

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Martin Štefl

**Možnosti využití časově rozlišené FCS ke studiu
interakcí proteinů**

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Školitel-konzultant: Doc. Dr. Martin Hof, DSc.

Praha 2008

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelů Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a Doc. Dr. Martina Hofa, DSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne.....^{30.4}.....2008

Podpis.....*Martin Hofa*.....

Úvodem bych rád poděkoval svým školitelům panu Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. a panu Doc. Dr. Martinu Hofovi, DSc. za kvalitní vedení, zájem, připomínky a rady, které mi ochotně po celou dobu řešení diplomové práce poskytovali. Dále bych rád poděkoval paní Mgr. Anně Kuřakowské, Mgr. Alešovi Bendovi, Ph.D., Mgr. Janu Sýkorovi, Ph.D. a ostatním členům Hofovy fluorescenční skupiny za obětavou pomoc při řešení problémů.

Obsah

1. Seznam použitých zkratk a symbolů.....	5
2. Úvod a přehled literatury	8
2.1. Fluorescence'	9
2.1.1. Jablonskiho diagram	9
2.1.2. Stokesův posun	10
2.1.3. Franck-Condonův princip	10
2.1.4. Základní veličiny pro charakteristiku fluorescence	12
2.2. FCS	14
2.2.1. Experimentální provedení.....	15
2.2.2. Teorie autokorelační analýzy.....	16
2.2.3. Teorie kroskorelační analýzy.....	19
2.2.4. Z-scan.....	21
2.2.5 FLCS - Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy	23
2.3. Fosfolipidové dvojvrstvy	23
2.4. Proteiny	24
2.4.1. Cytochrom c.....	24
2.4.2. Prothrombin	26
3. Cíl práce	31
4. Materiál a metody	32
4.1. Značení a purifikace lipidů	32
4.2. Značení a purifikace proteinů	33
4.2.1. Cytochrom c.....	33
4.3. Příprava membrán.....	37
4.3.1. Příprava SUV`s.....	37
4.3.2. Příprava SPB`s.....	38
4.4. Fluorescenční FCS měření.....	39
4.5. FLCS měření.....	40
5. Výsledky a diskuse	41
5.1. Značení a purifikace lipidů	41
5.2. Značení a purifikace proteinů	44
5.2.1. Cytochrom c.....	44
5.2.2. Prothrombin	48
5.3. Příprava membrán.....	49
5.4. FCS měření	51
5.4.1. Posun ohnisek dvou různých laserů při FCS měření	51
5.4.2. Určení disociačních konstant	52
5.5. FLCS měření.....	59
6. Souhrn.....	63
6.1. Značení a purifikace lipidů	63
6.2. Značení a purifikace proteinů	63
6.3. Příprava membrán.....	63
6.4. FCS měření	64
6.5. FLCS měření.....	65
8. Seznam použité literatury:	66

1. Seznam použitých zkratek a symbolů

A	absorbance
ACF	autokorelační funkce
c	rychlost světla ve vakuu
C, c	koncentrace
C ₁₂	koncentrace dvojmo značených molekul při interakci
C _i	koncentrace jedné značené molekuly i (i=1,2)
D	difúzní koeficient
DOPC	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylcholin
DOPE	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfoethanolamin
DOPS	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-fosfatidylserin
E	energie záření
EDTA	diaminoethantetraoctová kyselina
F(0)	intenzita fluorescence v čase t = 0
F(t)	intenzita fluorescence v čase t
FCS	fluorescenční korelační spektroskopie
FLCS	fluorescenční korelační spektroskopie využívající poločas života fluorescence
FRAP	metod obnovení fluorescence po fotovybělení
FRET	Försterův rezonanční přenos energie
G(τ)	normalizovaná autokorelační funkce
G _{celková} (τ)	celková autokorelační funkce
G _{směsi} (τ)	autokorelační funkce zahrnující různé druhy molekul
h	Planckova konstanta
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina
I _{ex} (r)	prostorové rozdělení excitační energie s maximální amplitudou I ₀
K	suma všech rychlostních konstant účastnících se depopulace excitovaného stavu fluoroforu

k	rychlostní konstanta
K_a	asociační konstanta
k_{cat}	katalytická konstanta, číslo přeměny
K_d	disociační konstanta
k_m	rychlostní konstanta fluorescence
K_m	Michaelisova konstanta
k_{nr}	rychlostní konstanta nezářivých procesů
k_{off}	rychlostní konstanta disociace
k_{on}	rychlostní konstanta přímé asociace
l	optická dráha paprsku procházejícího kyvetou
$M_i(\tau)$	výraz pro pohyb molekul
MPD	vícefotonový detektor
n	index lomu
N	počet částic
Q	ubichinon
Q, q	kvantový výtěžek
QH_2	ubihydrochinon
r	polohový vektor
r_0	parametr pro laterální difúzi
$S(r)$	optická funkce přenosu paprsku spojená s kombinací objektiv-štěrbina
SPAD	jednofotonová lavinová dioda
SPB	fosfolipidová dvouvrstva na podkladu
SPR	povrchová plasmonová rezonance
SUV	malá unilamelární vezikula
S_x	singletní stav určité elektronové hladiny x
T	poločas života všech přechodů spojených s depopulací excitovaného stavu fluoroforu
T	část fluoroforů, která přejde do tripletního stavu

TCSPC	časově korelované jednofotonové čítání
TEA	triethanolamin
TLC	tenkovrstevná chromatografie
T_x	tripletní stav určité elektronové hladiny x
V_{eff}	efektivní objem
V_{max}	maximální rychlost reakce
w	poloměr laserového paprsku ve střední poloze
x,y,z	souřadnice systému
$X_{\text{triplet}}(\tau)$	část autokorelační funkce zahrnující zakázané přechody
z_0	parametr pro axiální difúzi
Δz	vzdálenost mezi pozicí vzorku a pozicí minimálního průměru laserového paprsku
ϵ_λ	molární extinkční koeficient
κ	celková účinnost detekce
λ	vlnová délka záření
ν	frekvence záření
σ	molekulární absorpční průřez
τ	časová změna oproti původnímu času t
τ_D	laterální difúzní čas
τ_m	poločas života fluorescence
τ_{triplett}	poločas života fluoroforů v tripletním stavu

2. Úvod a přehled literatury

Proteiny jsou základní „kameny“ jakéhokoli organismu. Jejich porucha, disfunkce, může vést k poškození správného fungování organismu. Abychom mohli takovýmto „nehodám“ zabránit, popřípadě jim předcházet, musíme znát mechanismy fungování příslušných proteinů. Pro pochopení funkce je nezbytná znalost struktury, která pak napomáhá k určení dalších nezbytných parametrů důležitých pro komplexnější pochopení jejich funkce. Mezi tyto parametry patří nejen detailní znalost molekulárně-biologického mechanismu funkce, ale i kinetika interakcí těchto proteinů s ligandy, membránami a dalšími proteiny. Nezanedbatelným parametrem je i dynamika proteinů, která nepřímo souvisí s již zmíněnou kinetikou. Tyto parametry získáváme pomocí nejrůznějších biochemických, fyzikálních, fyzikálně-chemických a matematických metod.

Pro zjištění struktury proteinů dnes nejčastěji používáme metody rentgenostrukturní analýzy a nukleární magnetické rezonance.

K poznání kinetiky interakce proteinů s ligandy, membránami či jinými proteiny se využívá velká řada metod, od absorpční spektrofotometrie, přes fluorescenční spektroskopii, kalorimetrii, SPR, cirkulární dichroismus, po Ramanovu spektroskopii.

Tato práce je zaměřená právě na fluorescenční spektroskopii, jakožto užitečnou metodu pro studium dynamiky respektive kinetiky interakce proteinů s fosfolipidovou dvojrůstvou. V této práci se bude pojednávat o značení proteinů fluorescenčními značkami, dále pak o celé řadě purifikačních biochemických metod (dialýza, tenkovrstevná chromatografie, gelová chromatografie, absorpční chromatografie) a o již zmíněné fluorescenční korelační spektroskopii jakožto metody k určení dynamiky proteinů.

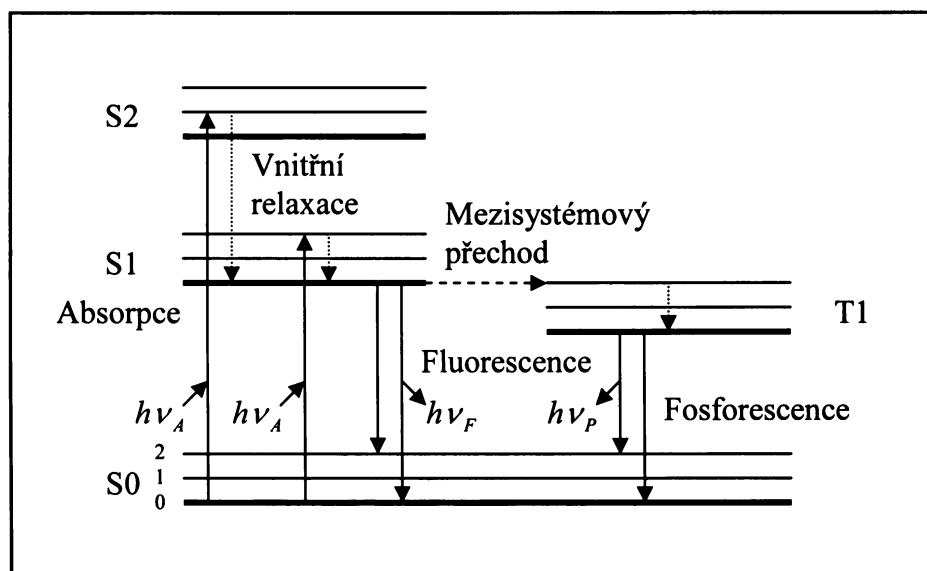
Tato práce vznikla ve spolupráci Katedry biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy s Ústavem fyzikální chemie Jaroslava Heyrovského Akademie věd České republiky.

2.1. Fluorescence^{1,2}

Fluorescenční spektroskopie využívá interakci elektromagnetického záření s molekulami. Tuto interakci provází řada jevů, které mohou být základem mnoha experimentálních technik. Může dojít k odrazu (měřenou veličinou je reflektance), průchodu s částečnou absorpcí (transmitance, absorbance), luminiscenčním jevům (fosforescence, fluorescence), elastickému (Rayleighovu) rozptylu a neelastickému Ramanovu rozptylu.

2.1.1. Jablonskiho diagram

Pro popis a diskusi dějů spojených s fluorescencí, fosforescencí se nejvíce využívá Jablonskiho diagram. Po absorbování záření molekulou přejde elektron ze základní elektronové hladiny S_0 (symbol S označuje singletní stav) na některou z vibračních hladin excitované elektronové hladiny S_1, S_2 (Obr. 1).



Obr. 1. Jablonskiho diagram (upraveno podle²)

Excitovaný elektron může podléhat několika různým jevům. Může dojít k vnitřní relaxaci, kdy elektron z vyšší excitované elektronové hladiny (např. S_2) přejde na nižší excitovanou elektronovou hladinu (např. S_1), nebo v rámci stejné excitované elektronové hladiny přejde elektron z vyšší vibrační hladiny na základní vibrační hladinu. Tento proces trvá přibližně 1ps. Elektron z této základní vibrační první excitované elektronové hladiny se může zářivým procesem vrátit na vrstvu S_0 (přechod $S_1 \rightarrow S_0$), tomuto procesu říkáme fluorescence a trvá přibližně 10 ps-1 μ s. Jinou možností je přechod z hladiny S_1 na T_1

hladinu (symbol T značí tripletní stav). Tento proces je spinově zakázaný, přesto k němu v malé míře dochází a říkáme mu mezisystémový přechod. Na této tripletní hladině opět dojde k vnitřní relaxaci na základní vibrační hladinu a pak dochází k zářivému procesu na základní elektronovou hladinu (přechod $T_1 \rightarrow S_0$), tento proces se nazývá fosforescence a trvá vteřiny až hodiny.

2.1.2. Stokesův posun

Pokud se podíváme na Jablonskiho diagram, vidíme, že se díky vnitřní konverzi a mezisystémovému přechodu „ztratí“ část energie na tyto nezářivé procesy. Ze známého Planckova vzorce pro výpočet energie:

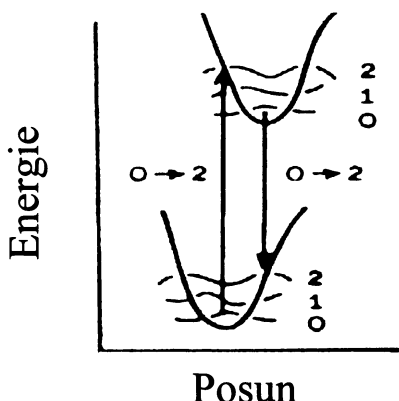
$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}, \quad (1)$$

kde h je Planckova konstanta, c značí rychlost světla ve vakuu a λ je vlnová délka, vyplývá, že energie je nepřímo úměrná vlnové délce. Díky tomuto jevu jsou fluorescenční spektra vůči spektrům absorpčním posunuta o určitou hodnotu vlnové délky. První, kdo si tohoto jevu všimnul byl G.G. Stokes, podle nějž je tento jev pojmenován.

2.1.3. Franck-Condonův princip

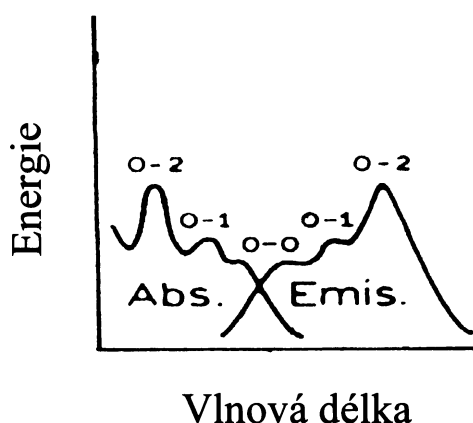
Franck-Condonův princip je založen na zjednodušení, že se během excitace a emise molekuly nemění vzájemná poloha jader, a tudíž se nemění jednotlivé vibrační vlnové funkce. Toto je možné proto, protože vůči rychlosti pohybu elektronů je rychlost pohybu jader v podstatě zanedbatelná. Schematické znázornění je na Obr. 2. Přidržíme-li se tohoto schematického znázornění, bude platit následující popis. Při excitaci je největší pravděpodobnost přechodu z nulté vibrační hladiny základního elektronového stavu na druhou vibrační hladinu prvního excitovaného stavu, protože elektron přejde na takovou vibrační hladinu o určité vlnové funkci, která nejvíce připomíná vlnovou funkci základního elektronového stavu. Naopak při emisi je největší pravděpodobnost přechodu z nulté vibrační hladiny prvního excitovaného elektronového stavu do druhé vibrační hladiny základního elektronového stavu. Pravděpodobnosti ostatních přechodů se snižují v řadě $0 \rightarrow 1$, $0 \rightarrow 3$, $0 \rightarrow 0$, $0 \rightarrow 4$ atd. (vibrační hladiny 3 a 4 nejsou na Obr. 2 znázorněny). Pro

různé molekuly je posun potenciálových křivek různý, tudíž pravděpodobnosti přechodů budou jiné.



Obr. 2 Schematické znázornění přechodu elektronů v rámci jedné molekuly (upraveno podle²).

S Franck-Condonovým principem úzce souvisí základní vlastnost fluorescenčních spekter, tedy zrcadlová symetrie k absorpčním spektrům (Obr. 3). Pravděpodobnosti přechodů jsou viditelné i v jemné vibrační struktuře v absorpčních a fluorescenčních spektrech. Jak bylo napsáno výše, určité přechody nastávají s vyšší pravděpodobností než jiné, tudíž nastávají častěji. Je tedy zřejmé, že právě tyto přechody budou mít v jemné vibrační struktuře absorpčních a emisních spektrech vyšší intenzitu než přechody s nižší pravděpodobností. Jelikož pravděpodobnost přechodu z nulté vibrační hladiny základního elektronového stavu na určitou hladinu prvního elektronového stavu při absorpci je stejná jako pravděpodobnost přechodu z této určité vibrační hladiny prvního elektronového stavu na nultou vibrační hladinu základního elektronového stavu při emisi, jsou absorpční a emisní spektra zrcadlově symetrická.



Obr. 3 Znázornění zrcadlové symetrie absorpčních a emisních fluorescenčních spekter (upraveno podle²).

2.1.4. Základní veličiny pro charakteristiku fluorescence

Mezi základní veličiny, jimiž je možno charakterizovat fluorescenci patří:

- Intenzita (F) – počet fotonů procházejících v daném směru jednotkovou plochou za jednotku času.
- Polarizace – směr kmitání elektrického vektoru elektromagnetické vlny.
- Doba dohasínání (τ) – je dána vnitřní dobou života excitovaného stavu, z něhož dochází k emisi.
- Kvantový výtěžek (Q) – poměr počtu emitovaných světelných kvant ku absorbovaným světelným kvantům jedním fluoroforem.
- Excitační spektrum – závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (energii, vlnočtu, frekvenci) při konstantní vlnové délce emitovaného záření.
- Emisní spektrum – závislost intenzity fluorescence na vlnové délce (energii, vlnočtu, frekvenci) při konstantní vlnové délce budícího záření.

V mnohých fluorescenčních metodách se nejvíce využívá vlastnosti polarizace fluorescence pro měření anizotropie, doba dohasínání fluorescence a excitačních a emisních spekter.

Jednou z nejdůležitějších charakteristik pro všechny fluorofory je kvantový výtěžek (Q), který můžeme definovat pomocí rychlostních konstant:

$$Q = \frac{k_m}{k_m + k_{nr}}, \quad (2)$$

kde k_m je rychlostní konstanta fluorescence a k_{nr} je rychlostní konstanta pro všechny nezářivé procesy spojené s uvolněním energie během depopulace excitovaného stavu fluoroforu (vnitřní konverze, mezisystémový přechod, ...). Dále je možno rovnici (2) přepsat do tohoto tvaru:

$$Q = \frac{k_m}{K}, \quad (3)$$

kde K odpovídá sumě rychlostních konstant všech procesů.

Jelikož emise fotonu je monomolekulární proces, řídí se kinetikou prvního řádu a má monoexponenciální dohasínání, tedy:

$$F(t) = F(0)e^{-kt}, \quad (4)$$

kde $F(t)$ je intenzita v čase t , $F(0)$ je intenzita v čase $t=0$, k je rychlostní konstanta.

Pokud:

$$\tau = \frac{1}{k}, \quad (5)$$

kde τ je poločas života fluorescence, můžeme na základě rovnice (5) přepsat rovnici (4) takto:

$$F(t) = F(0)e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (6)$$

Výraz pro kvantový výtěžek pak můžeme pomocí předchozích rovnic vyjádřit takto:

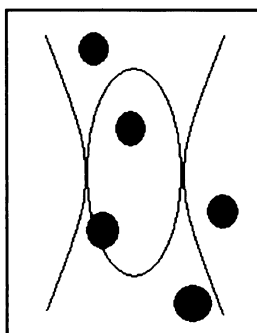
$$Q = \frac{T}{\tau_m}, \quad (7)$$

kde T je suma všech poločasů života.

Výše uvedené rovnice popisují přímou spojitost rychlostních konstant s dobou dohasínání fluorescence a kvantovým výtěžkem. Právě těchto spojitostí se využívá v mnoha fluorescenčních technikách.

2.2. FCS

Fluorescenční korelační spektroskopie je metoda, která poskytuje s vysokým rozlišením prostorovou i časovou analýzu molekul za velmi nízkých koncentrací vzorku. FCS byla poprvé použita na počátku sedmdesátých let minulého století, jako metoda, která navazovala na klasické relaxační metody. Základem FCS je měření, sledování a analýza fluktuací fluorescence v detekčním (konfokálním) objemu, jehož objem je přibližně jeden femtolitr (Obr. 4). Vyhodnocení těchto fluktuací je možné jen při snížení počtu sledovaných molekul takovým způsobem, že je poté možno sledovat fluoreskující molekuly jednotlivě, tudíž rozpoznat příchod jedné molekuly a její pohyb.



