného bílku má izoelektrický bod mezi pH 10,5 - 11 a pH optimum pro lýzi buněk je kolem 7. Tento druh lysozymu dokáže štěpit vysokomolekulární i nízkomolekulární substráty. Téměř všechny druhy lysozymu mají podobné vlastnosti jako slepičí lysozym z vaječného bílku. Tento lysozym a jeho podobné formy se označují jako tzv. c-typ.¹⁰ Rozdíly mezi jednotlivými typy lysozymu budou podrobněji popsány v kapitole 1.3.3.

1.3.2 Struktura a prostorové uspořádání slepičího lysozymu z vaječného bílku

Slepíčí lysozym z vaječného bílku (HEWL - hen egg white lysozyme) je globulární protein, který se skládá ze 129 AMK zbytků. Tato struktura je rozdělena na dvě domény s aktivním místem v hluboké štěrbině mezi nimi. Zbytky AMK 1 - 35 a 85 - 129 tvoří doménu se čtyřmi α -helikálními strukturami a krátkou 3_{10} šroubovici poblíž C konce. Druhá doména, zahrnující zbytky AMK 36 - 84, obsahuje dlouhou smyčku, trojitý pás antiparalelní struktury β a 3_{10} šroubovici. Další krátká oblast β -struktury spojuje zbytky AMK 2 a 3 se zbytky AMK 39 a 40. Celkové prostorové uspořádání proteinu je na obr. 3. Struktura je upevněna čtyřmi disulfidovými můstky mezi AMK 6 a 127, 64 a 80, 76 a 94, 30 a 115.¹¹



Obr. 3: Schematický diagram znázorňující hlavní řetězec HEWL. Čtyři λ -helikální struktury jsou označeny písmeny A - D. (převzato¹¹)

1.3.3 Další typy lysozymu

Lidský lysozym

Lidský lysozym má podobnou strukturu jako lysozym izolovaný ze slepičího vaječného bílku. Zásadním rozdílem je vložený aminokyselinový zbytek glycinu na pozici 48. Díky tomu se lidský lysozym skládá ze 130 aminokyselinových zbytků. Tyto dva proteiny vykazují také rozdíly v kinetice skládání jejich nativní struktury, přičemž celková rychlost renaturace nativní struktury lidského lysozymu je rychlejší než u slepičího lysozymu, přestože základní proces skládání těchto dvou proteinů je podobný.^{12,13}

Pomocí iontové chromatografie byl z leukocytů zdravého člověka izolován pouze jeden biologicky aktivní pík lysozymu. Ale z leukocytů pacienta s chronickou leukemií byly izolovány a charakterizovány tyto biologicky aktivní píky dva. Také ve vzorku moči pacienta byly nalezeny dvě formy lysozymu. První aktivní pík ze vzorku pacienta byl eluován ve stejném rozsahu jako obvyklý enzym, ale druhý měl zásaditější chování. Studium molární hmotnosti, aminokyselinového složení, UV spektra a elektroforetického chování nerozlišilo dva enzymové píky, ačkoliv jejich chování při rechromatografii prokázalo odlišný obsah dusíkatých amidů. Snížený obsah amidů je připisován nižší amidaci, která je důsledkem menší životnosti lysozymu u mladých buněk pacienta s leukemií.¹⁰

Myší lysozym

Také u myší byly nalezeny dva typy lysozymu, lysozym M a P. Lysozym M převažuje ve většině myší tkáně kromě tenkého střeva, kde dominuje naopak lysozym P.¹⁴ Oba tyto typy, které jsou produkty různých genů a liší se sedmi substitucemi v prvním exonu,¹⁵ projevíly podobné fyzikální, chemické i enzymové vlastnosti jako lidský a vaječný lysozym, ale rozdílnou funkci v organismu myši. První polovina sekvence myšího lysozymu je podobná sekvenci lidského lysozymu. Je zde zahrnut opět vložený Gly na pozici 48. Oba lysozomy vykazují typické rysy sekvence savčích lysozymů.¹⁶

Kachní lysozym

Gelovou filtrací a iontovou chromatografií byl lysozym purifikován ze vzorků vaječného bílku několika druhů kachen. U všech vzorků bylo zjištěno, že tři píky obsahují materiál aktivní proti *Micrococcus lysodeikticus*. Ze dvou píků byl izolován lysozym, který neobsahoval žádný His zbytek. Tyto dva enzymy měly elektroforetické i imunologické vlastnosti stejně jako jejich chování v přítomnosti inhibitoru mírně odlišné. To může být způsobeno rozdílnou sekvencí AMK, neboť bylo zjištěno, že ve své sekvenci se liší šesti substitucemi.¹⁰

Lysozym z vaječného bílku husy

Husí lysozym je odlišný od lysozymů izolovaných z vaječného bílku ostatních ptáků zahrnujících i kachnu. To je poněkud překvapivé vzhledem k příbuznosti těchto dvou druhů ptáků. Husí lysozym je tepelně nestabilní, zřejmě kvůli nižšímu obsahu cysteinu a tryptofanu. Není inhibován stejnými molekulami jako ostatní lysozomy (např. acetylglukosaminem) a neštěpí nízkomolekulární substráty.¹⁰

Lysozomy bezobratlých

Byly provedeny studie lysozymů izolovaných z velkého počtu bezobratlých živočichů. Stopy enzymu byly nalezeny téměř ve všech případech. Větší množství bylo zjištěno u hmyzu, ostnokožců a kroužkovců. Všechny tyto enzymy se mohou zařadit do třídy enzymů, která zahrnuje i slepičí lysozym z vaječného bílku a lidský lysozym.¹⁰

Rostliné lysozomy

Také u rostlin byla zjištěna přítomnost lysozymu, především v latexu. Tento typ lysozymu má větší molekulovou hmotnost, nižší pH optimum a vyšší teplotní optimum pro lýzi *Micrococcus lysodeikticus* ve srovnání se slepičím lysozymem.¹⁰

1.3.4 Stabilita, inaktivace a denaturace lysozymu

V kyselé oblasti pH je lysozym velmi stabilní, dokonce i při vysokých teplotách. Naopak v alkalickém prostředí termální stabilita klesá a lysozym ztrácí lytickou aktivitu. Tato extrémní stabilita je způsobena především disulfidovými vazbami, proto každá reakce, která narušuje disulfidové můstky vede ke snížení stability nebo k úplné inaktivaci.^{5,17} Nízká koncentrace chloridu sodného stabilizuje lysozym proti tepelné inaktivaci, zatímco přítomnost cukru má stabilizační efekt spíše při nižší teplotě.⁹

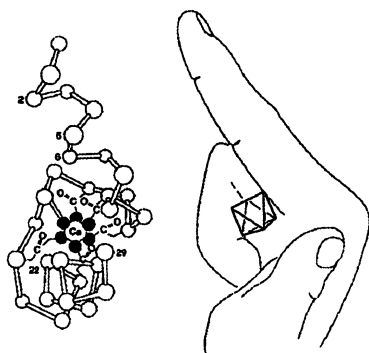
Trypsin, chymotrypsin a papain nedokážou štěpit nativní lysozym, oproti tomu pepsin tuto schopnost má. Každý z těchto proteolytických enzymů je schopen hydrolyzovat denaturovaný lysozym.

V přítomnosti jódu je lysozym neaktivní. Tato reakce je výsledek vzniku nestabilního N-jodidhistidinového zbytku. Při fotooxidaci a působením rentgenového záření je enzym také neaktivní. Denaturace UV zářením může být důsledek narušení tyrosinových zbytků.⁵

1.3.5 Porovnání lysozymu a α -laktalbuminu

Lysozym a α -laktalbumin mají velmi podobné AMK složení a terciární strukturu, ale jejich biologické funkce jsou odlišné. Lysozym je lytický enzym, který katalyzuje hydrolýzu β -1,4-glykosidové vazby mezi NAG a NAM v buněčné stěně bakterií. Laktalbumin je velmi významný protein, který hraje důležitou roli při biosyntéze mléčného cukru. Katalyzuje produkci laktosy z UDP-galaktosy a glukosy.¹⁸

Další odlišnou vlastností těchto dvou proteinů je schopnost vázat ionty vápníku. HEWL nevytváří specifické vazby s ionty vápníku, zatímco α -laktalbumin tyto ionty váže pevně, dokonce pomocí této interakce upevňuje terciární strukturu. Krystalografické studie odhalily, že vazebné místo vápníku α -laktalbuminu má některé charakteristické vlastnosti, které byly zaznamenány u proteinů s motivem EF-hand (obr. 4).¹⁹ Tato struktura má ustálenou oblast, která je tvořena smyčkou, v jejímž blízkém okolí jsou dva helixy (helix-smyčka-helix).^{20,21}



Obr. 4: Znáznornění vazebného místa vápníku, tzv. struktury EF-hand. (převzato²²)

Porovnáním AMK složení lysozymu a α -laktalbuminu bylo zjištěno, že odpovídající Asp zbytky, které jsou součástí EF-hand motivu v α -laktalbuminu jsou zachovány v lysozymu z koňského mléka a v lysozymu z vaječného bílku holuba. Bylo prokázáno, že oba tyto druhy lysozymu jsou schopné silně navázat jeden kation vápníku.¹⁸ Podle dalších studií také lysozymy, které byly izolované z mléka ježury a psa, mohou navázat kation vápníku, protože rovněž mají ve své struktuře zachovanou smyčku podobnou EF-hand motivu.²³ Ačkoliv c-typ lysozymu nemá schopnost vázat vápník, struktura podobná EF-hand motivu je zachována. Byly provedeny studie mutovaného lidského lysozymu, které dokazují, že při záměně AMK v oblasti smyčky dojde k navázání kationtu vápníku a také ke zvýšení strukturální stability.¹⁹

Podle fylogenetického stromu, sestaveného právě na základě schopnosti vázat ionty kovu a AMK složení, se usuzuje, že α -laktalbumin se vyvinul z lysozymu schopného vázat vápník. Při evoluci α -laktalbumin nezískal schopnost vázat ionty kovu, ale naopak lysozym tuto vlastnost ztratil.²⁴

1.4 Spektrofotometrické metody pro studium bílkovin

Mezi velmi často používané metody pro studium proteinové struktury patří krystalografie a nukleární magnetická rezonance (NMR), které určují „absolutní“ strukturu bílkovin a tzv. nepřímé metody, mezi které patří absorpční spektrofotometrie v oblasti ultrafialové (UV), viditelné (VIS) nebo infračervené (IR), Ramanova spektroskopie, cirkulární dichroismus (CD) a fluoescenční metody.²⁵ Ty vypovídají především o změnách struktury. Spektrální techniky jsou široce užívanou metodou také

pro studium změn v okolí aminokyselinových postranních řetězců. Je to díky jejich velké citlivosti, relativně snadnému provedení a nedestruktivnímu charakteru.^{25,26}

Protože absorpční UV-VIS spektroskopie využívá poměrně jednoduchá a obvykle dostupná provozní zařízení, které je součástí většiny biochemických laboratoří, je jednou z nejčastěji používaných metod pro studium bílkovin.

1.4.1 Vznik absorpčních spekter bílkovin

Absorpční spektra bílkovin v UV-VIS oblasti vznikají díky elektronickým přechodům. Spektra jsou vyvolána absorpcí světla, která způsobuje přechod ze základního do excitovaného stavu. Přechody mezi vazebnými a antivazebnými orbitaly π ($\pi \rightarrow \pi^*$) jsou nejčastější příčinou absorpce v UV-VIS oblasti (vlnové délky od 200 do 800 nm) a mají největší intenzitu. Také přechody z nevazebných orbitalů ($n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$) způsobují absorpci v této oblasti, bývají však o něco méně intenzivní. Přítomnost komplexních a velkých konjugovaných systémů se projevuje absorpcí záření převážně ve viditelné oblasti spektra (vlnové délky od 380 do 750 nm). Ve vzdálené ultrafialové oblasti (vlnová délka pod 200 nm) absorbují kromě bílkovin ještě jednoduché anorganické ionty. Měření v této oblasti není běžné, protože tato oblast spektra je z experimentálního hlediska obtížně přístupná.²⁷

1.4.2 Absorpční spektra bílkovin

Hlavními chromoforními skupinami u bílkovin jsou zejména systémy obsahující násobné vazby, což splňují zvláště aromatické postranní řetězce aminokyselin a peptidová vazba. Aromatické aminokyseliny mají dominantní příspěvky v blízké UV oblasti okolo 280 nm. Peptidová vazba absorbuje ve vzdálené oblasti UV v rozmezí vlnových délek 190 - 220 nm. Absorbující složky proteinů jsou tedy peptidové vazby, aromatické AMK jako je tyrosin, tryptofan a fenylalanin, AMK obsahující síru, mezi které patří cystein, cystin, methionin a také absorbuje histidin.^{25,26} Nejvýznamnější chromofory bílkovin jsou uvedeny v tab. 1.

