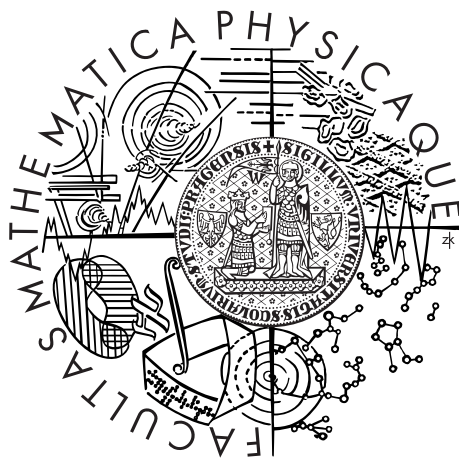


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Ondřej Socha

Studium lokálních změn ve stabilitě dvoušroubovice DNA po methyloaci cytosinu pomocí jaderné magnetické rezonance

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Václav Římal

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2014

Rád bych poděkoval svému vedoucímu Mgr. Václavu Římalovi za ochotu a hlavně trpělivost při vedení bakalářské práce. Zvláště mu děkuji za uvedení do problematiky NMR a za nesčetné konzultace v průběhu psaní celého textu.

Také děkuji profesorce RNDr. Heleně Štěpánkové, CSc za rady a připomínky k této práci.

Poděkování patří také mé rodině za podporu v průběhu celého studia.

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

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

V Praze dne 22.5.2014

Podpis autora

Název práce: Studium lokálních změn ve stabilitě dvoušroubovice DNA po metylaci cytosinu pomocí jaderné magnetické rezonance

Autor: Ondřej Socha

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Václav Římal, Katedra fyziky nízkých teplot

Abstrakt: Metylace cytosinu v CpG dinukleotidech hraje významnou roli při regulaci genové exprese a diferenciaci buněk. Oligonukleotidy s CpG motivem po metylaci příliš nemění svoji prostorovou strukturu, je však značně ovlivněna stabilita dvoušroubovice. V této práci je pomocí jaderné magnetické rezonance studováno tání duplexu DNA dvou selfkomplementárních oligonukleotidů o složení CAAC GTTG a CAAm⁵C GTTG lišících se pouze metylací centrálního cytosinu. Za tímto účelem byla změřena NMR spektra ¹H v rozsahu teplot (276-350) K. Fitováním spektrálních čar bázevodíků s ohledem na probíhající chemickou výměnu mezi duplexy a samostatnými vlákny byly získány rovnovážné i kinetické parametry tání duplexu nezávisle pro jednotlivé rezonance. Metylace cytosinu v centrálním CpG motivu zvyšuje teplotu tání, a to pro každý bázevodíkový pár. To poukazuje na vysokou míru kooperativity při tvorbě a rozpadu duplexu v celé molekule měřeného osmimeru.

Klíčová slova: NMR, metylace DNA, tání duplexu DNA

Title: Nuclear magnetic resonance study of local changes in DNA double-helix stability induced by cytosine methylation

Author: Ondřej Socha

Department: Department of Low Temperature Physics

Supervisor: Mgr. Václav Římal, Department of Low Temperature Physics

Abstract: Cytosine methylation in CpG dinucleotides plays an important role in regulation of gene expression and cell differentiation. The structure of DNA double-helix is only weakly affected by cytosine methylation in CpG containing oligonucleotides, but a significant change of the duplex stability is caused. In this thesis, the melting preoperties of two self-complementary oligonucleotides CAAC GTTG and CAAm⁵C GTTG are studied using nuclear magnetic resonance spectroscopy. We measured ¹H spectra at temperature range (276-350) K. The equilibrium and kinetic parameters of chemical exchange between duplexes and single strands were obtained by fitting the spectral lineshapes. Methylation of cytosine in the central CpG dinucleotide increases the melting temperature of each base pair. Thus, a high degree of cooperativity during chemical exchange is observed in our samples.

Keywords: NMR, DNA methylation, DNA melting

Obsah

Úvod	2
1 Deoxyribonukleová kyselina	3
1.1 Primární struktura DNA	3
1.2 Sekundární struktura DNA	4
1.3 Tání duplexu DNA	5
2 Jaderná magnetická rezonance	7
2.1 Blochovy rovnice	8
2.2 Pulsní metody	10
2.3 Interakce uvnitř vzorku	11
2.4 Nukleární Overhauserův jev	12
2.5 Tvar NMR spektra při chemické výměně	12
3 Měření	14
3.1 Popis spektrometru	14
3.2 Příprava rozpouštědla a vzorku	14
3.3 Regulace teploty vzorku	15
3.4 Měření vodíkových 1D spekter	15
3.5 Měření NOESY spekter	17
4 Zpracování spekter	21
4.1 Přiřazení signálů v aromatické oblasti	21
4.2 Fitování spekter bez chemické výměny	26
4.3 Fitování spekter s chemickou výměnou	33
4.4 Vyhodnocení termodynamických parametrů	36
4.5 Diskuse výsledků	36
Závěr	40
Seznam použité literatury	41
Seznam tabulek	43
Seznam použitých zkratk	44
Přílohy	45

Úvod

Základy genetiky položil v polovině 19. století brněnský přírodovědec Gregor Mendel. V té době již byla známa funkce buněk v živém organismu, a proto se očekávalo, že dědičná informace je uložena v každé z nich. Zpočátku nebylo jasné, která část buňky je zodpovědná za uchování dědičné informace. Přestože byla DNA již známa, předpokládalo se, že tuto funkci mají proteiny. V roce 1944 publikovala trojice vědců Avery, MacLeod a McCarty výsledky svého experimentu [1], jenž dokazoval, že nositelem genetické informace v buňce je právě DNA. Watson a Crick pak na základě rentgenové difrakce odhalili v roce 1953 její dvoušroubovicovou strukturu [2]. Tato dvoušroubovice se tak stala synonymem pro dědičnou informaci a posunula studium genetiky na zcela novou úroveň – molekulární.

Moderní analytické metody nám dnes umožňují studovat stavbu DNA velmi podrobně. Bylo popsáno velké množství genů, byly objeveny různé konformace DNA nebo modifikace v primární struktuře. Jednou z těchto modifikací je metylace cytosinu, a to zejména v CpG dinukleotidech. Tato chemická změna báze má významný vliv na míru exprese genetické informace, je důležitou součástí mechanismu diferenciaci buněk a vzniku nádorů.

Metylace cytosinu obvykle stabilizuje dvoušroubovici DNA, aniž by výrazně měnila její prostorovou strukturu [3]. Cílem této práce je popsat vliv metylace cytosinu na stabilitu duplexu DNA na spektroskopie jaderné magnetické rezonance. NMR je lokální metoda, která nám dovoluje sledovat průběh rozpadu dvoušroubovice a oproti metodám optickým či kalorimetrickým umožňuje podrobnější náhled do celého procesu. Z NMR spekter, která jsou během tání duplexu ovlivněna procesem chemické výměny, lze získat termodynamické parametry, které jsou jinak špatně dostupné. V rámci této bakalářské práce byla měřena spektra NMR izotopu ^1H dvou selfkomplementárních oktamerů DNA lišících se metylací cytosinu v centrálním CpG dinukleotidu v závislosti na teplotě, jejichž analýzou lze získat rovnovážné i kinetické parametry popisující tvorbu duplexu.

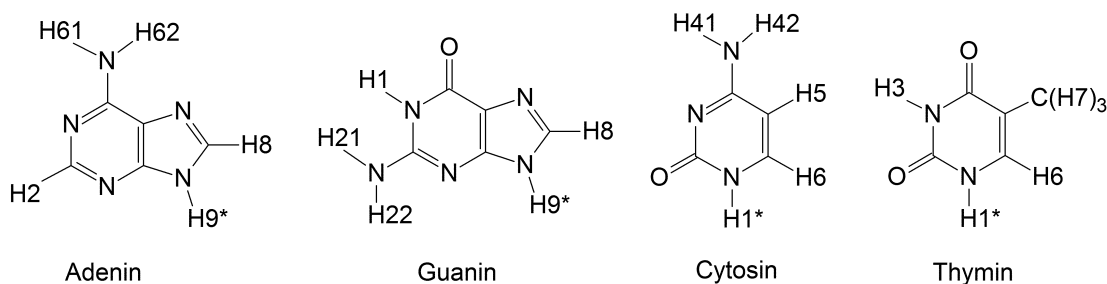
1. Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina, zkráceně DNA, je biologicky aktivní makromolekula (polymer), která se nachází v každé buňce. Slouží jako předpis pro syntézu bílkovin, které jsou nezbytné pro fungování celé buňky resp. celého organismu. V procesu zvaném transkripce DNA dochází k přepisu části DNA – genu do RNA (ribonukleová kyselina). Na základě informace obsažené v RNA se pak na ribozomech syntetizuje daný protein. Tento proces se označuje jako transkripce RNA. DNA může být za účasti mnoha proteinů a enzymů replikována. Tato vlastnost je důležitá při buněčném dělení, jelikož každá nová buňka potřebuje DNA, aby mohla fungovat.

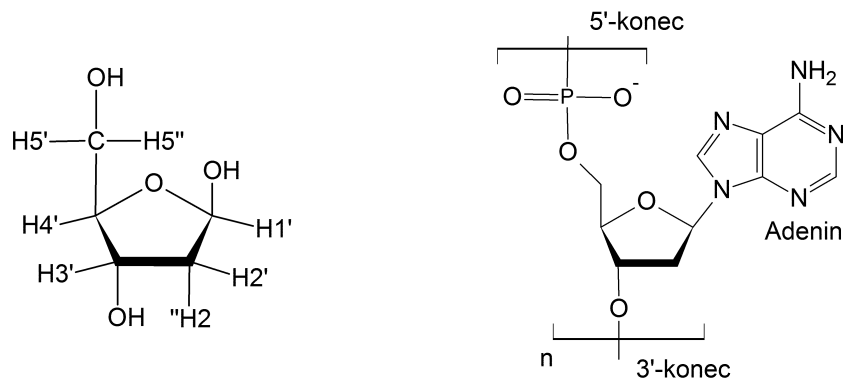
1.1 Primární struktura DNA

Řetězec DNA se skládá z nukleotidů. Každý nukleotid je tvořen purinovou nebo pyrimidinovou nukleovou bází navázanou na deoxyribózu. V DNA se vyskytují celkem čtyři základní nukleové báze. Dvě purinové – adenin, guanin a dvě pyrimidinové – thymin a cytosin. Jejich schémata jsou na obrázku 1.1. Vazbu mezi bází a deoxyribózou tvoří uhlík C1' deoxyribózy a dusík N9 purinové báze nebo dusík N1 pyrimidinové báze. Součástí nukleotidu je také fosfát, který se váže na uhlík C5' deoxyribózy. Navázáním fosfátové skupiny jednoho nukleotidu na uhlík C3' deoxyribózy následujícího nukleotidu vzniká řetězec DNA. Tomuto řetězci se říká nespárované vlákno nebo anglicky single strand. U řetězce DNA rozlišujeme dva konce – 3'-konec a 5'-konec. Čísla odpovídají uhlíkům první a poslední deoxyribózy v řetězci, které nejsou navázány přes fosfátovou skupinu na další nukleotid. Primární strukturou DNA rozumíme pořadí nukleových bází v řetězci. Udává se směrem od 5'-konce k 3'-konci.

Jednotlivé nukleotidy se označují různými zkratkami podle báze, kterou obsahují. V této práci budu používat jednopísmenné značení: A–adenin, G–guanin, C–cytosin, T–thymin. Termínem oligonukleotid označujeme řetězec skládající se z několika (nemnoha) nukleotidů. Pro označení konkrétního vodíku v řetězci budu používat označení skládající se z jednopísmenné zkratky příslušného nukleotidu, jeho pořadí od 5'-konce a označení daného vodíku podle obrázků 1.1 a 1.2. Vodíky deoxyribózy se uvádí s čárkou. Například označení A3-H8 značí vodík H8 adeninové báze třetího nukleotidu.



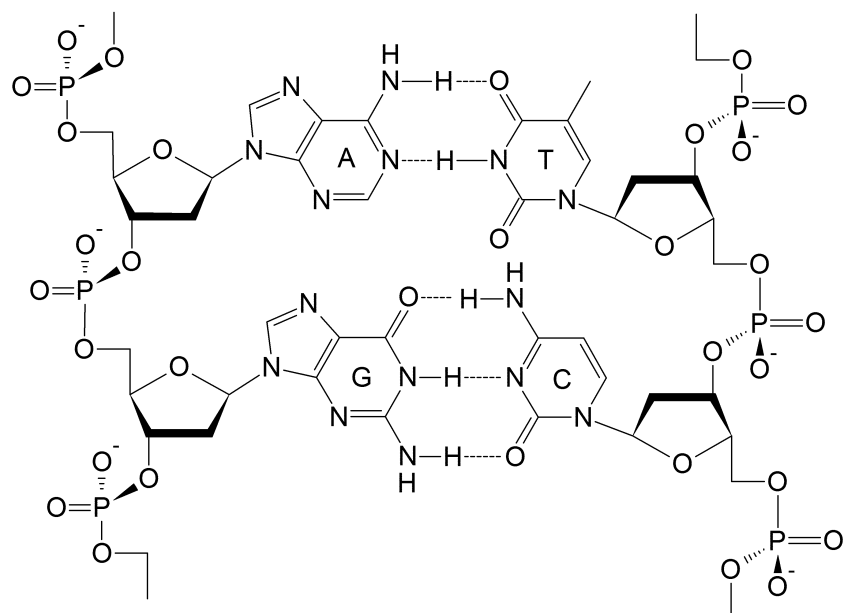
Obrázek 1.1: Čtyři základní báze tvořící deoxyribonukleové kyseliny. Místo vodíků označených hvězdičkou je v DNA připojena deoxyribóza.



Obrázek 1.2: Schéma deoxyribózy (vlevo) a příklad adeninového nukleotidu s vyznačenými konci (vpravo).

1.2 Sekundární struktura DNA

Mezi purinovými a pyrimidinovými bázemi vznikají vodíkové můstky. Adenin s thyminem resp. guanin s cytosinem tak vytvářejí bázový pár spojený dvěma resp. třemi vodíkovými vazbami. DNA obsažená v buňkách živých organismů tvoří dvoušroubovici, která se skládá ze dvou opačně orientovaných vláken DNA. Obě vlákna jsou spojena přes nukleové báze právě pomocí vodíkových můstků. Tomuto párování bází se říká Watsonovo-Crickovo párování a jeho schéma je na obrázku 1.3. Spárovaná vlákna DNA nazýváme duplexy.



Obrázek 1.3: Watsonovo-Crickovo párování bází.

Jelikož se každá nukleová báze páruje pouze s jednou tzv. komplementární bází, musí pořadí bází druhého vlákna odpovídat komplementárním bázím prvního. Tomuto vláknu říkáme komplementární řetězec. Vzhledem k tomu, že duplex je složen ze dvou protiběžných vláken, může být vlákno DNA selfkomplementární. To znamená, že dvě vlákna mohou vytvořit duplex, přestože mají stejné pořadí bází tj. stejnou primární strukturu.

Duplexy se mohou vyskytovat v několika formách. Nejběžnější a z biologického hlediska nejdůležitější je B-DNA. Jedná se o pravotočivou dvoušroubovici, v níž jsou báze páry naskládány téměř rovnoběžně nad sebou. Mezi nimi dochází k patrové interakci, což významně stabilizuje celý komplex. V přírodě se za jistých podmínek vyskytuje také A-DNA nebo levotočivá Z-DNA [5]. Tyto formy však nejsou tak běžné jako B-DNA. Uměle se pak podařilo připravit i další konformace. Výsledkem párování bází (nejen Watsonova-Crickova) nemusí být vždy duplex, ale třeba kvadruplex nebo triplex. Vlákno DNA se také může ohnout a spárovat samo se sebou, a to třeba jen na části delšího řetězce. Takový útvar se nazývá vlásenka [5].

Na stabilitu duplexu DNA má vliv více faktorů. Jedním z nich je primární struktura vláken. Bylo zjištěno, že úseky DNA s větším počtem CG párů jsou stabilnější. Může to být tím, že CG pár je svázán třemi vodíkovými vazbami oproti dvěma v AT páru. Výpočty však naznačují, že klíčovou roli při stabilizaci duplexu hraje patrová interakce mezi sousedními báze páry [6]. Další faktory ovlivňující stabilitu dvoušroubovice jsou teplota, délka řetězce, přítomnost některých iontů nebo metylace cytosinu.

Metylovaný cytosin, m^5C , se liší od nemetylovaného cytosinu tím, že na uhlíku C5 má navázanou metylovou skupinu. Bylo zjištěno, že CG dinukleotid v DNA obratlovců má v přibližně 80% případů metylovaný cytosin. Zajímavé je, že průměrně se metylace cytosinu v DNA vyskytuje jen ve 2-7% případů [7]. Z výsledků rentgenové difrakce [8] nebo NMR experimentů [3] vyplývá, že metylace cytosinu nemění strukturní vlastnosti B-DNA. Má však vliv na celkovou stabilitu duplexu DNA [3].

1.3 Tání duplexu DNA

V předchozích odstavcích bylo zmíněno několik faktorů ovlivňujících stabilitu duplexu DNA. Jedním z nich je teplota. Pro posuzování energetické výhodnosti duplexu oproti nespárovaným vláknům, můžeme použít vztah pro změnu Gibbsovy volné energie

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S, \quad (1.1)$$

kde ΔH a ΔS jsou změny entalpie a entropie, které jsou způsobeny vznikem duplexu. Po nastavení teploty se systém po čase dostane do termodynamické rovnováhy. V ní je podíl duplexů a single strandů v čase konstantní, ale stále probíhá tvorba a rozpad duplexů D na samostatná vlákna S.