Obr. 4 Schematické znázornění konfokálního objemu.

Analýzou fluktuací je poté možno získat různé informace (fyzikální parametry) o sledovaných molekulách. Mezi tyto fyzikální parametry patří určení koncentrace, difúzních koeficientů, rychlostních konstant inter- a intramolekulárních reakcí biomolekul. Fluktuace intenzity detekovaného signálu jsou kvantifikovány pomocí autokorelační funkce (ACF). Na základě jejího tvaru je možno následně určit parametry uvedené výše. Z hodnoty amplitudy ACF je možno určit koncentraci fluorescenčních částic v konfokálním objemu, z tvaru ACF je pak možno zjistit informaci o zastoupení tripletu, o rotační fluktuaci a difúzi⁶.

Další výhodou této techniky je její neinvazivnost. Ozáření laserovým paprskem při použití vhodné intenzity není nikterak ničující pro studované biomolekuly. Je možno měřit ve fyziologickém pH a ve vodném prostředí (pufru).

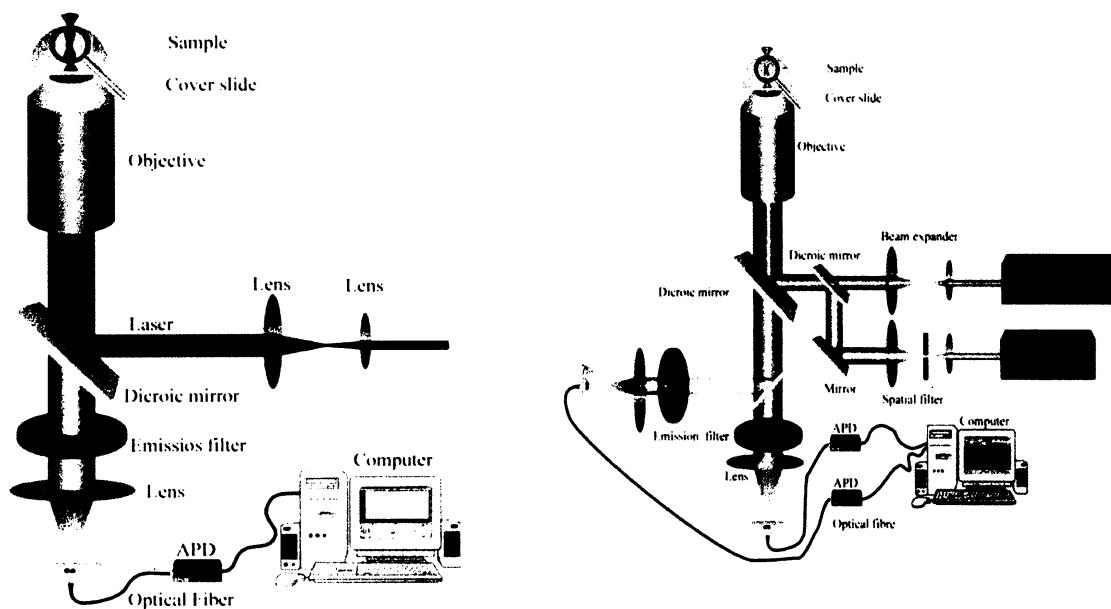
Díky výše uvedeným informacím o fluorescenční korelační spektroskopii má tato metoda spoustu využitelných aplikací:

- Sledování koncentračních fluktuací fluorescenčně značeného vzorku³.
- Díky vysoké citlivosti FCS je možno využít tuto metodu při sledování fluorescenčně značených molekul procházejících matabolickými cestami v příslušném organismu³.
- Možnost sledovat difúzi vezikulů, určit difúzní konstanty, rotační pohyby, interakce mezi molekulami⁴.
- Možnost sledovat agregaci molekul⁴.
- Na základě rozdílných dohasínání odlišit volné vezikuly v roztoku od membrány⁵.
Jak vezikuly tak membrána jsou značeny stejnou fluorescenční značkou.

V této diplomové práci je použita a rozšířena poslední zmíněná aplikace FCS. Aplikujeme ji na studium interakce proteinů s membránou a určujeme jak difúzní koeficienty volného a vázaného proteinu, tak i rychlostní konstanty interakce.

2.2.1. Experimentální provedení

Schema aparatury pro excitaci jedním a dvěma lasery je zobrazeno na Obr. 5.



Obr. 5 Schema aparatury pro FCS pro excitaci jedním laserem (vlevo) a dvěma lasery (vpravo)⁶.

Laserový paprsek je veden přes čočky na dichroické zrcadlo. Toto zrcadlo odráží paprsek o vlnové délce nižší než je jeho charakteristická vlnová délka a paprsek o vyšší vlnové délce propouští. Paprsek je objektivem fokusován do vzorku. V tomto vzorku excituje molekuly, které následně emitují fluorescenci posunutou k vyšším vlnovým délkám. Tato fluorescence je následně sbírána objektivem a jde přes dichroické zrcadlo, které ji propustí. Poté přechází přes emisní filtr, přes štěrbinu na detektor. Z tohoto detektoru je signál posílán do počítače a následně vyhodnocován.

Poměr signálu k šumu je velmi závislý na systému filtrů. Jako první filtr funguje dichroické zrcadlo, které odráží paprsek o jisté vlnové délce a následně červeně posunutou fluorescenci propouští. Dále jde světelný paprsek přes emisní filtr, který má za úkol odstranit světlo odražené od vzorku a Rayleighův rozptyl.

Abychom mohli studovat např. reakce enzymu a substrátu a odlišit navázaný substrát od volného, kdy se významně nemění molekulová hmotnost během reakce a tudíž ani difúze komplexu, je možnost označit enzym a substrát dvěma různými fluorescenčními značkami a sledovat změny v průběhu reakce. Pro takovýto experiment je třeba dvoubarevné uspořádání, jehož schema je znázorněno na Obr. 5 vpravo. Toto schema se mnoho nemění od jednolaserového FCS, jen je potřeba dvou laserů a k nim příslušných filtrů. Problém je pouze v synchronizaci a nastavení laserových paprsků tak, aby se konfokální objemy překrývaly a měly stejnou velikost, což se řeší složitou kalibrací přístroje⁷.

2.2.2. Teorie autokorelační analýzy^{6,8}

Jak bylo řečeno v úvodu o FCS, naměřená data jsou vyhodnocovány autokorelační analýzou. Při FCS měření je signál emitován molekulami v konfokálním objemu, jejichž počet se řídí Poissonovým rozdělením. To znamená, že plošná fluktuace počtu částic N lze zapsat jako:

$$\frac{\sqrt{\langle(\partial N^2)\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{\sqrt{\langle(N - \langle N \rangle)^2\rangle}}{\langle N \rangle} = \frac{1}{\sqrt{\langle N \rangle}}. \quad (8)$$

Fluorescence F emitovaná molekulami v konfokálním objemu je definovaná jako odchylka průměrného signálu v čase, tedy:

$$\partial F(t) = F(t) - \langle F(t) \rangle, \quad (9)$$

kde $F(t)$ je:

$$\langle F(t) \rangle = \frac{1}{T} \int_0^T F(t) dt. \quad (10)$$

Pokud jsou fluktuace způsobeny změnou koncentrace ∂C uvnitř efektivního objemu V_{eff} , můžeme rovnici pro fluktuaci fluorescence zapsat jako:

$$\partial F(t) = \kappa \int_V I_{\text{ex}}(\underline{r}) S(\underline{r}) \partial(\sigma q C(\underline{r}, t)) dV, \quad (11)$$

kde κ je celková účinnost detekce, $I_{\text{ex}}(\underline{r})$ prostorové rozdělení excitační energie s maximální amplitudou I_0 , $S(\underline{r})$ optická funkce přenosu paprsku spojená s kombinací objektiv-šterbina, $\partial(\sigma q C(\underline{r}, t))$ dynamika fluoroforu na stupni jednotlivé částice, $\partial\sigma$ je změna v molekulárním absorpčním průřezu, ∂q je fluktuace v kvantovém výtěžku a $\partial C(\underline{r}, t)$ je fluktuace lokální koncentrace částic způsobená např. Brownovým pohybem.

Pro další vyjádření optické funkce přenosu paprsku $S(\underline{r})$ je použita aproximace Gaussovým rozdělením, která umožňuje odvodit jednoduché analytické řešení autokorelační funkce. Přesnější popis $S(\underline{r})$ je možno nalézt v literatuře⁹, ale analytické vyjádření takto získané autokorelační funkce by bylo značně složité.

Normalizovaná autokorelační funkce je definována takto:

$$G(\tau) = \frac{\langle \partial F(t) \partial F(t + \tau) \rangle}{\langle F(t) \rangle^2}, \quad (12)$$

kde τ značí časovou změnu oproti původnímu času t .

Pro vztah mezi difúzním časem τ_D pro molekulu v konfokálním objemu a mezi difúzním koeficientem D platí:

$$\tau_D = \frac{r_0^2}{4D} \quad (13)$$

a definujeme-li vztah pro efektivní konfokální objem:

$$V_{eff} = \pi^{\frac{3}{2}} r_0^2 z_0, \quad (14)$$

můžeme vypočítat autokorelační funkci pro jeden druh molekul volně difundujících v konfokálním objemu:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}}. \quad (15)$$

První část rovnice (15) odpovídá reciproké hodnotě průměrného počtu částic v konfokálním objemu.

Autokorelační funkce pro jeden druh laterálně difundujících molekul je pak možno vyjádřit takto:

$$G(\tau) = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \frac{1}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_D}\right)} \frac{1}{\sqrt{1 + \left(\frac{r_0}{z_0}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_D}}}. \quad (16)$$

Známe-li diametr r_0 a určíme-li z kalibrace parametr z_0 , můžeme vypočítat lokální koncentraci fluoreskujících molekul z amplitudy autokorelační křivky $G(0)$:

$$G(0) = \frac{1}{\langle N \rangle} = \frac{1}{V_{eff} \langle C \rangle} \Leftrightarrow \langle C \rangle = \frac{1}{V_{eff} G(0)}. \quad (17)$$

Do této chvíle nebyl brán v potaz možný přechod části energie do tripletního stavu. Vezmeme-li v potaz tento fakt, dostaneme nový výraz pro autokorelační funkci:

$$G_{\text{celková}}(\tau) = G_{\text{pohybová}}(\tau)X_{\text{triplet}}(\tau), \quad (18)$$

kde $X_{\text{triplet}}(\tau)$ je ta část molekul, která přejde do tripletního stavu a její matematické vyjádření je toto:

$$X_{\text{triplet}}(\tau) = 1 - T + Te^{-\frac{\tau}{\tau_{\text{triplett}}}}, \quad (19)$$

kde T je frakce fluoroforu, která přechází do tripletního stavu a τ_{triplett} je poločas života molekul v tripletním stavu.

Autokorelační funkci, která zahrnuje různé druhy molekul ovlivněné různými pohyby můžeme vyjádřit takto:

$$G_{\text{směrné}}(\tau) = \frac{1}{V_{\text{eff}}} \frac{\sum_i \eta_i \langle C_i \rangle M_i(\tau)}{(\sum_i \eta_i \langle C_i \rangle)^2}, \quad (20)$$

kde $M_i(\tau)$ je výraz pro pohyb molekuly a je závislý na konkrétním případě. Tento výraz se liší v závislosti na 3D a 2D difúzi molekul⁶ a je vyjádřen v nezakroužkované části rovnic (15) a (16).

2.2.3. Teorie kroskorelační analýzy

Autokorelační analýza nám umožňuje vyjádřit vztah mezi intenzitou daného signálu v různém čase.

Pomocí kroskorelace můžeme srovnat dva nezávislé signály, např. naměřené pro různé molekuly. Prakticky kroskorelace poskytuje dvě možné aplikace. První je prostorová kroskorelace mezi fluktuacemi naměřenými ve dvou oddělených konfokálních objemech¹⁰. Druhou aplikací je možnost odlišit fluorofory značené jednou nebo dvěma fluorescenčními značkami. Pro druhou možnost¹¹ je potřeba použít excitaci dvěma lasery, což je doprovázeno problémy uvedenými v kapitole 2.2.1.. Jejich vzájemné ovlivňování je způsobeno pouze jejich interakcemi během reakce. Zaznamenaný fluktuující fluorescenční signál je možno zapsat jako:

$$\partial F_1(t) = \int S_1(r) \eta_1 \partial(C_1(r,t) + C_{12}(r,t)) dV \quad (21)$$

$$\partial F_2(t) = \int S_2(r) \eta_2 \partial(C_2(r,t) + C_{12}(r,t)) dV, \quad (22)$$

kde $S_i(r)$ je rozdělení prostorové intenzity detekované fluorescence pro molekuly $i=1,2$, $C_i(r,t)$ je koncentrace jedné značené molekuly i ($i=1,2$) a $C_{12}(r,t)$ je koncentrace dvojmo značených molekul při interakci.

Pohyb různých částic je dán parametrem $M_i(\tau)$. Předpokládáme-li ideální podmínky, korelační křivky mohou být vyjádřeny jako¹²:

a) pro autokorelaci:

$$G_i(\tau) = \frac{(\langle C_i \rangle M_i(\tau) + \langle C_{12} \rangle M_{12}(\tau))}{V_{eff} (\langle C_i \rangle + \langle C_{12} \rangle)^2} \quad \text{pro } i=1,2 \quad (23)$$

b) pro kroskorelaci:

$$G_x(\tau) = \frac{\langle C_{12} \rangle M_{12}(\tau)}{V_{eff} (\langle C_1 \rangle + \langle C_{12} \rangle) (\langle C_2 \rangle + \langle C_{12} \rangle)} \quad (24)$$

Veliká výhoda kroskorelace je v tom, že je za určitých podmínek přímo úměrná koncentraci značených molekul při interakci. Známe-li amplitudy autokorelací pro jednotlivé molekuly, platí, že:

$$\langle C_{12} \rangle = \frac{G_x(0)}{G_1(0)G_2(0)V_{eff}}. \quad (25)$$

2.2.4. Z-scan

Měří-li se pomocí FCS v roztoku (třidimenzionální difúze), není potřeba znát přesnou polohu zaostřeného paprsku v detekovaném objemu. Použije-li se ovšem FCS metoda pro měření dvoudimenzionální difúze na membráně, výsledek tohoto měření je velmi ovlivňován polohou membrány vůči zaostřenému paprsku. Aby FCS měření na membráně byla srovnatelná, je potřeba znát přesnou polohu fokusovaného paprsku vzhledem k planárnímu vzorku v detekovaném objemu. Toto nám umožňuje tzv. Z-scan¹³. Tuto metodu můžeme použít pro kalibraci při FCS měření, ale nejen to. Pomocí této metody můžeme určit disociační konstanty (použitím Langmuirovy izotermy), difúzní koeficienty¹³ a koncentraci fluorescenčních molekul lokalizovaných na fosfolipidové dvouvrstvě¹⁴.

Tato metoda je založena na získávání jednotlivých FCS měření v závislosti na pozici vzorku v z-ové souřadnici.

Poloměr laserového paprsku můžeme definovat jako:

$$w^2 = w_0^2 \left(1 + \frac{\lambda_0^2 \Delta z^2}{\pi^2 n^2 w_0^4} \right), \quad (26)$$

kde w_0 je poloměr laserového paprsku ve střední poloze, λ je excitační vlnová délka ve vakuu, n je index lomu a Δz je vzdálenost mezi pozicí vzorku a pozicí minimálního průměru laserového paprsku. Průměrný počet částic N na membráně v konfokálním objemu je:

$$N = N_0 \left(1 + \frac{\lambda_0^2 \Delta z^2}{\pi^2 n^2 w_0^4} \right), \quad (27)$$

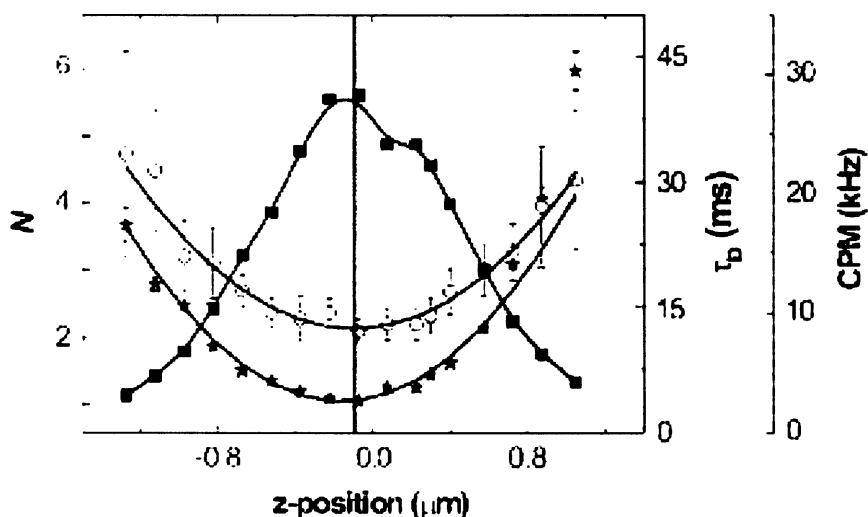
kde

$$N_0 = \pi c w_0^2, \quad (28)$$

c je průměrná koncentrace difundujících fluorescenčních molekul v rovině kolmé na laserový paprsek. Dále můžeme určit vztah pro difúzní koeficient D při volné laterální difúzi difundujících molekul:

$$\tau_D = \frac{w_0^2}{4D} \left(1 + \frac{\lambda_0^2 \Delta z^2}{\pi^2 n^2 w_0^4} \right). \quad (29)$$

Výsledkem Z-scanu je určení přesné pozice laserového paprsku v detekovaném objemu vůči membráně, což se projevuje minimalizací počtu částic popřípadě difúzních časů v závislosti na pohybu objektivu v z-ové souřadnici.



Obr. 6 Závislost počtu částic (N -černé hvězdičky), difúzních časů (τ_D -průhledná kolečka) a počtu fotonů na jednu molekulu fluoroforu (CPM-černé čtverečky) na z-ové souřadnici (převzato z¹⁴).

Minimu počtu částic (difúzních časů) odpovídá maximum signálu přicházejícího na detektor, což je dáno lokalizací vzorku přesně uprostřed konfokálního objemu (Obr. 4).

2.2.5 FLCS - Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

FLCS je kombinace FCS s TCSPC (Time-Correlated Single Photon Counting). Je to metoda, kterou separujeme různé příspěvky měřené na FCS. Tedy z jednoho naměřeného histogramu dohasínání fluorescence, který získáme měřením dvou molekul se stejnou nebo různou fluorescenční značkou a jejichž časy dohasínání (nemusí být fitovatelné sumou exponenciál) se musí vzájemně lišit, dokážeme pomocí této metody získat příspěvky pro každé dohasínání zvlášť¹⁵.

Tato metoda je velice užitečná v mnoha biochemických a fyzikálně-chemických aplikacích. Můžeme studovat dynamiku přechodu mezi dvěma konformačními stavy pro fluorescenčně značený protein, kdy jednotlivé stavy různě ovlivňují čas dohasínání fluorescence¹⁶. Další možností využití této metody je možnost odlišení vezikulů (tedy lipidových koulí) v roztoku od membrány, která je imobilizovaná na speciálním povrchu zhášejícím fluorescenci. Přitom jak vezikuly tak membrána jsou značené stejnou fluorescenční značkou. Toto odlišení je na základě rozdílných dohasínání vezikulů a membrány⁵.

Tato práce by ráda navázala na tyto experimenty a pokusila by se aplikovat tuto metodu na proteiny, tedy odlišit proteiny pohybující se volně v roztoku (třidimenzionální difúze) od proteinů navázaných na membráně (dvoudimenzionální difúze). Dále pak pomocí FLCS analýzy určit kinetické konstanty interakce proteinů s membránou.