Tab. 1: Nejvýznamnější chromofory bílkovin. (převzato²⁷)

Chromofor	Odpovídající část molekuly	Poloha maxima λ , nm	ϵ_i
—S—	CysS-	235	3200
—SS—	Cystin	250	500
—CONH—	peptidická vazba	225	400
fenyl	Phe	206	8000
		261	220
fenol (ionizovaný)	TyrO-	235	9300
		287	2600
fenol	TyrOH	222	8000
		270	1450
indol	Trp	220	3400
		280	5550
imidazol	His	211	6000

Z absorpčních spekter je možné získat informace o aminokyselinovém složení nebo konformaci bílkoviny, avšak více informací při přímém měření absorpčních spekter v UV oblasti nelze zřetelně pozorovat. Vhodnou technikou měření můžeme potřebné informace z absorpčního spektra zpřístupnit. Touto technikou může být diferenční a derivační spektrofotometrie.²⁷

1.5 Diferenční spektrofotometrie

1.5.1 Vznik diferenčního spektra

Při malé změně tvaru či polohy absorpčního pásu ve spektru bílkoviny (např. následkem změny teploty nebo polaroty prostředí) je vhodné pozorovat tuto změnu porovnáním s absorpčním spektrem původního vzorku bílkoviny. To je možno provést například odečtením absorpčních spekter. Experimentálně se provádí odečítání optické ve dvoupaprskovém spektrofotometru, který používá jako srovnávací vzorek původní vzorek bílkoviny.^{4,27}

Jelikož poloha absorpčního pásu pro danou chromoforní skupinu závisí i na polaritě prostředí, je tato změna polohy absorpčního pásu zajímavá z praktického

hlediska. Tvar diferenčního spektra pak přibližně odpovídá průběhu první derivace absorpčního spektra, což vyplývá z následující úvahy:

$$\text{absorpční spektrum: } \varepsilon = \varepsilon(\lambda) \quad (2)$$

$$\text{pertubované (posunuté) spektrum: } \varepsilon' = \varepsilon(\lambda + \Delta\lambda) \quad (3)$$

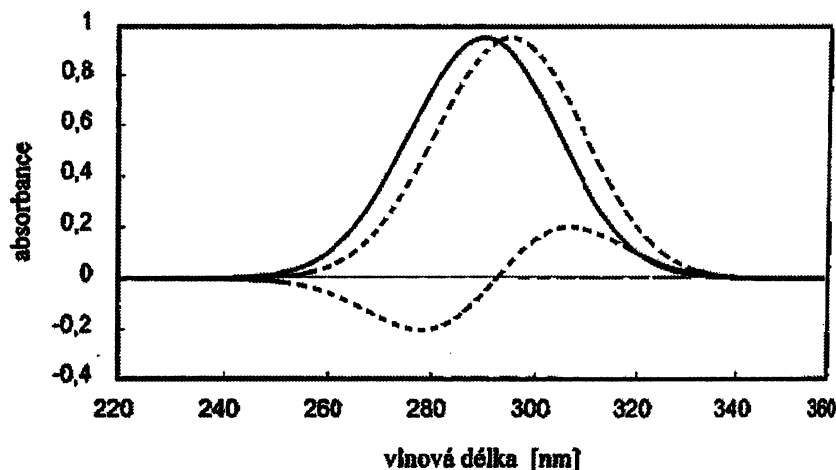
Rozvinutím funkce ε' v Taylorovu řadu podle hodnoty λ_0 se získá vztah:

$$\varepsilon(\lambda_0 + \Delta\lambda) = \varepsilon(\lambda_0) + \frac{\Delta\lambda}{1!} \cdot \left(\frac{d\varepsilon}{d\lambda} \right)_{\lambda_0} + \frac{(\Delta\lambda)^2}{2!} \cdot \left(\frac{d^2\varepsilon}{d\lambda^2} \right)_{\lambda_0} + \dots \quad (4)$$

Je-li posunutí $\Delta\lambda$ malé, je možné třetí člen na pravé straně zanedbat a psát pro rozdíl spekter ε a ε' v okolí bodu λ_0

$$\varepsilon(\lambda + \Delta\lambda) - \varepsilon(\lambda) = \Delta\lambda \cdot \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (5)$$

Na obr. 5 je grafické znázornění vzniku diferenčního spektra posunem absorpčního pásu.



Obr. 5: Grafické znázornění vzniku diferenčního spektra posunem absorpčního pásu. (převzato⁴, upraveno)

V reálných diferenčních spektrech obvykle probíhají složitější děje než jen pouhý posun absorpčního pásu. Při změně expozice nebo obecně změně polarizace v okolí chromoforu často dochází nejen k posunutí maxima, ale i ke snížení intenzity.

Při snížení polarit u většiny chromoforů typických pro bílkoviny dochází k posunutí absorpčního maxima k větším vlnovým délkám, jde o tzv. červený posuv. Při posunutí absorpčního maxima k menším vlnovým délkám nastává tzv. modrý posuv, který je zpravidla pozorován při zvýšení polarit v okolí chromoforů, popř. při denuraci proteinu.²⁶⁻²⁸

1.5.2 Perturbace spekter bílkovin

Nejčastěji používaným způsobem perturbace je změna teploty, koncentrace a pH či přidavek jiné látky k roztoku bílkoviny (např. nízkomolekulární látky, ionty, rozpouštědla).

Perturbace spektra vlivem teploty

Změna teploty výrazně ovlivňuje spektrum bílkoviny, v rozmezí několika desítek stupňů Celsia může způsobit denuraci proteinu. Také důsledkem menších teplotních rozdílů se projevují malé, ale významné změny spekter bílkovin v UV oblasti, i když ještě nedochází k denuraci. Tyto změny jsou charakteristické pro perturbaci hlavně Tyr a Trp zbytků ve vodných roztocích. Poskytují informace o přístupnosti těchto aminokyselinových zbytků na povrchu bílkoviny. Tato metoda se nazývá teplotně perturbační diferenční spektrofotometrie (TPDS). Je založena na předpokladu, že nepřístupné chromofory, umístěné v nepolárním vnitřku bílkoviny se neúčastní na vzniku diferenčního spektra. Teplotně diferenční spektrum je tedy důsledek rozdílu interakcí rozpouštědlo-chromofor bílkoviny při změně teploty. Konformační změny molekuly bílkoviny se tedy nemusejí nutně podílet na vzniku tohoto spektra. Je možné se o tom přesvědčit z průběhu závislosti změny absorbance na rozdílu teplot, která by měla být pro nedenaturující systémy lineární. Při vyhodnocení spekter obdržných z TPDS je třeba vždy porovnání se spektry modelových látek. Porovnáním amplitudy diferenčních spekter s modelovými látkami můžeme získat odhad počtu přístupných chromoforních skupin na povrchu bílkoviny. V tab. 2 je uveden přehled hlavních charakteristik TPDS modelových látek.^{27,29,30}

Tab. 2: Charakteristiky TPDS modelových látek. (podle²⁹, upraveno)

Chromofor	Vlnová délka λ , nm ^a	$\left(\frac{\Delta\varepsilon}{\Delta T}\right)_\lambda$
Phe	270	0,49
Tyr	288	2,71
Trp	292,5	6,50

^a poloha nejvýznačnějšího diferenčního maxima

Perturbace spektra vlivem přidavku další látky (perturbantu)

Tato metoda je starší než TPDS a označuje se SPDS z anglického názvu „solvent perturbation difference spectrophotometry“. Jako perturbant se používají mírně hydrofobní látky v takové koncentraci, která neovlivňuje konformaci nativního proteinu, ale dochází při ní k posunu spekter. Mezi nejpoužívanější perturbanty patří organické nízkomolekulární látky, především rozpouštědla. SPDS využívá citlivosti chromoforových zbytků, které volně přicházejí do kontaktu s rozpouštědlem, na změny fyzikálních vlastností rozpouštědla. Podstatou je, že perturbačnímu efektu rozpouštědla jsou vystavené jen AMK zbytky umístěné na povrchu bílkoviny nebo v jeho blízkosti. Naopak skupiny uvnitř molekuly nejsou změnou složení rozpouštědla zasaženy.³¹ Základ je tedy velmi podobný jako u TPDS, proto i interpretace je analogická - porovnání se spektrem modelové látky ve stejném systému. Při porovnání výsledků z obou metod lze zjistit, že se od sebe přeci jen v něčem liší. Změna rozpouštědla může vést ke konformačním změnám molekuly bílkoviny a tím zkreslit výsledky spekter. Na rozdíl od TPDS, kde se používá jen malých teplotních rozdílů, které většinou neovlivní konformaci molekuly. Určitou nevýhodou je také to, že přidaná látka může přímo reagovat s bílkovinou.^{27, 31}

Další způsoby perturbace spektra^{27,28}

- **perturbace spektra vlivem přidavku iontů**

Při interakci iontů s molekulou bílkoviny není podstatou diferenčních spekter přímá perturbace dostupných aminokyselinových zbytků, ale často způsobují specifické změny konformace celé molekuly bílkoviny nebo blízkého okolí chromoforu. Údaje z diferenčního spektra mohou například posloužit k zjištění disociační konstanty komplexu bílkoviny s ligandem.

- **perturbace spektra vlivem změny koncentrace**

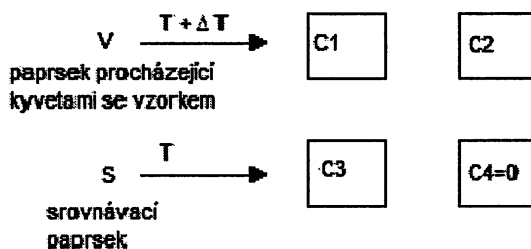
Tato metoda používá rozdílné koncentrace bílkoviny v kyvetách o různých délkách jako perturbujícího činitele. Je založena na měření odchylek od Lambertova-Beerova zákona, způsobených asociací makromolekul v roztoku.

- **perturbace spektra vlivem malých molekul**

Základem mnoha biologických dějů je interakce malých molekul, jako jsou ligandy nebo substrát, s bílkovinnými makromolekulami. Z diferenčních spekter lze získat hodnotu disociační konstanty komplexu enzymu se substrátem. Touto metodou byly také pozorovány konformační změny molekuly bílkoviny jako důsledek interakce, je však třeba tuto metodu ještě kombinovat s dalšími metodami.

1.5.3 Měření diferenčního spektra

K měření diferenčních spekter se přistupuje podle typu použité metodiky. Stejně jako se měří absorpční spektra lze měřit také TPDS - ve dvou kyvetách (vzorková a referenční) s použitím držáků kyvet termostatovaných na dvě různé teploty. Rozdíl teplot způsobuje změnu objemu a tím i molární koncentraci rozpuštěné látky. Pro rozdíly teplot do 20 °C a pro vodné roztoky se mohou tyto koncentrační změny zanedbat, protože jsou menší než 0,5 %. Při použití organických rozpouštědel dochází k větším rozdílům koncentrací, je tedy třeba je buď početně korigovat na roztažnost kapaliny nebo použít čtyřkyvetové uspořádání (obr. 6), které eliminuje vliv absorbance jednotlivých složek.²⁷



Obr. 6: Schéma čtyřkyvetového uspořádání pro měření TPDS. Srovnávací paprsek S prochází kyvetami o teplotě T, koncentrace bílkoviny je c_3 ; kyveta se vzorkem o teplotě $T + \Delta T$ obsahuje vlivem tepelné roztažnosti rozpouštědla bílkovinu o koncentraci c_1 . Pro kompensaci vzniklého rozdílu koncentrací je přidána kyveta s roztokem bílkoviny o koncentraci c_2 . (podle²⁷, upraveno)

1.6 Derivační spektrofotometrie

V blízké UV oblasti absorpčního spektra se projevy jednotlivých chromoforních skupin v proteinu značně překrývají. Jejich spektra jsou tedy často obtížněji interpretovatelná a to omezuje kvalitativní i kvantitativní využití metody. Východiskem z této situace může být výpočet a vnesení první, druhé či vyšší derivace. Tato technika se nazývá derivační spektrofotometrie.³²

1.6.1 Pojem derivační spektrum

Pro výpočet derivačních spekter lze vycházet z obvyklého Lambertova-Beerova zákona:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (6)$$

kde A_{λ} je absorbance, ε_{λ} je molární absorpční koeficient, c je koncentrace a l je délka kyvety.