Pro rovnovážnou konstantu tedy platí

$$K = \frac{c_D}{c_S^2}, \quad (1.3)$$

kde c_D je koncentrace duplexů a c_S koncentrace samostatných vláken DNA. Změnu Gibbsovy volné energie a rovnovážnou konstantu svazuje van't Hoffova rovnice

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad (1.4)$$

přičemž R je univerzální plynová konstanta. Pomocí těchto tří rovnic pak můžeme vyjádřit vztah pro teplotní závislost relativního podílu duplexů v roztoku self-komplementárních oligonukleotidů

$$p_A = \frac{1 + \alpha - \sqrt{1 + 2\alpha}}{\alpha}, \quad (1.5)$$

kde

$$\alpha = 4 \frac{c_0}{c_{H_2O}} e^{-\frac{\Delta G}{RT}}, \quad (1.6)$$

přičemž c_0 je celková koncentrace molekul DNA a c_{H_2O} je referenční molární koncentrace vody.

Teplotou tání T_m duplexu DNA rozumíme teplotu, při níž je podíl spárovaných a nespárovaných řetězců stejný. Pro koncentrace selfkomplementárních oligonukleotidů pak platí

$$c_S = 2c_D = \frac{1}{2}c_0. \quad (1.7)$$

Pro teplotu tání selfkomplementárních oligonukleotidů platí rovnice odvozená ze vztahů (1.1) až (1.4) a (1.7)

$$T_m = \frac{\Delta H}{R \ln \frac{c_0}{c_{H_2O}} + \Delta S}, \quad (1.8)$$

Při termodynamické rovnováze dále platí vztah mezi asociační rychlostní konstantou k_S a disociační rychlostní konstantou k_D

$$k_S c_S^2 = k_D c_D. \quad (1.9)$$

Vliv teploty na rychlostní konstantu je popsán Eyringovou rovnicí

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G_A}{RT}}, \quad (1.10)$$

přičemž k_B je Boltzmannova konstanta, h je Planckova konstanta a G_A nazýváme Gibbsovou aktivační energií.

2. Jaderná magnetická rezonance

Atomová jádra jsou složena z protonů a neutronů. Proton a neutron jsou fermiony se spinovým číslem $\frac{1}{2}$. Spinové číslo jádra l dostaneme složením spinů nukleonů s jejich orbitálními momenty. Platí, že protony resp. neutrony se párují a vzájemně tak kompenzují spin a orbitální moment k nule. Jádra se sudým počtem protonů i neutronů mají tedy nulový spin. V jádrech s lichým nukleonovým číslem přebývá jeden nespárovaný nukleon. Víme, že jeho orbitální moment je celočíselný, spin je poločíselný, a proto je celkový spin jádra poločíselný. Celočíselný spin mají jádra s lichým počtem protonů i neutronů, protože u nich zůstává nespárovaný proton a neutron a skládají se tedy dva orbitální momenty a dva spiny $\frac{1}{2}$.

Pro účely NMR jsou vhodná pouze jádra s nenulovým spinem, jelikož mají nenulový magnetický moment $\boldsymbol{\mu}$. Pro ten platí vztah [9]

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \mathbf{I}, \quad (2.1)$$

kde \mathbf{I} je spin jádra. Konstanta γ se nazývá gyromagnetický poměr a je pro každý izotop jiná. Její hodnoty pro několik vybraných izotopů jsou v tabulce 2.1. Velikost z-ové komponenty spinu I_z je dána magnetickým spinovým číslem m -

$$I_z = m\hbar. \quad (2.2)$$

Magnetické spinové číslo však může nabývat pouze hodnot

$$m = -l, -l + 1, \dots, l - 1, l. \quad (2.3)$$

To znamená, že velikost z-ové komponenty spinu I_z je kvantována (to platí obecně pro průmět spinu do libovolného směru).

Energie příslušející jednotlivým magnetickým spinovým číslům jsou stejné, dokud jádro nevložíme do magnetického pole, čímž dojde k sejmutí degenerace energetických hladin. Takové rozštěpení energetických hladin nazýváme Zeemanův jev. Velikost rozštěpení ΔE je úměrné intenzitě magnetického pole \mathbf{B}_0 a platí

$$\Delta E = \gamma B_0 \hbar. \quad (2.4)$$

Budeme-li působit radiofrekvenčním polem o úhlové frekvenci ω_0 na jádro, můžeme indukovat přechody mezi jednotlivými energetickými hladinami. Tento jev se nazývá jaderná magnetická rezonance. Velikost ω_0 plyne z předchozího vztahu

$$\omega_0 = \gamma B_0. \quad (2.5)$$

Pokud vložíme celý vzorek do magnetického pole \mathbf{B}_0 , bude rozložení energetických hladin dáno magnetickým polem v místě jádra. To ale bývá trochu odlišné od pole \mathbf{B}_0 . Atom je totiž tvořen jádrem a elektrony. Elektrony v magnetickém poli však vytvářejí také magnetické pole, které působí proti původnímu poli \mathbf{B}_0 . Jádro v atomu je tedy v poli, které je dáno superpozicí vnějšího magnetického pole \mathbf{B}_0 a malého magnetického pole vytvářeného elektrony v obalu. Pro rezonanční frekvenci jádra pak máme

$$\omega = \gamma(1 - \sigma)B_0, \quad (2.6)$$

kde veličinu σ nazýváme chemické stínění. Nachází-li se atom v molekule, pak se elektrony účastní chemických vazeb. Hodnota chemického stínění σ pak závisí na chemických vazbách, kterých se elektron účastní. V NMR vysokého rozlišení jsme tak schopni od sebe rozlišit atomy, jež se nacházejí na různých neekvivalentních pozicích v molekule.

Pro jednoduchost nepoužíváme k popisu spekter absolutní frekvenční škálu, ale zavádíme relativní veličinu chemický posuv

$$\delta = \frac{\omega - \omega_s}{\omega_s}. \quad (2.7)$$

Chemický posuv se uvádí v jednotkách ppm a výhodou takto zavedené škály je úspornější zápis, ale hlavně to, že nezávisí na velikosti magnetického pole \mathbf{B}_0 . Takže lze porovnávat spektra naměřená na různých spektrometrech bez nutnosti přeskálování frekvenční osy. Frekvence ω_s je rezonanční frekvence vhodného standardu. K tomuto účelu se nejčastěji používá TMS (tetrametylsilan), který je však špatně rozpustný ve vodě, proto se pro měření vodných roztoků používá standard DSS (2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfonate).

Izotop	Spin l	$\gamma \cdot 10^{-6} [s^{-1}T^{-1}]$	f [MHz]	Přírodní zastoupení [%]
^1H	1/2	267,5	500,0	99,985
^2H	1	41,1	76,8	0,015
^{13}C	1/2	67,2	125,8	1,07
^{14}N	1	19,3	36,2	99,64
^{15}N	1/2	-27,1	50,7	0,36
^{17}O	5/2	36,3	67,8	0,038
^{19}F	1/2	251,7	470,7	100
^{31}P	1/2	108,3	202,6	100

Tabulka 2.1: Přehled parametrů vybraných izotopů. Rezonanční frekvence jsou uváděny v magnetickém poli o indukci 11,7 T.

2.1 Blochovy rovnice

Předpokládejme, že máme velký soubor jader (vzorek), jejichž spiny jsou náhodně orientovány v prostoru. Úhrn všech magnetických momentů jader ve vzorku se nazývá jaderná magnetizace \mathbf{M} . Vložíme-li vzorek do magnetického pole \mathbf{B}_0 orientovaného ve směru osy z , dojde k reorientaci jaderných spinů tak, aby se minimalizovala energie celého souboru jader v magnetickém poli. Po ustálení termodynamické rovnováhy tedy budou jaderné spiny a tedy i magnetizace \mathbf{M} orientovány ve směru pole \mathbf{B}_0 .

Blochovy rovnice popisují fenomenologicky časový vývoj magnetizace vzorku v magnetickém poli o indukci \mathbf{B} s ohledem na relaxační procesy:

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x}{T_2}, \quad (2.8)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y}{T_2}, \quad (2.9)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (2.10)$$

kde M_0 je velikost magnetizace v rovnováze a T_1 a T_2 jsou relaxační doby.

Z historického hlediska je významné tzv. stacionární řešení Blochových rovnic. Stacionární řešení popisuje časový vývoj magnetizace vzorku v magnetickém poli složeného ze statické složky B_0 a slabé střídavé složky \mathbf{B}_1 . Předpokládejme, že průběh střídavé složky pole je

$$\mathbf{B}_1(t) = B_1(\cos \omega t, -\sin \omega t, 0) \quad (2.11)$$

a dále předpokládejme, že pole \mathbf{B}_0 míří ve směru osy z . Pak magnetické pole, které vznikne složením \mathbf{B}_0 a \mathbf{B}_1 , bude mít tvar

$$\mathbf{B}(t) = (B_1 \cos \omega t, -B_1 \sin \omega t, B_0). \quad (2.12)$$

Necháme-li toto pole působit na vzorek dostatečně dlouho, bude magnetizace vzorku \mathbf{M} nuceně precedovat okolo osy z s úhlovou frekvencí ω . Podélná složka magnetizace M_{\parallel} bude tedy konstantní a v čase se bude měnit pouze složka příčná M_{\perp} . Řešení příslušných Blochových rovnic budou tedy ve tvaru:

$$M_x = u \cos \omega t + v \sin \omega t, \quad (2.13)$$

$$M_y = -u \sin \omega t + v \cos \omega t, \quad (2.14)$$

$$M_z = \textit{konst.} \quad (2.15)$$

Parametry u a v najdeme dosazením výše uvedených výrazů do Blochových rovnic.

$$u = \frac{\gamma B_1 T_2^2 (\omega - \omega_0)}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad (2.16)$$

$$v = \frac{\gamma B_1 T_2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad (2.17)$$

$$M_z = \frac{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0. \quad (2.18)$$

Řešení pro příčnou složku magnetizace lze zapsat v komplexním tvaru

$$M_{\perp}(t) = M_x + iM_y = (u + iv)e^{-i\omega t}. \quad (2.19)$$

Intenzitu příčné složky magnetizace jsme pak schopni zaznamenat pomocí detekčních cívek spektrometru. Zavedením komplexní symboliky jsme rozdělili příčnou magnetizaci na absorpční a disperzní složku. Disperzní složka u popisuje tu část příčné magnetizace, která preceduje ve fázi s radiofrekvenčním polem, a absorpční složka v popisuje část fázově posunutou o $\frac{\pi}{2}$ vůči radiofrekvenčnímu poli. Příčná složka magnetizace tedy preceduje s fázovým posunem, který je určen hodnotou ω . Pokud zvolíme frekvenci rf. pole tak, že $\omega = \omega_0$, pak dojde k vymizení disperzní složky a příčná magnetizace bude precedovat s fázovým posunem $\frac{\pi}{2}$ vůči rf. poli.

Z tohoto řešení můžeme získat tvar spektra pro NMR experiment, při kterém ozařujeme vzorek radiofrekvenčním polem s frekvencí ω , kterou měníme pomalu tak, aby byl splněn předpoklad ustálené nucené precese. Amplituda zaznamenaného signálu pro různé hodnoty ω pak bude mít průběh, který přibližně popisuje vztah

$$S(\omega) = \frac{T_2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2} + i \frac{T_2^2 (\omega - \omega_0)}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2}. \quad (2.20)$$

Zde jsme zanedbali člen s B_1^2 , o kterém předpokládáme, že je malý. Také není uvedena konstanta úměrnosti γB_1 , která nemá vliv na samotný tvar spektra.

Tento typ NMR experimentu, při kterém ozařujeme vzorek kontinuálně radiofrekvenčním polem s proměnnou frekvencí, se v dnešní době příliš nepoužívá. Díky rozvoji elektroniky a výpočetní techniky byl vytlačen pulsními metodami, které měření zrychlují. Stále se však používá v některých pomocných funkcích spektrometru.

2.2 Pulsní metody

Magnetizace \mathbf{M} vzorku v magnetickém poli \mathbf{B}_0 bude po vychýlení ze směru \mathbf{B}_0 konat Larmorovu precesi s frekvencí ω_0 kolem vektoru \mathbf{B}_0 . Působením relaxačních mechanismů dojde postupem času ke zmenšování úhlu mezi \mathbf{M} a \mathbf{B}_0 . Po uplynutí dostatečně dlouhé doby bude vektor magnetizace rovnoběžný s vektorem indukce magnetického pole. Larmorovu precesi lze zachytit detekčními cívkami jako signál volné precese – FID. FID se skládá ze dvou složek - harmonického průběhu s frekvencí ω_0 , který odpovídá Larmorově precesi, a obálky ve tvaru klesající exponenciály, kterou tvarují relaxační procesy. Fourierovou transformací tohoto signálu dostaneme spektrum s Lorenzovou křivkou na frekvenci ω_0 .

Abychom však mohli FID dobře změřit tj. aby byl co nejdelší a nejsilnější, potřebujeme nejprve sklopit magnetizaci \mathbf{M} do příčné roviny vůči magnetickému poli B_0 . Toho lze docílit kruhově polarizovaným radiofrekvenčním polem (2.11). Opět předpokládejme, že pole B_0 a magnetizace zrelaxovaného vzorku míří ve směru osy z . Pro zjednodušení budeme pozorovat vývoj magnetizace ze soustavy, která kolem této osy rotuje s úhlovou frekvencí ω . V této soustavě pozorujeme tzv. efektivní magnetické pole

$$\mathbf{B}(t) = (B_1, 0, \frac{\omega - \omega_0}{\gamma}). \quad (2.21)$$

Vidíme, že pokud frekvence radiofrekvenčního pole ω bude stejná jako Larmorova frekvence ω_0 , nebudeme v rotující soustavě pozorovat pole \mathbf{B}_0 . Přítomna bude jen složka B_1 , okolo které začne magnetizace M precesovat. Ze vztahu pro Larmorovu frekvenci (2.5) můžeme odvodit, o jaký úhel se magnetizace stočí vůči ose z za čas τ

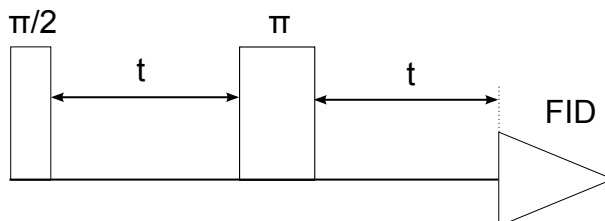
$$\theta = B_1 \gamma \tau. \quad (2.22)$$

Přitom předpokládáme, že doba τ je dostatečně krátká na to, aby se nestihly výrazněji uplatnit relaxační procesy.

Samotné měření probíhá tedy tak, že nejprve radiofrekvenčním pulsem vychýlíme magnetizaci zrelaxovaného vzorku o úhel $\frac{\pi}{2}$ do příčné roviny a naměříme signál volné precese. Po Fourierově transformaci dostaneme jeho spektrum. Toto je nejjednodušší pulsní sekvence s jedním $\frac{\pi}{2}$ pulsem.

Často se k měření používá metoda spinového echa, která je znázorněna na obrázku 2.1. Jde o metodu, kde se po prvním pulsu nechá FID odeznít a poté se po čase t od prvního pulsu aplikuje druhý puls, který stočí magnetizaci o úhel π . V čase $2t$ dojde k obnovení signálu FID. Vysvětlit se to dá tím, že magnetizace je složena z mnoha příspěvků z různých oblastí vzorku. Magnetické pole však není všude stejné a po prvním pulsu dojde k rozfázování příčných složek magnetizace

vlivem rozdílných Larmorových frekvencí. To způsobí postupné odečtení jednotlivých příspěvků a zánik signálu FID. π -pulesem pak otočíme příspěvky k příčné magnetizaci kolem osy ležící v příčné rovině. Tím se příspěvky k příčné magnetizaci začnou opět sbíhat, což zaznamenáme jako rostoucí signál volné precese. Po úplném sfázování se jednotlivé příspěvky k příčné magnetizaci začnou opět rozbíhat a signál FID postupně zanikne. Výhodou této pulsní sekvence je, že měříme signál FID s větším časovým odstupem od pulsu. Bezprostředně po excitačním pulsu je totiž snímací kanál zahlcen a není schopen správně zaznamenat FID.



Obrázek 2.1: Pulsní sekvence spinového echa.

2.3 Interakce uvnitř vzorku

Ve vzorku dochází k několika interakcím, které ovlivňují tvar NMR spektra. Mezi ně patří přímá a nepřímá dipól-dipólová interakce, chemický posuv a kvadrupólová interakce. Ne všechny interakce se však při každém měření uplatní.

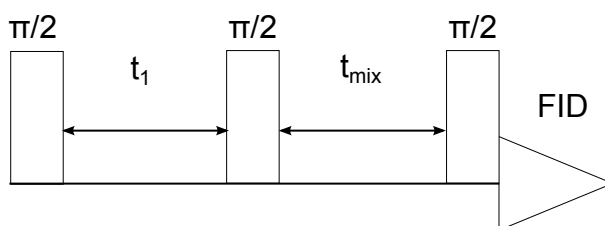
Významnou interakcí je nepřímá dipól-dipólová interakce. K nepřímé dipól-dipólové interakci nebo také J-interakci dochází mezi dvěma jádry v molekule, ve spektru se však projevuje pouze J-interakce mezi neekvivalentními jádry. Máme-li několik atomů v molekule spojených chemickou vazbou, pak orientace spinu jednoho jádra ovlivňuje vzdálenost energetických hladin jader ostatních. Například jádro se spinem $\frac{1}{2}$ má dva možné průměty spinu do zvoleného směru. Druhé jádro, které je s ním spojeno chemickými vazbami, bude mít rozštěpenou spektrální čáru na dublet. To odpovídá dvěma možným orientacím spinu prvního jádra. Interakce je vzájemná, takže první jádro bude mít také rozštěpenou spektrální čáru. Vlivem více J-interakcí může dojít ke několikanásobnému rozštěpení spektrální čáry na multiplety. Velikost rozštěpení je popsána J-konstantou, která nezávisí na velikosti magnetického pole a je rovna vzdálenosti dvou čar dubletu ve spektru. Udává se v jednotkách Hz a její hodnoty závisí na typu chemických vazeb, které J-interakci zprostředkovávají. Nepřímá dipól-dipólová interakce se obvykle projevuje do vzdálenosti čtyř chemických vazeb mezi interagujícími jádry.