2.3. Fosfolipidové dvojvrstvy

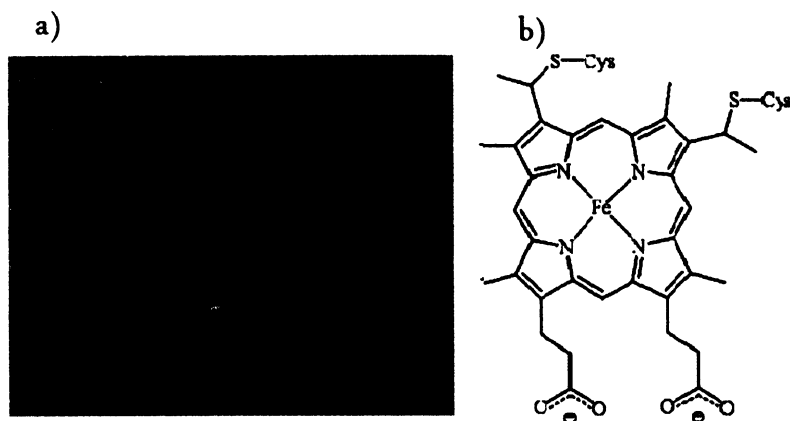
Membrány (fosfolipidové dvojvrstvy) jsou tvořeny ze dvou vrstev lipidů, kde hydrofobní část lipidů je schovaná uvnitř této dvojvrstvy a hydrofilní část je vystavená na povrchu membrány. V této práci byla jako náhražka přírodní membrány použita uměle vytvořená fosfolipidová dvojvrstva imobilizovaná na podkladu (SPB-supported phospholipid bilayer).

2.4. Proteiny

Jak již bylo zmíněno v úvodu, proteiny jsou základní stavební kameny jakéhokoliv organismu. Můžeme je dělit dle nejrůznějších kritérií, např. dle primární struktury, dle sekundární struktury, dle funkce, zda prochází skrz membránu či s ní jen interagují. Právě interakce proteinů s membránou jsou hojně studovány z hlediska jejich kinetiky, protože ta nám může napovědět ledasco o funkci a mechanismu funkce proteinů. Tato kinetika byla v této práci studována pomocí FCS a FLCS. Jako proteiny interagující s membránou byly vybrány *cytochrom c* a *prothrombin*.

2.4.1. Cytochrom c

Cytochrom c je globulární protein interagující s membránou. Patří do skupiny hemových proteinů. Na povrchu tohoto proteinu se nachází několik lysinových zbytků, které dávají proteinu kladný povrchový náboj. Díky tomuto náboji je pak možná interakce cytochromu c se záporně nabitou membránou. Krystalová struktura cytochromu c je na Obr. 7.

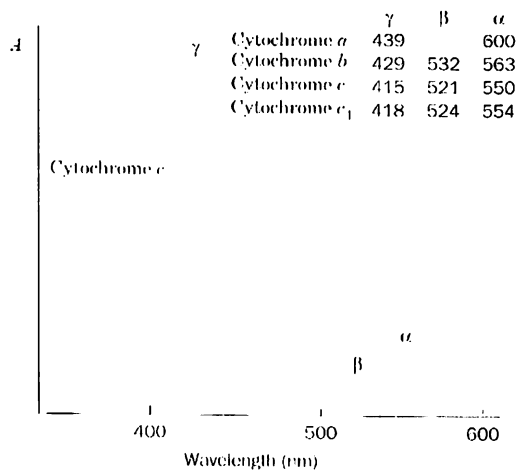


Obr. 7 Na obrázku a) krystalová struktura hovězího cytochromu c (PDB:P62894, obrázek upraven v programu PyMol) spolu s hemem c v aktivním místě, na obrázku b) znázornění hemu c (převzato z ¹⁷).

Cytochrom c obsahuje hem c, který je do proteinu kovalentně ukotven pomocí dvou thioeterových vazeb vzniklých z cysteinu a z vinylové skupiny porfyrintu v pozicích 2 a 4¹⁷. Díky přítomnosti hemu získávají cytochromy obecně charakteristické absorpční spektrum (Obr. 8). V tomto spektru jsou tři charakteristické pásy α , β a γ , jejichž poloha závisí na struktuře ligandů, které se vážou na atom železa.

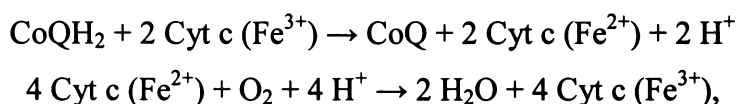
Železo v hemu je ligováno ve čtyřech pozicích porfyrintovými dusíky, pátým a šestým ligandem jsou aminokyselinové zbytky histidinu a methioninu, které jsou součástí skeletu

proteinu. Právě přítomnost těchto dvou rozdílných aminokyselinových zbytků v aktivním místě cytochromu c přispívá k vyššímu redukčnímu potenciálu železa oproti hemu s železem koordinovaným dvěma histidinovými zbytky¹⁸.



Obr. 8 Absorpční spektrum cytochromu c, porovnání polohy jednotlivých pásů s jinými typy cytochromů⁽¹⁹⁾.

Funkce tohoto proteinu je velmi různorodá a i přes již velmi rozsáhlý výzkum není plně objasněna. Základní funkce cytochromu c je přenos elektronu v dýchacím řetězci. Cytochrom c funguje jako prostředník mezi komplexem III (koenzym Q:cytochrom c oxidoreduktasa) a komplexem IV (cytochrom c oxidasa). Přesněji řečeno v komplexu III odebírá elektron cytochromu c₁ a v komplexu IV předává tento elektron cytochromu a. Tento proces lze shrnout do dvou následujících rovnic:



kde Q značí ubichinon a QH₂ značí ubihydrochinon¹⁹.

Obecně se má za to, že při přechodu elektronů z a na cytochrom c dojde k rozbalení globulární struktury proteinu, což umožní těsnější interakci s příslušným proteinem a tedy snadnější přenos.

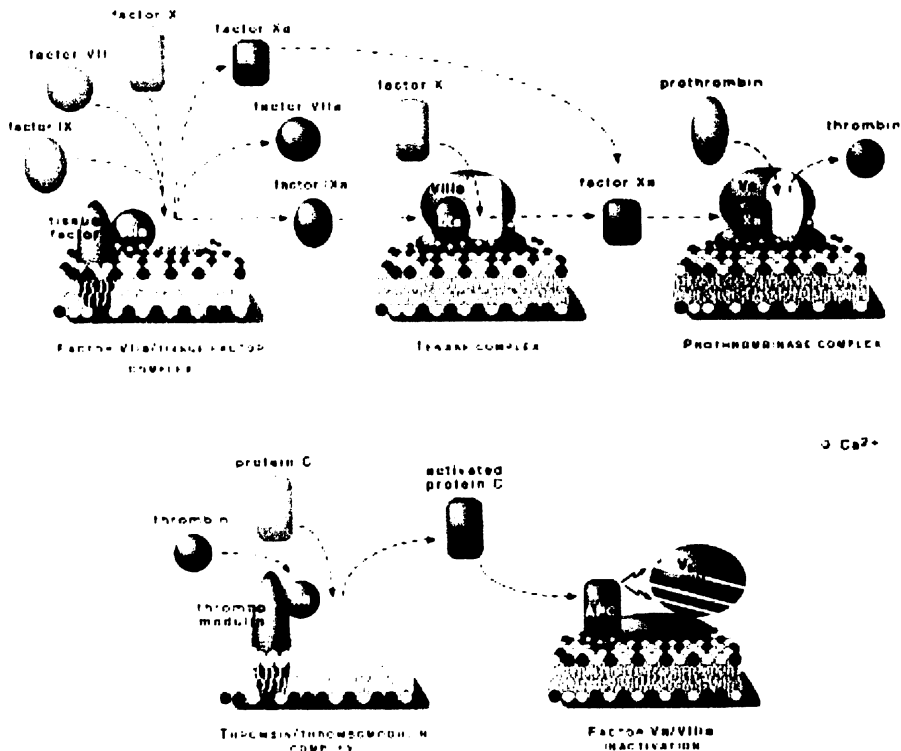
Dále se má za to, že cytochrom c asistuje při apoptose buňky. Toto je nově objevená funkce, která není ještě detailněji objasněna²⁰.

U cytochromu c byla navíc zjištěna značná stabilita jak vůči pH, tak i vůči teplotě. Byla zjištěna²¹ vratná tepelná denaturace, která funguje i přes širší rozmezí pH.

2.4.2. Prothrombin

Koagulační proteiny, koagulační kaskáda

Prothrombin je jedním z celé řady proteinů, které se podílejí na srážení krve. Celá kaskáda enzymových reakcí, které tento proces doprovázejí, je lokalizována na povrchu membrán, tudíž i prothrombin je protein interagující s membránou. Proces je spuštěn tehdy, když se integrální protein zvaný tkáňový protein dostane do kontaktu s krví²². Poté dochází k propagaci signálu až ke konečné aktivaci thrombinu, který se aktivuje z prothrombinu. Thrombin pak katalyzuje reakci přechodu fibrinogenu na fibrin, který následně spontánně zesítuje za vzniku netozpustného fibrinového polymeru²³. Kaskáda aktivace thrombinu se dá rozdělit do tří komplexů znázorněných na Obr. 9. Tkáňový faktor za pomoci dalších tří faktorů (faktor IX, faktor VII a faktor X) aktivuje faktor VIIa. Dále na tomto komplexu jsou aktivovány další faktory (faktor Xa, faktor IXa). Faktor IXa jde do druhého komplexu, kde spolu s faktorem VIII dává vzniku dalšímu množství faktoru Xa, který pak s faktorem Va formuje prothrombinasový komplex, na kterém dochází ke vzniku thrombinu²⁴.



Obr. 9 Kaskáda aktivace prothrombinu na thrombin a následná regulace tvorby thrombinu (převzato z²⁷).

Vznik thrombinu je zpětně regulován kaskádou antikoagulačního proteinu C, který spolu s thrombinem vstupuje do thrombomodulinového komplexu a tím se aktivuje^{25,26}. Aktivovaný protein C dále pak inaktivuje faktory VIIIa a Va, které se podílí na tvorbě thrombinu.

Interakce periferních proteinů s membránou je podmíněna přítomností vápenatých iontů²⁷. Vápenaté ionty interagují s tzv. Gla doménou, která se nachází na N-konci proteinu a obsahuje 9-12 aminokyselinových zbytků γ -karboxyglutamové kyseliny, a s anionickými fosfolipidy (těm odpovídá fosfatidylserin). Objasnění interakce proteinů, které obsahují Gla doménu (tedy i prothrombinu), vedlo v nedávné době k mnoha dohadům o přesném mechanismu. Dnes se má za to, že vápenaté ionty iontově interagují s aminokyselinami proteinu za tvorby jakési smyčky²⁸. Tato smyčka se pak nekovalentně váže na membránu. Toto vysvětlení ale neobjasňuje to, že membrány obsahující fosfatidylserin poskytují daleko optimálnější funkční vazebná místa než ostatní fosfolipidy. Na základě různých proteinů obsahujících Gla doménu bylo zjištěno, že při konformačních změnách proteinu během vazby na membránu dochází k tvorbě hydrofilní štěrbiny (pukliny), která je tvořena aminokyselinami lysinem, serinem a Gla doménou. Tato puklina může mít komplementární tvar a náboj k polární skupině fosfatidylserinu. Proto afinita membrány obsahující fosfatidylserin k proteinu, který obsahuje Gla doménu, je větší, než afinita k jiným fosfolipidům²⁹ a disociační konstanta těchto proteinů k membráně obsahující fosfatidylserin se pohybuje v rozmezí 1-5 μ M (závislé na obsahu PS v membráně, viz. Tab. 1)

Tab. 1 Závislost disociační konstanty fragmentu 1 hovězího prothrombinu na složení membrány³⁰.

Složení membrány	K_d (μ M)
5/95 (mol/mol) PS/POPC	5,3 \pm 0,1
15/85 (mol/mol) PS/POPC	3,8 \pm 0,1
25/75 (mol/mol) PS/POPC	0,9 \pm 0,2

Struktura prothrombinu

Prothrombin je globulární protein, který obsahuje 625 aminokyselin, molekulová hmotnost je 70 506 Da. Molekula prothrombinu obsahuje čtyři hlavní řetězce:

- fragment 1 – 156 aminokyselin (aminokyseliny 44-199),
- fragment 2 – 118 aminokyselin (aminokyseliny 200-317),
- lehký řetězec thrombinu – 49 aminokyselin (aminokyseliny 318-366),
- těžký řetězec thrombinu – 259 aminokyselin (aminokyseliny 367-625).

Prvních 43 aminokyselin je signální sekvence. Krystalová struktura je na Obr. 10.

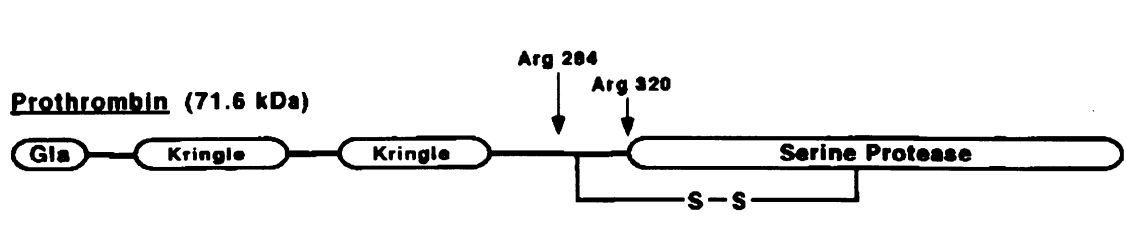


Obr. 10 Krystalová struktura hovězího prothrombinu (PDB:P00735, upraveno v programu PyMol).

Běžněji se ale molekula prothrombinu popisuje pomocí domén (Obr. 11):

- Gla doména,
- 2 kringle domény,
- doména serinové proteasy.

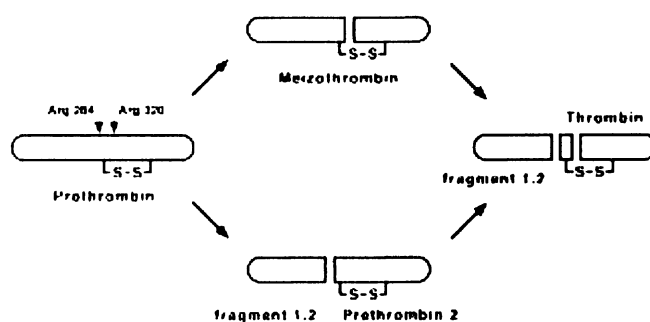
Gla doména je shodná se signální sekvencí, tedy nachází se v regionu prvních 40 aminokyselin. Je vysoce konzervovaná a je postranslačně modifikovaná za pomoci vitamínu K, který napomáhá karboxylaci glutamové kyseliny.



Obr. 11 Schematické znázornění domén prothrombinu (převzato z²⁷).

Aktivace thrombinu

Při aktivaci prothrombinu na thrombin dochází k odštěpení fragmentu 1 a 2, dále ke štěpení mezi lehkým a těžkým řetězcem thrombinu. Celý mechanismus je komplikovaný a může probíhat dvěma způsoby (Obr. 12), které jsou závislé na přítomnosti aktivovaného faktoru Xa³⁰, jenž je aktivován v prvním (komplex faktoru VIIa/tkáňového faktoru) a druhém komplexu.



Obr. 12 Schematické znázornění dvou možných způsobů aktivace thrombinu z prothrombinu (převzato z²⁷).

- V prvním mechanismu je prothrombin štěpen ve vzdálenosti 60 Å od membrány faktorem Xa za argininem 320 za vzniku meizothrombinu^{31,32}. Při přechodu z prothrombinu na meizothrombin dochází k prodloužení molekuly asi o 20 Å. Toto prodloužení umožní další štěpení faktorem Xa ve stejné vzdálenosti od membrány, ovšem o přibližně 40 aminokyselin blíže k N-konci (přesněji za argininem 284). Po tomto štěpení se uvolní fragmenty 1 a 2 (cit.^{33,34}). Dva vzniklé řetězce thrombinu jsou propojeny pomocí disulfidické vazby.
- Druhý mechanismus není ještě plně objasněn. Jako štěpící proteasa v něm vystupuje také faktor Xa, který nejdříve štěpí prothrombin za argininem 284. Tím se oddělí fragmenty 1 a 2 a vznikne prethrombin. Ten je pak dále štěpen za argininem 320 za vzniku thrombinu^{35,36}. Opět oba dva řetězce vzniklého thrombinu jsou propojeny S-S můstkem.

Katalytická účinnost faktoru Xa pro štěpení obou vazeb je velmi podobná, což by předpokládalo vznik ekvimolárního množství prethrombinu a meizothrombinu. Ovšem díky přítomnosti fosfatidylserinu v membráně je upřednostňován vznik meizothrombinu nad vznikem prethrombinu^{37,38,39}.

Kinetické aspekty interakce koagulačních proteinů s lipidy

Přítomností membrány se výrazně snižuje zdánlivá Michaelisova konstanta (K_m) reakce substrátů oproti reakci v nepřítomnosti membrány. Pokles Michaelisovy konstanty a zvýšení maximální rychlosti reakce (V_{max}) vyplývá a) ze zvýšení koncentrace substrátu v blízkosti membrány nebo přímo na membráně⁴⁰, b) z konformačních změn, které nastávají v průběhu reakce a které přítomnost membrány (tedy možnost tvořit enzymové komplexy) usnadňuje^{31,32,41}.

Právě díky možnosti tvořit enzymové komplexy se katalytická účinnost (k_{cat}/K_m) přibližuje teoretickému maximu pro enzymatické reakce řízené difúzí ($\approx 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$). Další aspekt přítomnosti membrány je možnost dvoudimenzionálního pohybu (přenosu) aktivovaných substrátů z jednoho komplexu na druhý⁴². Jelikož rychlostní disociační konstanta obecně koagulačních proteinů mezi proteinem a membránou je více než milionkrát nižší než příslušná rychlostní asociační konstanta, je pro přechod z jednoho komplexu na druhý daleko jednodušší a rychlejší dvoudimenzionální difúze po membráně, než disociace z membrány, třídimenzionální difúze ve volném prostoru a následná asociace na příslušné místo. Navíc dvoudimenzionální difúze je usnadněna tekutostí membrány⁴³. Tudíž je tato difúze jedním z faktorů ovlivňujících rychlost jednotlivých aktivačních reakcí.

Jedna ze složek ovlivňujících katalytickou účinnost a aktivitu koagulačních komplexů je přítomnost a poměr zastoupení fosfatidylserinu vůči ostatním fosfolipidům. V prothrombinasovém komplexu, se katalytická účinnost blíží maximu v přítomnosti 10-15 mol% fosfatidylserinu v membráně. S dalším zvyšováním zastoupení PS se katalytická účinnost snižuje⁴¹. Toto pozorování je odlišné od ostatních anionických lipidů, jež obvykle vykazují maximum aktivity s 25-50 molárními procenty⁴⁴. Překvapivě některé koagulační faktory se vážou stereospecificky, tedy s vyšší afinitou k L-fosfatidylserinu než k D-fosfatidylserinu^{45,46,47}.

Z těchto poznatků o složení membrán bylo vycházeno při navrhování jednotlivých pokusů, kde množství zastoupení fosfatidylserinu ve vytvořených membránách se pohybovalo od 0 % (tedy bez fosfatidylserinu) do 20 %.

3. Cíl práce

Cíle této diplomové práce lze rozdělit do několika skupin.

- 1) Značení lipidů (DOPE - 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin) fluorescenční značkou a následná purifikace a detekce pomocí základních jednoduchých biochemických a fyzikálních technik.
- 2) Značení proteinů (cytochromu c a prothrombinu) fluorescenční značkou a následná purifikace od volné fluorescenční značky pomocí základních biochemických technik.
- 3) Příprava homogenních fluorescenčně značených membrán, které poslouží jako SPB pro sledování interakce proteinů s těmito membránami.
- 4) Pomocí časově rozlišené fluorescenční korelační spektroskopie a Z-scanu určit disociační konstanty a difúzní koeficienty vazby prothrombinu na membránu.
- 5) Pomocí kroskorelace na FLCS určit rychlostní konstanty k_{on} a k_{off} pro vazbu prothrombinu na membránu a jeho disociaci.