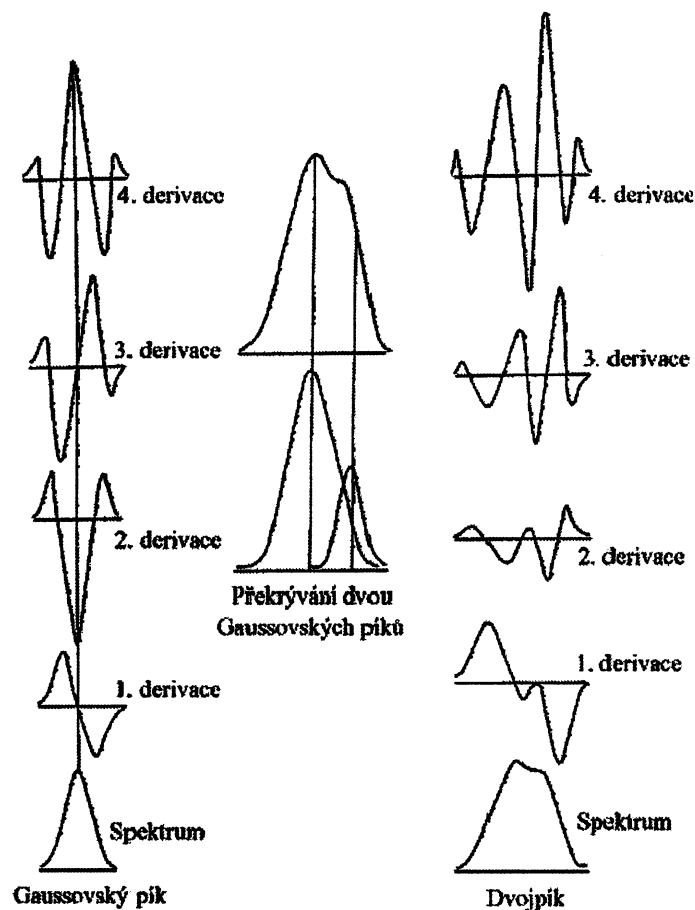
Derivací podle vlnové délky vznikne:

$$\text{první derivace} \quad \frac{dA}{d\lambda} = c \cdot l \cdot \frac{d\varepsilon}{d\lambda} \quad (7)$$

$$\text{druhá derivace} \quad \frac{d^2 A}{d\lambda^2} = c \cdot l \cdot \frac{d^2 \varepsilon}{d\lambda^2} \quad (8)$$

$$\text{n-tá derivace} \quad \frac{d^n A}{d\lambda^n} = c \cdot l \cdot \frac{d^n \varepsilon}{d\lambda^n} \quad (9)$$

Je zřejmé, že společnou vlastností derivačních spekter je jejich lineární závislost na koncentraci. Průběh první až čtvrté derivace pro gaussovský pík a pro pík, ve kterém dochází k překrytí absorpčních pásů je znázorněn na obr. 7.³³

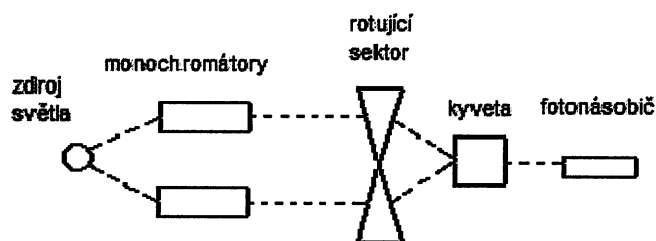


Obr. 7: Grafické znázornění průběhu první až čtvrté derivace pro gaussovský pik a dvojpek. (převzato³⁴)

1.6.2 Získání derivačních spekter

Metody k získání derivačního spektra můžeme rozdělit do dvou hlavních skupin. V jedné skupině je základem modifikace optické části spektrofotometru, ve druhé skupině pak metody, které využívají dodatečné zpracování záznamu z běžných přístrojů připojením přídavného zařízení nebo matematickým zpracováním.

Příkladem měření derivačních spekter modifikací optické části spektrofotometru je technika dvojí vlnové délky. Ta využívá světla rozděleného na dva paprsky, které procházejí dvěma monochromátory, jejichž nastavení se liší o malý interval vlnových délek. Rotující sektor světlo přerušuje a to pak střídavě prochází jedinou kyvetou se vzorkem a dopadá na fotonásobič. Schéma takového spektrofotometru je na obr. 8. Nevýhodou je vyšší pořizovací cena přístrojů se dvěma monochromátory a také to, že u těchto zařízení nelze získat derivace vyšších řádů, proto se dnes již moc nepoužívají.



Obr. 8: Zjednodušené schéma spektrofotometru pro techniku dvojí vlnové délky. (podle²⁷, upraveno)

Další metodou je modulace vlnové délky dopadajícího spektra, kde vlnová délka nastavená na monochromátoru osciluje v malém intervalu $\Delta\lambda$ okolo zvolené hodnoty λ . Ačkoliv je tato metoda velmi komplikovaná, je často využívána v atomové absorpční a fluorescenční spektrofotometrii.

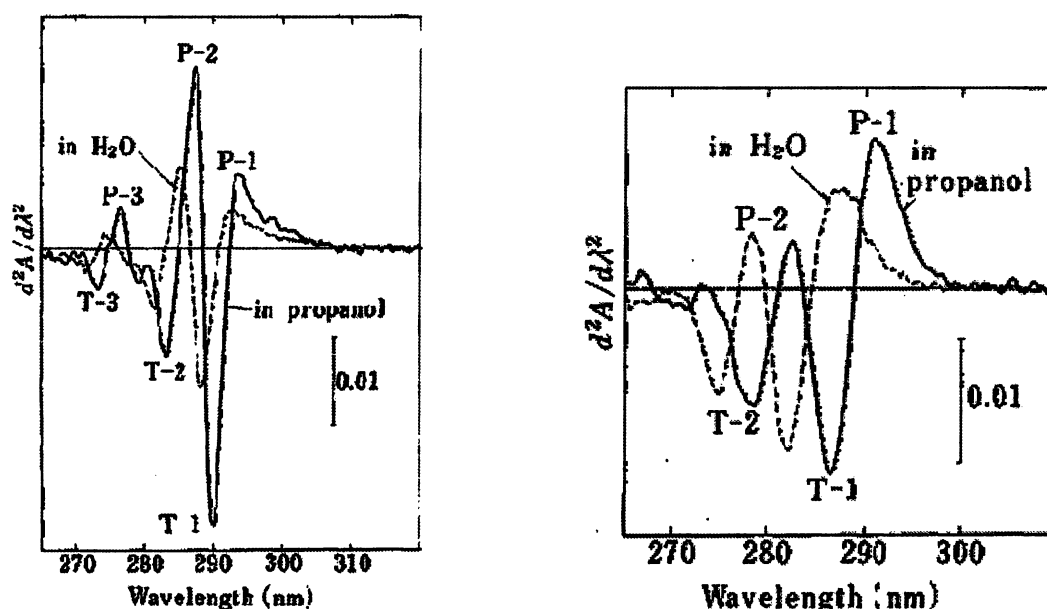
Jinou možností, jak získat derivační spektra je numerický výpočet derivace podle vlnové délky. Vypočtení derivace spektra může být prováděno bod po bodu podle vzorce (10) nebo složitějšími matematickými postupy.²⁷

$$\frac{dA}{d\lambda} = \frac{A(\lambda + \Delta\lambda) - A(\lambda - \Delta\lambda)}{2\Delta\lambda} \quad (10)$$

Jedna z nejpoužívanějších metod při digitálním zpracování dat pro tvorbu derivačních spekter je metoda podle Savitzkyho a Golaye. Tato metoda využívá k výpočtu derivace sestavení křivky z několika bodů v nejbližším okolí bodu, ve kterém se počítá derivace. Bere v úvahu body nejen za danou hodnotou, ale i před ní, prochází tedy body $x-n$, x , $x+n$. Dochází tak k jakémusi vyhlazení spektra. Při vyšším počtu bodů zahrnutých do konstrukce křivky dochází k velkému vyhlazení a tím až k deformaci spektra. Efektivita derivace tedy závisí na počtu bodů, ze kterých je křivka sestavena. Savitzky a Golay tabelovali koeficienty pro různé stupně derivace³³ a jejich metoda je dnes běžnou součástí programových balíčků pro zpracování a grafický výnos dat.

1.6.3 Využití derivačních spekter

V analytické chemii je derivační spektrofotometrie užitečným prostředkem k získání kvalitativní i kvantitativní informace. Základem rozsáhlého použití této techniky je schopnost odlišit od sebe vzájemně se překrývající pásy. Tato technika umožňuje kvantifikaci jednoho nebo několika analytů bez počáteční separace nebo purifikace. Také vede ke zvýšení selektivity, citlivosti a správnosti stanovení.³⁵ Těchto vlastností bylo využito v mnoha studiích ke stanovení zastoupení aromatických aminokyselin v řadě bílkovin porovnáním druhé derivace absorpčních spekter se spektry modelových látek (obr. 9).²⁷ Další možnost použití je určení reakčních rovnováhy, výpočet fyzikálně-chemických konstant (vazebná konstanta, konstanta komplexu) a studium reakční kinetiky. V poslední době tato technika nalézá uplatnění v různých analytických odvětvích. Především ve farmaceutickém průmyslu ke stanovení hlavní složky léčiva v přítomnosti různých přísad, zkoumání stability léčiva nebo zjištění rozkladu produktu. V klinické a biochemické analýze lze stanovit určité látky v lidském séru, moči nebo plazmě již ve velmi nízkých koncentracích. V potravinářském a kosmetickém oboru slouží k určení barviv a konzervačních látek. Praktické uplatnění má tato metoda také v anorganické a organické analýze nebo v oblasti životního prostředí.^{35,36}



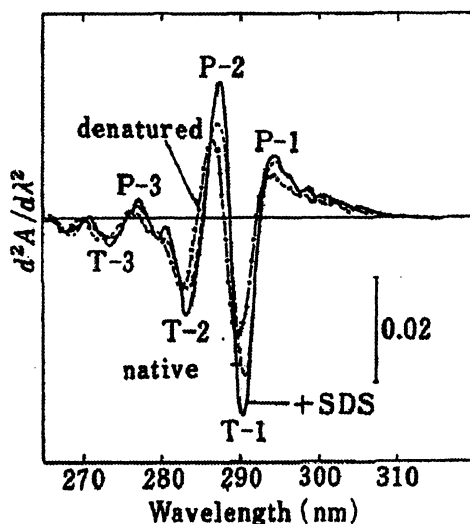
Obr. 9: Druhá derivační spektra N-acetyllethylster tryptofanu (vlevo) a N-acetyllethylster tyrosinu (vpravo) ve fosfátovém pufru o pH 7 (čárkovaná čára) a v n-propanolu (plná čára). (převzato³⁷)

1.6.4 Derivační spektra lysozymu

V práci³⁷ bylo využito derivačních spekter pro studium tyrosinových a tryptofanových zbytků v několika proteinech a bylo studováno také působení dodecylsulfátu sodného (SDS) a guanidinium chloridu na tyto bílkoviny. Výsledná derivační spektra lysozymu jsou zobrazena na obr. 10. Spektrum nativního lysozymu je velmi podobné spektru Trp v n-propanolu (obr. 9). Jsou zde viditelná tři maxima a tři minima, jejich vlnové délky jsou v tab. 3 (str. 33). Lysozym obsahuje tři tyrosinové a šest tryptofanových zbytků. Jeho spektrální vlastnosti jsou obdobné vlastnostem Trp, protože Tyr zbytky jsou plně zamaskovány větší absorbancí Trp zbytků. Proto spektrum lysozymu v oblasti vlnové délky větší než 270 nm dominují především Trp zbytky.