Přímá dipól-dipólová interakce se v kapalinách středuje k nule a přímo se ve spektru neprojevuje. Lze však pozorovat nukleární Overhauserův jev, který je jejím důsledkem. Chemický posuv, důležitá interakce mezi jádrem a elektrony, byl popsán výše. Kvadrupólová interakce se projeví jen u jader se spinem větším než $\frac{1}{2}$.

2.4 Nukleární Overhauserův jev

Při nukleárním Overhauserově jevu (NOE) dochází k přenosu magnetizace mezi dvěma jádry pomocí dipól-dipólové interakce. Působením radiofrekvenčního pole na rezonanční frekvenci jednoho jádra dojde k narušení populací stavů s různým průmětem spinu. Tím dojde k přenosu magnetizace na jiné jádro, které se nachází v jeho blízkosti, čímž ovlivní intenzitu jeho spektrální čáry. NOE je pozorovatelný mezi jádry, která jsou od sebe vzdálena až 5 Å [10].

Tohoto jevu se využívá při měření NOESY spekter. NOESY spektra jsou nejčastěji dvourozměrná, ale při studiu proteinů a dalších biomolekul se často měří vícerozměrná spektra při kombinaci NOESY a dalších metod (HSQC, TROSY, TOCSY). Nejjednodušší měřicí sekvence 2D ^1H - ^1H NOESY se skládá ze tří pulsů – viz obrázek 2.2. Dobu t_{mix} nazýváme směšovací čas a během této fáze necháváme NOE, aby se projevil. Následně aplikujeme čtecí puls, změříme FID a po Fourierově transformaci získáme spektrum. Toto měření mnohokrát opakujeme se stále delším časem t_1 . Jakmile máme naměřenou sadu spekter, provedeme Fourierovu transformaci ve směru t_1 . Tím vznikne 2D spektrum, které znázorňujeme pomocí vrstevnic. Ve spektru uvidíme výrazné diagonální píky, které odpovídají signálům v 1D spektru. Nás však budou zajímat mimodiagonální píky, které odpovídají výraznému NOE. A jelikož se NOE nejvíce projevuje na krátké vzdálenosti, můžeme podle intenzity kros píku usuzovat na vzdálenosti příslušných atomů v prostoru. Jejich jádra přitom nemusí být spojena chemickou vazbou.



Obrázek 2.2: Pulsní sekvence pro měření NOESY.

2.5 Tvar NMR spektra při chemické výměně

Magnetické pole v okolí jádra se mění podle toho, v jakém stavu se atom nachází. Pokud se účastní chemické výměny, pak se NMR signál jeho jádra změní. Může dojít k posuvu rezonanční frekvence, nebo změně relaxačních dob T_1 a T_2 .

Předpokládejme, že probíhá chemická výměna mezi stavy A a B s rychlostními konstantami

$$k_A = k_B = k. \quad (2.23)$$

Dále budeme předpokládat, že pro magnetizaci obou stavů platí

$$M_0^A = M_0^B = M_0. \quad (2.24)$$

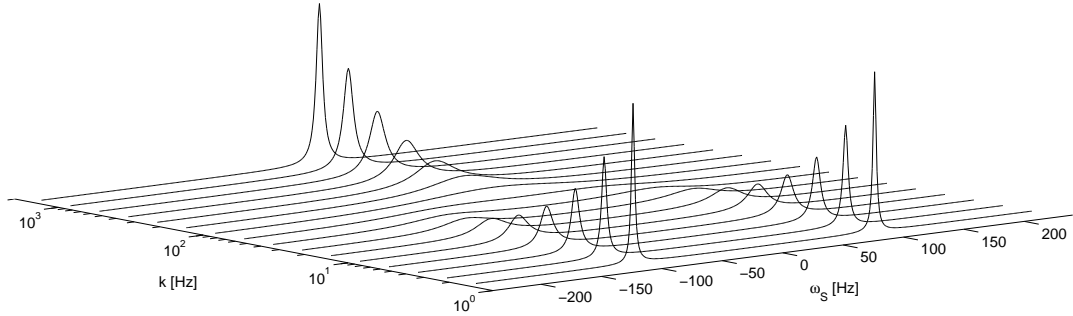
Pak lze z Blochových-McConnellových rovnic odvodit vztah popisující tvar spektra při takové chemické výměně [11]

$$S(\omega_S) = \frac{4M_0k\delta^2}{(\delta - \omega_S)^2(\delta + \omega_S)^2 + 4k^2\omega_S^2}, \quad (2.25)$$

kde

$$\delta = \frac{1}{2}(\omega_A - \omega_B)$$

a ω_S je frekvenční posun vůči aritmetickému průměru rezonančních frekvencí stavů A a B. Tvar spektra pro různé rychlosti výměny je znázorněn na obrázku 2.3. Vidíme, že s rostoucí rychlostí chemické výměny dochází zpočátku k rozšiřování obou signálů a jejich posunu směrem k sobě. Při vysokých rychlostech k pak pozorujeme pouze jeden signál na průměrné frekvenci obou původních signálů.



Obrázek 2.3: Tvar spektra při symetrické chemické výměně v závislosti na rychlosti výměny. Vypočteno podle (2.25) pro $\delta = 100$ Hz.

Této chemické výměně, kdy jsme předpokládali (2.23) a (2.24), se říká symetrická. Běžně však dochází k výměně asymetrické, u které výše uvedené předpoklady neplatí. Tvar NMR spektra při takové výměně popisuje vztah, který je odvozen v [12]

$$S(\omega) = \frac{M_0^A k_A + M_0^B k_B + M_0^A \alpha_B + M_0^A \alpha_A}{\alpha_A \alpha_B - k_A k_B}, \quad (2.26)$$

kde

$$\alpha_A = R_A + k_A - i(\omega - \omega_A), \quad (2.27)$$

$$\alpha_B = R_B + k_B - i(\omega - \omega_B), \quad (2.28)$$

přičemž R_A a R_B jsou převrácené hodnoty příčných relaxačních časů T_2^A a T_2^B .

Chemická výměna doprovází chemické reakce a změny struktur molekul jako například rotace kolem vazby nebo jinou změnu prostorového uspořádání. Mezi to patří také tvorba a rozpad duplexu DNA.

3. Měření

3.1 Popis spektrometru

Měření NMR spekter jsem prováděl na spektrometru Avance 500 od firmy Bruker. Supravodivý magnet vytváří magnetické pole o indukci 11,7 T, což umožňuje měření NMR spekter s rezonanční frekvencí ^1H 500 MHz. Pro NMR vysokého rozlišení je důležitá homogenita magnetického pole uvnitř vzorku, ale také časová stabilita pole. Z tohoto důvodu obsahuje spektrometr soustavu cívek, které jsou schopny při vhodném nastavení zvýšit homogenitu pole. O časovou stabilitu pole se v průběhu měření stará systém *lock*, jenž na základě měření rezonanční frekvence deuteria ve vzorku reguluje proud cívkami tak, aby výsledné magnetické pole nekolísalo v čase.

Detekční a zároveň excitační cívka je umístěna v NMR sondě, která se zasouvá do magnetu. Součástí sondy jsou gradientní cívky, umožňující vytvoření přesně definovaných gradientů magnetického pole ve vzorku. K měření teplotních závislostí chemických posuvů ^1H jsem použil dvoukanalovou sondu BBO, která umožňuje příjem signálu z jader ^1H a druhý kanál je naladitelný pro libovolné jádro z rozsahu ^{31}P - ^{109}Ag , což v poli 11,7 T odpovídá frekvencím 202 MHz - 23 MHz. Sonda má ještě třetí kanál pro příjem pomocného signálu ^2H pro *lock*. K měření 2D NOESY spekter jsem použil sondu TBI.

Součástí spektrometru je obslužný program TopSpin, který kromě řízení spektrometru umožňuje také základní manipulaci s naměřenými daty (spektry). Pro další zpracování spekter jsem však využil specializovanějších programů.

3.2 Příprava rozpouštědla a vzorku

Oligonukleotidy byly rozpuštěny ve vodě s přídatkem fosfátového pufru o koncentraci 25 mM. Pufr byl připraven smícháním NaH_2PO_4 a Na_2HPO_4 v molárním poměru 39:64. Tento poměr měl zajistit udržení pH roztoku se vzorkem okolo hodnoty 7. Rozpouštědlo dále obsahovalo sodíkové ionty Na^+ o celkové koncentraci 200 mM. Toho jsem docílil přidáním NaCl , proto roztok obsahoval ještě ionty Cl^- o koncentraci 160 mM. Pro udržování stability magnetického pole systémem *lock* bylo do rozpouštědla přidáno 10% obj. D_2O . Jako reference chemického posuvu byl použit interní standard DSS o koncentraci přibližně 0,25 mM. V tabulce 3.1 jsou rozepsány hmotnosti těchto látek, navážených při přípravě 20 ml rozpouštědla. Výsledné pH rozpouštědla bez rozpuštěného oligonukleotidu bylo 7,06 při 25°C. K určení pH jsem používal digitální pH-metr Cole Parmer s elektrodou Spintode od firmy Rototec-Spintec. Měřicí elektroda byla dostatečně tenká a dlouhá, a proto se dalo měřit pH přímo v úzké NMR kyvetě. V kontrolním NMR spektru rozpouštědla se neprojeví žádné nečistoty. Kyvety pro vzorky byly skleněné o vnějším průměru 5 mm, před použitím jsem je vymyl destilovanou vodou a sušil po dobu 2 h při 150°C.

Měření jsem prováděl na dvou vzorcích s DNA sekvencemi CAAC GTTG a CAAm ^5C GTTG. m ^5C v druhém oligonukleotidu značí cytosinovou bázi, u níž byl vodík na pozici 5 nahrazen metylovou skupinou. Dále budu sekvence označovat jako CG a m ^5CG . Oligonukleotidy připravila Centrální laboratoř - Proteomika,

Středoevropský technologický institut CEITEC, Masarykova univerzita. Podle údajů výrobce jsem měl k dispozici 0,67 μmol oligonukleotidu CG a 0,70 μmol oligonukleotidu $m^5\text{CG}$. Oligonukleotid CG byl rozpuštěn v 0,5 ml rozpouštědla, jeho koncentrace ve vzorku tedy byla 1,34 mM. Po skončení měření NMR spekter bylo pH roztoku v kyvetě 6,86 při 25°C. Metylovaný oligonukleotid $m^5\text{CG}$ jsem rozpustil také v 0,5 ml rozpouštědla, koncentrace byla o něco větší – 1,40 mM a pH bylo 6,77 při 25°C. U tohoto vzorku jsem pH měřil ještě před vlastním měřením NMR spekter, ale opět přímo v NMR kyvetě.

Chemikálie	Naváženo [mg]
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30,4
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	54,4
NaCl	187,3
DSS	0,2

Tabulka 3.1: Hmotnosti látek použitých při přípravě 20 ml rozpouštědla.

3.3 Regulace teploty vzorku

Teplota vzorku v průběhu měření byla regulována teplotní jednotkou spektrometru, ovládanou přes obslužný program TopSpin. V NMR sondě byl umístěn teplotní snímač, který posílal informace o teplotě čidla obslužnému programu, a ten reguloval výkon topné spirály, umístěné taktéž v sondě spektrometru. Kolem vzorku neustále proudil dusík, který byl pro dosažení nízkých teplot, tj. teplot nižších než pokojová teplota, předchlazován chladicí jednotkou. Regulačnímu programu jsem nastavil tyto parametry:

Průtok dusíku.....	400 l/h
Omezení topného výkonu	10%
Proportional band.....	41,0
Integral time.....	60,0
Derivative time.....	0,0

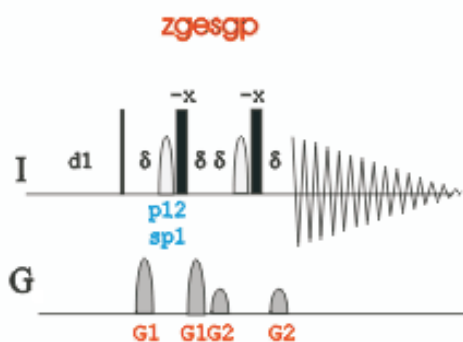
Vlastní měření spekter probíhalo vždy za nastavené teploty, která byla udržována konstantní po dobu měření daného spektra. Postupoval jsem od nejvyšší teploty k nižším s krokem 2 K. Po nastavení příslušné teploty byl vzorek po dobu 15 min temperován a až poté jsem spustil samotné měření. Vzhledem k tomu, že teplotní čidlo bylo umístěno mimo vzorek v měřící sondě, neodpovídala skutečná teplota vzorku nastavené teplotě. Měl jsem k dispozici teplotní kalibraci sondy, kterou jsem použil k přesnějšímu stanovení teploty vzorku. Rozdíl však nebyl velký.

3.4 Měření vodíkových 1D spekter

Pro vyhodnocení teplotní závislosti vodíkových spekter jsem naměřil 39 spekter vzorku CG při teplotách od 350 K do 274 K s krokem 2 K. U vzorku $m^5\text{CG}$ bylo naměřeno 40 spekter v rozmezí teplot od 354 K do 276 K s krokem 2 K. Jedná se

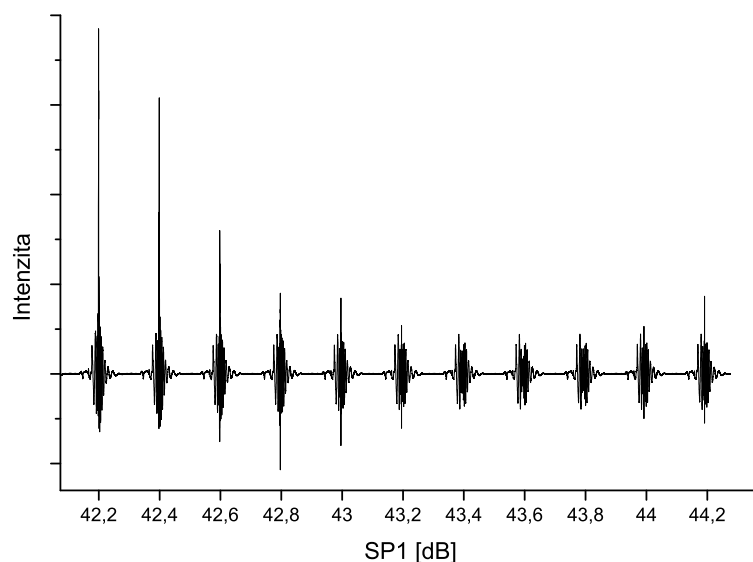
o teploty, které byly nastaveny na teplotní jednotce, a byly tedy před kalibrací. V příloze na obrázcích P1 až P5 jsou všechna naměřená 1D spektra.

Vzhledem k tomu, že použité rozpouštědlo se skládalo převážně z vody, byl signál vodíku z molekul vody mnohonásobně větší než signály příslušející jednotlivým vodíkovým pozicím v oligonukleotidu. Signál vody bylo tedy potřeba potlačit. K tomu slouží různě složité pulsní sekvence. Použil jsem pulsní sekvenci excitation sculpting zgesgp [13], která potlačila vodu velice dobře a jen minimálně ovlivnila okolní signály. Na obrázku 3.1 je schéma celé sekvence nakresleno. Po aplikaci $\pi/2$ pulsu se vytvoří pomocí gradientních cívek nehomogenní magnetické pole. Tím dojde k rozfázování jednotlivých příspěvků k příčné magnetizaci všech vodíkových jader. Následně aplikujeme na vzorek selektivní π -puls na rezonanční frekvenci vody a hned po něm neselektivní π -puls a opět gradient. U jader vodíků vody dojde k ještě většímu zeslabení signálu, jelikož jejich magnetizace byla díky selektivnímu pulsu stočena celkem o 360° a po aplikaci druhého gradientu došlo k dalšímu rozfázování příspěvků jednotlivých jader k celkové magnetizaci. Ale u ostatních vodíkových jader dojde po stočení magnetizace o 180° a aplikaci stejného gradientu jako na počátku k opětovnému sfázování jednotlivých příspěvků k magnetizaci a vytvoření spinového echa. U této pulsní sekvence se celý postup zopakuje ještě jednou s jinou hodnotou gradientu. Kvalita potlačení rozpouštědla závisí především na správném nastavení rezonanční frekvence jader ^1H rozpouštědla (vody) a přesném nastavení výkonu selektivního pulsu. Se změnou teploty je potřeba tyto parametry mírně korigovat, to se týká zejména rezonanční frekvence vody. Ve spektrech na obrázku 3.2 vidíme, jaký vliv má hodnota parametru SP1 (útlum selektivního pulsu) na kvalitu potlačení signálu vody.



Obrázek 3.1: Pulsní sekvence zgesgp na potlačení signálu rozpouštědla.

Všechny důležité parametry pulsních programů jsou v tabulce 3.2. Ve vodíkových spektrech okolo teploty tání oligonukleotidu (294 K - 318 K) dochází k rozšiřování píků a ve spektru se výrazněji projevuje šum. Z tohoto důvodu jsem zvýšil počet scanů při těchto teplotách na čtyřnásobek. Tím došlo k redukci šumu na polovinu a spektra se pak lépe a přesněji vyhodnocovala.



Obrázek 3.2: Intenzita signálu vody pro různé hodnoty parametru SP12 – útlum selektivního pulsu.