4. Materiál a metody

4.1. Značení a purifikace lipidů

Fosfolipidy 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolamin (DOPE), 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DOPC) a 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylserinu (DOPS) byly zakoupeny od firmy Avanti Polar Lipids. DOPE lipidy byly značeny komerčními fluorescenčními značkami atto o vlnových délkách excitace (488 respektive 501 a 633), které byly zakoupeny od firmy Atto-Tec GmbH (Siegen/Německo). Značení bylo provedeno pomocí $-NH_2$ skupiny lipidů za vzniku tzv. „NHS-esterů“.

Pro značení lipidů byla připravena směs 1,14 μM DOPE, 1,14 μM TEA (triethanolamin) a 1,6 μM atto 488/633. Přítomnost triethanolaminu byla nutná pro „vychytání“ všech volných $-NH_2$ skupin ve směsi, které by rušily reakci. Tato směs byla rozpuštěna v 60 μM bezvodém methanolu. Reakce byla inkubována 90 minut za laboratorní teploty a průběh reakce byl detekován pomocí tenkovrstevné chromatografie (pouze při značení attem 488).

Pro oddělení značeného lipidu od volné fluorescenční značky byla použita absorpční chromatografie (Silicagel/Kiesegel 60, 230-400 mesh). Délka kolony 20 cm, jako eluent použita směs chloroform/methanol/voda (60/25/4). Veškerá reakční směs byla převedena na kolonu. Pomocí absorpční chromatografie se vyprofilovaly dva silné pásy. Tyto pásy byly sebrány jako frakce I a frakce II.

Tyto frakce byly detekovány pomocí tenkovrstevné chromatografie (TLC). Jako TLC destičky byly použity destičky Silufol (Kavalier, sorbent – Silpearl – širokoporézni silikagel podle Pitry, pojídlo – škrob) a jako eluent byla použita směs chloroform/methanol/voda (60/25/4).

Poté bylo z obou frakcí pod dusíkovou atmosférou odpařeno organické rozpouštědlo, následně byly dosušeny pod vakuovou pumpou. Vysušený vzorek byl rozpuštěn ve 3 ml methanolu.

Koncentrace I. a II. frakce byla určena pomocí spektrofotometrie na spektrofotometru Hélios Unicam. Extinkční koeficient pro atto 488 je $\epsilon_{501} = 90000 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$ a extinkční koeficient pro atto 633 je $\epsilon_{633} = 130000 \text{ cm}^{-1}M^{-1}$.

Po půl roce byla zjišťována míra disociace vázané fluorescenční značky od samotného lipidu. Toto bylo detekováno pomocí TLC. Jako eluent byla použita směs chloroform/methanol/voda (60/25/4) a jako TLC destičky byly použity destičky Silufolu.

4.2. Značení a purifikace proteinů

4.2.1. Cytochrom c

Cytochrom c byl značen pomocí dvou fluorescenčních značek – alexa 488 a alexa 647. Tyto značky byly zakoupeny od firmy Invitrogen (Molecular Probes). Značky jsou specifické pro kovalentní vazbu na aminoskupinu aminokyselin (převážně lysinu a argininu) za vzniku tzv. „NHS-steru“.

Značení cytochromu c alexou 488 a alexou 647:

K 500 μl cytochromu c o koncentraci $c = 2 \text{ mg/ml}$ (protein byl připraven ve fosfátovém pufru o koncentraci 10 mM, $\text{pH} = 7,2$) bylo přidáno 50 μl 1 M hydrogenuhličitanu sodného (přítomnost hydrogenuhličitanu sodného je kvůli zvýšení pH na hodnotu 8,3, která je pH optimem pro značící reakci). Těchto 550 μl bylo převedeno do vialky s fluorescenční značkou, dobře promícháno a necháno 60 minut při laboratorní teplotě za současného míchání magnetickým míchadýlkem.

Pro značení cytochromu c alexou 647 byla použita koncentrace cytochromu c $c = 1,9 \text{ mg/ml}$.

Purifikace značeného cytochromu c-alexa 488:

Jako purifikační metoda byla použita gelová chromatografie na Sephadexu G-25. Jako eluent byl použit fosfátový pufr PBS (10 mM, $\text{pH} = 7,2$). Délka kolony 30 cm. Na tuto kolonu byla pipetována reakční směs. Byly sbírány frakce po 250 μl a proměřen eluční profil. Na základě elučního profilu bylo jako značený cytochrom c spojeno 11 frakcí.

Koncentrace značeného cytochromu c v těchto spojených frakcích byla určena spektrofotometricky na spektrofotometru SPECORD M40 při vlnové délce 410 nm, tedy v Soretově pásu cytochromu c ($\epsilon_{410} = 78000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) podle Lambert-Beerova zákona dle vzorce:

$$A = c\varepsilon_{\lambda}l, \quad (30)$$

kde A je naměřená absorbance, ε_{λ} molární absorpční (extinkční) koeficient a l je optická dráha paprsku procházejícího kyvetou.

Stupeň značení cytochromu c alexou 488 byl spočítán podle vzorce uvedeného v protokolu pro značení:

$$\text{stupeň} = \frac{A_{494(\text{dye})} * \text{ředění}}{71000 * c_{\text{proteinu}}}, \quad (31)$$

kde $\varepsilon_{\text{alexa488}}$ při 494nm = 71000 cm⁻¹M⁻¹ a absorbance značky při vlnové délce 494 nm se vypočítá dle vzorce:

$$A_{494(\text{dye})} = A_{494} - A_{494(\text{cytc})} = A_{494} - c_{\text{cytc}} * \varepsilon_{494(\text{cytc})}. \quad (32)$$

$\varepsilon_{494(\text{cytc})}$ je 5416 cm⁻¹M⁻¹ a A_{494} je absorbance vzorku při 494 nm.

Pro detekci účinnosti purifikace byla připravena druhá gelová chromatografie. Jako gel byl použit Sephadex G-25, jako eluent fosfátový pufr PBS (10 mM, pH = 2). Jelikož $pI_{\text{cytc}} \approx 9,6$ a $pI_{\text{alexa488}} \approx 4,5$, tudíž v tomto prostředí by mělo dojít k přerušení veškerých elektrostatických interakcí mezi barvivem alexa 488 a cytochromem c a zbýt pouze kovalentně vázaná fluorescenční značka na cytochromu c. Délka kolony byla 10 cm. Na tuto kolonu bylo pipetováno 400 μ l ze spojených frakcí z první kolony a sebráno dalších 80 frakcí, které byly proměřeny na fluorescenčním mikroskopu Confocor I (Zeiss, PicoQuant) pro přítomnost fluorescence v jednotlivých frakcích.

Dále byl vzorek z první kolony proměřen na FCS pro další ověření nepřítomnosti volné fluorescenční značky. Toto bylo měřeno taktéž na fluorescenčním mikroskopu Confocor I (Zeiss, PicoQuant). Získaná data byla vyhodnocována pomocí programu Origin 7.0.

Purifikace značeného cytochromu c-alexa 647:

Jako purifikační metoda byla použita gelová chromatografie na Sephadexu G-25. Jako eluent byl použit fosfátový pufr PBS (10 mM, pH = 7,2). Délka kolony byla 30 cm. Na

tuto kolonu byla pipetována reakční směs. Byly sbírány frakce po 300 μl a proměřen eluční profil.

Koncentrace cytochromu c byla určena spektrofotometricky na spektrofotometru SPECORD M40 při vlnové délce 410 nm ($\epsilon_{410} = 78000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) podle rovnice (30).

Stupeň značení byl vypočítán podle modifikované rovnice (31) s tou změnou, že extinkční koeficient alexy 647 při vlnové délce 650 nm byl $\epsilon_{650} = 239000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ a absorbance značky při 650 nm mohla být přímo změřena, protože v této oblasti cytochrom c už neabsorbuje.

Pro detekci čistoty značeného cytochromu c byla použita druhá kolona Sephadexu G-25. Jako eluent byl použit fosfátový pufr PBS (10 mM, pH = 3,7). Na tuto kolonu bylo pipetováno 400 μl ze spojených frakcí z první kolony. Z této druhé kolony bylo sebráno 32 frakcí a proměřeno na fluorescenčním mikroskopu Confocor I (Zeiss, PicoQuant) pro přítomnost fluorescence v jednotlivých frakcích.

Dále byl tento vzorek proměřen na FCS pro další ověření nepřítomnosti volné fluorescenční značky. Toto bylo měřeno taktéž na fluorescenčním mikroskopu Confocor I (Zeiss, PicoQuant). Získaná data byla vyhodnocována pomocí programu Origin 7.0.

4.2.2. Hovězí prothrombin

Hovězí prothrombin byl získán od firmy Synapse BV University Maastricht, Nizozemí. Tento prothrombin byl značen jednou fluorescenční značkou alexa 633. Fluorescenční značka byla zakoupena od firmy Invitrogen (Molecular Probes). Prothrombin byl značen přes aminoskupinu lysinu a argininu za tvorby tzv. „NHS-esteru“. Veškerá práce s prothrombinem byla prováděna v chladící místnosti při 4°C.

Značení prothrombinu alexou 633:

Prothrombin byl dodán v trishydroxymethylaminomethanovém pufru (Tris pufr). Jelikož volné aminoskupiny v tomto pufru by vychytávaly molekuly fluorescenční značky, a tím by snižovaly účinnost značení prothrombinu, byl prothrombin potřebný pro značení dialyzován proti 1,5 l 10 mM fosfátového pufru o pH = 7,2 (PBS). Dialyzační trubice byla utáhnutá takovým způsobem, aby se koncentrace prothrombinu uvnitř po dialýze výrazně neměnila.

Pro samotné značení bylo použito 750 μl dialyzovaného prothrombinu ve fosfátovém pufru o koncentraci c = 2 mg/ml. K tomuto prothrombinu bylo přidáno 75 μl hydrogenuhličitanu

sodného. Tato směs byla převedena do vialky s fluorescenční značkou. Vzorek byl mírně protřepán a za současného míchání magnetickým míchadýlkem byl inkubován po dobu jedné a čtvrt hodiny.

Purifikace značeného prothrombinu-alexa 633:

Značený prothrombin byl purifikován na koloně Sephadexu G-25, která byla ekvilibrována elučním pufrem 10 mM PBS (pH = 7,2). Délka kolony byla 30 cm, objem kolony byl $V = 40$ ml. Na tuto kolonu byla pipetována reakční směs. Frakce byly sbírány po 500 μ l. Dle elučního profilu bylo jako značený prothrombin spojeno 7 frakcí.

Koncentrace v těchto spojených frakcích byla určena spektrofotometricky na přístroji SPECORD M40 při vlnové délce 280 nm ($\epsilon_{\text{prot při } 280\text{nm}}=100800 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) podle vzorce v rovnici (30).

Stupeň značení prothrombinu alexou 633 byl vypočítán dle rovnice (31). Absorbance fluorescenční značky při vlnové délce 633 již není ovlivňována prothrombinem, tudíž může být naměřena přímo. Extinkční koeficient barviva alexa 633 při vlnové délce 633 nm je $\epsilon_{633} = 100000 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Čistota značeného prothrombinu byla detekována pomocí FCS na fluorescenčním mikroskopu MicroTime 200. Získaná data byla vyhodnocována pomocí programu Origin 7.0.

4.3. Příprava membrán

4.3.1. Příprava SUV`s

SUV`s jsou malé unilamelární vezikuly, které se používají pro tvorbu SPB`s (fosfolipidových membrán, které slouží pro studium interakcí). Pro přípravu SPB`s jsme používali různé druhy SUV`s, které se lišily v poměru 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylcholinu (DOPC) a 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfatidylserinu (DOPS). Při našich měřeních jsme používali poměry 1:4, 1:6, 1:7, 1:9, 1:18 a 1:30. Pro možnost detekce homogenity membrán, bylo mezi výše uvedené lipidy zakorporováno určité množství fluorescenčně značeného 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-fosfoethanolaminu (DOPE) attem 488. Poměr DOPE ku ostatním lipidům byl 1:50000 a 1:200000. Speciálním případem byla příprava SUV`s se dvěma fluorescenčními značkami DOPE-atto 488 a DOPE-atto 633 v poměru 1:200000 každého značeného lipidu ku ostatním neznačeným lipidům. Toto bylo pro měření posunu ohnisek v konfokálním objemu pro lasery o vlnové délce 470 a 633, což se projeví v odlišných minimech počtu částic při Z-scanu.

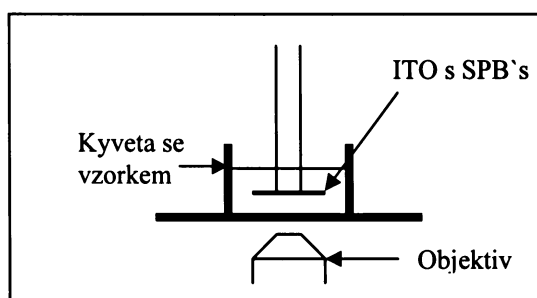
Pro přípravu SUV`s byla připravena směs DOPC/DOPS v žádaném poměru o koncentraci 10 mM. K 200 μ l této směsi bylo přidáno příslušné množství značeného DOPE-atto 488. Jelikož všechny tyto lipidy jsou rozpuštěny v chloroformu, byla směs vysušena v dusíkové atmosféře a potom pod vakuovou pumpou. K dokonale vysušenému lipidovému filmu bylo přidáno 1 ml 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonová kyselina) pufru (2 mM EDTA (diaminoethantetraoctová kyselina), 150 mM chlorid sodný, pH = 7,4). Tato směs byla pečlivě promíchána na vortexu. Během míchání se v roztoku tvoří multilamelární vezikuly, které byly sonikovány po dobu 20 minut (Bandelin Sonoplus). Během sonikace jsou multilamelární vezikuly rozbíjeny na unilamelární vezikuly. Vznikne heterogenní směs, která se nechá 30 minut centrifugovat (13,2 otáček za minutu, Centrifuge 5415D). Po centrifugaci se opatrně odebere vrchních 500 μ l roztoku, které jsou považovány za homogenní unilamelární vezikuly.

4.3.2. Příprava SPB`s

SPB`s (podporované fosfolipidové dvojvrstvy) byly pro naše měření tvořeny na speciálním podkladu. Tento podklad tvoří skleněná destička s nanesenou vrstvou tzv. ITO (směs oxidů india a cínu). Tento oxid je elektricky vodivý, tudíž má schopnost zhášet fluorescenci. Na vrstvě z ITO je pak ještě tenká hydrofilní vrstva oxidu křemičitého, která funguje jako tzv. spacer. Přítomnost spaceru usnadňuje tvorbu membrány na podkladu (pro další práci se bude celý podklad nazývat pouze ITO). Díky schopnosti tohoto podkladu zhášet fluorescenci je možné odlišit časy dohasínání pro jednu značku v závislosti na vzdálenosti od membrány, tedy je-li navázaná či ne. Schematické znázornění přípravy membrány je na Obr. 13.

Nejříve se nechá ionizovat ITO pod UV lampou po dobu 10 minut. Toto je pro úplné vyčištění povrchu a pro hydrofilizaci $-OH$ skupin oxidu křemičitého. Poté se do kyvety pipetují 2 ml 10 mM HEPES pufr (1 mM chlorid vápenatý, 150 mM chlorid sodný) a 200 μ l připravených SUV`s. Do této směsi se ponoří skleněná tyčinka na jejímž konci je nalepena destička ITO. Za velmi silného míchání se nechá membrána tvořit po dobu jedné hodiny. Poté se kyveta vypláchne 60 ml 10 mM HEPES (1 mM chlorid vápenatý a 150 mM chlorid sodný) pufru. Následně je měřena homogenita membrány na FCS pomocí funkce scanu.

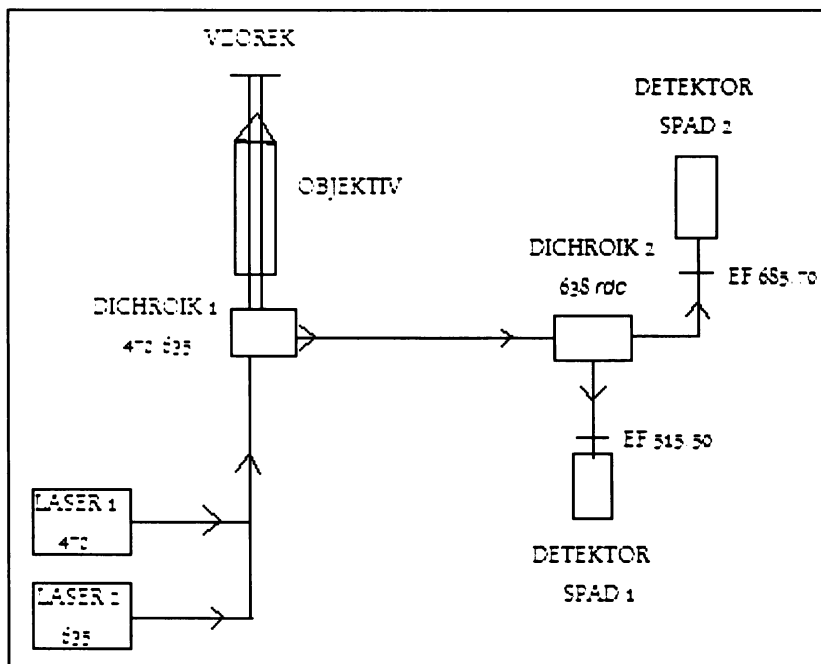
Pro následnou inkubaci prothrombinem se musí po měření kyveta opět propláchnout 60 ml 10 mM HEPES pufru (10 mM chlorid vápenatý a 150 mM chlorid sodný). Pak se do kyvety přidá prothrombin a směs se nechá 1 hodinu inkubovat za velmi slabého míchání. Poté je prothrombin měřen na FCS nebo FLCS, podle typu měření.



Obr. 13 Schematické znázornění kyvety s ITO, na kterém se tvoří fosfolipidová dvojvrstva.

4.4. Fluorescenční FCS měření

Z-scan a fluorescenční měření pomocí časově rozlišené fluorescenční korelační spektroskopie byly měřeny na přístroji MicroTime 200 (PicoQuant, Olympus). Pro excitaci byly použity pulsní lasery v tzv. PIE (Pulsed Interleaved Excitation) módu excitačních vlnových délkách 470 a 635 nm v závislosti na excitační vlnové délce fluoroforu. Pro odfiltrování nežádoucích vlnových délek laserů při emisi bylo použito dichroické zrcadlo 470/635. Jelikož bylo použito více detektorů, jeden pro měření červené fluorescence a druhý pro měření modré fluorescence při Z-scanu, muselo být použito další dichroické zrcadlo 635 rdc, které oddělilo vlnové délky pod a nad uvedenou hodnotou a přes emisní filtry byly HQ515/50 a HQ685/70 je poslalo na příslušné detektory. Jako detektory byly použity detektory typu SPAD (Single-Photon Avalanche Diode). Celá měřicí aparatura je shrnuta na Obr. 14. Velikost štěrbiny byla 50 μm . Při Z-scanu byl pohyb objektivu ve směru z-ové osy po 150-200 nm.