Všechna maxima i minima ve spektru lysozymu v prostředí 6 mol/dm guanidinium chloridu jsou menší oproti těm, která jsou ve spektru nativního lysozymu. A navíc prokazují nepatrný modrý posuv (0,5 - 1,0 nm). Tyto spektrální změny jsou charakteristické při přenosu Trp zbytků z nepolárního prostředí do polárního prostředí.

Přídavek SDS do roztoku nativního lysozymu způsobil nárůst všech píků, ale s malou změnou jejich pozice. Takže přidáním SDS dochází k uzavření Trp zbytků do hydrofobního prostředí ve srovnání s nativním lysozymem. Pravděpodobně se stávají součástí SDS-lysozymového komplexu a mohou tak vytvářet část vazebného místa pro SDS.



Obr. 10: Spektra druhé derivace lysozymu za různých podmínek. Čárkovaná čára - lysozym ve fosfátovém pufru při pH 7, čerchovaně - lysozym s přídavkem guanidinium chloridu, plná čára - lysozym s přídavkem SDS. (převzato³⁷)

2 Cíl práce

Cílem práce bylo seznámit se s možnostmi využití spektrofotometru s diodovým polem typu HP 8453 k měření diferenčních a derivačních spekter proteinů a využití tohoto přístroje ke studiu konformace a stability lysozymu při různých hodnotách pH. Dále využít perturbace spektra vlivem přídavku methanolu ke studiu konformačních změn lysozymu. V této souvislosti bylo cílem bakalářské práce také zpracování rešerše o současných znalostech lysozymu. Tato bakalářská práce navazuje na předchozí práce v laboratoři školitele, které obdobnými metodickými postupy studovaly lidský a hovězí sérový albumin a cytochrom c.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a přístroje

3.1.1 Použité chemikálie

- lysozym z vaječného bílku (PRO. MED.CS, Praha, Česká republika)
- HCl (Lachema, Praha, Česká republika)
- Methanol (Lach-Ner, Neratovice, Česká republika)
- Destilovaná voda

3.1.2 Použité laboratorní přístroje

- spektrofotometr Hewlett-Packard 8453 (Agilent Technologies, USA)
- pH metr perpHecT logR 370 (ATI Orion, USA), kalibrace standardními pufrý od výrobce
- analytické váhy (Adam Scholler, Německo)

3.2 Postup

Lysozym byl rozpuštěn v destilované vodě na výslednou koncentraci 1 mg/ml. Poté bylo upraveno pH na hodnotu 1,87 pomocí 1 mol/dm HCl a na hodnotu pH 3,08 pomocí ředěné 1 mol/dm HCl (ředění 1:3). Absorpční spektra obou vzorků byla proměřena v rozsahu 190 - 1100 nm na spektrofotometru HP 8453 za laboratorní teploty, jako srovnávací vzorek byla použita destilovaná voda. Poté byl do obou vzorků postupně přidáván methanol v poměru 1:10 až 1:1 (objemový podíl methanol:voda) a pro každý přídavek bylo u obou vzorků proměřeno absorpční spektrum ve stejném rozsahu. Každé měření bylo opakováno třikrát.

3.3 Metody

3.3.1 Měření absorpčních spekter

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru s diodovým polem typu HP 8453. Tento spektrofotometr je jednopaprskový. Polychromatické záření ze zdroje prochází vzorkem a je soustředěno na vstupní štěrbinu polychromátoru. Polychromátor rozkládá záření na povrch diodového pole, ve kterém každá dioda měří úzký pás vlnových délek. Šířka tohoto pásu závisí na velikosti vstupní štěrbinu polychromátoru a na velikosti diod. Oba tyto parametry jsou u námi použitého přístroje nastaveny pevně a nelze je měnit, určují spektrální rozlišení, které je zhruba 1 nm.³⁸ Nastavitelným parametrem je integrační čas, jehož hodnota byla na základě zkušeností z předchozích prací s podobnou tematikou nastavena na 5 s. Tato doba integrace efektivně potlačuje šum, další prodlužování integračního času již nepřináší pozorovatelný užitek. Spektrofotometr byl ovládán připojeným počítačem, na kterém se zobrazovala změřená absorpční spektra prostřednictvím programu Chemstation (Agilent). Napojení počítače na spektrofotometr umožnilo matematicky zpracovat experimentální data.

3.3.2 Zpracování experimentálních dat

Experimentální data byla ukládána prostřednictvím programu Chemstation do textových souborů formátu „csv“. Následně byla exportována a zpracována pomocí programu Origin (ver. 6.0). Absorpční spektra byla převáděna na diferenční a derivační pomocí příslušných funkcí. Pro derivační spektra bylo provedeno: „*Analysis*“ → „*Calculus*“ → „*Diff/Smooth*“ → „*Smoothing: Polynomial Order Second, Points to the Left 2, Points to the Right 2*“ dle metody Savitzky a Golay (kapitola 1.6.2) → „*Order of Derivative: First/Second*“. Pro diferenční spektra bylo provedeno: „*Analysis*“ → „*Subtract*“ → „*Reference data*“ → „*Výběr sloupců a jejich odečet*“.

Pro všechna spektra byla provedena korekce absorbance na změnu objemu vlivem přidavku methanolu vzhledem k počátečnímu objemu. Pro výpočet korigované absorbance byl použit vzorec:

$$A_{corr} = V_{směsi} * A_{směsi} / V_{poč}$$

kde A_{corr} je korigovaná absorbance, $V_{směsi}$ je objem směsi methanolu s vodou, $A_{směsi}$ je měřená absorbance směsi a $V_{poč}$ je počáteční objem. Pro zjištění hodnot hustoty směsi při daném obsahu methanolu byly použity tabelované hodnoty³⁹.

Tab. 3: Data použitá pro korekci absorbance na změnu objemu s přidávaným methanolem

Přídavek^a	Koncentrace^b	Hustota směsi^c	Objem směsi^d
0	0	1,000	1,000
10	7,4	0,986	1,097
20	13,7	0,977	1,189
30	19,3	0,969	1,281
40	24,1	0,962	1,373
50	28,4	0,956	1,465
60	32,3	0,950	1,558
70	35,8	0,944	1,652
80	38,9	0,939	1,746
90	41,7	0,934	1,840
100	44,3	0,929	1,936

^a přídavek methanolu vzhledem k počátečnímu objemu (%)

^b hmotnostní koncentrace methanolu (%)

^c specifická hustota směsi methanolu s vodou

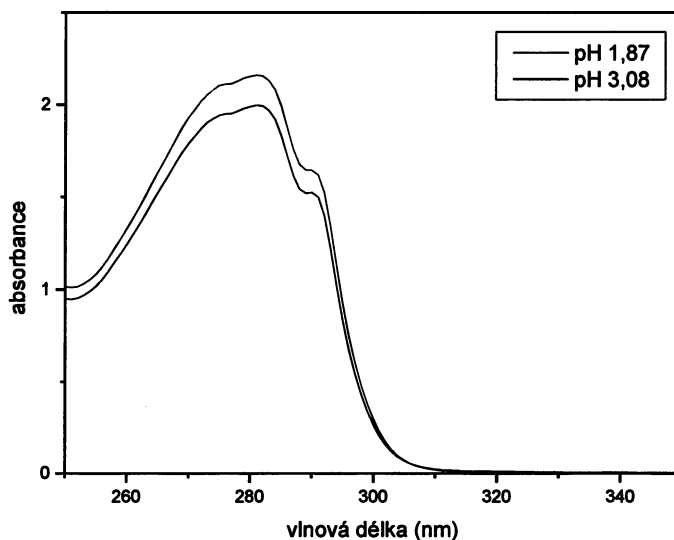
^d relativní objem směsi methanolu s vodou

4 Výsledky a diskuse

4.1 Vliv pH

4.1.1 Absorpční spektra

Na obr. 11 jsou uvedena absorpční spektra lysozymu z vaječného bílku (dále jen lysozymu) při dvou různých hodnotách pH (1,87 a 3,08). Z obrázku je vidět, že malý rozdíl hodnot pH významným způsobem neovlivňuje absorpční spektra. Tvary spekter jsou téměř totožné, liší se jen naměřená velikost absorbance. Ve studovaném intervalu absorpčního spektra dominuje maximum kolem 280 nm, které je pro bílkoviny typické a je způsobeno především absorpcí záření postranními řetězci tyrosinu a tryptofanu. „Raménko“ u vlnové délky přibližně 290 nm je způsobeno absorpcí tryptofanu, který spektru lysozymu celkově dominuje.



Obr. 11: Absorpční spektra lysozymu v destilované vodě za laboratorní teploty při pH 1,87 a pH 3,08

4.1.2 Spektra první derivace

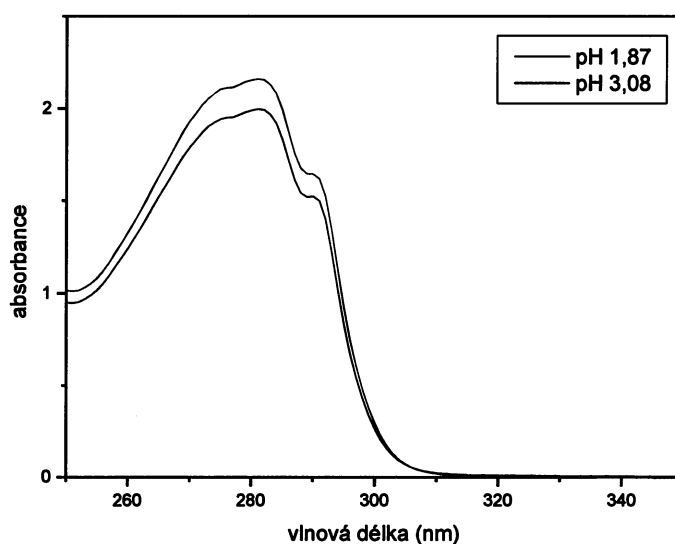
Ve spektrech první derivace (obr. 12) jsou zřetelně rozpoznatelná dvě minima přibližně při 286 nm a 294 nm a dvě maxima při 279 nm a 289 nm. Pro obě pH se objevují tato maxima i minima při prakticky stejné vlnové délce, tudíž malý rozdíl pH se výrazně neprojeví ani ve spektru první derivace. Velmi nepatrný rozdíl je pouze ve výšce, přičemž větší amplitudu má spektrum první derivace při pH 3,08.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Vliv pH

4.1.1 Absorpční spektra

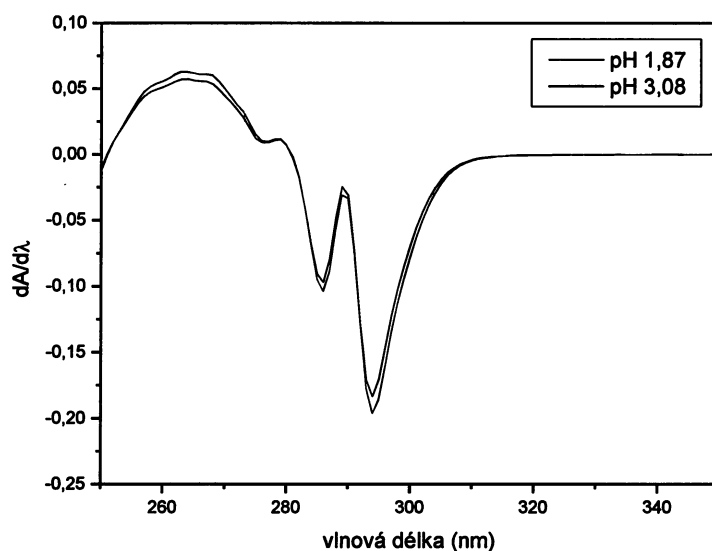
Na obr. 11 jsou uvedena absorpční spektra lysozymu z vaječného bílku (dále jen lysozymu) při dvou různých hodnotách pH (1,87 a 3,08). Z obrázku je vidět, že malý rozdíl hodnot pH významným způsobem neovlivňuje absorpční spektra. Tvary spekter jsou téměř totožné, liší se jen naměřená velikost absorbance. Ve studovaném intervalu absorpčního spektra dominuje maximum kolem 280 nm, které je pro bílkoviny typické a je způsobeno především absorpcí záření postranními řetězci tyrosinu a tryptofanu. „Raménko“ u vlnové délky přibližně 290 nm je způsobeno absorpcí tryptofanu, který spektru lysozymu celkově dominuje.