Název a označení parametru		Hodnota
Počet scanů v rozmezí teplot 294 K - 318 K	NS	1024
Počet scanů při ostatních teplotách	NS	256
Šířka spektra [ppm]	SW	24
Relaxační prodleva [s]	D1	1,00
Délka $\pi/2$ -pulsu [μs]	P1	11,0
Útlum $\pi/2$ -pulsu [dB]	PL1	5,0
Délka selektivního π -pulsu [ms]	P12	4,0
Útlum selektivního π -pulsu [dB]	SP1	43,6

Tabulka 3.2: Nastavení parametrů pro měření 1D spekter.

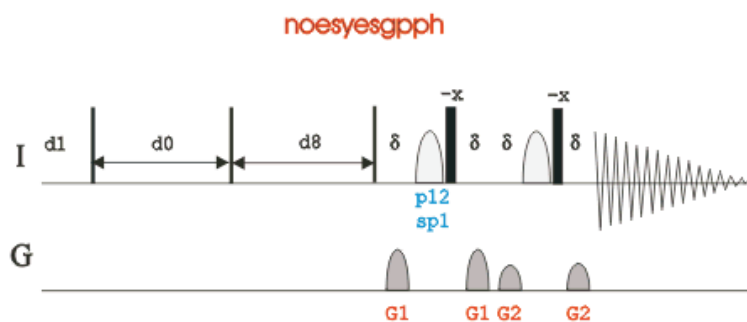
3.5 Měření NOESY spekter

NOESY spektra jsem měřil za účelem přiřazení vodíkových signálů jednotlivým vodíkům v oligonukleotidu. Pro každý vzorek jsem naměřil dvě NOESY spektra při teplotě $T=284\text{K}$ pro dvě hodnoty směšovacího času D8. Při této teplotě jsou spektrální čáry relativně úzké a nedochází k překryvům píků v aromatické části spektra. Také ještě není ve spektru patrná chemická výměna, a proto se žádné píky nerozšiřují či dokonce nemizí.

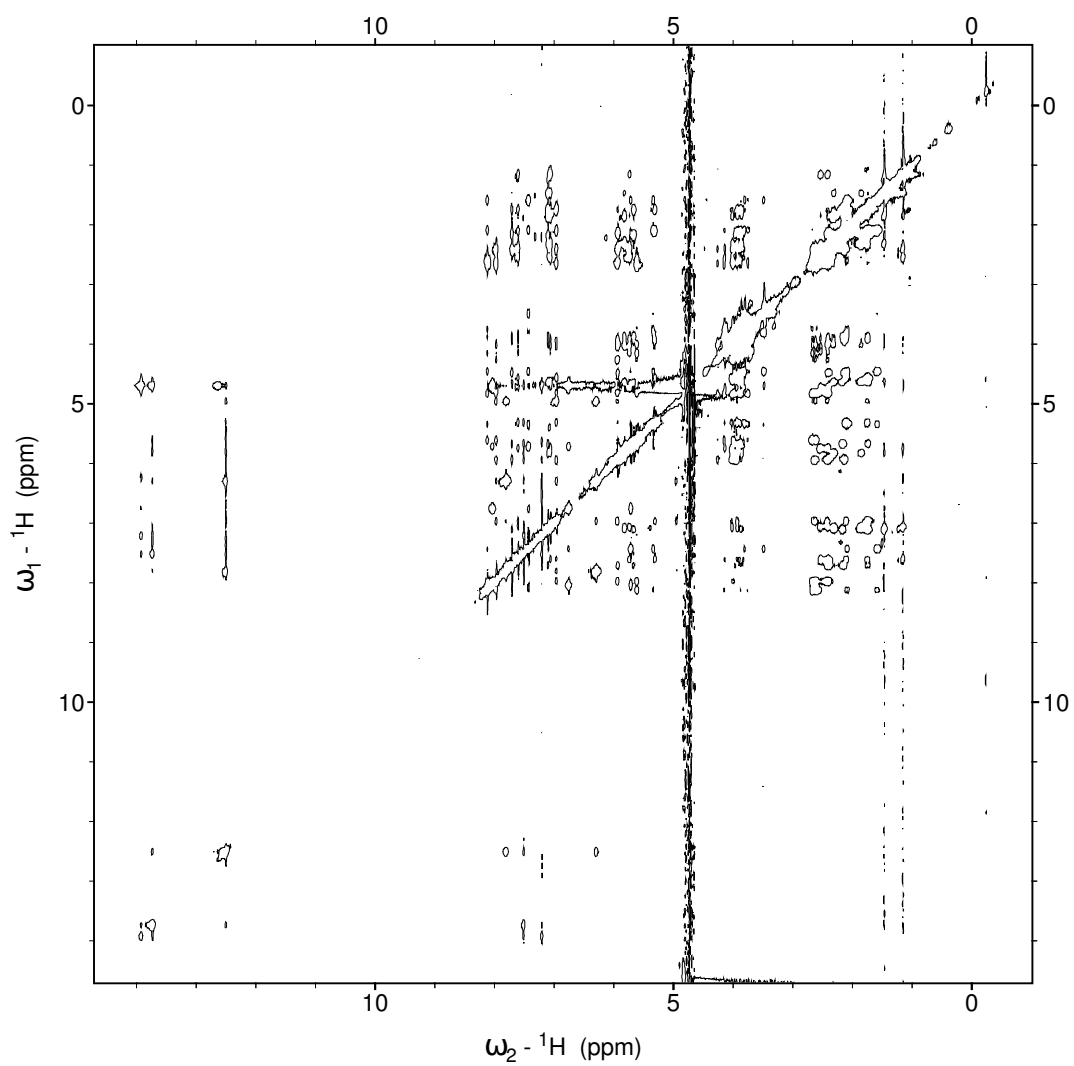
Schéma měřicí pulsní sekvence je na obrázku 3.3, parametry v tabulce 3.3. Stejně jako u 1D spekter bylo potřeba použít potlačení vody. Naměřená spektra jsou na obrázku 3.4 a 3.5

Název a označení parametru		Hodnota
Počet scanů	NS	128
Počet spekter	TD2	512
Šířka spektra [ppm]	SW	20
Relaxační prodleva [s]	D1	1,00
Délka $\pi/2$ -pulsu [μs]	P1	8,5
Útlum $\pi/2$ -pulsu [dB]	PL1	6,0
Směšovací doba [s]	D8	0,25/0,10
Délka selektivního π -pulsu [ms]	P12	4,0
Útlum selektivního π -pulsu [dB]	SP1	46,5

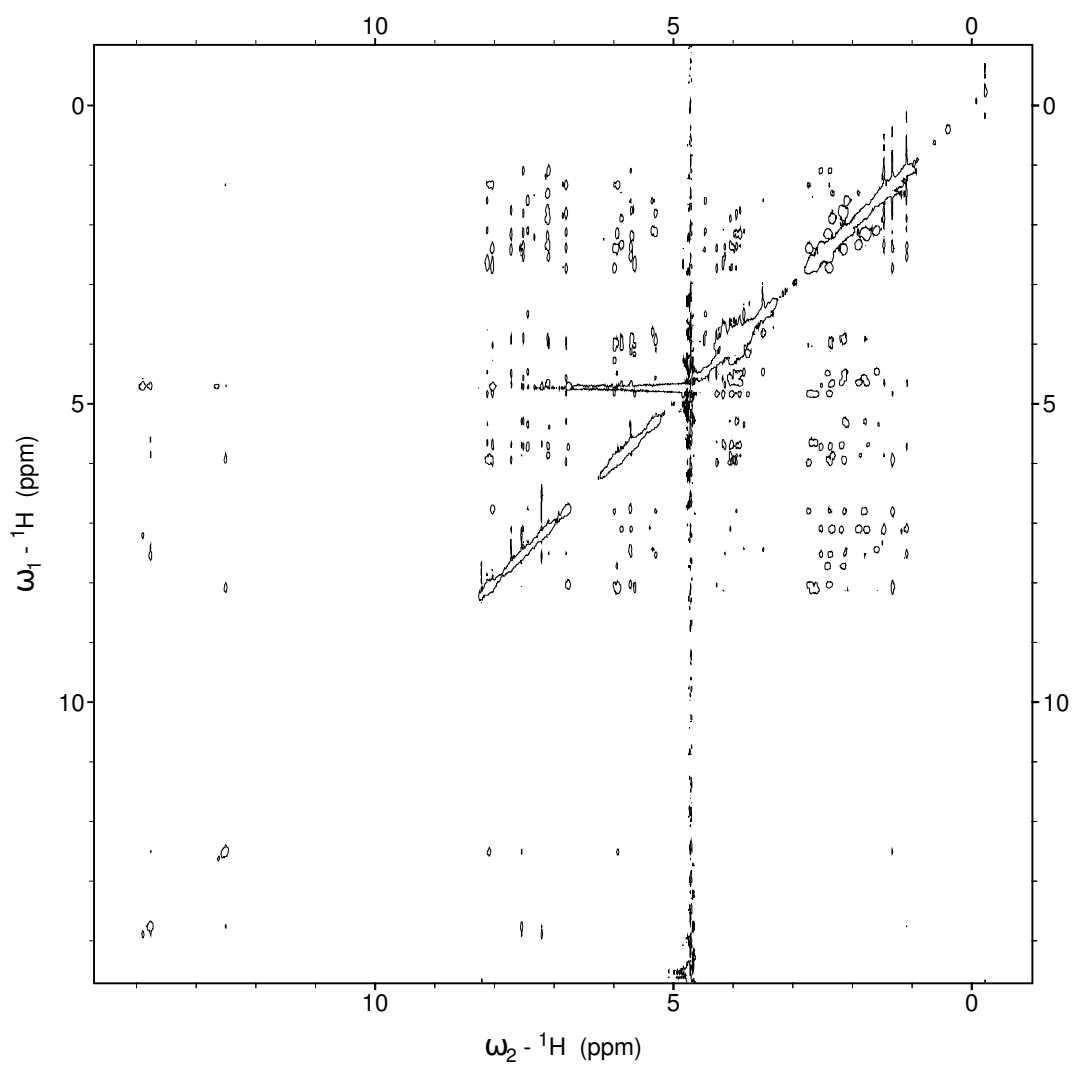
Tabulka 3.3: Nastavení parametrů pro měření ^1H NOESY spekter.



Obrázek 3.3: Pulsní sekvence použitá při měření NOESY spekter.



Obrázek 3.4: Naměřené ^1H - ^1H NOESY spektrum vzorku CG při teplotě $T=283,5\text{ K}$ a se směšovacím časem $D8=250\text{ ms}$.



Obrázek 3.5: Naměřené ${}^1\text{H}$ - ${}^1\text{H}$ NOESY spektrum vzorku m^5CG při teplotě $T=283,5\text{ K}$ a se směšovacím časem $D8=250\text{ ms}$.

4. Zpracování spekter

V naměřených spektrech bylo potřeba přiřadit jednotlivé píky k odpovídajícím vodíkům v molekule. Avšak ne všechny vodíkové signály jsou ve spektru přítomny. Vzhledem k tomu, že použitým rozpouštědlem byla voda, jejíž signál musel být ve spektru potlačen, došlo také k částečnému nebo úplnému potlačení signálů v okolí rezonanční frekvence vodíku vody. Toto se týká hlavně signálů od vodíků H3' deoxyribózy, které nejsou ve spektru vůbec. Při vyšších teplotách také dochází k chemické výměně mezi některými báзовými vodíky a vodou. Například thyminové H3 nebo guaninové H1, které tvoří iminoskupiny, jsou ve spektru přítomny při nízkých teplotách, ale při zvyšování teploty se rozšiřují a od teploty zhruba 320 K nejsou ve spektru vidět. Podobná situace je u amino vodíků H41/H42 cytosinu a H61/H62 adeninu.

Na obrázku 4.7 jsou dvě změřená spektra. Můžeme v nich vidět shluky více píků. Tyto shluky odpovídají signálům, které patří stejným vodíkovým pozicím v různých nukleotidech DNA. V oblasti zhruba od 6,8 ppm do 9 ppm se nacházejí píky příslušející báзовým vodíkům H6 resp. H8 a adeninovým H2. U těchto signálů nedochází k mnohačetným překryvům jako v jiných oblastech a s rostoucí teplotou se výrazně nesnižuje jejich intenzita. Vzhledem k těmto vlastnostem jsou signály vodíků H6/H8 vhodné ke studiu tání duplexu DNA. V ostatních částech spektra s výjimkou oblasti 12-15 ppm, kde se nachází signály vodíků iminoskupin, dochází ke koncentraci signálů v malé oblasti, což vede k jejich mnohonásobnému překryvu. Tato skutečnost je navíc umocněna tím, že se vesměs jedná o vodíky deoxyribózy, které jsou štěpeny J-vazbou na multiplety, což dále zvyšuje nepřehlednost spektra. Signály vodíků deoxyribózy jsou však důležité pro přiřazení jednotlivých píků v oblasti aromatických signálů H6/H8.

Za tímto účelem jsem změřil ke každému vzorku $^1\text{H} - ^1\text{H}$ NOESY spektrum (obr. 3.4 a 3.5). Známe-li přibližné uspořádání jednotlivých atomů v molekule, můžeme v NOESY spektru najít odpovídající krosníky a podle něj přiřadit atomy signálům v 1D spektrech. Pro další zpracování bylo potřeba přiřadit hlavně signály aromatických vodíků. Budeme předpokládat, že molekula DNA se ve vzorku vyskytuje v B formě, která je za běžných podmínek nejčastější. Za tohoto předpokladu známe přibližně meziatomové vzdálenosti vodíků v molekule [15]. Na základě toho můžeme vybrat dvojice jader, jež mají mít společný krosník, a tento krosník v NOESY spektru najít. Přiřazení krosníků jsem prováděl v programu Sparky [16].

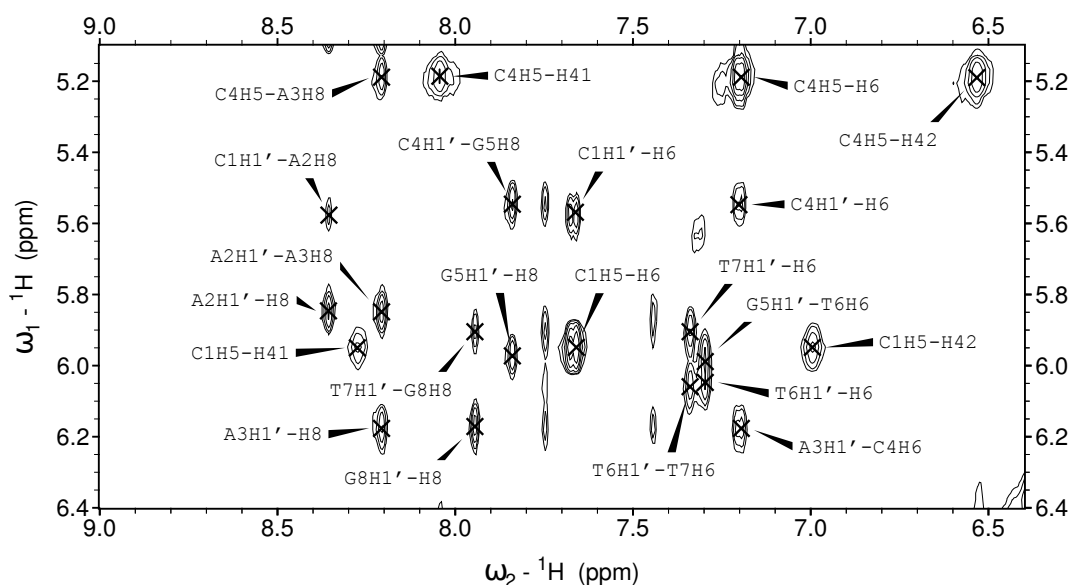
4.1 Přiřazení signálů v aromatické oblasti

Na obrázcích 4.1 a 4.2 jsou výřezy z NOESY spekter. V nich jsou výrazné krosníky mezi aromatickými vodíky H6/H8 a vodíky H1' deoxyribózy. Vzhledem k prostorovému uspořádání oligonukleotidů má každý aromatický vodík H6/H8 dva výrazné krosníky. První krosník je s vodíkem H1' deoxyribózy v rámci nukleotidu. Druhý krosník je s vodíkem H1' deoxyribózy z nukleotidu sousedícího ve směru k 5'-konci. Díky těmto sekvenčním krosníkům lze identifikovat a přiřadit postupně všechny signály vodíků H6/H8 z celého oligonukleotidu. K potvrzení správnosti přiřazení můžeme stejným způsobem použít krosníky H6/H8 s H2'/H2'', které

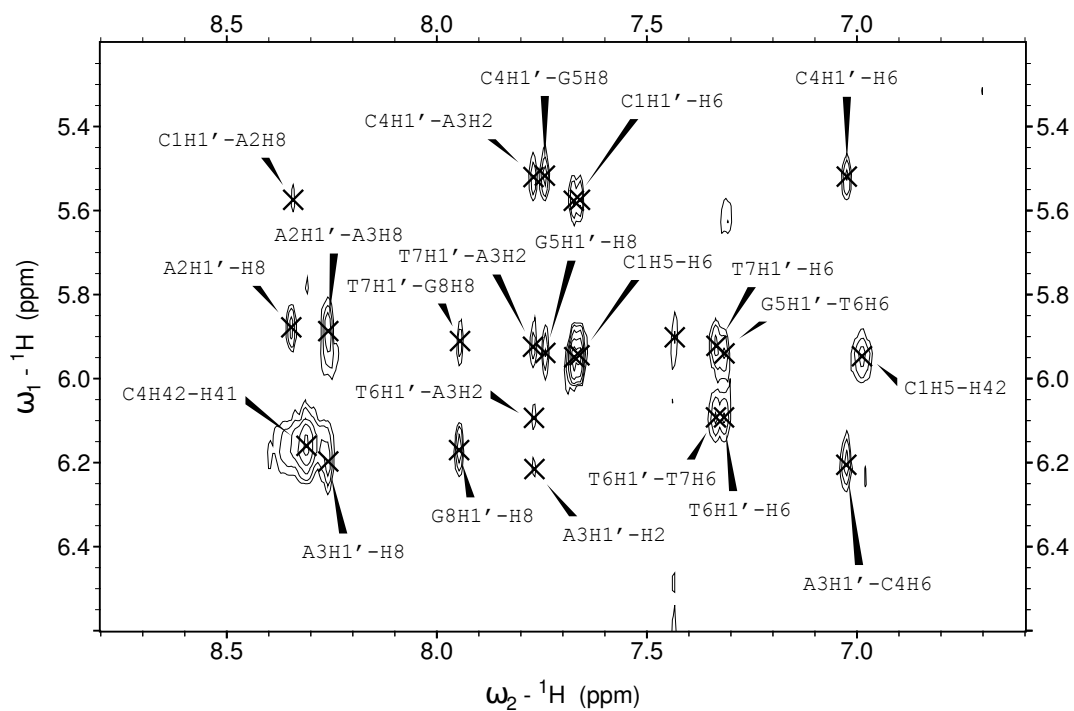
jsou taktéž velice silné. Jako nejlepší způsob přiřazení se můžou jevit slabší, ale stále viditelné krosníky mezi vodíky H6/H8 v po sobě následujících bázích. Ty však někdy bývají příliš blízko diagonále a vzhledem k nízké intenzitě splývají s diagonálními krosníky.