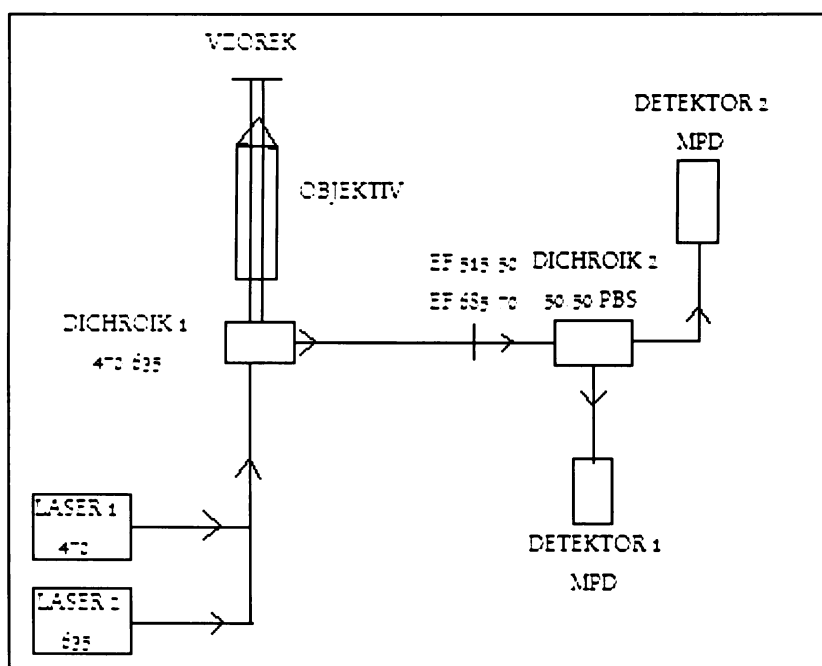


Obr. 14 Schema měřicí aparatury při FCS měření pomocí Z-scanu pro excitaci dvěma lasery.

Pro vyhodnocení dat byly použity programy SymphoTime a speciální makra v programu Origin 7.0, který byla vytvořena naší laboratoří.

4.5. FLCS měření

FLCS měření byla provedena na přístroji MicroTime 200 (PicoQuant, Olympus). Jako excitační lasery byly použity pulsní PIE lasery o excitační vlnové délce 470 a 635 nm. Oproti Z-scanu byly tyto lasery používány separátně, modrý laser pro sledování a kontrole homogenity vytvořené membrány a červený laser byl použit pro samotné FLCS měření. První dichroické zrcadlo bylo stejné jako při Z-scanu. Na rozdíl od Z-scanu emisní filtry HQ515/50 a HQ685/70 byly dány před druhé dichroické zrcadlo. Tyto filtry se během měření v závislosti na excitaci měnily. Velikost štěrbiny byla 50 μm v průměru. Místo druhého dichroického zrcadla byl použit 50/50 PBS (polarised beam splitter), který 50 procent fluorescence propouští a 50 procent odráží v závislosti na rovině polarizace. Odražené, respektive prošlé fluorescenční záření bylo detekováno pomocí dvou MPD (Multiple-Photon Detector) detektorů. Schema aparatury je znázorněno na Obr. 15.



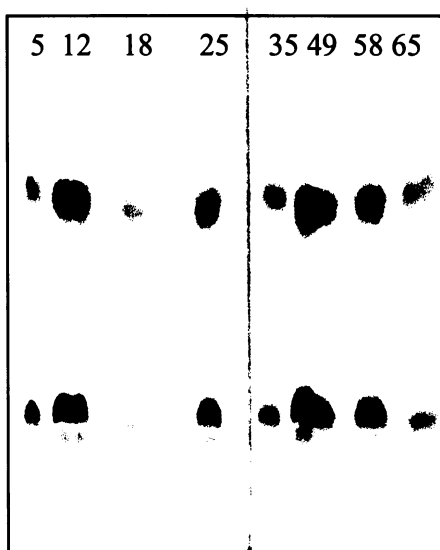
Obr. 15 Schema aparatury pro FLCS měření.

Pro vyhodnocení dat byly použity programy SymphoTime a speciální makra v programu Origin 7.0, který byla vytvořena naší laboratoří.

5. Výsledky a diskuse

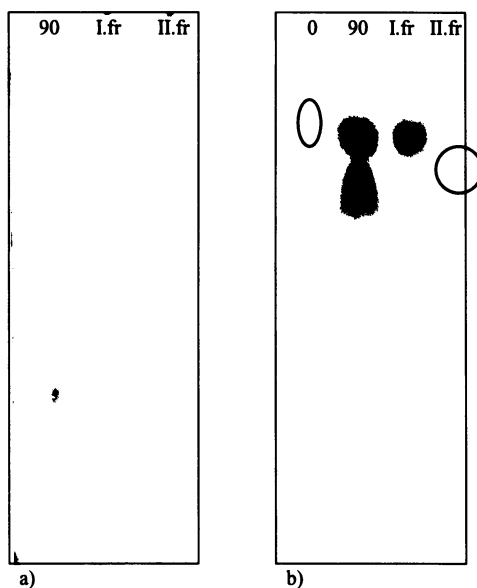
5.1. Značení a purifikace lipidů

Příslušné lipidy byly označeny dle postupu uvedeného v oddíle 4.1.. Průběh reakce značení DOPE pomocí atto 488 byl detekován pomocí TLC a je znázorněn na Obr. 16. Spodní pás je nezreagovaná fluorescenční značka, horní pás je fluorescenčně značený lipid. Z tohoto obrázku je patrné, že není možno přesně nadávkovat vzorek (stejná velikost skvrny a stejná koncentrace ve skvrně) na počátku TLC experimentu, tudíž výpovědní hodnota pro určení průběhu reakce je malá. Při dalším značení průběh reakce nebyl detekován.



Obr. 16 TLC destičku zachycující průběh značení lipidů DOPE pomocí fluorescenční značky atto 488. Vzorky pro TLC byly odebrány po 5, 12, 18, 25, 35, 49, 58 a 65 minutách od počátku inkubace reakce.

Při čištění na absorpční chromatografii se vytvořily dva oddělené pásy, které byly zachyceny a označeny jako frakce I a II. Tyto frakce byly následně detekovány na TLC (Obr. 17). Obrázek a) zachycuje purifikaci DOPE-atto 488. V první dráze je nevyčištěný lipid ihned po skončení inkubace. Na tomto vzorku jsou patrné dvě skvrny, pomalejší je nezreagované barvivo, rychlejší je značený lipid. Ve druhé dráze je vzorek z první frakce. Z TLC experimentu je jasně patrné, že se v něm vyskytuje pouze jedna komponenta, která odpovídá značenému lipidu. Ve třetí dráze je pak vzorek z druhé frakce, který podle pohybu na TLC destičce odpovídá nezreagované fluorescenční značce.

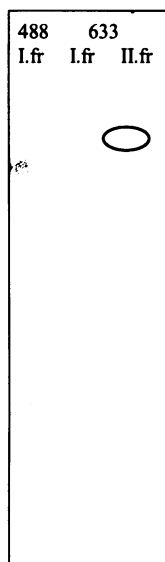


Obr. 17 TLC destičky znázorňující úspěšnost purifikace. Obrázek a) je pro značení pomocí atty 488, TLC byla pořízena pro 3 vzorky: vzorek po skončení reakce, I. frakce a II. frakce. Obrázek b) je pro značení pomocí atty 633, TLC byla pořízena pro 4 vzorky: počátek reakce, konec reakce, I. frakce a II. frakce.

Obrázek b) odpovídá purifikaci DOPE-atto 633. Na této TLC destičce jsou 4 vzorky. Pro větší přehlednost jsou málo viditelné skvrny červeně zakroužkovány. V první dráze je vzorek, který odpovídá reakční směsi těsně po smíchání. Jsou tedy viditelné dvě skvrny, pomalejší skvrna, tedy skvrna nezreagované fluorescenční značky je tmavší, jelikož reakce je teprve ve svém počátku (celkově jsou skvrny málo viditelné, to je dáno malou koncentrací naneseného vzorku). Ve druhé dráze je vzorek odpovídající reakční směsi na konci své inkubace. Jsou zde viditelné dvě skvrny, jedna je nezreagovaná fluorescenční značka a druhá skvrna odpovídá značenému lipidu. Ve třetí dráze je vzorek z první frakce. Z Obr. 17 b) je jasně patrné, že purifikace proběhla úspěšně, ve třetí dráze je pouze jedna skvrna odpovídající značenému lipidu. Ve čtvrté dráze je pak vzorek z druhé frakce, tedy nezreagovaná fluorescenční značka, což potvrzuje poloha skvrny na TLC destičce.

Pro kontrolu a ověření, že s časem nedochází k žádným změnám (disociacím, přerušením vazeb) ve značených lipidech, byla po půl roce provedena nová tenkovrstevná chromatografie pro I. frakci z purifikace DOPE-atto 488 a I. a II. frakci z purifikace DOPE-atto 633 (Obr. 18). Z tohoto pokusu je patrné, že k žádným změnám nedochází, v obou prvních frakcích se vyskytoval pouze značený lipid příslušnou fluorescenční značkou. Ve druhé frakci z purifikace DOPE-atto 633 se kromě skvrny pro nezreagovanou fluorescenční značku vyskytovala ještě jedna velmi slabá skvrna, která svou polohou odpovídala značenému lipidu (na Obr. 18 zvýrazněna kroužkem). Toto je opravdu

značený lipid, který vznikl po purifikaci, kdy se během purifikace neznačený lipid „rozmyl“ do pásu II. frakce a poté s ní zreagoval.



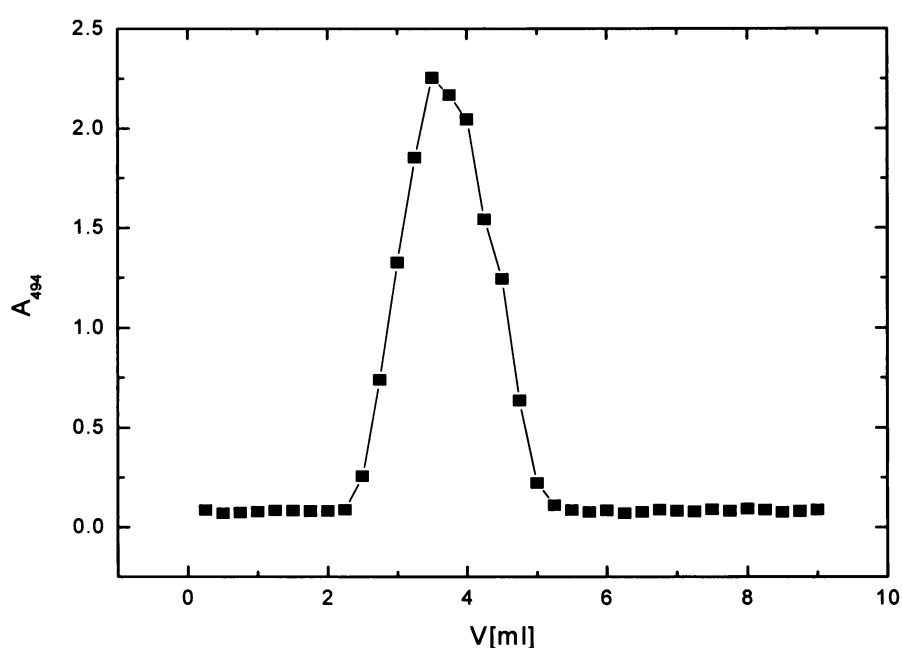
Obr. 18 TLC destička vytvořená půl roku po značení. V první dráze je první frakce z purifikace DOPE-atto 488, ve druhé a třetí dráze jsou první resp. druhá frakce z purifikace DOPE-atto 633.

5.2. Značení a purifikace proteinů

5.2.1. Cytochrom c

Cytochrom c-alexa 488:

Cytochrom c byl úspěšně označen dle postupu uvedeného v oddíle 4.2. a následně převeden na první kolonu. Na koloně byly v průběhu chromatografie zřetelné dva oddělené pásy, z nichž první odpovídal značenému cytochromu c a druhý nezreagované volné fluorescenční značce. Bylo zachyceno prvních 36 frakcí odpovídajících prvnímu pásu, u kterých byl proměřen eluční profil (Obr. 19).



Obr. 19 Eluční profil cytochromu c-alexy 488 pořízený pro prvních 36 frakcí a měřen při excitační vlnové délce $\lambda = 494$ nm.

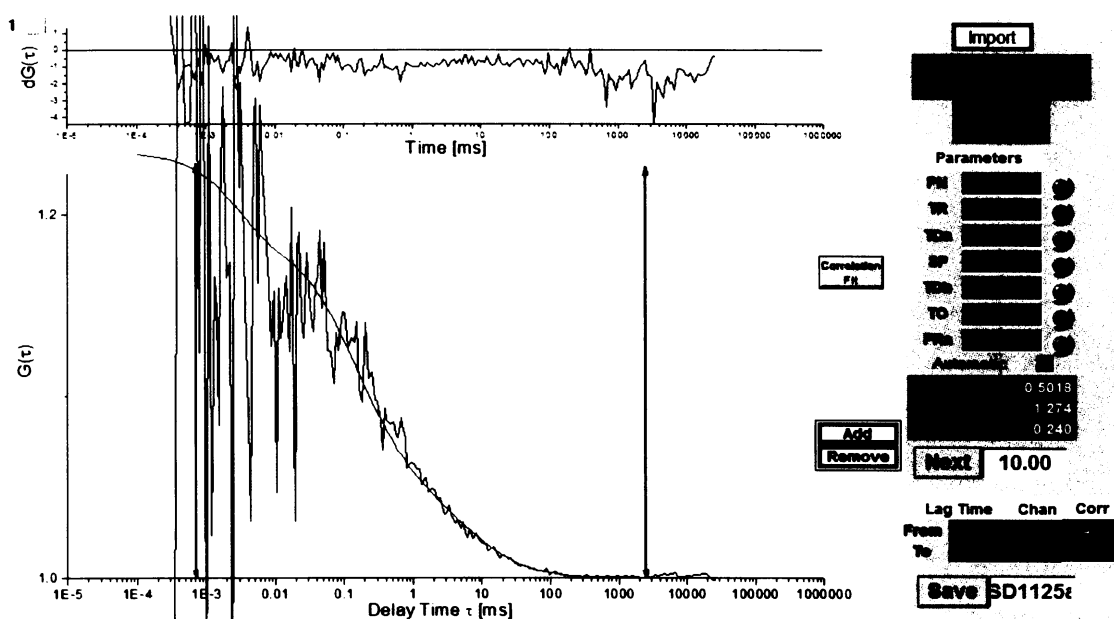
Pro další použití bylo spojeno 11 frakcí (frakce 10-20), které odpovídaly elučnímu píku. Objem těchto spojených frakcí byl $V = 4$ ml. Ze spojených frakcí bylo odebráno 400 μ l a pipetováno na druhou kolonu gelové chromatografie (pH 2).

Z této druhé kolony bylo sebráno 80 frakcí o objemu $V = 500$ μ l a všechny tyto frakce byly proměřeny pro přítomnost fluorescence. V Tab. 2 jsou naměřené hodnoty fluorescence. Z těchto hodnot vyplývá, že ve vzorku po první chromatografii se vyskytují stále dva pásy. První (frakce 2-6) odpovídá značenému cytochromu c, ve frakcích 55-75 je pak rozmytý pás pro nezreagovanou alexu 488.

Tab. 2 Naměřené hodnoty fluorescence pro druhou kolonu (Sephadex G-25, pH 2). Č. fr. označuje číslo frakce, CR označuje count rate, tedy množství fotonů detekovaných detektorem.

č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]
1	0,1	11	0,2	27	0,2	43	0,2	59	0,5	75	0,5
2	13,0	13	0,2	29	0,2	45	0,2	61	0,8	77	0,3
3	47,0	15	0,2	31	0,2	47	0,3	63	1,0	79	0,2
4	20,0	17	0,2	33	0,3	49	0,2	65	0,7		
5	5,0	19	0,2	35	0,3	51	0,5	67	0,7		
6	0,9	21	0,2	37	0,3	53	0,5	69	1,4		
7	0,4	23	0,2	39	0,2	55	1,0	71	1,1		
9	0,2	25	0,2	41	0,2	57	0,7	73	1,0		

Následně byla udělána FCS analýza značeného cytochromu c-alexu 488. Fitovaná data jsou vidět na Obr. 20. V levé části je znázorněna autokorelační křivka vypočítaná dle naměřených dat. V pravé části jsou pak příslušné hodnoty. PN je počet částic v konfokálním objemu, TR množství fotonů přešlých do tripletu, TDa (ms) difúzní čas pro první komponentu v roztoku, SP parametr popisující konfokální objem, TDb (ms) difúzní čas pro druhou komponentu v konfokálním objemu, TO (ms) čas strávený v tripletu a FRA je zastoupení komponenty s difúzním časem TDa. CpM (kHz) je počet fotonů vyzářených jednou molekulou.



Obr. 20 Vyhodnocení FCS analýzy pro cytochrom c-alexu 488.

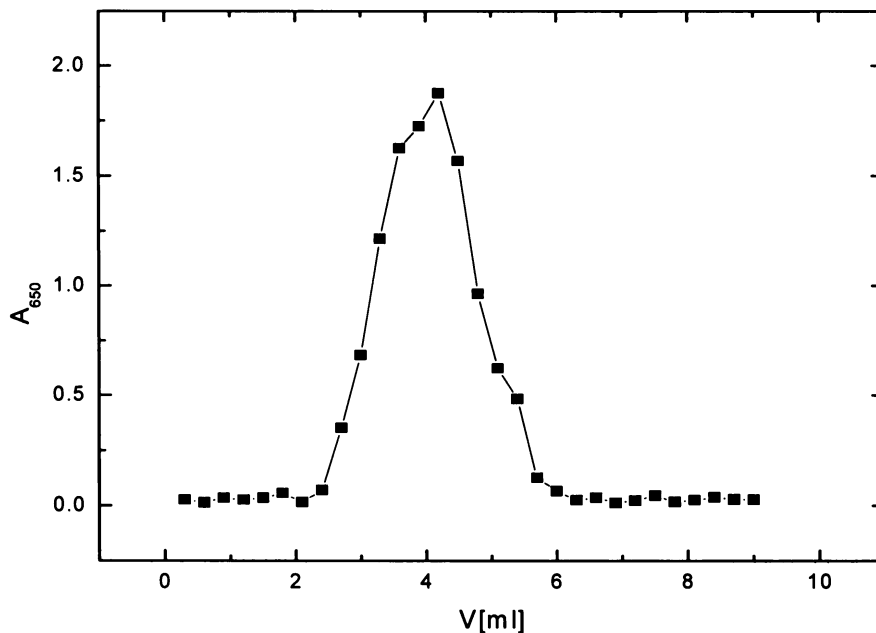
Z těchto údajů vyplývá, že značený cytochrom c je sice vyčištěn od volné fluorescenční značky (difúzní čas volné alexy je kolem 55 μ s), avšak pravděpodobně dochází k agregaci značených cytochromů. Difúzní čas pro monomer cytochromu c je kolem 150 μ s. Na Obr. 20 je ale ještě jedna komponenta o difúzním času 7 ms, což je nějaký agregát cytochromu c.

Dále je z tohoto vyhodnocení vidět, že svítivost značeného cytochromu c je velice malá ($CpM = 0.240$ kHz), což je pravděpodobně způsobeno přítomností hemu, který fluorescenci navázané fluorescenční značky zháší, tedy emitovaná fluorescence je absorbovaná β -pásem hemu.

Cytochrom c-alexa 647:

Díky nízké svítivosti značeného cytochromu c-alexu 488, byl označen cytochrom c alexou 647, která emituje své světlo daleko za všemi pásy cytochromu c.

Při čištění značeného cytochromu c-alexu 647 byla použita stejná první kolona jako při čištění cytochromu c od nezreagované alexy 488, z této kolony bylo sebráno prvních 30 frakcí po 300 μ l a proměřen eluční profil při vlnové délce $\lambda = 650$ nm (Obr. 21).



Obr. 21 Eluční profil cytochromu c-alexu 647. Absorbance měřena při $\lambda = 650$ nm.

Na základě tohoto elučního profilu bylo spojeno 10 frakcí (frakce 9-18). Z těchto spojených frakcí bylo odebráno 200 μ l a pipetováno na druhou kolonu (pH 3,7). Z této kolony bylo sebráno 32 frakcí ($V_{fr} = 1$ ml) od první barevné frakce a proměřena přítomnost

fluorescence (Tab. 3). Naměřené hodnoty prokázaly přítomnost pouze jednoho pásu, ovšem dosti rozmytého. To může být způsobeno agregací cytochromu c do větších agregátů, které putují kolonou s různou rychlostí.