Obr. 11: Absorpční spektra lysozymu v destilované vodě za laboratorní teploty při pH 1,87 a pH 3,08

4.1.2 Spektra první derivace

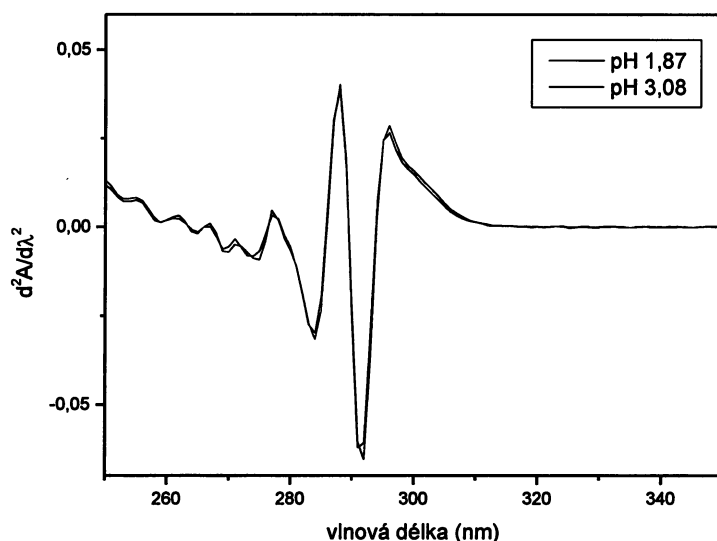
Ve spektrech první derivace (obr. 12) jsou zřetelně rozpoznatelná dvě minima přibližně při 286 nm a 294 nm a dvě maxima při 279 nm a 289 nm. Pro obě pH se objevují tato maxima i minima při prakticky stejné vlnové délce, tudíž malý rozdíl pH se výrazně neprojeví ani ve spektru první derivace. Velmi nepatrný rozdíl je pouze ve výšce, přičemž větší amplitudu má spektrum první derivace při pH 3,08.



Obr. 12: Průběh první derivace absorpčního spektra lysozymu v destilované vodě za laboratorní teploty při pH 1,87 a pH 3,08

4.1.3 Spektra druhé derivace

Zlepšené rozlišení poskytuje spektrum druhé derivace (obr. 13). Je zde několik výrazných maxim a minim, jejich přehled zobrazuje tab. 4. Také této oblasti spektra dominuje absorbance zbytků aromatických aminokyselin tyrosinu a tryptofanu. “Vlnky“ v oblasti kolem 260 nm odrážejí přítomnost fenylalaninu. Lysozym obsahuje tři tyrosinové a šest tryptofanových zbytků.³⁷ Na první pohled je jeho spektrum velmi podobné spektru modelové sloučeniny s tryptofanovým chromoforem (obr. 9, str. 25). Tato podobnost je způsobena tím, že spektrální vlastnosti tyrosinu jsou prakticky zcela zamaskované silnější absorbancí tryptofanových zbytků.³⁷ Derivační spektra lysozymu získaná v této práci se tvarem velmi podobají spektrům publikovaným v práci³⁷ pro neutrální pH (obr. 10, str. 26). Vlnové délky maxim a minim se pouze nepatrně liší (viz tab. 4). Rozdíl může být způsoben měřením za odlišných podmínek, nebo je důsledkem použití jiné instrumentace, případně jinou metodou derivace (v práci³⁷ bylo použito přídavné elektronické analogové derivační zařízení).



Obr. 13: Průběh druhé derivace absorpčního spektra lysozymu v destilované vodě za laboratorní teploty při pH 1,87 a pH 3,08

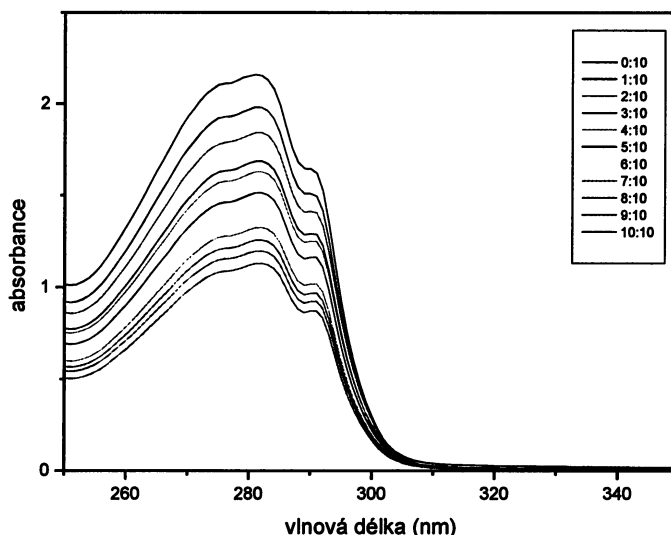
Tab. 4: Polohy maxim v druhé derivaci absorpčního spektra lysozymu (hodnoty pro destilovanou vodu a kyselý pH z této práce, pro fosfátový pufr pH 7 z práce³⁷)

Rozpouštědlový systém	Vlnová délka (nm)					
	Minimum			Maximum		
voda pH 1,87	273,0	284,0	291,0	277,0	288,0	296,0
voda pH 3,08	275,0	284,0	292,0	277,0	288,0	296,0
fosfátový pufr pH 7,00	273,5	283,5	290,5	277,0	287,5	294,5

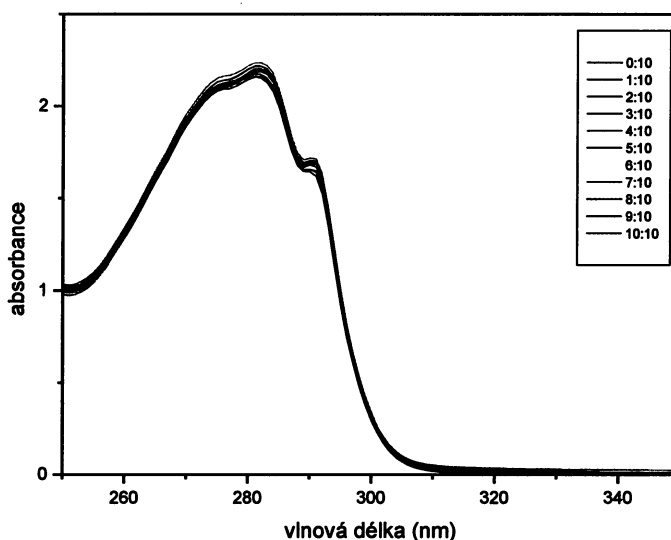
4.2 Vliv methanolu při pH 3,08

4.2.1 Absorpční spektra

Na obr. 14 jsou zobrazena absorpční spektra lysozymu při pH 3,08 s přidávkou methanolu před objemovou korekcí a po objemové korekci (obr. 15). Z obrázku je patrné, že před korekcí se v absorpčním spektru výrazně mění velikost amplitudy díky změně koncentrace. V obou případech je výrazné maximum okolo 280 nm, které je způsobeno především absorpcí tyrosinu a tryptofanu. Vliv methanolu lze z absorpčních spekter jen těžko interpretovat.



Obr. 14: Absorpční spektra lysozemu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přidavky methanolu před objemovou korekcí. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.

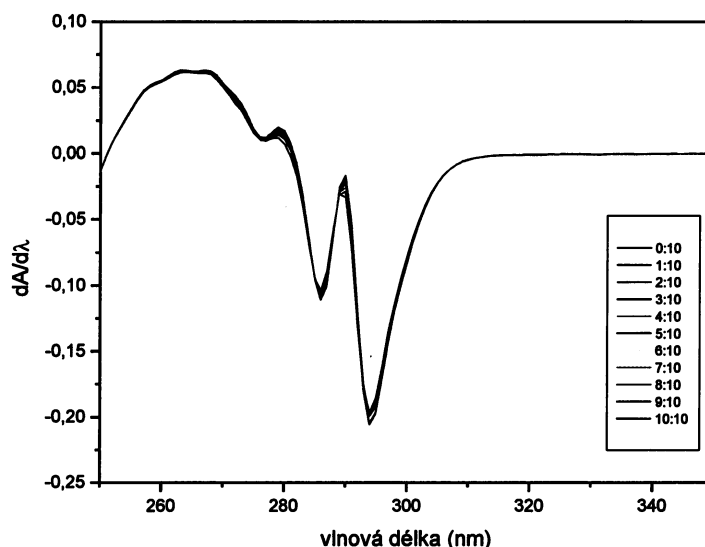


Obr. 15: Absorpční spektra lysozemu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přidavky methanolu po objemové korekci. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.

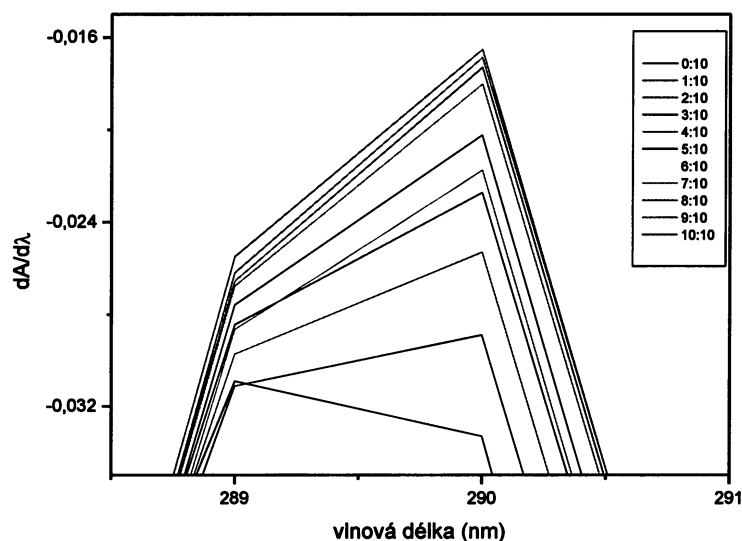
4.2.2 Spektra první derivace

Průběh spektra první derivace s přidavky methanolu na obr. 16 vykazuje dvě minima o vlnové délce 286 nm a 294 nm a dvě maxima kolem 279 nm a 290 nm. Ve všech případech přidavku methanolu jsou tato maxima při stejné vlnové délce. Při větším přiblížení extrémů je viditelná tendence zvětšování amplitudy s každým přidavkem methanolu např. pro maximum při 290 nm viz obr. 17. S větším obsahem methanolu se snižuje tempo růstu amplitudy. Při porovnání se spektrem bez přidavku

methanolu mají všechny přídavky methanolu nepatrně posunuté absorpční maximum při vlnové délce 290 nm směrem k větší vlnové délce (obr. 17).



Obr. 16: Průběh první derivace absorpčního spektra lysozemu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přídavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).