Adeninové vodíky H2 jsem přiřadil pomocí krosníků s vodíky H3 thyminu, se kterým adenin tvoří básový pár. Také je vidět silný sekvenční krosník A2H2 s A3H2.

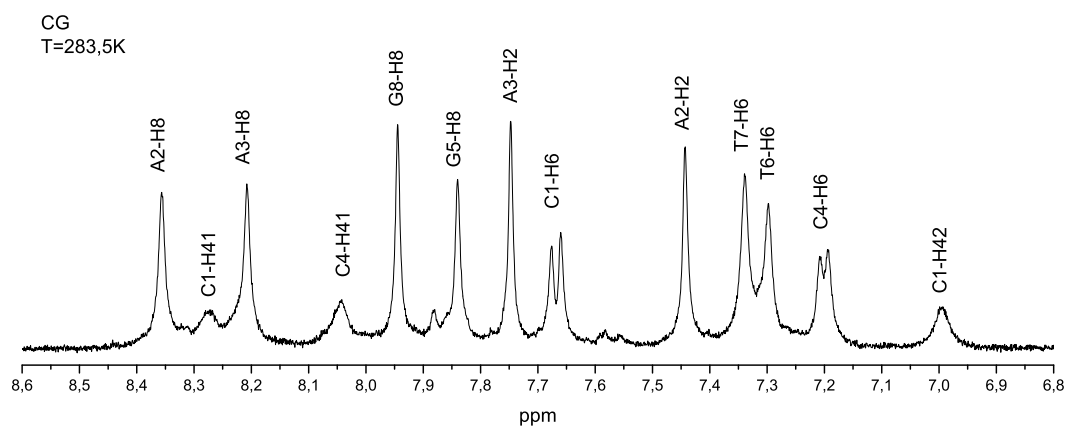
Přiřazená aromatická část 1D spektra při teplotě 283,5 K jsou na obrázku 4.3 pro vzorek CG a na obr. 4.4 pro vzorek m⁵CG. Na obrázcích 4.8 a 4.9 je aromatická oblast spekter při různých teplotách. Vidíme, že aromatické signály se dají vytrasovat až do oblasti vysokých teplot, kde se vyskytují nespárovaná vlákna DNA. V této oblasti teplot nemůžeme signály přiřadit z NOESY spekter změřených při vysokých teplotách. Je to dáno tím, že prostorové uspořádání nespárované oligonukleotidu není pevně dané a meziatomové vzdálenosti jsou příliš velké na to, aby se dalo změřit NOESY spektrum. Pořadí aromatických signálů při těchto teplotách je na obrázcích 4.5 a 4.6. Hodnoty chemických posuvů jsou pak shrnuty v tabulce 4.1.



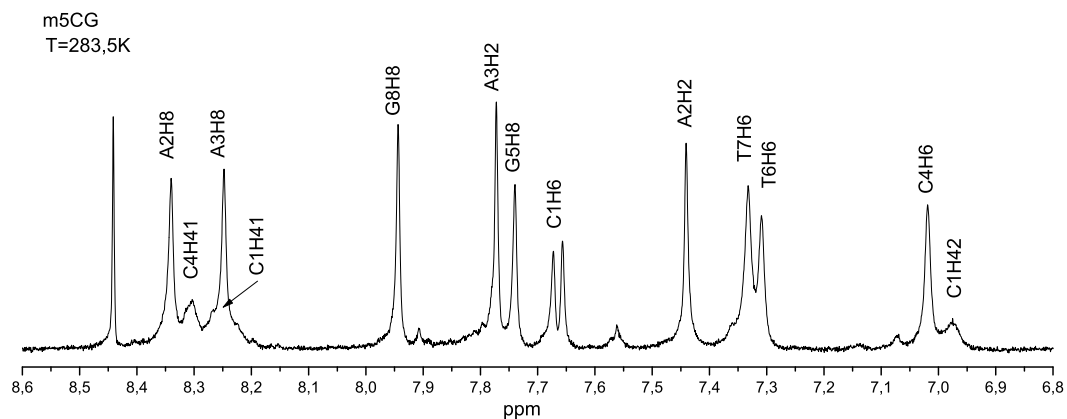
Obrázek 4.1: Výřez z NOESY spektra vzorku CG. Přiřazení aromatických vodíků H6/H8 podle krosníků s vodíky H1' deoxyribózy.



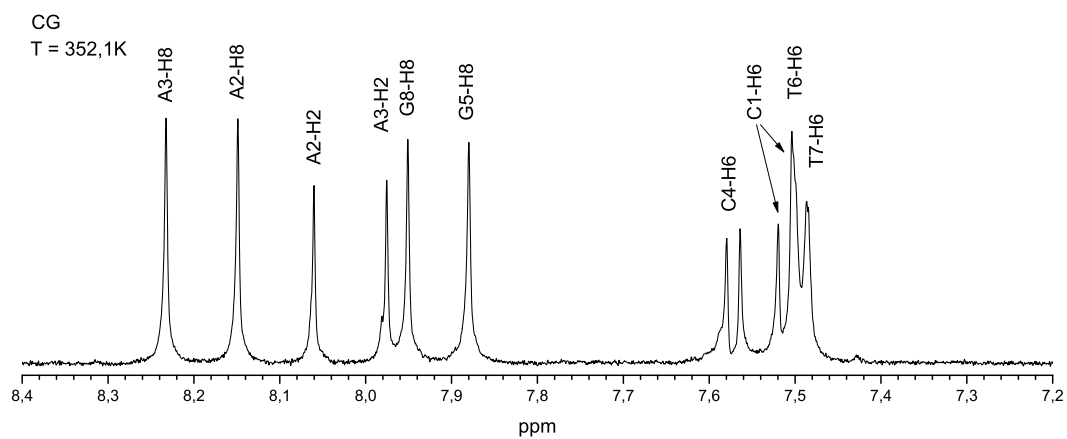
Obrázek 4.2: Výřez z NOESY spektra vzorku m⁵CG. Přiřazení aromatických vodíků H6/H8 podle krospeků s vodíky H1' deoxyribózy.



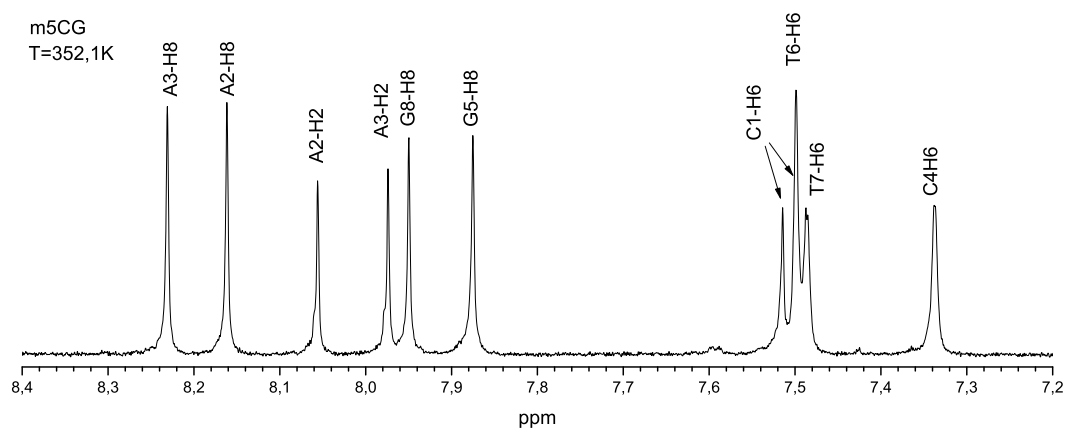
Obrázek 4.3: Přiřazení píků v aromatické oblasti spektra vzorku CG při $T=283,5\text{ K}$.



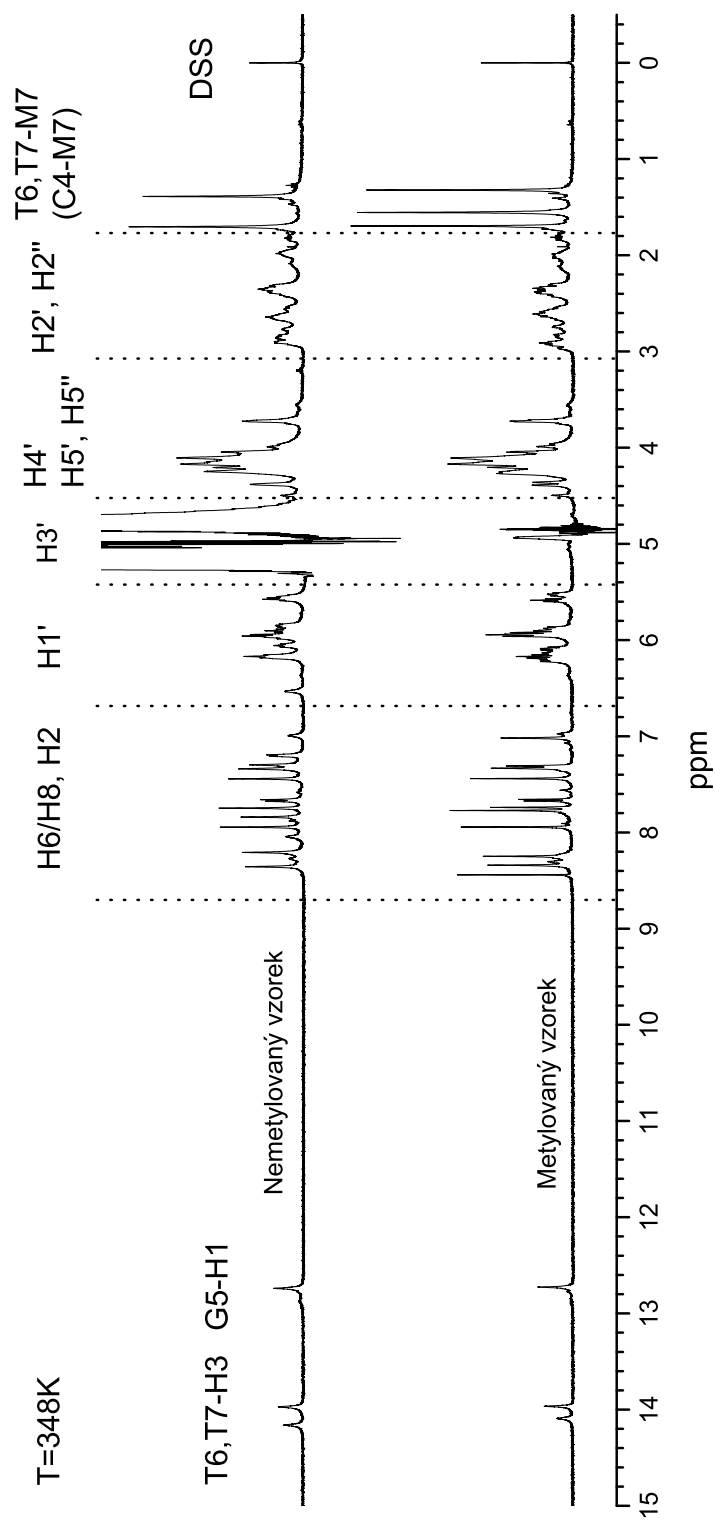
Obrázek 4.4: Přiřazení píků v aromatické oblasti spektra vzorku m⁵CG při $T=283,5$ K.



Obrázek 4.5: Přiřazení píků v aromatické oblasti spektra vzorku CG při $T=352,1$ K.



Obrázek 4.6: Přiřazení píků v aromatické oblasti spektra vzorku m⁵CG při $T=352,1$ K.



Obrázek 4.7: Oblasti výskytu signálů jednotlivých vodíků oligonukleotidu.

	$T=284,5\text{ K}$		$T=352,1\text{ K}$	
	CG	m^5CG	CG	m^5CG
C1H6	7,668	7,668	7,512	7,507
A2H8	8,356	8,347	8,149	8,161
A3H8	8,208	8,260	8,233	8,231
C4H6	7,200	7,025	7,572	7,337
G5H8	7,840	7,743	7,880	7,875
T6H6	7,298	7,316	7,500	7,499
T7H6	7,339	7,337	7,486	7,486
G8H8	7,945	7,947	7,951	7,950
A2H2	7,443	7,433	8,060	8,056
A3H2	7,747	7,770	7,975	7,980

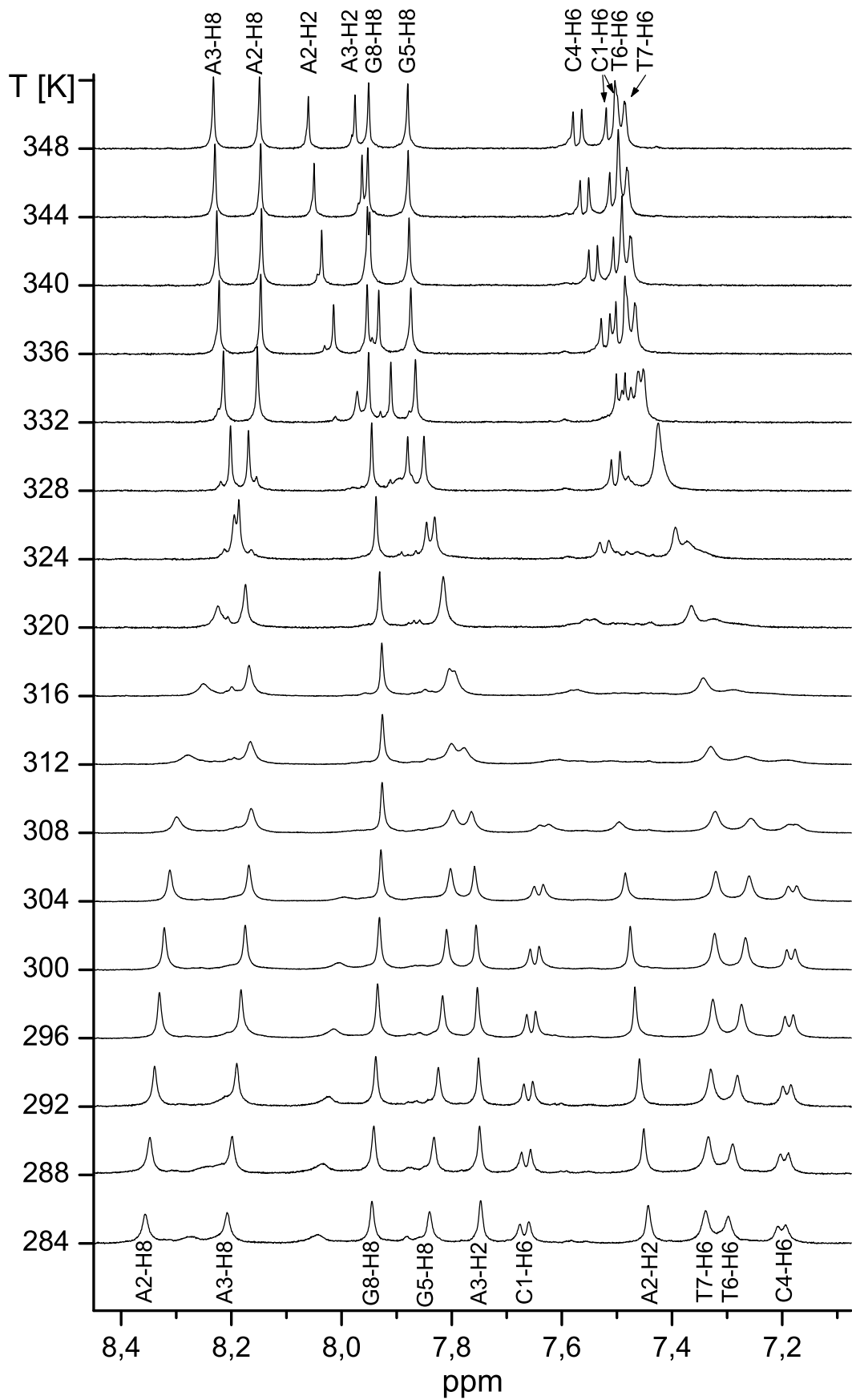
Tabulka 4.1: Hodnoty chemických posuvů obou vzorků v jednotkách ppm.