Tab. 3 Naměřené hodnoty fluorescence pro druhou kolonu (Sephadex G-25, pH 3,7) pro cytochrom c-alexu 647. Č. fr. označuje číslo frakce, CR označuje count rate, tedy množství fotonů detekovaných detektorem.

č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]	č. fr.	CR [kHz]
1	12,0	9	16,0	17	0,9	25	0,5
3	35,0	11	20,0	19	0,5	27	0,5
5	47,0	13	13,0	21	0,4	29	0,8
7	12,0	15	3,0	23	0,3	31	0,3

Značený cytochrom c-alexu 647 byl proměřen na FCS. Naměřené hodnoty pro difúzní časy pomalé a rychlé komponenty, zastoupení první komponenty a svítivost označeného proteinu jsou uvedeny v Tab. 4. Z výsledků vyplývá, že svítivost proteinu se zvýšila 10x oproti cytochromu c-alexu 488. Ve vzorku jsou opět dvě komponenty, první odpovídá značenému cytochromu c ($TD = 180 \pm 2 \mu s$), druhá odpovídá agregátu cytochromu c ($TD = 1,83 \pm 0,19 ms$). Monomeru značeného cytochromu c je ve vzorku $68 \pm 4 \%$.

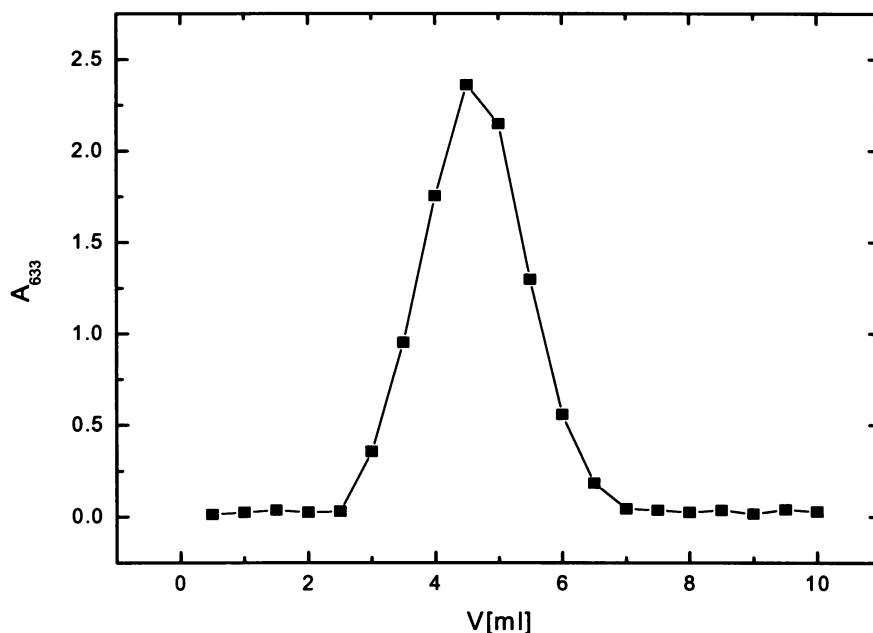
Jelikož pro určení difúzních koeficientů, disociačních konstant a dalších měření na FLCS je potřeba mít roztok s pouze jednou komponentou, bylo upuštěno od cytochromu c a jako další protein byl vybrán prothrombin.

Tab. 4 Hodnoty z jednotlivých FCS měření značeného cytochromu c-alexu 647, chyba je vyjádřena střední kvadratickou chybou aritmetického průměru.

	TDa [ms]	TDb [ms]	FRa	CpM [kHz]
1	0,15	1,30	0,75	2,74
2	0,17	1,97	0,79	3,07
3	0,29	5,17	0,91	3,02
4	0,14	1,37	0,72	2,28
5	0,14	1,27	0,74	2,30
6	0,19	2,57	0,48	2,70
7	0,24	2,90	0,69	2,84
8	0,12	1,33	0,54	2,73
9	0,19	1,71	0,57	2,80
10	0,15	2,03	0,57	2,88
Průměr	$0,18 \pm 0,02$	$1,83 \pm 0,19$	$0,68 \pm 0,04$	$2,74 \pm 0,08$

5.2.2. Prothrombin

Označený prothrombin byl purifikován na jediné koloně Sephadexu G-25. Na této koloně se velice pěkně vyprofilovaly dva silné pásy, první pro značený prothrombin-alexu 633, druhý pro nezragovanou fluorescenční značku. Z kolony bylo sebráno 20 frakcí po 500 μ l, které odpovídají elučnímu píku, a proměřen eluční profil (Obr. 22). Jako značený prothrombin bylo sebráno 7 frakcí (frakce 6-12).



Obr. 22 Eluční profil značeného prothrombinu-alexu 633. Profil proměřován při vlnové délce $\lambda = 633$ nm.

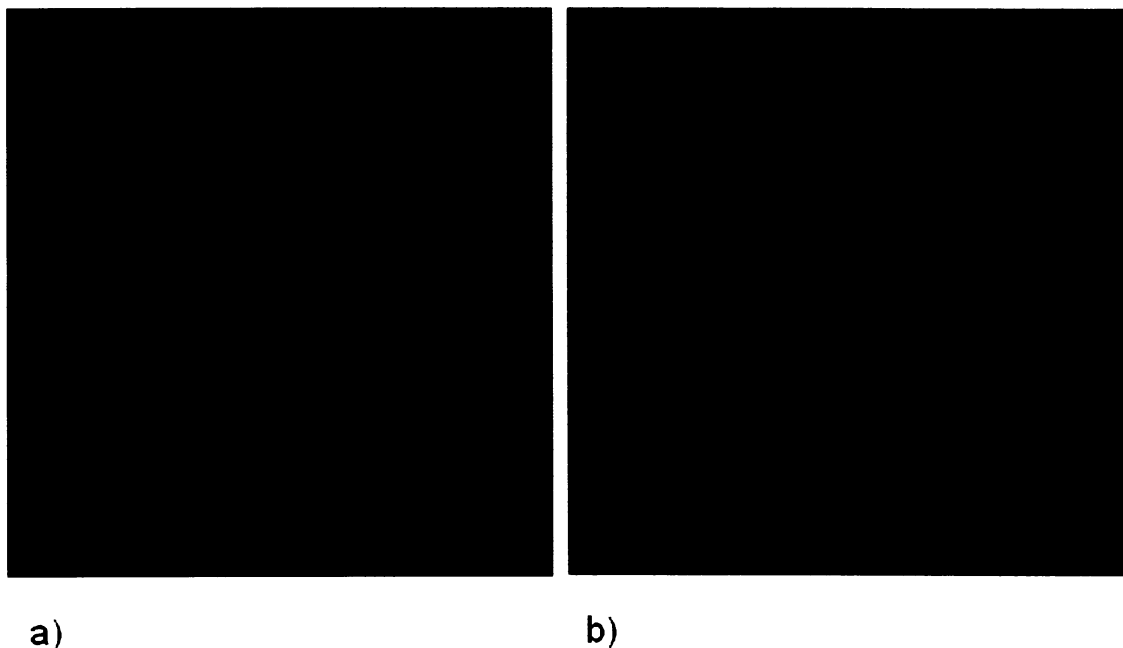
Pro označený prothrombin-alexu 633 byla udělána FCS autokorelační analýza (Tab. 5). Data bylo možno fitovat jednou komponentou, ve vzorku se tedy nachází pouze značený prothrombin. Pro prothrombin-alexu 633 byla vypočtena hodnota difúzního času $TD = 45 \pm 0,7 \mu$ s.

Tab. 5 Hodnoty výsledků jednotlivých FCS měření pro prothrombin-alexu 633. Chyba je vyjádřena pomocí střední kvadratické chyby aritmetického průměru.

	PN	TR	TD [ms]	SP	TO [μ s]	CpM [kHz]
1	2,87	0,43	0,44	4,56	2,00	3,42
2	2,77	0,80	0,43	6,44	1,00	2,67
3	2,48	0,44	0,45	7,00	2,00	2,92
4	2,15	0,41	0,46	6,56	2,00	3,44
5	1,98	0,39	0,47	7,00	3,00	3,38
Průměr			$0,45 \pm 0,01$			$3,17 \pm 0,16$

5.3. Příprava membrán

Všechny membrány byly připraveny dle postupu uvedeného v oddílu 4.3. Jelikož pro správné vyhodnocení interakce proteinů s membránou je potřeba její naprostá homogenita, byly všechny membrány po inkubaci měřeny na fluorescenčním mikroskopu (MicroTime 200).



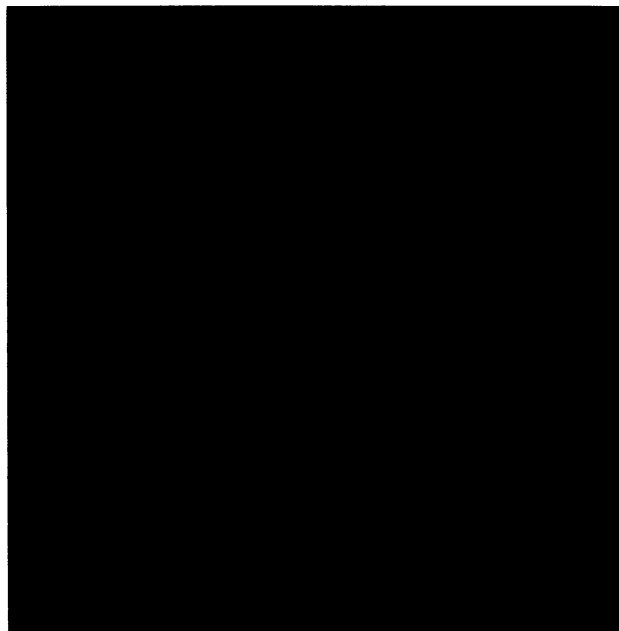
Obr. 23 Vybrané scany membrány pořízené na fluorescenčním mikroskopu. Na obrázku a) je scan v XZ-ových souřadnicích, na obrázku b) je pak scan v XY-ových osách. Excitace byla prováděna laserem o vlnové délce 470 nm.

Ukázka homogenní membrány značené pomocí att488 je na Obr. 23. Na obrázku a) je scan v XZ-ových osách, tedy jakýsi „profil“ membrány. Je jasně vidět, že fosfolipidová dvouvrstva je vytvořena v podstatě nepřerušena.

Na obrázku b) je pak scan v XY-ových osách membrány. Barvy jednotlivých bodů v tomto scanu odpovídají intenzitě fluorescence v určitých bodech, modrá barva odpovídá nízké intenzitě fluorescence, sytě červená odpovídá vysoké intenzitě. Na tomto obrázku je nejdůležitější, že barva všech bodů je velice podobná, což značí, že membrána je homogenní.

Na Obr. 24 je scan membrány po inkubaci s prothrombinem, excitováno laserem o vlnové délce 633 nm, tedy vidět je pouze fluorescence značeného prothrombinu alexou 633. Nad membránou není viditelná žádná fluorescence, to proto, že z vrchní části membrány je ITO

přilepené na skleněné tyčince. Pod membránou je pak patrná fluorescence v roztoku, to je volný značený prothrombin, který se v roztoku pohybuje pouze difúzí. Dále je na obrázku patrný prothrombin navázaný na membráně.

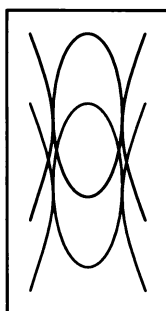


Obr. 24 Scan v XZ-ových souřadnicích. Obrázek představuje membránu po inkubaci s prothrombinem. Excitace byla provedena pomocí laseru o vlnové délce 633 nm.

5.4. FCS měření

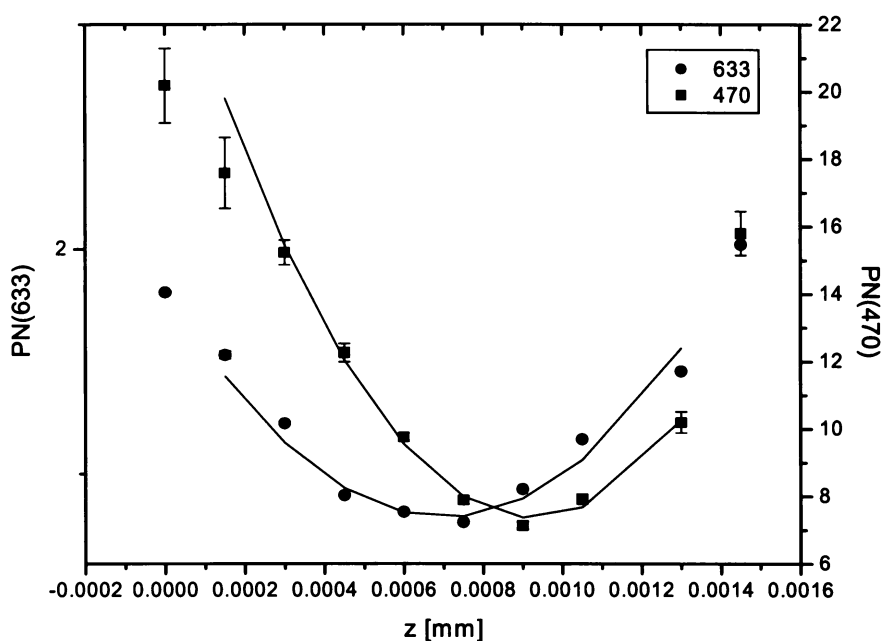
5.4.1. Posun ohnisek dvou různých laserů při FCS měření

Pro další měření, bylo nutno zjistit posun ohnisek fokusace dvou různých laserů (excitace 470 nm a 633 nm) v konfokálním objemu jak je znázorněno na Obr. 25.



Obr. 25 Schematické znázornění posunu ohnisek fokusovaných laserů do konfokálního objemu. Odlišné barvy znázorňují odlišná ohniska laserů.

Pro tento experiment byla připravena membrána se dvěma fluorescenčními značkami, attem 488 a attem 633. Příprava této membrány byla podle postupu uvedeném v oddíle 4.3.



Obr. 26 Výsledek měření posunů ohnisek laserů o excitaci 633 a 470 nm. X-ová souřadnice popisuje posun v z-ové ose během Z-scanu. Závislé proměnné znázorňuje počet částic pro jednotlivé FCS měření.

Posun pak byl měřen pomocí Z-scanu. Schema měřicí aparatury je znázorněno na Obr. 14. Výsledek tohoto měření je na Obr. 26. Jednotlivé body v grafu odpovídají počtu částic v konfokálním objemu během jednotlivých FCS měření. Z tohoto obrázku je patrné, že posun ohniska červeného laseru vůči modrému laseru je přibližně 200 nm k nižším hodnotám v z-ové ose.

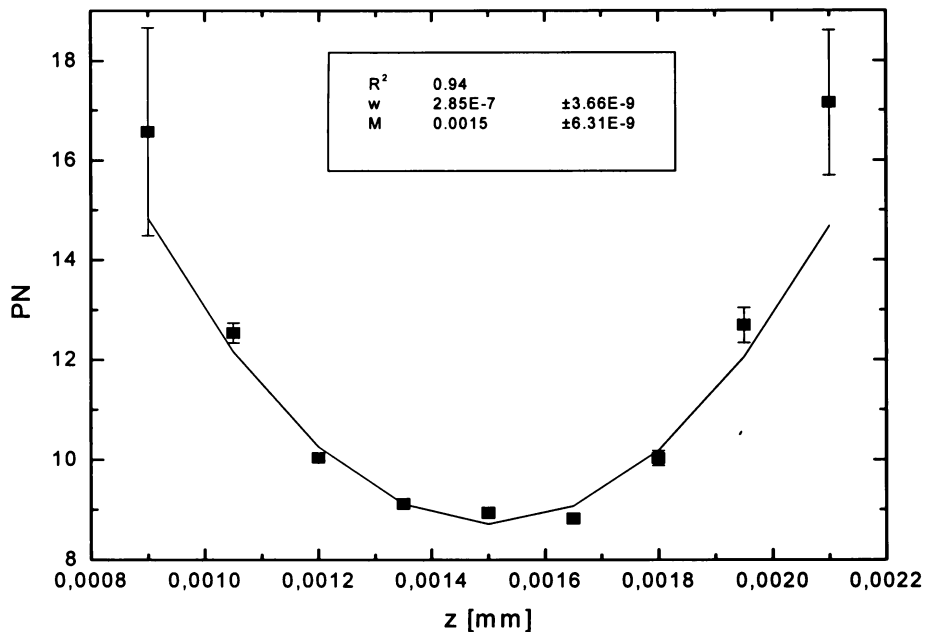
Takovýchto měření bylo provedeno pět, s různým posunem v z-ové souřadnici během jednotlivých FCS měření. Shrnutí posunu ohnisek laserů je v Tab. 6. Z těchto měření bylo určeno, že posun mezi jednotlivými ohnisky je 192 ± 19 nm.

Tab. 6 Shrnutí jednotlivých Z-scanů. Ve druhém sloupci jsou posuny v z-ové souřadnici během jednotlivých FCS měření, ve třetím resp. čtvrtém sloupci jsou z-ové hodnoty minima počtu částic pro modrý resp. červený laser, v pátém sloupci je pak rozdíl pozic minim jednotlivých laserů. Chyba je vyjádřena pomocí střední kvadratické chyby aritmetického průměru.

	z-posuny [nm]	minimum 470 [μm]	minimum 633 [μm]	rozdíl [nm]
1	500	1,79	2,02	230
2	350	1,28	1,48	200
3	300	1,39	1,52	130
4	200	1,38	1,55	170
5	150	0,70	0,93	230
Průměr				192 ± 19

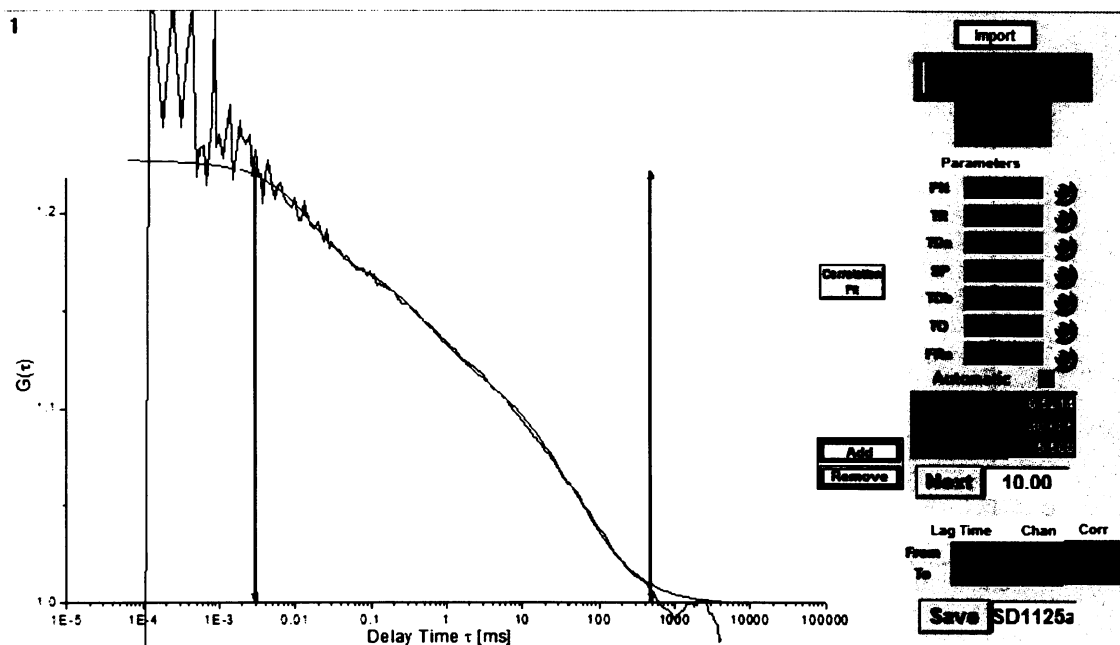
5.4.2. Určení disociačních konstant

Disociační konstanty a difúzní koeficienty byly měřeny pomocí Z-scanu. Membrána byla připravena podle postupu popsaného v oddíle 4.3. Po zjištění homogenity této membrány byla membrána inkubována směsí značeného prothrombinu-alexu 633 a neznačeného prothrombinu tak, aby počet částic v konfokálním objemu byl kolem jedné značené molekuly. Poměr značeného ku neznačenému prothrombinu byl 1:4000. Koncentrace, při kterých byl měřen Z-scan, byly 160 nM, 500 nM, 1 μM, 2 μM, 4 μM a 6 μM. Měření bylo děláno formou titrace na jedné membráně s postupným zvyšováním koncentrace prothrombinu. Z-scan byl vyhodnocován pouze pro modrý detektor, který snímá fluorescenci modře značené membrány (Obr. 27).