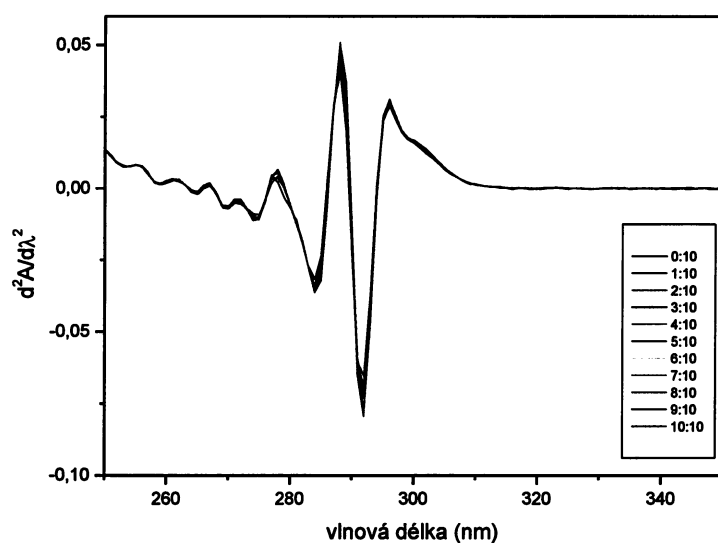


Obr. 17: Přiblížení absorpčního maxima při vlnové délce 290 nm z první derivace absorpčního spektra lysozemu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přídavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).

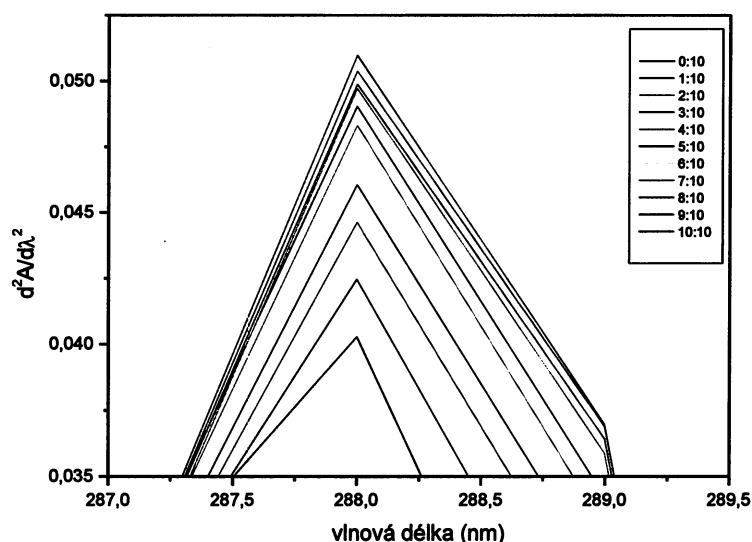
4.2.3 Spektra druhé derivace

Ve spektrech druhé derivace jsou výrazná tři maxima o vlnové délce 278, 288 a 296 nm a dvě minima při 284, 292 nm. Při všech přídavcích methanolu jsou tyto vlnové délky prakticky stejné. Nejvýraznější maxima ukazují zejména na příspěvky tryptofanových zbytků, protože jak již bylo uvedeno výše, absorpce tyrosinových

zbytků je maskována. Tento závěr je podpořen také porovnáním tvaru derivačního spektra modelové látky s tryptofanovým chromoforem na obr. 9 (str. 25). Podobně jako ve spektru první derivace se zde přídavky methanolu projevují především zvyšováním amplitudy a také míra zvyšování při větším obsahu methanolu se zmenšuje (obr. 19). Velmi zdůrazněna je zde přítomnost tzv. ramének v oblasti 250 - 280 nm, která v absorpčním spektru vytváří dojem šumu. Spektra druhé derivace tak výrazně usnadňují rozlišení příspěvku fenylalaninu.



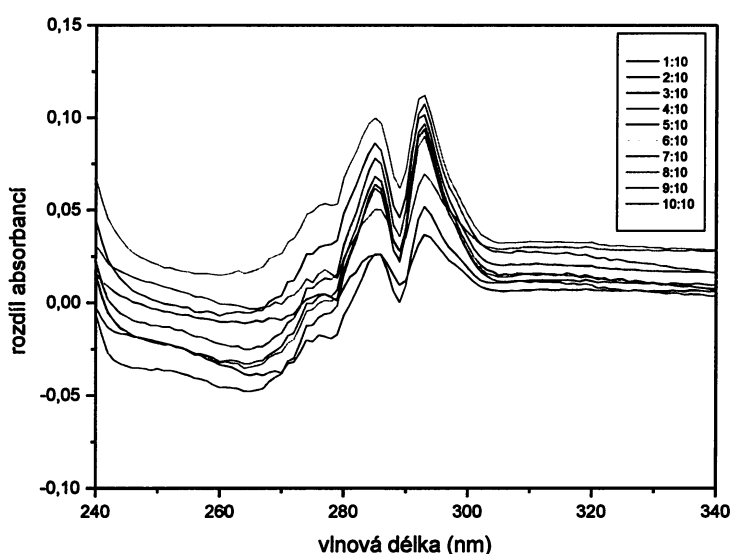
Obr. 18: Průběh druhé derivace lysozymu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přídavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).



Obr. 19: Přiblížení maxima při vlnové délce 288 nm z druhé derivace absorpčního spektra lysozymu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přídavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).

4.2.4 Diferenční spektra

Při sledování průběhu diferenčního spektra lysozymu jsou viditelná dvě maxima o vlnové délce 285 nm a 293 nm a jedno minimum při 289 nm (obr. 20). Tyto extrémy mají přibližně stejnou vlnovou délku při všech přidavcích methanolu, liší se pouze velikost amplitudy. Je patrné, že s přidavky methanolu dochází ke zvýraznění extrémů a zúžení absorpčních pásů. Podle tvaru diferenčního spektra lze usuzovat, že došlo k nepatrnému posunu absorpčního pásu k větší vlnové délce - červený posun. Tento děj nastává při snížení polarity v okolí chromoforu, je tedy možné se domnívat, že došlo k ukrytí chromoforů do vnitřní struktury lysozymu.

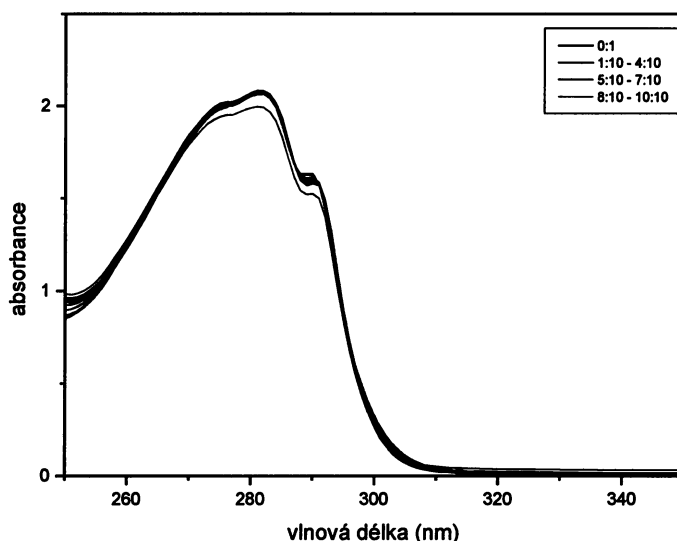


Obr. 20: Průběh diferenčního spektra lysozymu ve vodě při pH 3,08 za laboratorní teploty s přidavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).

4.3 Vliv methanolu při pH 1,87

4.3.1 Absorpční spektra

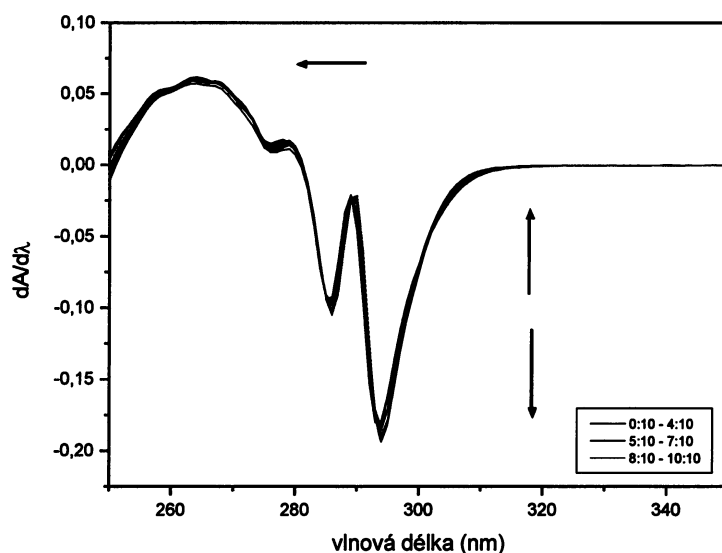
Absorpční spektra lysozymu při pH 1,87 s přidavky methanolu (obr. 21) se průběhem a tvarem příliš neliší od absorpčního spektra lysozymu s přidavky methanolu při pH 3,08. Opět zde vyniká maximum typické pro bílkoviny kolem 280 nm. Působení přidavku methanolu při pH 1,87 v absorpčních spektrech není příliš zřetelné. Je zde větší rozdíl amplitudy mezi absorpčním spektrem lysozymu bez přidavku a s přidavkem methanolu.



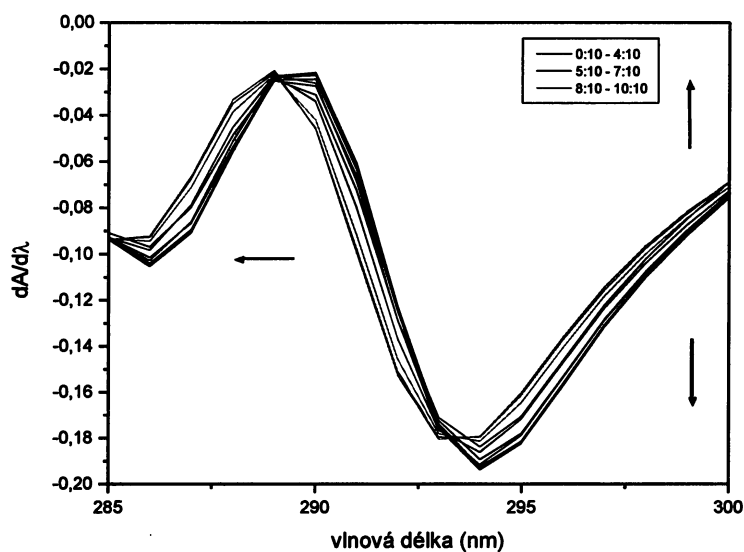
Obr. 21: Absorpční spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu (vyjádřeno objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu).

4.3.2 Spektra první derivace

Průběh spektra první derivace s přidavky methanolu při pH 1,87 na obr. 22 se příliš neliší od derivačního spektra při pH 3,08. Ale při větším přiblížení extrémů jsou zde viditelné rozdíly. Zatímco u spekter při pH 3,08 zůstávají vlnové délky maxim a minim při stejné vlnové délce a postupně se pouze zvyšuje amplituda, u spekter první derivace při pH 1,87 se maxima i minima posouvají směrem k nižší vlnové délce - modrý posun. Nejdříve se stejně jako při pH 3,08 postupně zvyšuje amplituda až do objemového poměru 2:5, poté se amplituda snižuje a dochází k posunu absorpčního maxima a při poměru 4:5 dochází již ke zřetelnému posunu absorpčního pásu (obr. 23). Lze tedy usuzovat, že přidavkem methanolu dochází k rozbalení nativní struktury lysozymu a chromofory, které byly dříve „pohřbené“ uvnitř, se dostávají na povrch lysozymu a tím i do kontaktu s rozpouštědlem.



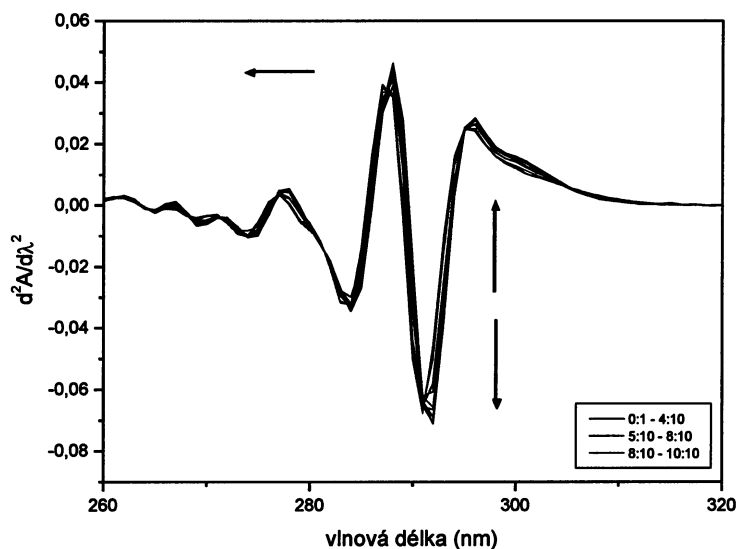
Obr. 22: Průběh první derivace absorpčního spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu. Černá linie (šipka) značí nárůst amplitudy, červená linie (šipka) značí pokles amplitudy, zelená linie (šipka) značí posun absorpčního pásu. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.