4.2 Fitování spekter bez chemické výměny

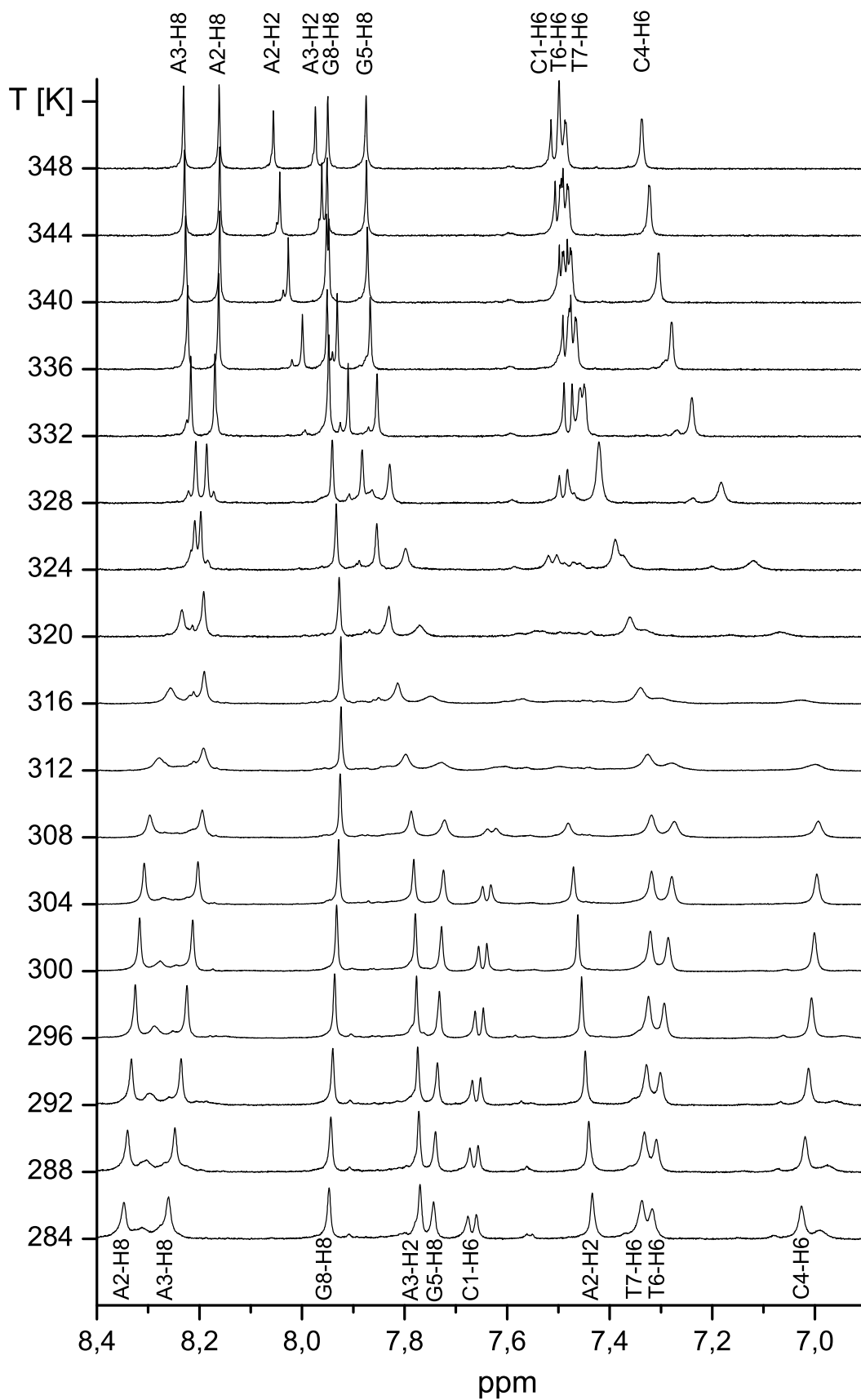
K fitování jsem používal program Matlab 2009b s toolboxem Asymexfit [14]. Asymexfit umožňuje fitovat NMR spektra s chemickou výměnou a z naitovaných parametrů dále určí parametry chemické výměny. Fitoval jsem pouze oblast zhruba od 7,2 ppm do 8,4 ppm, kde se nacházejí signály aromatických vodíků H6/H8 a H2. Pro správné naitování spekter s chemickou výměnou je však nejprve potřeba určit teplotní závislosti posuvů aromatických signálů duplexů ω_A a single strandů ω_B . Předpokládám, že chemický posuv se mění lineárně s teplotou.

Na obrázku 4.10 a 4.11 jsou vyneseny teplotní závislosti chemických posuvů jednotlivých jader, které byly získány fitováním spekter bez chemické výměny. Chybějící chemické posuvy ve střední části grafu jsou ovlivněny chemickou výměnou a jejich vyhodnocením se budu zabývat v dalším odstavci. Naměřené body jsou v oblasti vysokých a nízkých teplot proloženy přímkou a extrapolovány do oblasti tání duplexu. Za zmínku stojí nelineární závislost jádra C1-H6 při teplotách přibližně do 290 K. Počáteční body jsem proto nezahrnul do lineárního fitu a jsou v grafu označeny prázdným čtverečkem. Na obrázku 4.12 jsou srovnány posuvy aromatických vodíků obou vzorků. Podle očekávání je největší rozdíl v chemických posuvech u centrálního cytosinu. Směrem ke koncovým nukleotidům se rozdíl zmenšuje. U vodíků koncových nukleotidů je změna chemického posuvu po metylaci minimální.

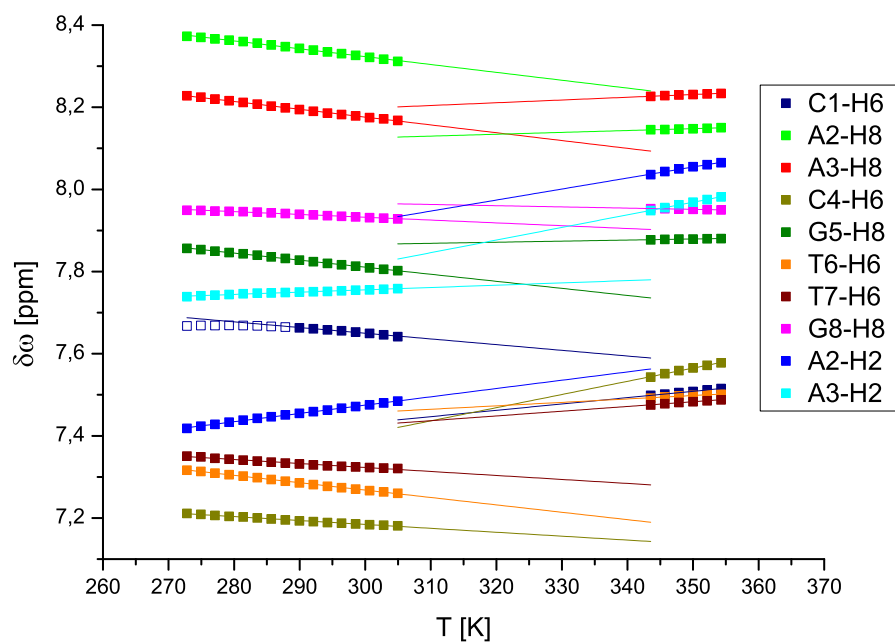
Další parametr potřebný pro fitování spekter s chemickou výměnou je příčná relaxační doba T_2^* . Ta se od T_2 liší v tom, že je do ní zahrnuto i rozšíření spektrální čáry způsobené nehomogenitou magnetického pole \mathbf{B}_0 . Na obrázcích 4.13 až 4.16 jsou teplotní závislosti příčných relaxačních dob T_2^* pro jednotlivá jádra. Můžeme si všimnout, že v oblasti nízkých teplot dochází s rostoucí teplotou k postupnému nárůstu relaxačních dob z důvodu klesající viskozity roztoku, kdežto při teplotách vysokých se relaxační časy T_2^* příliš nemění. Pokles příčných relaxačních časů duplexů při teplotách těsně pod oblastí tání je způsoben začínající chemickou výměnou mezi duplexy a single strandy. V oblasti vysokých teplot nebylo možno změřit několik bodů u A3-H2 vzorku m^5CG a T6-H6 u obou vzorků. Bylo to v důsledku překryvu se signálem nečistoty.



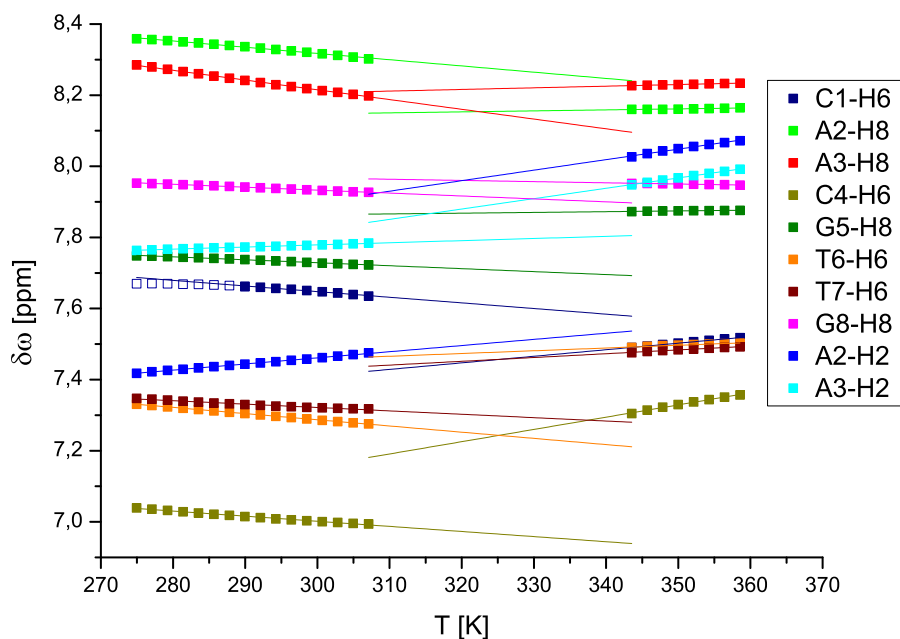
Obrázek 4.8: Trasování píků do oblasti vysokých teplot, vzorek CG. Vykreslena jsou spektra pouze při každé druhé naměřené teplotě. Uvedené teploty jsou teploty nastavené při měření tj. nepřepočtené podle kalibrační křivky.



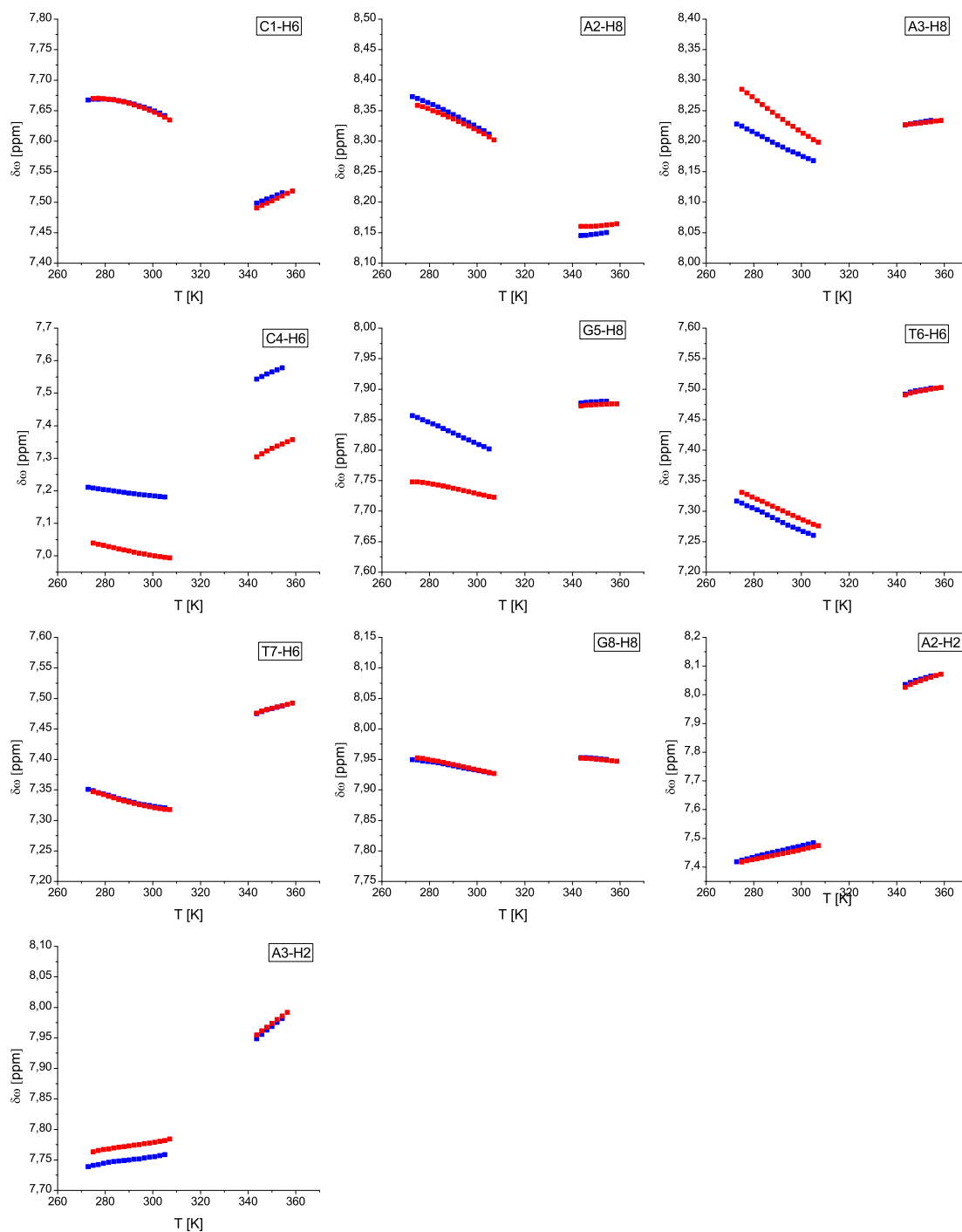
Obrázek 4.9: Trasování píků do oblasti vysokých teplot, vzorek m⁵CG. Vykreslena jsou spektra pouze při každé druhé naměřené teplotě. Uvedené teploty jsou teploty nastavené při měření tj. nepřepočtené podle kalibrační křivky.



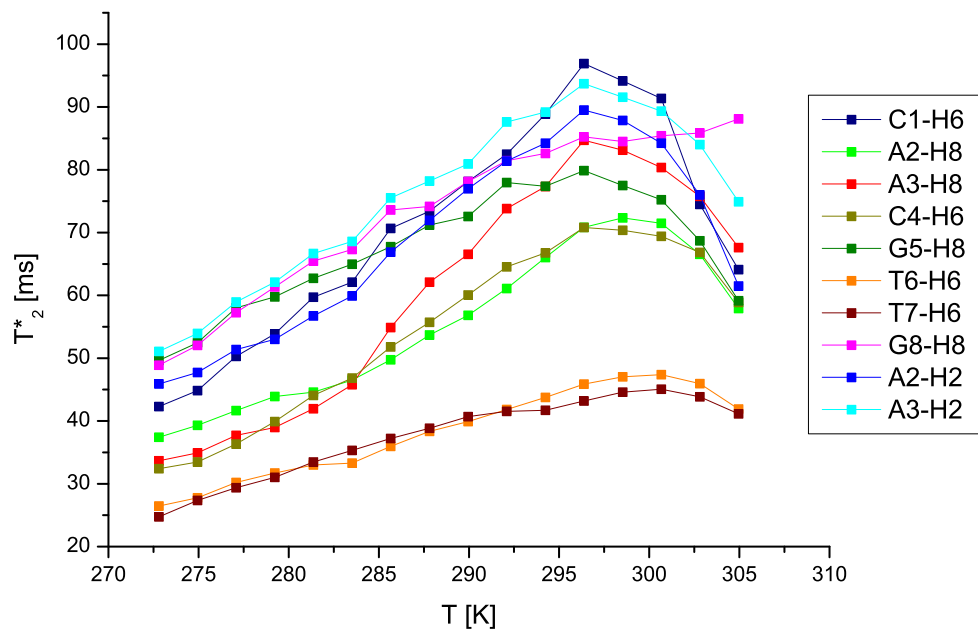
Obrázek 4.10: Teplotní závislost chemických posuvů aromatických jader vzorku CG. Body jsou proloženy přímkou, přičemž prázdným čtverečkem jsou označeny body nepoužité při prokládání.



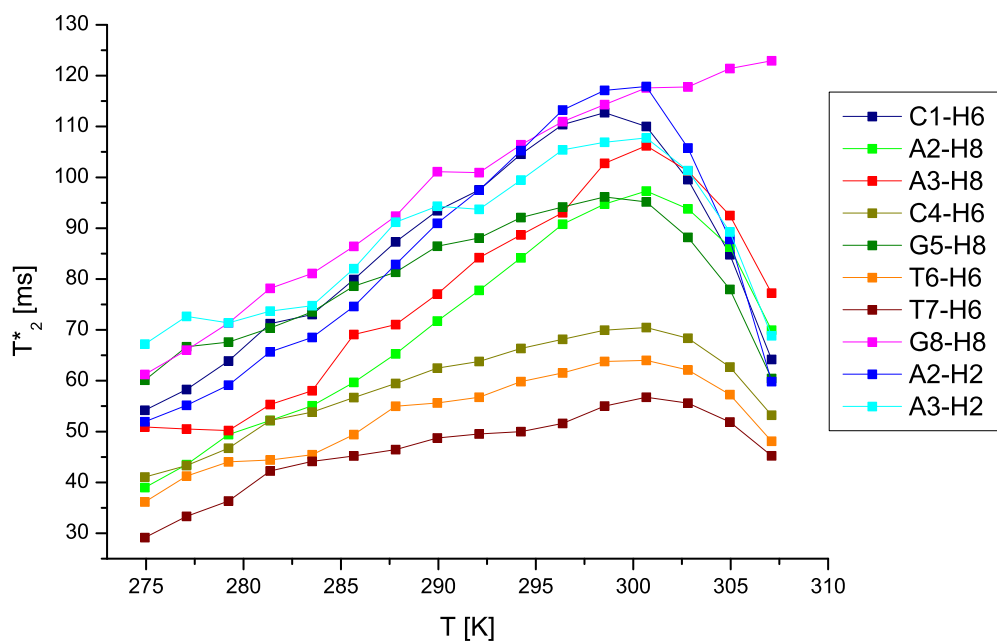
Obrázek 4.11: Teplotní závislost chemických posuvů aromatických jader vzorku m⁵CG. Body jsou proloženy přímkou, přičemž prázdným čtverečkem jsou označeny body nepoužité při prokládání.