Obr. 27 Z-scan vyhodnocený pro modrý detektor, w je pološířka píku, M je hodnota z -ové souřadnice minima počtu molekul v konfokálním objemu, R^2 je koeficient determinace.

Na Obr. 27 je vyhodnocený Z-scan pro modrý detektor. Minimu počtu částic odpovídá $1,5 \mu\text{m}$ na z -ové souřadnici. Tato hodnota přímo odpovídá jednomu FCS měření. Pro vyhodnocení červeného detektoru bylo použito měření o jednu pozici zpět (aproximováno podle výsledku z měření posunu ohnisek modrého a červeného laseru), tedy měření, které odpovídalo pozici $1,35 \mu\text{m}$ v z -ové ose. Vyhodnocení tohoto konkrétního případu je na Obr. 28. Hodnoty pro parametr popisující konfokální objem (SP) a pro difúzní čas prothrombinu volně se pohybujícího v roztoku (TDb) jsou fixované. Hodnota pro SP je vždy kolem 7. Číslo pro difúzní čas volného prothrombinu bylo zafixováno na hodnotě $0,5 \text{ ms}$, což odpovídá hodnotě naměřené pro difúzní čas volného prothrombinu (uvedeno v oddíle 5.2.2.). Do Langmuirovy izotermy pak byla vynášena hodnota součinu počtu částic (PN) a zastoupení molekul prothrombinu vázaného na membráně (FRa).



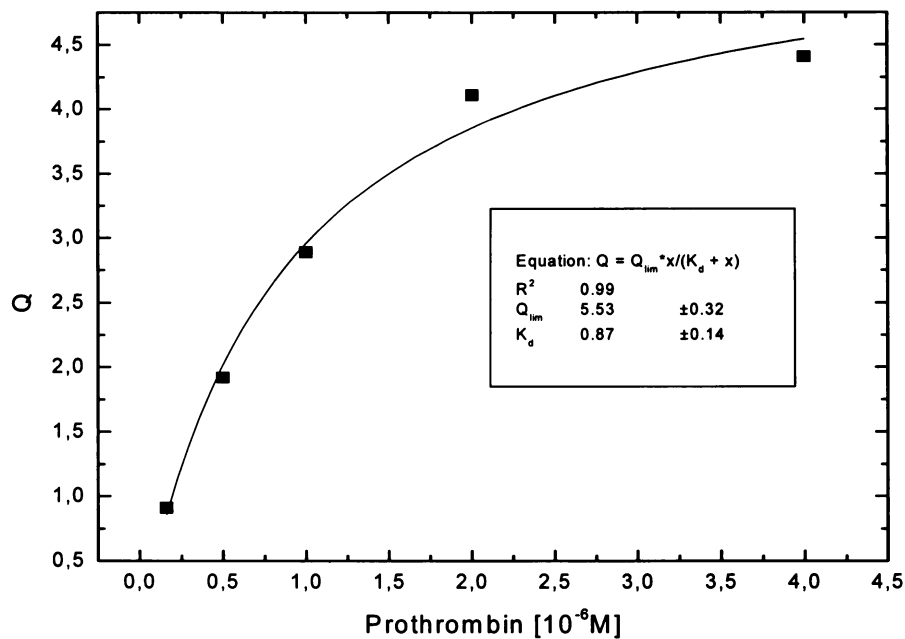
Obr. 28 Vyhodnocení autokorelace pomocí programu Origin 7.0. V levé části obrázku je autokorelace naměřeného signálu, červená křivka je pak autokorelační křivka odpovídající hodnotám v pravé části obrázku (PN je počet částic v konfokálním objemu, TR zastoupení tripletního stavu, TDa (ms) difúzní čas pro prothrombin navázaný na membráně, SP parametr popisující konfokální objem, TDa (ms) difúzní čas pro prothrombin v roztoku, TO (ms) čas strávený v tripletním stavu, FRa zastoupení molekul o difúzním času TDa).

Vynesené body byly fitovány rovnicí pro Langmuirovu izotermu, která byla upravena pro přímé vyjádření disociační konstanty. Tato závislost má charakter hyperboly a příslušná rovnice je:

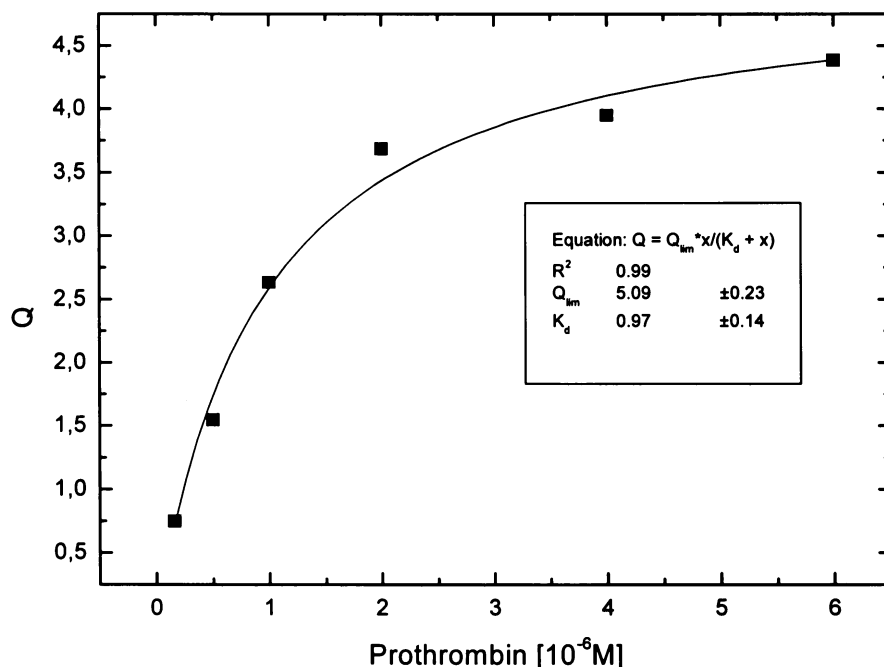
$$Q = \frac{Q_{\text{lim}} x}{K_d + x}, \quad (33)$$

kde Q je množství navázaného prothrombinu na membráně, Q_{lim} je limitní hodnota pro množství navázaného prothrombinu a K_d je disociační konstanta.

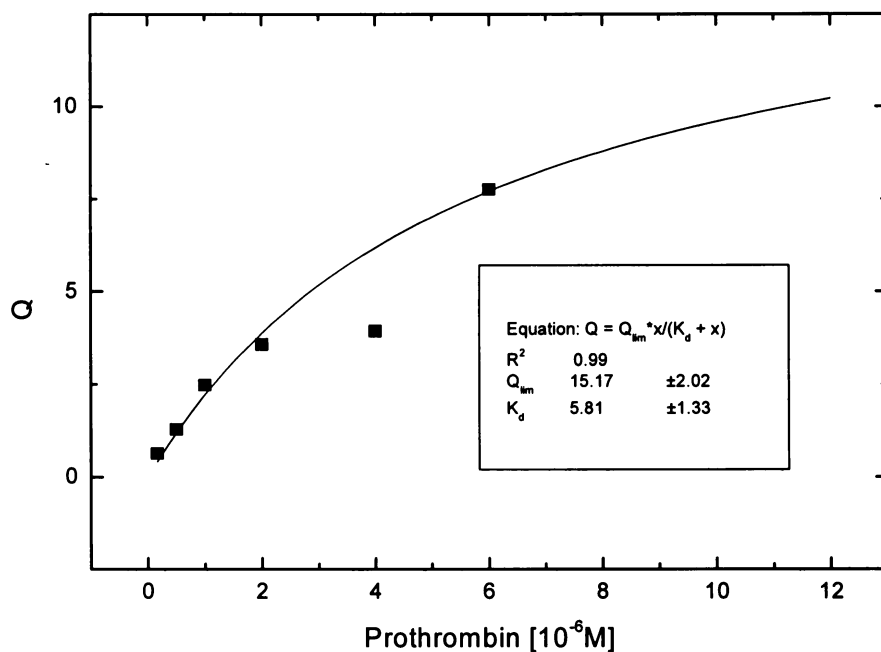
V našem případě byly měřeny čtyři typy membrán s různým zastoupením fosfatidylserinu (20%, 14%, 10 % a 5%). Grafy jednotlivých izoterm jsou na obrázcích 29-32. Z naměřených hodnot pro disociační konstanty je patrný stoupající trend hodnot pro K_d s klesajícím zastoupením fosfatidylserinu v membráně.



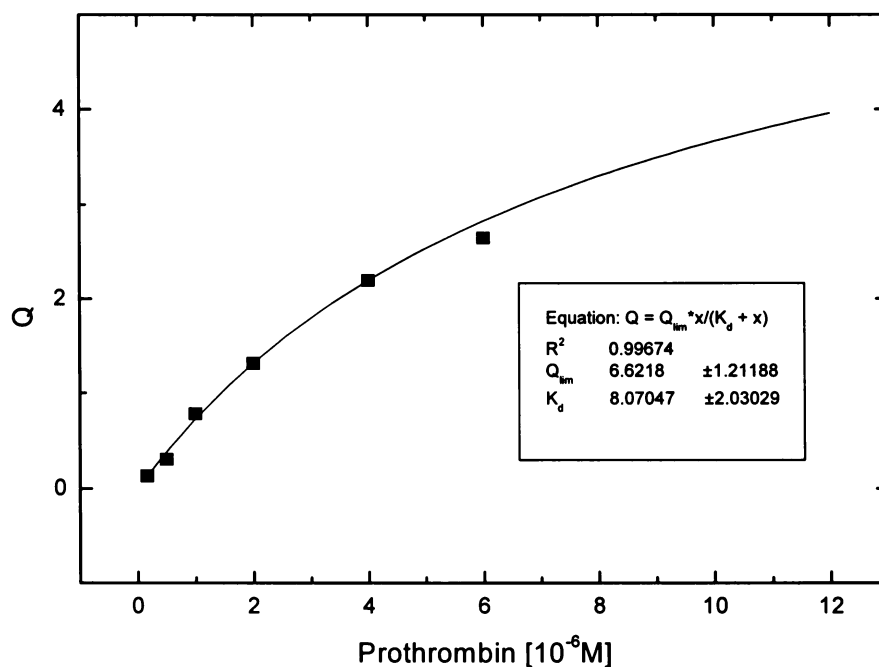
Obr. 29 Graf Langmuirovy izotermy pro membránu s 20 % zastoupením fosfatidylserinu. Na ose y je množství navázaného prothrombinu na membráně, na ose x pak koncentrace prothrombinu během měření. V rámečku jsou uvedeny hodnoty pro koeficient determinace (R^2), pro limitní hodnotu navázání prothrombinu na membránu (Q_{lim}) a pro disociační konstantu (K_d).



Obr. 30 Graf Langmuirovy izotermy pro membránu s 14 % zastoupením fosfatidylserinu. Na ose y je množství navázaného prothrombinu na membráně, na ose x pak koncentrace prothrombinu během měření. V rámečku jsou uvedeny hodnoty pro koeficient determinace (R^2), pro limitní hodnotu navázání prothrombinu na membránu (Q_{lim}) a pro disociační konstantu (K_d).



Obr. 31 Graf Langmuirovy izotermy pro membránu s 10 % zastoupením fosfatidylserinu. Na ose y je množství navázaného prothrombinu na membráně, na ose x pak koncentrace prothrombinu během měření. V rámečku jsou uvedeny hodnoty pro koeficient determinace (R^2), pro limitní hodnotu navázání prothrombinu na membránu (Q_{lim}) a pro disociační konstantu (K_d).



Obr. 32 Graf Langmuirovy izotermy pro membránu s 5 % zastoupením fosfatidylserinu. Na ose y je množství navázaného prothrombinu na membráně, na ose x pak koncentrace prothrombinu během měření. V rámečku jsou uvedeny hodnoty pro koeficient determinace (R^2), pro limitní hodnotu navázání prothrombinu na membránu (Q_{lim}) a pro disociační konstantu (K_d).

Hodnoty pro naměřené disociační konstanty jsou uvedeny v Tab. 7. Pro membránu s 5 % zastoupením fosfatidylserinu byla disociační konstanta $8,07 \pm 2,03 \mu\text{M}$, pro membránu s 10 % zastoupením PS byla $K_d = 5,81 \pm 1,33 \mu\text{M}$, pro membránu s 14 % zastoupením byla $K_d = 0,97 \pm 0,14 \mu\text{M}$ a pro membránu s 20 % zastoupením PS byla $K_d = 0,87 \pm 0,14 \mu\text{M}$. Tedy s rostoucím zastoupením fosfatidylserinu v membráně stoupá afinita proteinu k vazebným místům na membráně.

Tab. 7 Shrnutí disociačních konstant, limitních hodnot pro množství navázaného prothrombinu a koeficientů determinace v závislosti na složení membrán. Chyba je uvedena pomocí směrodatné odchylky.

	5 % PS	10 % PS	14 % PS	20 % PS
K_d [μM]	$8,07 \pm 2,03$	$5,81 \pm 1,33$	$0,97 \pm 0,14$	$0,87 \pm 0,14$
Q_{lim}	$6,62 \pm 1,21$	$15,17 \pm 2,02$	$5,09 \pm 0,23$	$5,53 \pm 0,32$
R^2	0,99	0,99	0,99	0,99

5.4.3. Určení difúzních koeficientů

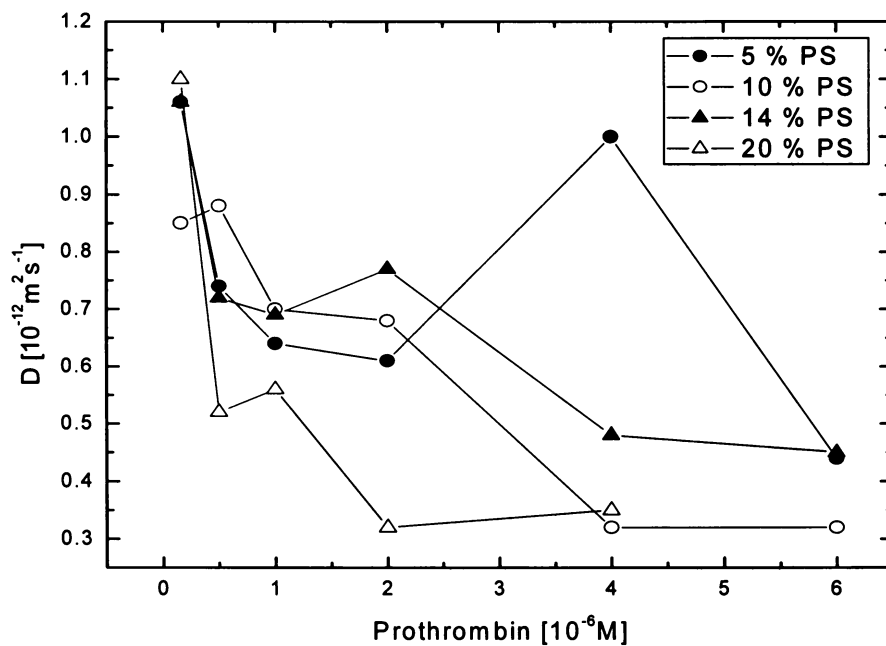
Difúzní koeficienty byly vypočítány pomocí Z-scanu, tedy jako závisle proměnná byly vyneseny namísto počtu částic difúzní časy vázaného prothrombinu. Nezávisle proměnnou byl stejně jako v předchozích případech pohyb objektivu v z-ové souřadnici. Difúzní koeficienty byly vypočteny jak pro prothrombin navázaný na membráně, tak pro značený lipid, který byl inkorporován do membrány, byla tedy měřena fluidita membrán, pomocí vzorce z rovnice (29). Shrnutí všech naměřených difúzních koeficientů je v Tab. 8.

Tab. 8 Shrnutí difúzních koeficientů pro prothrombin difundující na membráně a pro lipidy pohybující se v membráně. Chyba je znázorněna pomocí střední kvadratické chyby aritmetického průměru.

(μM)	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (20 % PS) proth.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (20 % PS) membr.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (14 % PS) proth.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (14 % PS) membr.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (10 % PS) proth.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (10 % PS) membr.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (5 % PS) proth.	D [$\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$] (5 % PS) membr.
0,16	1,10	2,72	1,06	2,82	0,85	2,15	1,06	2,68
0,5	0,52	2,63	0,72	2,90	0,88	3,49	0,74	2,45
1	0,56	2,32	0,69	2,40	0,70	3,77	0,64	3,18
2	0,32	1,75	0,77	2,38	0,68	2,34	0,61	2,92
4	0,35	2,01	0,48	1,60	0,32	1,98	1,00	2,25
6	-	2,33	0,45	1,97	0,32	3,46	0,44	2,32
Průměr		$2,29 \pm 0,15$		$2,34 \pm 0,20$		$2,87 \pm 0,32$		$2,63 \pm 0,15$

Z naměřených hodnot je patrné, že difúzní koeficient značeného lipidu v samotné membráně se výrazně nemění. Jednotlivé odchylky pro různé koncentrace prothrombinu mohou být způsobeny zpomalením laterální difúze díky přítomnosti navázaného prothrombinu. Průměrná hodnota laterální difúze membrány je $D = 2,29 \pm 0,15 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 20 % zastoupením fosfatidylserinu, $D = 2,34 \pm 0,20 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 14 % zastoupením fosfatidylserinu, $D = 2,87 \pm 0,32 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 10 % zastoupením fosfatidylserinu, $D = 2,63 \pm 0,15 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 5 % zastoupením fosfatidylserinu. Jednotlivé hodnoty pro různé membrány se výrazně nemění, ani nemají žádný viditelný trend.

V Tab. 8 jsou uvedeny difúzní koeficienty pro laterální difúzi prothrombinu na membráně. Tyto hodnoty jsou pro větší přehlednost vyneseny do grafu na Obr. 33. Na tomto obrázku je patrný klesající trend pro hodnoty difúzních koeficientů v závislosti na stoupající koncentraci prothrombinu.



Obr. 33 Grafické znázornění difúzních koeficientů v závislosti na koncentraci prothrombinu v přítomnosti membrány. Černá kolečka odpovídají 5 % zastoupení PS, prázdná kolečka 10 % zastoupení PS a černé trojúhelníky 14 % zastoupení PS a prázdné trojúhelníky 20 % zastoupení PS.

Srovnáme-li hodnoty pro difúzní koeficienty samotné membrány a prothrombinu laterálně se pohybujícího po membráně zjistíme, že hodnoty pro difúzní koeficienty samotné membrány jsou 3-6 krát (v závislosti na koncentraci prothrombinu) větší než hodnoty pro prothrombin. Tedy rychlost pohybu uvnitř membrány je 3-6 krát vyšší, než laterální pohyb prothrombinu po membráně.

5.5. FLCS měření

Měření a následná analýza pomocí FLCS byly provedeny pro interakci prothrombinu s různými typy membrán. Jako prothrombin byla použita směs značeného prothrombinu alexou 633 a neznačeného prothrombinu. Konečné koncentrace v kvěťě při měření byly:

- 1 nM značený prothrombin,
- 8 μ M neznačený prothrombin.