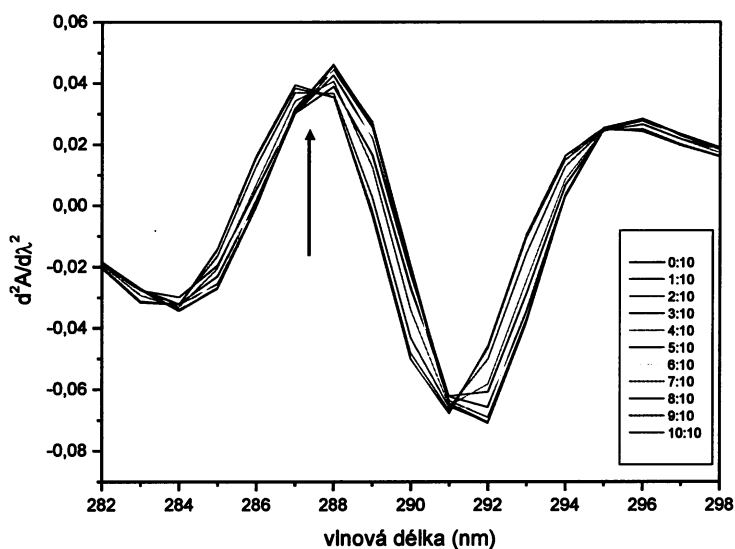
Obr. 23: Přiblížení absorpčního maxima při vlnové délce 289 nm a 294 nm z první derivace absorpčního spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu. Černá linie (šipka) značí nárůst amplitudy, červená linie (šipka) značí pokles amplitudy, zelená linie (šipka) značí posun absorpčního pásu. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.

4.3.3 Spektra druhé derivace

Celkový tvar průběhu spektra druhé derivace při pH 1,87 (obr. 24) se příliš neliší od derivačního spektra při pH 3,08. Charakter spektra druhé derivace je obdobný jako u spektra první derivace při stejné hodnotě pH. Také zde se projevuje posun absorpčních pásů směrem ke kratší vlnové délce (modrý posun). Spektra druhé derivace poskytují velmi výrazný izosbestický bod při vlnové délce zhruba 287,5 nm, který ukazuje na postupnou přeměnu mezi dvěma formami (obr. 25).



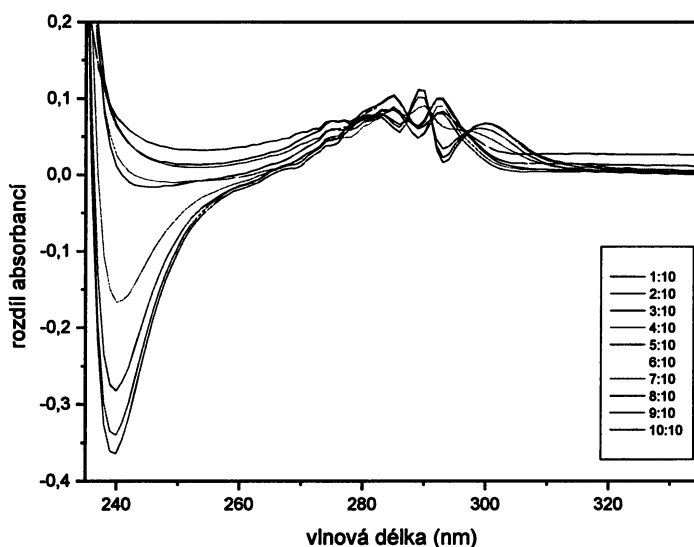
Obr. 24: Průběh druhé derivace absorpčního spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu. Černá linie (šipka) značí nárůst amplitudy, červená linie (šipka) značí pokles amplitudy, zelená linie (šipka) značí posun absorpčního pásu. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.



Obr. 25: Přiblížení druhé derivace absorpčního spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu s vyznačeným izosbestickým bodem. Přidavky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.

4.3.4 Diferenční spektra

Průběh diferenčního spektra lysozymu při pH 1,87 na obr. 26 je velmi odlišný od diferenčního spektra lysozymu při pH 3,08. Velmi výrazný je negativní pás při vlnové délce 240 nm, který se přidavkem methanolu více prohlubuje. Dále poskytují diferenční spektra nápadný posun absorpčních pásů směrem k nižší vlnové délce. To naznačuje, že dochází ke zvýšení polarizability v okolí chromoforů, popřípadě k denaturaci lysozymu. Dochází tedy k rozbalování nativní struktury lysozymu a tím k expozici dříve ukrytých chromoforů do rozpouštědla. Vlnové délky jednotlivých extrémů zobrazuje tab. 5.



Obr. 26: Průběh diferenčního spektra lysozymu ve vodě při pH 1,87 za laboratorní teploty s přidavky methanolu. Přidávky methanolu jsou vyjádřeny objemovým poměrem methanol:voda vzhledem k počátečnímu objemu.

Tab. 5: Přehled vlnových délek nejvýraznějších maxim a minim v diferenčních spektrech lysozymu při pH 1,87

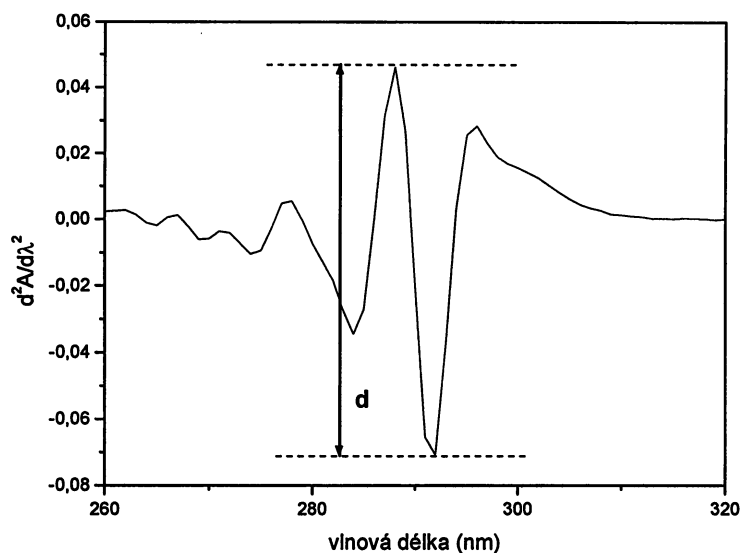
MeOH ^a	7,4	13,7	19,3	24,1	28,4	32,3	35,8	38,9	41,7	44,3
Max ^b	285	285	285	285	285	285	290	289	289	289
	293	293	293	292	292	293	-	299	300	300
Min ^b	289	289	289	289	289	289	294	293	293	293

^a hmotnostní koncentrace methanolu (%)

^b vlnová délka (nm)

4.4 Vyhodnocení vlivu methanolu pomocí parametru d

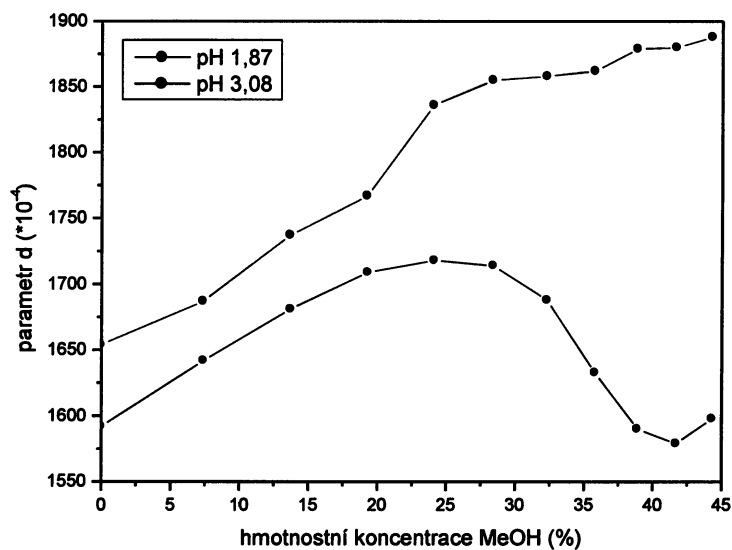
Pro vyhodnocení vlivu methanolu na strukturu lysozymu byla vynesena závislost parametru d na hmotnostní koncentraci methanolu při obou hodnotách měřeného pH. Definici tohoto parametru poskytuje obr. 27. V podstatě se jedná o tzv. rozkmit vrcholů spektra v závislosti na přidaném množství methanolu.



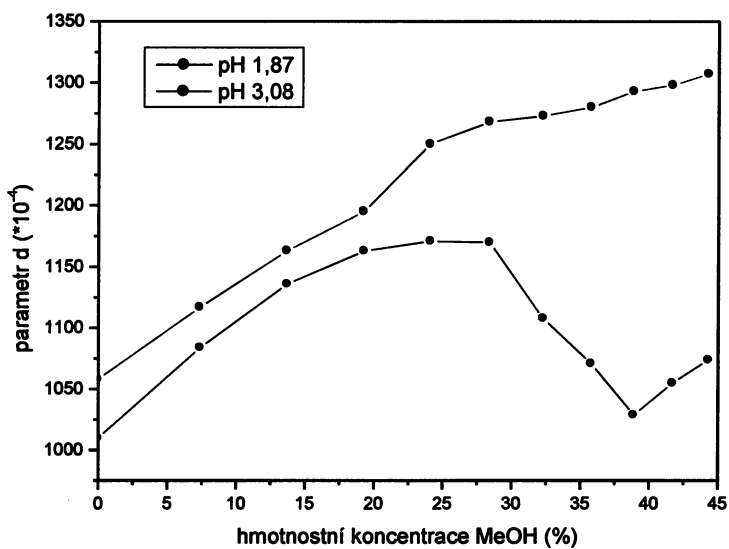
Obr. 27: Definice parametru d ze spektra druhé derivace.

Při porovnání průběhu závislosti parametru na hmotnostní koncentraci methanolu z absorpčního spektra první i druhé derivace a z diferenčního spektra je viditelný rozdíl mezi měřenými pH. Tvar průběhu závislosti parametru při pH 3,08 je ze všech spekter velmi podobný, ve srovnání s pH 1,87, kde je závislost z diferenčního spektra trochu odlišná od první a druhé derivace (obr. 28-30).

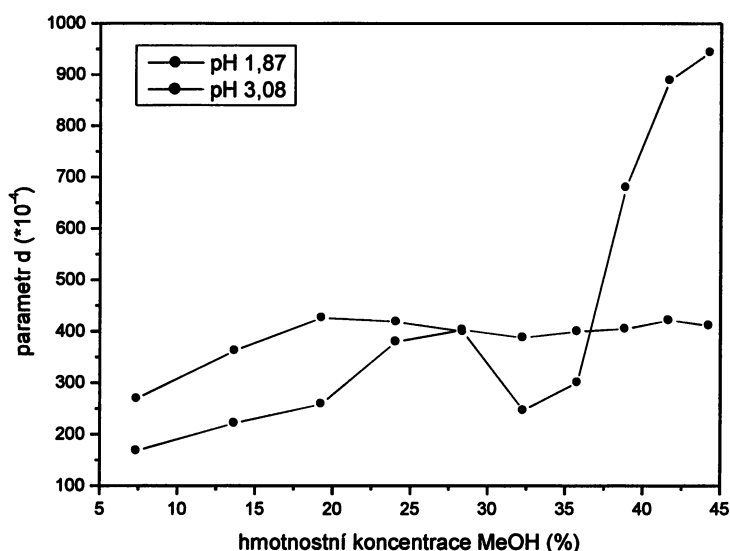
Průběh naměřené závislosti při pH 3,08 má rostoucí charakter, lze se tedy domnívat, že při tomto pH nedochází k denaturaci lysozymu ani k žádným rozsáhlým konformačním změnám. Výsledky se shodují s údaji v literatuře.⁴⁰ Za obdobných podmínek byl zkoumán vliv methanolu pomocí metody CD a NMR a bylo zjištěno, že při pH 3,08 je nativní struktura lysozymu zachována až do koncentrace methanolu 50 % (v/v).