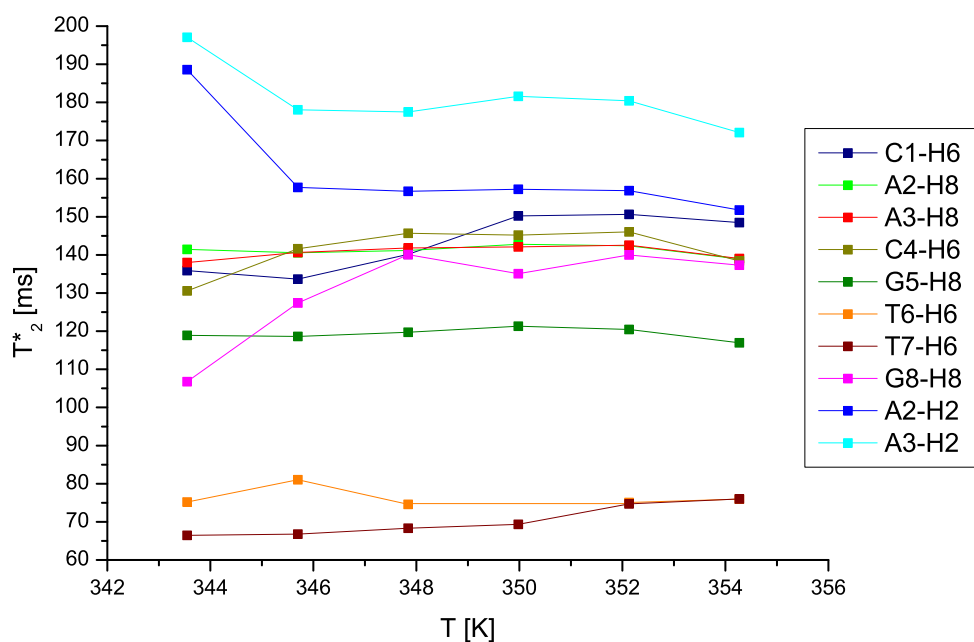
Obrázek 4.12: Srovnání teplotní závislosti chemických posuvů aromatických vodíků vzorku CG (modrá barva) a m^5CG (červená barva).



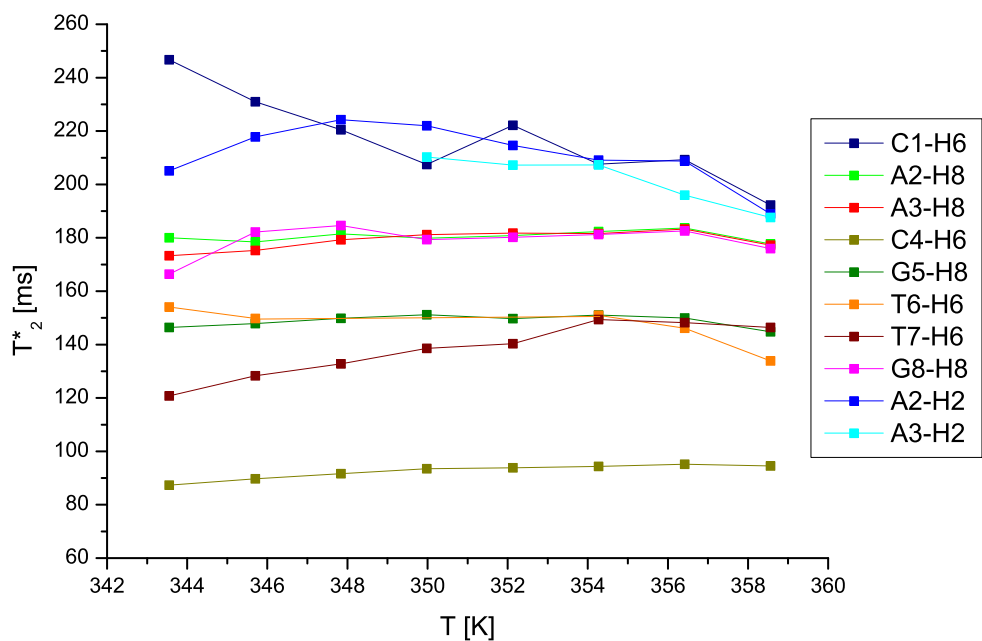
Obrázek 4.13: Teplotní závislost příčných relaxačních dob T_2^* aromatických vodíkových jader vzorku CG v duplexu. Body jsou spojeny pouze vodícími čarami.



Obrázek 4.14: Teplotní závislost příčných relaxačních dob T_2^* aromatických vodíkových jader vzorku m^5CG v duplexu. Body jsou spojeny pouze vodícími čarami.



Obrázek 4.15: Teplotní závislost příčných relaxačních dob T_2^* aromatických vodíkových jader vzorku CG v nespárovaných vláknech. Body jsou spojeny pouze vodíčovými čarami.



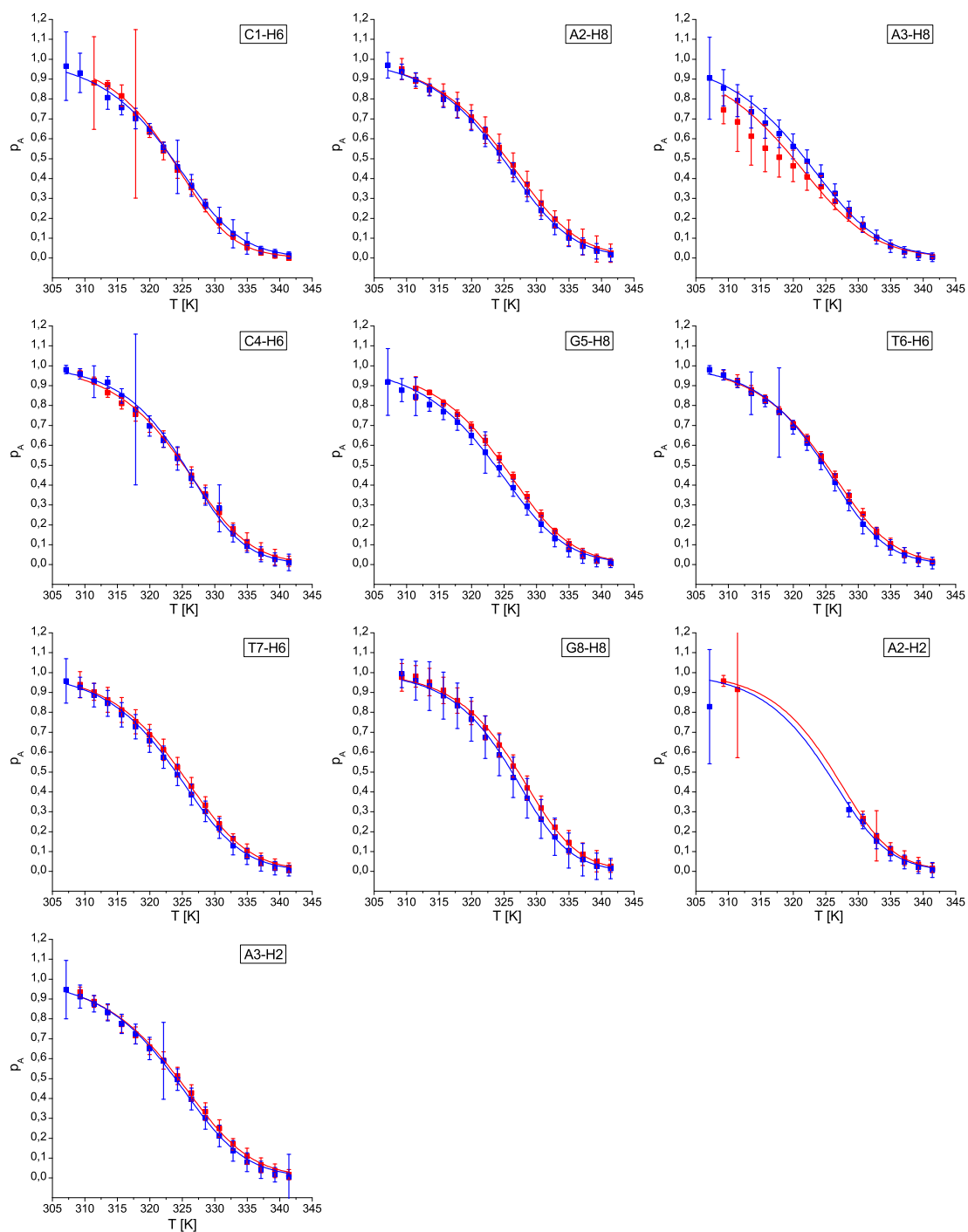
Obrázek 4.16: Teplotní závislost příčných relaxačních dob T_2^* aromatických vodíkových jader vzorku m^5CG v nespárovaných vláknech. Body jsou spojeny pouze vodíčovými čarami.

4.3 Fitování spekter s chemickou výměnou

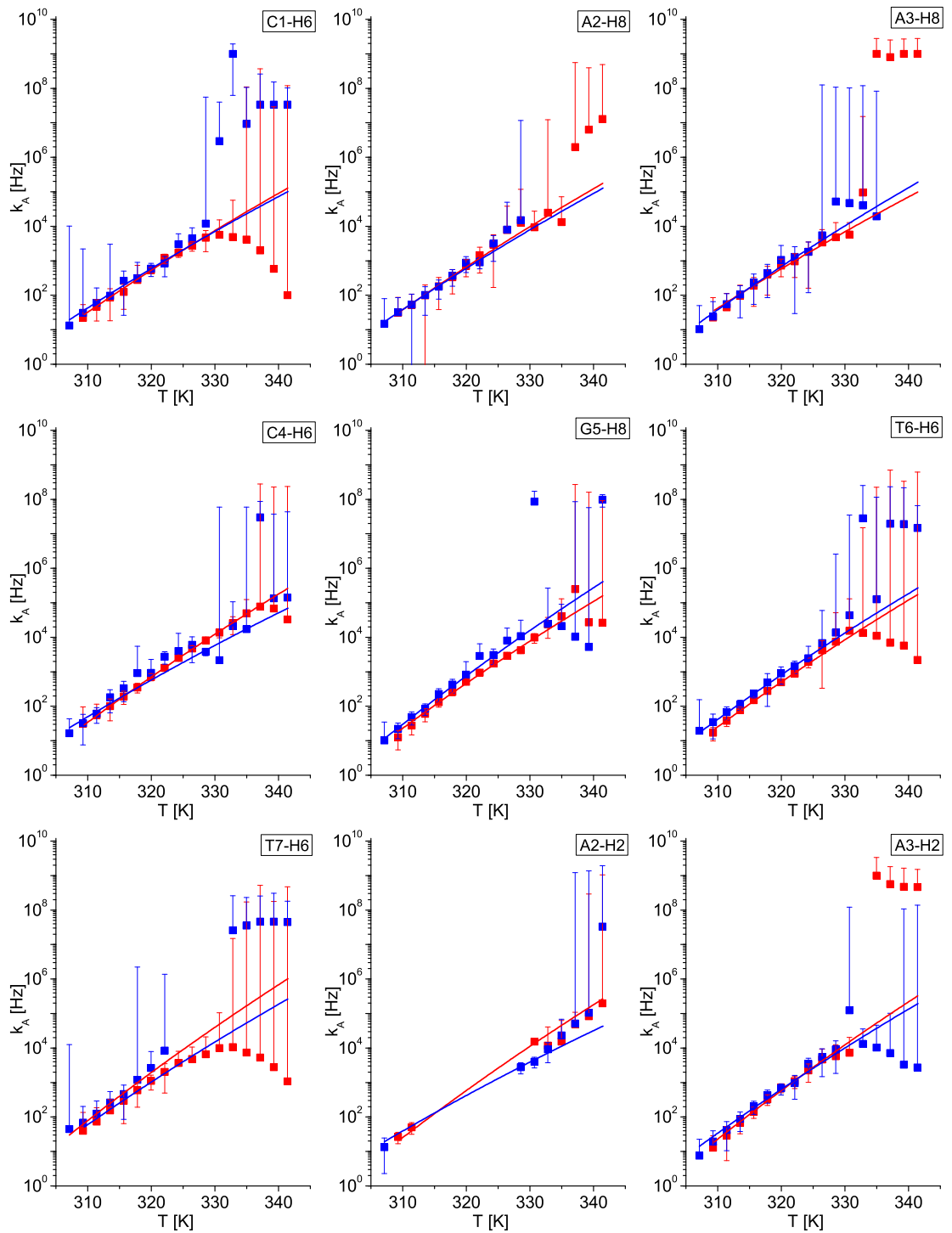
Nyní můžeme přejít k fitování spekter ze střední oblasti teplot, kde dochází k tání duplexů. Při těchto teplotách probíhá chemická výměna mezi duplexy a single strandy. Tvar NMR spektra při asymetrické chemické výměně popisuje funkce (2.26). Fitováním spekter duplexů a single strandů se podařilo získat parametry ω_A a ω_B . Za parametr R_A dosadíme převrácenou hodnotu maximální relaxační doby T_2^* u duplexů a za R_B převrácenou hodnotu průměru relaxačních dob T_2^* single strandů [14]. Volnými parametry potom pro každý signál jsou: počáteční magnetizace M_0 , relativní množství duplexů p_A , rychlostní konstanta disociace k_A a velikost J-konstanty u rozštěpených signálů.

V grafech 4.17 jsou vyneseny závislosti podílů duplexů p_A na teplotě pro každé jádro. Naměřené body jsou proloženy funkcí (1.5). V grafu je vidět podivný průběh u jádra A3-H8, u kterého došlo k překryvu se signálem C1-H41. Na základě toho bylo jádro A3-H8 vyřazeno z dalšího zpracování. Na obrázku 4.18 je teplotní závislost rychlosti chemické výměny k_A pro oba vzorky. Body jsou proloženy funkcí (1.10). V grafech chybí průběh k_A u vodíku G8-H8. U tohoto jádra je rozdíl chemických posuvů v duplexu a single strandu velmi malý, proto je jeho signál i v průběhu chemické výměny úzký a intenzivní. To způsobuje při určování parametru k_A chybu tak velkou, že nafilované hodnoty nejsou použitelné pro další zpracování.

Vyhodnocení chyb p_A a k_A bylo provedeno také pomocí Matlabu a Asymexfitu. Uvažujeme tři zdroje chyb. Z hlediska rychlosti výměny k_A je největší chyba způsobena nepřesným určením T_2^* duplexů a single strandů. Proto Asymexfit provede fitování spekter s výměnou znovu s celkem 25 kombinacemi relaxačních dob T_2^* duplexů a single strandů. A následně vyhodnotí odchylku p_A a k_A . Stejně se stanoví chyba vnesená nepřesnou extrapolací parametrů ω_A a ω_B . Posledním zdrojem chyb je šum ve spektru. Jeho příspěvek k celkové chybě se stanoví fitováním simulovaného spektra, které bylo vypočteno z nafilovaných parametrů a ke kterému byl přičten gaussovský šum o stejné amplitudě, jako má šum v experimentálním spektru. Celková chyba parametrů p_A a k_A je pak dána odmocninou ze součtu kvadrátů těchto tří příspěvků.



Obrázek 4.17: Teplotní závislost podílu duplexů ve vzorku CG (modrá barva) a m^5CG (červená barva). Body jsou proloženy funkcí (1.5).



Obrázek 4.18: Teplotní závislost rychlosti chemické výměny ve vzorku CG (modrá barva) a m^5CG (červená barva). Body jsou proloženy funkcí (1.10). Spodní chybové úsečky nejsou zakresleny u bodů, jejichž relativní chyba přesahuje 100%.

4.4 Vyhodnocení termodynamických parametrů

Z teplotních závislostí parametrů chemické výměny p_A a k_A získáme termodynamické parametry, které popisují tání duplexu. Teplotní závislost podílu duplexů p_A je fitována funkcí (1.5), tím dostáváme změnu entalpie ΔH a entropie ΔS spojenou s tvorbou duplexu. Gibbsovu volnou energii při $T=310\text{ K}$ pak určíme ze vztahu (1.1). Pomocí rovnice (1.8) byla vypočtena teplota tání duplexu.

K fitování teplotní závislosti rychlosti výměny k_A se použil Eyringův vztah (1.10). Touto funkcí jsem proložil naměřené body k_A a dostal aktivační energii ΔG_A . Jak bylo zmíněno výše, pro jádro G8-H8 nejsou k dispozici hodnoty k_A , proto nelze vypočítat jeho aktivační energii. Z fitování a grafu 4.18 jsou vyřazeny body, u kterých byla vypočtena malá chyba a zároveň leží daleko od nafitované křivky. Také nejsou zobrazeny spodní části chybových úseček, pokud jsou větší než hodnota odpovídající příslušnému bodu.

Hodnoty termodynamických parametrů jsou shrnuty v tabulkách 4.2 a 4.3. V grafech 4.19 až 4.21 je srovnání teplot tání T_m , Gibbsovy volné energie ΔG_{310K} a Gibbsovy aktivační energie disociace ΔG_A obou vzorků. V tabulce 4.4 jsou tyto termodynamické parametry pro celý oligonukleotid. Byly vypočteny jako vážený průměr hodnot v tabulkách 4.2 a 4.3.