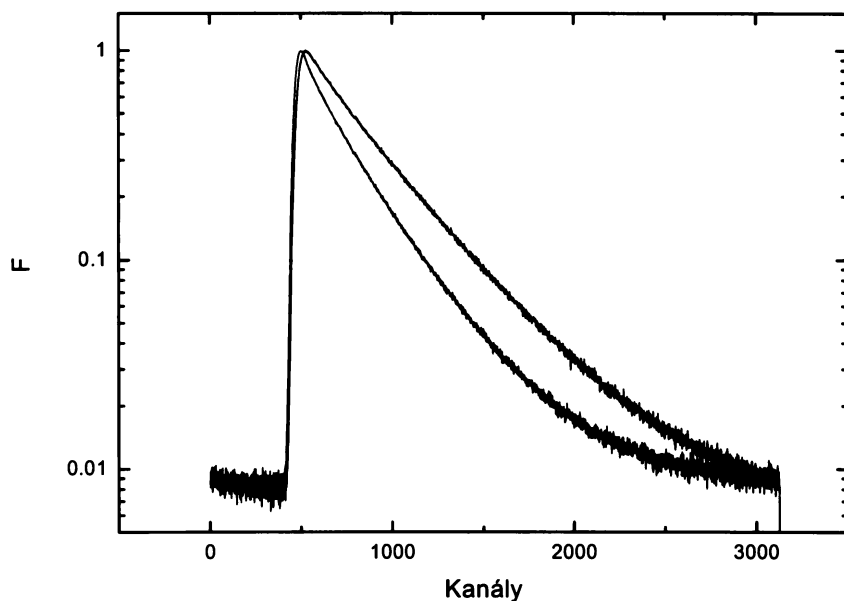
Jednotlivé membrány se lišily zastoupením fosfatidylserinu. Byly použity membrány s 0 %, 3 %, 5 %, 10 %, 12,5 % a 20 % zastoupením fosfatidylserinu.

Na základě FLCS analýzy je možno určit rychlostní konstanty asociace resp. disociace k_{on} a k_{off} , které doprovázejí vazbu prothrombinu na membránu, jak je uvedeno v rovnici:



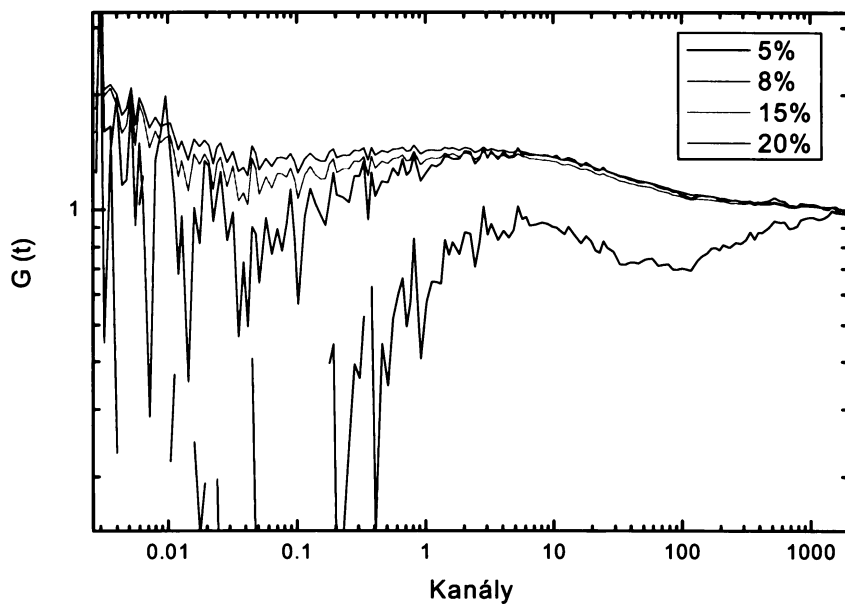
kde P je prothrombin v roztoku, M je vazebné místo na membráně a K je komplex navázaného prothrombinu na příslušném vazebném místě na membráně.

Při měření za použití FLCS analýzy je nutno odlišit dobu dohasínání jednotlivých fluoroforů (v našem případě odlišit volný prothrombin v roztoku – třídímenzionální difúzi od prothrombinu navázaného na membráně – dvoudímenzionální difúze). Toto je umožněno díky přítomnosti ITA jako podkladu pro tvorbu fosfolipidové dvouvrstvy. Během těchto měření je volný prothrombin v roztoku měřen samostatně. Další měření je pak těsně na povrchu membrány, kde naměřená data jsou směsí prothrombinu navázaného na membráně a volného prothrombinu. Rozdíly v časech dohasínání jsou vidět na Obr. 34.



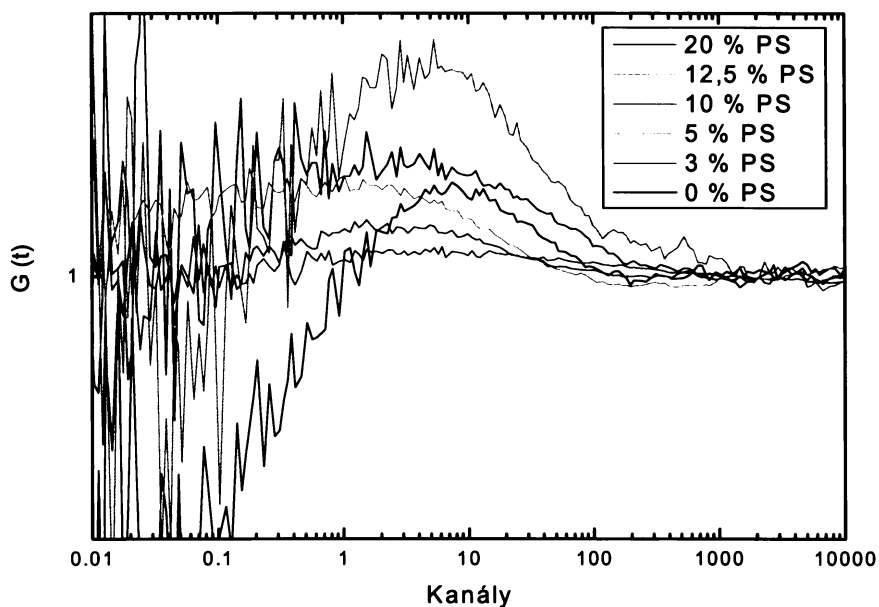
Obr. 34 Grafické logaritmické vynesení závislosti normalizované intenzity fluorescence (F) na kanálech. Černá křivka je pro prothrombin pohybující se volně v roztoku, červená křivka odpovídá směsi volného a vázaného prothrombinu.

Jelikož měření na membráně je směsí volného a vázaného prothrombinu, je pro další analýzu potřeba „odfiltrvat“ z této směsi část odpovídající času dohasínání volného prothrombinu. Toto je klíčový krok, který ještě není plně promyšlen. My jsme používali metodu maximalizace vrcholu kroskorelační křivky v časech kolem 1-10 ms jak je znázorněno na Obr. 35. Z hodnot pro dobu dohasínání naměřené směsi se postupně odečítaly větší a větší hodnoty pro dobu dohasínání volného prothrombinu. Jednotlivé vzniklé doby dohasínání pro tzv. pseudovázaný prothrombin byly kroskorelovány s dobou dohasínání volného prothrombinu. Touto kroskorelací vznikaly křivky uvedené v grafu na Obr. 35. Z těchto křivek pak byla vybrána taková, která měla pro maximum v příslušných časech co nejvyšší hodnotu a co nejstrměji stoupala do dosažení maxima. Těmto kritériím na Obr. 35 vyhovuje červená křivka, která byla kroskorelována dobou dohasínání volného prothrombinu s dobou dohasínání pseudovázaného prothrombinu, ze které bylo odečteno 8 % doby dohasínání volného prothrombinu.



Obr. 35 Kroskorelační křivky pro kroskorelaci volného prothrombinu a pseudovázaného prothrombinu. Jednotlivé křivky se liší množstvím odečtených procent doby dohasínání pro volný prothrombin (uvedeno v legendě) od doby dohasínání pro naměřenou směs.

Tyto kroskorelace byly provedeny pro všechna naměřená data, tedy pro všechny typy membrán, které byly měřeny. Přehled jednotlivých nejlépe vyhovujících kroskorelací je na Obr. 36.



Obr. 36 Shrnutí nejlépe vyhovujících kroskorelací pro různé typy membrán.

Strmá část křivky před dosažením maxima má v sobě zahrnutou informaci o rychlostní konstantě vzniku komplexu protein-lipid (k_{on}). Pro vyhodnocení těchto parametrů by byl potřebný matematický model, který by:

- vyhovoval kinetice interakce proteinu s membránou,
- byl aplikovatelný na FLCS analýzu.

Takový model zatím není k dispozici. Jako pomocná metoda k vytvoření tohoto modelu se využívají počítačové simulace, které umožňují vypočítat základní parametry modelu. Vytvoření modelu bude předmětem dalších studií, které již jdou nad rámec této diplomové práce.

6. Souhrn

6.1. Značení a purifikace lipidů

Lipidy, které byly potřeba pro další práci byly označeny pomocí fluorescenční značky atto 488/633 a purifikovány pomocí adsorpční chromatografie tak, že další práce s nimi už nevyžadovala dodatečné čištění.

6.2. Značení a purifikace proteinů

Proteiny (cytochrom c a prothrombin) byly označeny fluorescenční značkou alexa 488/647/633. Takto označené proteiny byly purifikovány od volné nezreagované fluorescenční značky pomocí gelové chromatografie. Tato purifikace proběhla úspěšně.

Emitovaná fluorescence značeného cytochromu c-alexu 488 byla zhasena přítomností β -páso hemu, proto bylo od takto značeného cytochromu upuštěno. Značený cytochrom c-alexou 647 sice nebyl zhasen, ale samovolně agregoval do větších komplexů, tudíž i od takto značeného cytochromu bylo upuštěno. Pomocí FCS analýzy bylo zjištěno, že difúzní čas značeného cytochromu c se pohybuje kolem 150 μ s.

Označený prothrombin pak naprosto vyhovoval všem předpokladům, měl dostatečnou svítivost, byl dokonale purifikován od volné fluorescenční značky a nepodléhal agregaci. Pomocí FCS analýzy byl určen difúzní čas volného prothrombinu pohybujícího se v roztoku jako $TD = 0,450 \pm 0,014$ ms.

6.3. Příprava membrán

Membrány, které byly používány pro další měření naprosto splňovaly podmínku homogenity, což bylo detekováno pomocí funkce scanu na FCS. FCS měření bylo umožněno díky přítomnosti malého množství fluorescenčně značeného lipidu v membráně.

6.4. FCS měření

Pomocí FCS měření byl zjišťován posun ohnisek dvou různých laserů v konfokálním objemu. Z těchto měření bylo zjištěno, že ohnisko červeného laseru, tedy laseru s excitační vlnovou délkou $\lambda = 633$ nm, bylo posunuto o 192 ± 38 nm směrem k nižším hodnotám v z-ové ose vůči modrému laseru (excitace $\lambda = 470$ nm). Tento posun byl využíván při vyhodnocování Z-scanů při určování disociačních konstant vazby prothrombinu na membránu.

Pomocí FCS a Z-scanu byly určovány disociační konstanty vazby prothrombinu na membrány o různém složení. Tyto membrány se lišily v zastoupení fosfatidylserinu (od 5 do 20 %). Naměřená data byla vyhodnocována pomocí Langmuirovy izotermy. Takto byly určeny hodnoty disociačních konstant jako:

- $K_d = 8,07 \pm 2,03$ μM pro 5 % zastoupení PS
- $K_d = 5,81 \pm 1,33$ μM pro 10 % zastoupení PS
- $K_d = 0,97 \pm 0,14$ μM pro 14 % zastoupení PS
- $K_d = 0,87 \pm 0,14$ μM pro 20 % zastoupení PS.

Dále ze Z-scanu byly určovány difúzní koeficienty pro prothrombin pohybující se na membráně a pro lipidy pohybující se v membráně. Difúzní koeficienty pro pohyb lipidů uvnitř membrány byly víceméně neměnné se změnou koncentrace prothrombinu v roztoku ($D = 2,29 \pm 0,15$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 20 % PS, $D = 2,34 \pm 0,20$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 14 % PS, $D = 2,87 \pm 0,32$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 10 % PS a $D = 2,63 \pm 0,15$ $\mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$ pro membránu s 5 % PS).

Naproti tomu difúzní koeficienty pro prothrombin vázaný na membráně klesaly se stoupající koncentrací prothrombinu v roztoku a tyto difúzní koeficienty byly 3-6 krát nižší než difúzní koeficienty pro lipidy uvnitř membrány.

6.5. FLCS měření

Pro FLCS analýzu byly provedeny experimenty interakce prothrombinu s membránou pro různé typy membrán (20 %, 12,5 %, 10 %, 5 %, 3 % a 0 % fosfatidylserinu v membráně). Z takto naměřených dat byly pomocí maximalizace kroskorelační křivky v časech 1-10 ms získány časy dohasínání pseudovázaného prothrombinu a zároveň byly získány kroskorelační křivky, jejichž tvar nám říká, že kinetika interakce se děje někde na 10 ms časové škále a výše.

8. Seznam použité literatury:

- ¹ Valeur, B.: Fluorescence Microscopy: Principles and Application, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001, s. 20-71
- ² Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 1999, s. 4-12
- ³ Nishimura, G.: Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and its Application, (2004)
- ⁴ Meseth, U., Wohland, T., Rigler, R., Vogel, H.: *Biophys. J.* 76, 1619-1631, (1999)
- ⁵ Benda, A., Fagul'ová, V., Deyneka, A., Enderlein, J., Hof, M.: *Langmuir* 22, 9580-9585, (2006)
- ⁶ Schwille, P., Haustein, E.: Fluorescence Correlation Spectroscopy, An Introduction to its Concepts and Applications, Biophysics Textbook Online, Germany, (2004)
- ⁷ Winkler, T., Kettling, U., Koltermann, A., Eigen, M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 1375, (1999)
- ⁸ Krichevsky, O., Bonnet, G.: *Rep. Prog. Phys.* 65, 251-297, (2002)
- ⁹ Dertinger, T., Pacheco, V., von der Hocht, I., Hartmann, R., Gregor, I., Enderlein, J.: *J. Chem. Physchem* 6, 433-443, (2007)
- ¹⁰ Brinkmeier, M., Döre, K., Stephan, J., Eigen, M.: *Anal. Chem.* 71, 609, (1999)
- ¹¹ Schwille, P., Meyer-Almes, F.-J., Ringler, R.: *Biophys. J.* 72, 1878, (1997)
- ¹² Schwille, P. in Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications (Elson, E.L., Rigler, R.), Eds. Springer, Berlin, 2001. s.360
- ¹³ Benda, A., Beneš, M., Mareček, V., Lhotský, A., Hermes, W.Th., Hof, M.: *Langmuir* 19, 4120-4126, 2003
- ¹⁴ Humpolíčková, J., Geilen, E., Benda, A., Fagulova, V., Vercammen, J., vandeVen, M., Hof, M., Ameloot, M., Engelborghs, Y.: *Biophys. J.* 91, L23-L25, (2006)
- ¹⁵ Kapusta, P., Wahl, M., Benda, A.: *J. Fluoresc.* 17, 43-48, (2007)
- ¹⁶ Gregor, I., Enderlein, J.: *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 13 – 18, (2007)
- ¹⁷ Anderson, J.L.R., Chapman, S.K.: *Dalton Trans*, 13-24, (2005)
- ¹⁸ Pokkukuluri, P.R., Konser, Y.Y., Duke, N.E.C., Ericsson, J., Pessanha, M., Salgueiro, C.A., Schiffer, M.: *Protein Sci.* 13, 1684-1692, (2004)
- ¹⁹ Voet, D., Voet, J.G.: Biochemistry. New Persey, Cleareance Center, 2004, s.814-818
- ²⁰ Vempati, U.D., Diaz, F., Barrientos, A., Narisawa, S., Mian, A.M., Millán, J.L., Boise, L.H., Moraes, C.T.: *Mol. Cell Biol.* 27, 1771-1783, (2006)

-
- ²¹ Fedunová, D., Antalík, M.: *Biotechnol. Bioeng*, 93, (2006)
- ²² Nemerson, Y.: *Semin. Hematol.* 29, 170-176, (1992)
- ²³ Jesty, J.: *Blood Coagul.*, 2007, s. 5-6
- ²⁴ Mann, K.G., Krishnaswamy, S., Lawson, J.H.: *Semin. Hematol.* 29, 213-226, (1992)
- ²⁵ Esmon, C.T.: *Thromb. Haemost.* 70, 29-35, (1993)
- ²⁶ Dahlbäck: *Thromb. Res.* 77, 1-43, (1995)
- ²⁷ Zwaal, R.F.A., Comfurius, P., Bevers, E.M.: *Biochim. Biophys. Acta* 1376, 433-453, (1998)
- ²⁸ Tendian, S.W., Lentz, B.R.: *Biochemistry* 29, 6720-6729, (1990)
- ²⁹ Pearce, K.H., Hiskey, R.G., Thompson, N.L.: *Biochemistry* 31, 5983-5995, (1992)
- ³⁰ Pearce, K.H., Hof, M., Lentz, B.R., Thompson, N.L.: *J. Biol. Chem.* 268, 22984-22991, (1993)
- ³¹ Chen, Q., Lentz, B.R.: *Biochemistry* 36, 4701-4711, (1997)
- ³² Husten, E.J., Esmon, C.T., Johnson, A.E.: *J. Biol. Chem.* 262, 12953-12961, (1987)
- ³³ Rosing, J., Zwaal, R.F.A., Tans, G.: *J. Biol. Chem.* 261, 4224-4228, (1986)
- ³⁴ Krishnaswamy, S., Mann, K.G., Nesheim, M.E.: *J. Biol. Chem.* 261, 8977-8984, (1986)
- ³⁵ Wu, J.R., Lentz, B.R.: *Thromb. Haemost.* 71, 596-604, (1994)
- ³⁶ Lentz, B.R., Zhou, C.-M., Wu, J.R.: *Biochemistry* 33, 5460-5468, (1994)
- ³⁷ Tans, G., Janssen-Claessen, T., Hemker, H.C., Zwaal, R.F.A., Rosing, J.: *J. Biol. Chem.* 266, 21864-21873, (1991)
- ³⁸ Govers-Riemslog, J.W.P., Janssen, M.P., Zwaal, R.F.A., Rosing, J.: *Biochemistry* 31, 10000-10008, (1992)
- ³⁹ Walker, R.K., Krishnaswamy, S.: *J. Biol. Chem.* 269, 27441-27450, (1994)
- ⁴⁰ van Rijn, J.L.M.L., Govers-Riemslog, J.W.P., Zwaal, R.F.A., Rosing, J.: *Biochemistry* 23, 4557-4564, (1984)
- ⁴¹ Pei, G., Powers, D.D., Lentz, B.R.: *J. Biol. Chem.* 268, 3226-3233, (1993)
- ⁴² Kalafatis, M., Swords, N. A., Rand, M.D., Mann, K.G.: *Biochim. Biophys. Acta* 1227, 113-129, (1994)
- ⁴³ Huang, Z., Pearce, K.H., Thompson, N.L.: *Biophys. J.* 67, 1754-1766, (1994)
- ⁴⁴ Gerads, I., Govers-Riemslog, J.W.P., Tans, G., Zwaal, R.F.A., Rosing, J.: *Biochemistry* 29, 7967-7974, (1990)
- ⁴⁵ Gilbert, G.E., Drinkwater, D.: *Biochemistry* 32, 9577-9585, (1993)

⁴⁶ Comfurius, P., Smeets, E.F., Willems, G.M., Bevers, E.M., Zwaal, R.F.A.: *Biochemistry* 33, 10319-10324, (1994)

⁴⁷ Gilbert, G.E., Arena, A.A.: *J. Biol. Chem.* 271, 11120-11125, (1996)