Obr. 28: Průběh závislosti parametru d na hmotnostní koncentraci methanolu z absorpčního spektra první derivace.



Obr. 29: Průběh závislosti parametru d na hmotnostní koncentraci methanolu z absorpčního spektra druhé derivace.



Obr. 30: Průběh závislosti parametru d na hmotnostní koncentraci methanolu z diferenčního spektra.

Při pH 1,87 je zjevné, že k určitým změnám dochází. Nejprve stejně jako při pH 3,08 závislost parametru na přidavku methanolu stoupá, poté při objemovém poměru 4:10 začne závislost klesat, dochází k určité konformační změně. Nakonec při objemovém poměru 8:10 začne závislost parametru opět stoupat. Závislost parametru na hmotnostní koncentraci z diferenčních spekter má stejný charakter, jen se mění objemový poměr - klesá od poměru 3:10 a stoupá od 6:10. Protože při pH 1,87 dochází v derivačním i diferenčním spektru ke změnám intenzity i k posunu absorpčních pásů, nelze z pouhé závislosti parametru na hmotnostní koncentraci methanolu přesně charakterizovat změny, ke kterým dochází. Pravděpodobně po přidání methanolu dochází k postupnému rozbalování nativní struktury a na povrch se dostávají chromofory, které byly dříve uloženy uvnitř nativního lysozymu. Dochází tak ke kontaktu s rozpouštědlem, které postupně s přidávaným methanolem mění své složení a tím i polaritu. V práci⁴⁰ pozorovali za obdobných podmínek vliv methanolu na strukturu lysozymu pomocí CD a NMR. Výsledky naznačily, že při pH 1,87 je při koncentraci 0 - 30 % methanolu nativní struktura plně zachována, při koncentraci 30 - 50 % methanolu dochází ke kooperativním konformačním změnám a při koncentraci vyšší než 50 % dochází k denaturaci lysozymu.

5 Závěr

1. Metodou derivační spektrofotometrie byla zkoumána konformace lysozymu ve vodě za laboratorní teploty při dvou hodnotách pH - 1,87 a 3,08. Ve spektrech první i druhé derivace je vliv methanolu naznačen pouze změnou amplitudy, přičemž větší amplituda je při pH 3,08.

2. Metodou derivační a diferenční spektrofotometrie byl zkoumán vliv methanolu na strukturu lysozymu ve vodě za laboratorní teploty při pH 3,08. Při tomto pH nedochází k větším konformačním změnám. V derivačních spektrech je s přidávkou methanolu patrný především nárůst amplitudy. V diferenčních spektrech byl pozorován červený posun, tedy posun absorpčních pásů směrem k větším vlnovým délkám, který bývá způsoben snížením polarizability v okolí chromoforů. Je tedy pravděpodobné, že při tomto pH dochází k ukrytí chromoforů do vnitřní struktury lysozymu.

3. Stejnými metodami byl zkoumán vliv methanolu na strukturu lysozymu ve vodě za laboratorní teploty při pH 1,87. Při tomto pH byl ve spektrech první i druhé derivace zjištěn modrý posun, tedy posun absorpčních pásů směrem k menším vlnovým délkám, který je způsoben převážně zvýšením polarizability v prostředí chromoforů. Zřejmě tedy přidávkou methanolu dochází k rozbalení struktury lysozymu a na povrch se dostávají chromofory, které byly dříve uvnitř nativní struktury. Také z diferenčního spektra lze usoudit, že došlo ke znatelným konformačním změnám lysozymu.

6 Použitá literatura

1. Hudeček, J.: Poznatky z biochemie v učivu SŠ i ZŠ a šlehání vaječného bílku, *Biologie, chemie, zeměpis* 14, 231-237 (2005)
2. Hudeček, J.; Kalous, V.: *Fyzikálně chemická podmíněnost struktury bílkovin*, Praha, Academia 1989
3. Voet, D.; Voet G.J.: *Biochemistry* (3rd Edition), Hoboken, John Wiley & Sons 2004
4. Kodíček, M.; Karpenko, V.: *Biofyzikální chemie* (2. vydání), Praha, Academia 2002
5. Jollès, P.: Lysozyme. In: *The enzymes* Vol. 4 část A. Boyer, P. D.; Lardy, H.; Myrbäck, K. (eds.). New York: Academic Press, 1960, p. 431-435
6. Sharon, N.: The chemical structure of lysozyme substrates and their cleavage by the enzyme, *Biological sciences* 167, 402-415 (1967)
7. Liu, S. T.; Sugimoto, T.; Azakami, H.; Kato, A.: Lipophilization of lysozyme by short and middle chain fatty acids, *Journal of Agricultural Food Chemistry* 48, 265-269 (2000)
8. Liu, S.; Azakami, H.; Kato, A.: Improvement in yield of lipophilized lysozyme by the combination with Maillar-type glycosylation, *Nahrung* 44, 407-410 (2000)
9. Makki, F.; Durance, T. D.: Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer, *Food Research International* 29, 635-645 (1996)
10. Jollès, P.; Bernier, I.; Berthou, J.; Charlemagne, D.; Faure, A.; Hermann, J.; Jollès, J.; Périn, J. P.; Saint-Blancard, J.: From lysozymes to Chitinases: Structural, kinetic, and crystallographic studies. In: *Lysozyme*. Osserman, E. F.; Canfield, R. E.; Beychock, S. (eds.). New York: Academic Press, 1974, p. 31-54
11. Smith, L. J.; Sutcliffe, M. J.; Redfield, Ch.; Dobson, Ch. M.: Structure of hen lysozyme in solution, *Journal of Molecular Biology* 229, 930-944 (1993)
12. Shaun, D.; Radford, S. E.; Dobson, Ch. M.: The refolding of human lysozyme: A comparison with the structurally homologous hen lysozyme, *Biochemistry* 33, 5867-5876 (1994)
13. Canet, D.; Sunde, M.; Last, A. M.; Miranker, A.; Spencer, A.; Robinson, C. V.; Dobson, Ch. M.: Mechanistic studies of human lysozyme and the origin

- of amyloidogenic behavior in its disease-related variants, *Biochemistry* **38**, 6419-6427 (1999)
14. Markart, P.; Faust, N.; Graf, T.; Na, Ch. L.; Weaver, T. E.; Akinbi, H. T.: Comparison of the microbial and muramidase activities of mouse lysozyme P and M, *Biochemical Journal* **380**, 385-392 (2004)
 15. Cross, M.; Renkawitz, R.: Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes, *EMBO Journal* **9**, 1283-1288 (1990)
 16. Riblet, R. J.: Sequence studies of mouse lysozyme. In: *Lysozyme*. Osserman, E. F.; Canfield, R. E.; Beychock, S. (eds.). New York: Academic Press, 1974, p. 89-93
 17. Radford, S. E.; Woolfson, D. N.; Martin, S. R.; Lowe, G.; Dobson, Ch. M.: A three-disulphide derivative of hen lysozyme, *Biochemical Journal* **273**, 211-217 (1991)
 18. Mizuguchi, M.; Nara, M.; Ke, Y.; Kawano, K.; Hiraoki, T.; Nitta, K.: Fourier-transform infrared spectroscopic studies on the coordination of the side-chain COO⁻ groups to Ca²⁺ in equine lysozyme, *European Journal of Biochemistry* **250**, 72-76 (1997)
 19. Kuroki, R.; Taniyama, Y.; Seko, Ch.; Nakamura, H.; Kikuchi, M.; Ikehara, M.: Design and creation of a Ca²⁺ binding site in human lysozyme to enhance structural stability, *Proceeding of the National Academy of Sciences of United States of America* **86**, 6903-6907 (1989)
 20. Aosaka, T.; Ando, T.; Meguro, T.; Yamato, I.: Development of a structure based protein function prediction method: calcium binding protein, *Chem-Bioinformatics Journal* **3**, 96-113 (2003)
 21. Yang, W.; Lee, H. W.; Hellinga, H.; Yang, J. J.: Structural analysis, identification, and design of calcium-binding sites in proteins, *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* **47**, 344-356 (2002)
 22. Nakayama, S.; Kawasaki, H.; Kretsinger, R.H.: Parvalbumin. In: Handbook of Metalloproteins. Messerschmidt, A.; Huber, R.; Poulos, T.; Wieghardt, K.; Cygler, M.; Bode, W. (eds.), John Wiley & Sons 2006
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/met/articles/met043/frame.html>
[cit. 15.04.2008]

23. Kikuchi, M.; Kawano, K.; Nitta, K.: Calcium-binding and structural stability of echidna and canine milk lysozymes, *Protein Science* **7**, 2150-2155 (1998)
24. Nitta, K.; Sugai, S.: The evolution of lysozyme and α -lactalbumin, *European Journal of Biochemistry* **182**, 111-118 (1989)
25. Havel, H. A.: *Spectroscopic methods for determining protein structure in solution*, New York, VCH Publisher, 1995
26. Irace, G.; Ragone, R.; Bismuto, E.; Giovane, A.; Quagliuolo, L., Colonna, G.: Use of second derivative spectroscopy in detecting protein conformational changes, *Rendiconti e Atti dell'Accademia di Scienze Mediche Chirurgiche (Napoli)* **86**, 1-12 (1982)
27. Azenbacher, P.; Hudeček, J.: Diferenční a derivační spektrofotometrie. Použití ke studiu proteinů, *Chemické Listy* **75**, 180-200 (1981)
28. Demchenko, A. P.: *Ultraviolet spectroscopy of proteins*, Berlin, Springer-Verlag 1986
29. Nicola, N. A.; Leach, S. J.: Interpretation and applications of thermal difference spectra of proteins, *International Journal of Peptide & Protein Research* **8**, 394-415 (1976)
30. Demchenko, A. P.: On the effect of temperature on the ultraviolet spectra of protein chromophores, *Biophysical Chemistry* **9**, 393-396 (1979)
31. Herskovits, T. T.; Laskowski, M.: Location of chromophoric residues in proteins by solvent Pertubation, *Journal of Biological Chemistry* **237**, 2481-2492 (1962)
32. Cahill, J. E.; Padera, F. G.: *Applications data buletin - Derivative spestroscopy application and theory*, Norwalk, Perkin-Elmer 1979
33. Talsky, G.: *Derivative spectrophotometry: low and higher order*, Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft 1994
34. <http://www.natur.cuni.cz/~analchem/pprakt/ds.pdf> [cit. 14.5.2008]
35. Karpińska, J.: Derivative spectrophotometry - recent applications and directions of development, *Talanta* **64**, 801-822 (2004)
36. Ojeda, C. B.; Rojas, F. S.: Recent developements in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry, *Analytica Chimica Acta* **518**, 1-24 (2004)
37. Terada, H.; Inoue, Y.; Ichikawa, T.: Second derivative spectral properties of tryptophan and tyrosine residues in proteins. Effect of guanidine hydrochloride

and dodecyl sulfate on the residues in lysozyme, ribonuclease and serum albumin, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **32**, (1984)

38. Owen, A. J.: *Fundamentals of Modern UV-Visible Spectroscopy*, Hewlett-Packard, Germany 1996
39. a Hodgman, C. D.: *Handbook of Chemistry and Physics* 37th Ed, Cleaveland, Chemical Rubber Publishing 1957
b Lide, D. R.: *Handbook of Chemistry and Physics* 87th Ed, Boca Raton, Taylor & Francis 2006
40. Kamatai, Y. O.; Konno, T.; Kataoka, M.; Akasaka, K.: The methanol-induced transition and the expanded helical conformation in hen lysozyme, *Protein Science* **7**, 681-688 (1998)