Vzhledem k malým rozdílům termodynamických parametrů oligonukleotidů a jejich velké chybě byl proveden párový t-test, aby se zjistilo, zda je rozdíl těchto veličin statisticky signifikantní. V tabulce 4.4 jsou příslušné p-hodnoty a na jejich základě můžeme potvrdit zvýšení teploty tání v m⁵CG. Rozdíly v Gibbsových energiích a Gibbsových aktivačních energiích jsou ale statisticky neprůkazné.

	ΔH [kJ·mol ⁻¹]	ΔS [J·mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG_{310K} [kJ·mol ⁻¹]	T_m [K]	ΔG_A [kJ·mol ⁻¹]
C1-H6	-236	-642	-37±1	323,3±0,4	68±5
A2-H8	-235	-637	-38±1	324,6±0,6	67±2
C4-H6	-271	-745	-40±1	325,2±0,5	66±1
G5-H8	-228	-617	-37±1	323,4±0,5	67±1
T6-H6	-263	-723	-39±1	324,6±0,5	67±1
T7-H6	-243	-662	-38±1	323,8±0,7	67±5
G8-H8	-286	-789	-41±2	326,1±1,2	–
A2-H2	-265	-726	-39±3	324,6±1,4	67±1
A3-H2	-232	-628	-37±1	323,7±0,7	67±1

Tabulka 4.2: Termodynamické parametry získané fitováním teplotních závislostí k_A a p_A vzorku CG.

4.5 Diskuse výsledků

Přestože chyba rozdílů teplot tání T_m obou oligonukleotidů je větší než samotný rozdíl, můžeme na základě párového t-testu potvrdit, že u vzorku s metylovaným centrálním cytosinem došlo ke zvýšení teploty tání T_m duplexu DNA. Zvýšení teploty tání se projevilo u všech nukleotidů, což naznačuje vysokou kooperativitu bázevých párů. Na druhou stranu pokles Gibbsovy energie ΔG_{310K} při tvorbě

	ΔH [kJ·mol ⁻¹]	ΔS [J·mol ⁻¹ K ⁻¹]	ΔG_{310K} [kJ·mol ⁻¹]	T_m [K]	ΔG_A [kJ·mol ⁻¹]
C1-H6	-267	-739	-38±1	323,4±0,4	67±1
A2-H8	-230	-617	-38±2	325,4±0,8	67±2
C4-H6	-245	-666	-39±1	325,2±0,5	67±1
G5-H8	-237	-643	-38±1	324,9±0,3	68±1
T6-H6	-248	-676	-39±1	325,1±0,3	68±1
T7-H6	-240	-650	-38±1	324,7±0,6	65±3
G8-H8	-279	-765	-42±2	327,2±0,7	–
A2-H2	-276	-757	-41±5	326,2±1,5	68±1
A3-H2	-224	-604	-37±1	324,4±0,5	68±1

Tabulka 4.3: Termodynamické parametry získané fitováním teplotních závislostí k_A a p_A vzorku m⁵CG.

Vzorek	ΔG_{310K} [kJ·mol ⁻¹]	T_m [K]	ΔG_A [kJ·mol ⁻¹]
CG	-38,1±1,3	324,2±0,8	66,9±0,6
m ⁵ CG	-38,4±0,8	324,9±0,8	67,6±0,6
P-hodnota	0,62	0,014	0,14

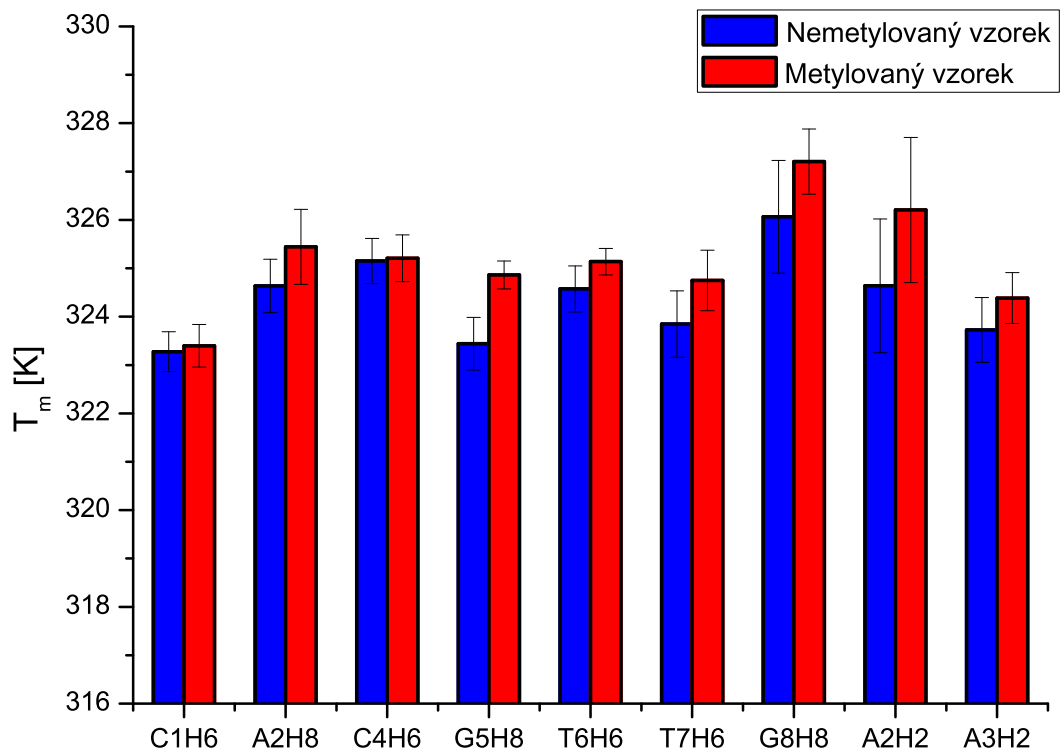
Tabulka 4.4: Termodynamické parametry obou oligonukleotidů s p-hodnotami párových t-testů.

duplexu je v rámci chyby měření stejný v obou vzorcích. Stejně tak nemůžeme potvrdit změnu v aktivační energii ΔG_A .

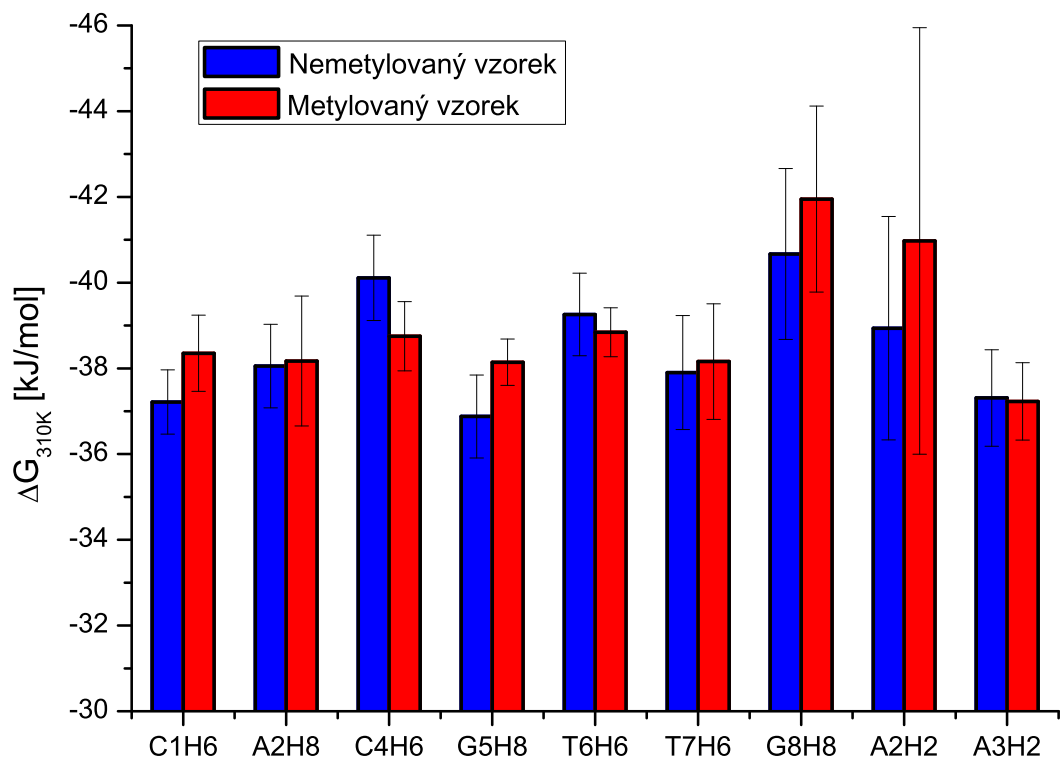
V článku [3] jsou výsledky NMR měření, kde u oligonukleotidu CTTC GAAG byl změřen nárůst teploty tání duplexu z 49,5°C na 50,5°C po metylaci. U sekvence CATC GATG byla teplota tání nemetylovaného oligonukleotidu 53,5°C u metylovaného 56,7°C. Koncentrace vzorků byla v obou případech 3,5 mM. To je více než dvakrát větší koncentrace, než jakou jsem měřil. Je však vidět, že vliv metylace silně závisí na sekvenci oligonukleotidu.

V práci [17] byl měřen oligonukleotid o délce 10 nukleotidů s metylací centrálního CpG páru v roztoku s 200 mM NaCl a bylo pozorováno zvýšení teploty tání duplexu o 1,5 K. Byla zde však použita data z UV absorpce a měřena rozdílná sekvence, a proto nelze výsledky kvantitativně porovnávat.

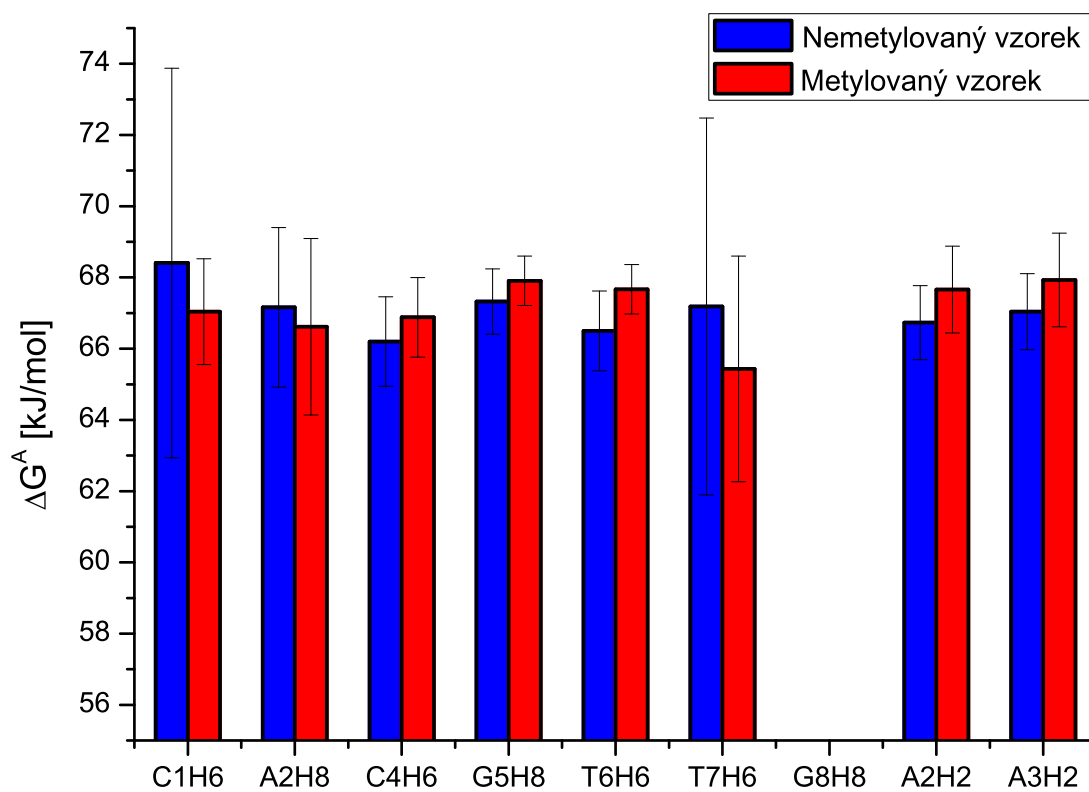
Hlavním zjištěním této práce je, že stabilizace duplexu po metylaci cytosinu v centrálním dinukleotidu CpG se projeví u všech bázevých párů v oligonukleotidu, a pouze u toho modifikovaného.



Obrázek 4.19: Srovnání teploty tání duplexu u obou vzorků.



Obrázek 4.20: Srovnání Gibbsovy volné energie při $T=310$ K u obou vzorků.



Obrázek 4.21: Srovnání aktivační energie disociace u obou vzorků.

Závěr

V práci byl studován vliv metylace centrálního cytosinu na stabilitu duplexu DNA. Shrnutí výsledků:

- Naměřili jsme teplotní závislost vodíkových spekter dvou selfkomplementárních oligodeoxynukleotidů CAAC GTTG a CAAm⁵C GTTG.
- Naměřili jsme NOESY spektra a na jejich základě bylo provedeno přiřazení jednorozměrných spekter.
- Byly porovnány chemické posuvy metylovaného a nemetylovaného vzorku. Největší rozdíl je podle očekávání v posuvech jader v okolí centrálního cytosinu. U koncových nukleotidů byl rozdíl minimální.
- Spektra byla nafiťována teoretickým tvarem při chemické výměně a tím jsme dostali teplotní závislost podílu duplexů p_A a rychlostní konstanty disociace k_D pro každý nukleotid.
- Fitováním těchto teplotních závislostí byla určena teplota tání T_m , Gibbsova volná energie ΔG_{310K} a Gibbsova aktivační energie disociace ΔG^A pro oba vzorky.
- Statistickým t-testem jsme potvrdili, že po metylaci cytosinu dojde ke zvýšení teploty tání duplexu T_m , ale nepodařilo se prokázat rozdíl v poklesu Gibbsovy volné energie ΔG_{310K} při tvorbě duplexu ani rozdíl v aktivačních energiích disociace ΔG^A .
- Nárůst stability byl pozorován u všech bázových párů, což značí jejich vysokou kooperativitu při tvorbě a rozpadu duplexu.
- Rozdíl v teplotě tání $\Delta T_m = (0,7 \pm 0,8)$ K určený v této práci jsme srovnali s jinými experimenty, které uvádějí zvýšení teploty tání T_m po metylaci od 1 K do 3,2 K u jiných selfkomplementárních oktamerů. To potvrzuje, že vliv metylace centrálního cytosinu silně závisí na použité sekvenci.

Seznam použité literatury

- [1] AVERY, O.; MacLEOD C.; McCARTY M. Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. *Journal of Experimental Medicine*. 1944, vol. 79, p. 137–158.
- [2] WATSON, J. D.; CRICK F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. *Nature*. 1953, vol. 171, p. 737–738.
- [3] LEFEBVRE, A.; MAUFFRET O.; EL ANTRI S. et al. Sequence dependent effect of CpG cytosine methylation. A joint ^1H -NMR and ^{31}P -NMR study. *Eur. J. Biochem.* 1995, vol. 229, p. 445–454.
- [4] PHILLIPS, T. The role of methylation in gene expression. *Nature Education*. 2008, vol. 1, issue 1, p. 116.
- [5] BLACKBURN, G. M. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006. Chap.2, DNA and RNA Structure, s. 13–43.
- [6] HOBZA, P.; HAVLAS, Z. Netušená síla slabých vazeb. *Vesmír*. 2010, roč. 89, č. 10, s. 594–597.
- [7] AUCLAIR, C. Structural and Functional Regulation of DNA: Geometry, Topology and Methylation. *Nanoscience*. 2009, vol. 1, p. 3–27.
- [8] RENCIUUK, D.; BLACQUE O.; VORLICKOVA M. et al. Crystal structures of B-DNA dodecamer containing the epigenetic modifications 5-hydroxymethylcytosine or 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Res.* 2013, vol. 41, p. 9891–9900.
- [9] HORE, P. J. *Nuclear Magnetic Resonance*. Oxford: Oxford University Press, 1998. ISBN 0-19-855682-9.
- [10] GÜNTHER, H. *NMR Spectroscopy: Basic principles, concepts, and applications in chemistry*. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. ISBN 978-3-527-67477-0.
- [11] BAIN, A. D. Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*. 2003, vol. 43, p. 63–103.
- [12] ŘÍMAL, V. *NMR studium lokální strukturní stability v molekule DNA*, diplomová práce, MFF UK, Praha 2009.
- [13] HWANG, T.-L.; SHAKA, A. J. Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Waveforms and Pulsed Field Gradients. *Journal of Magnetic Resonance*. 1995, vol. 112, p. 275–279.
- [14] ŘÍMAL, V.; STĚPÁNKOVÁ, H.; ŠTĚPÁNEK, J. Analysis of NMR Spectra in Case of Temperature-Dependent Chemical Exchange Between Two Unequally Populated Sites *Concepts in Magnetic Resonance Part A*. 2011, vol. 38A, issue 3, p. 117–127.

- [15] WÜTHRICH, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, Chap. NOE-Observable ^1H - ^1H Distances in Nucleic Acids, p. 203–219. Chichester: John Wiley & Sons, 1986. ISBN 978-0-471-82893-8
- [16] GODDARD, T. D.; KNELLER, D. G. *SPARKY 3*, San Francisco: University of California 2008.
- [17] THALHAMMER, A.; HANSEN, A. S.; EL-SAGHEER, A. H. et al. Hydroxylation of methylated CpG dinucleotides reverses stabilisation of DNA duplexes by cytosine 5-methylation. *Chemical Communications*. 2011, vol. 47, p. 5325–5327.

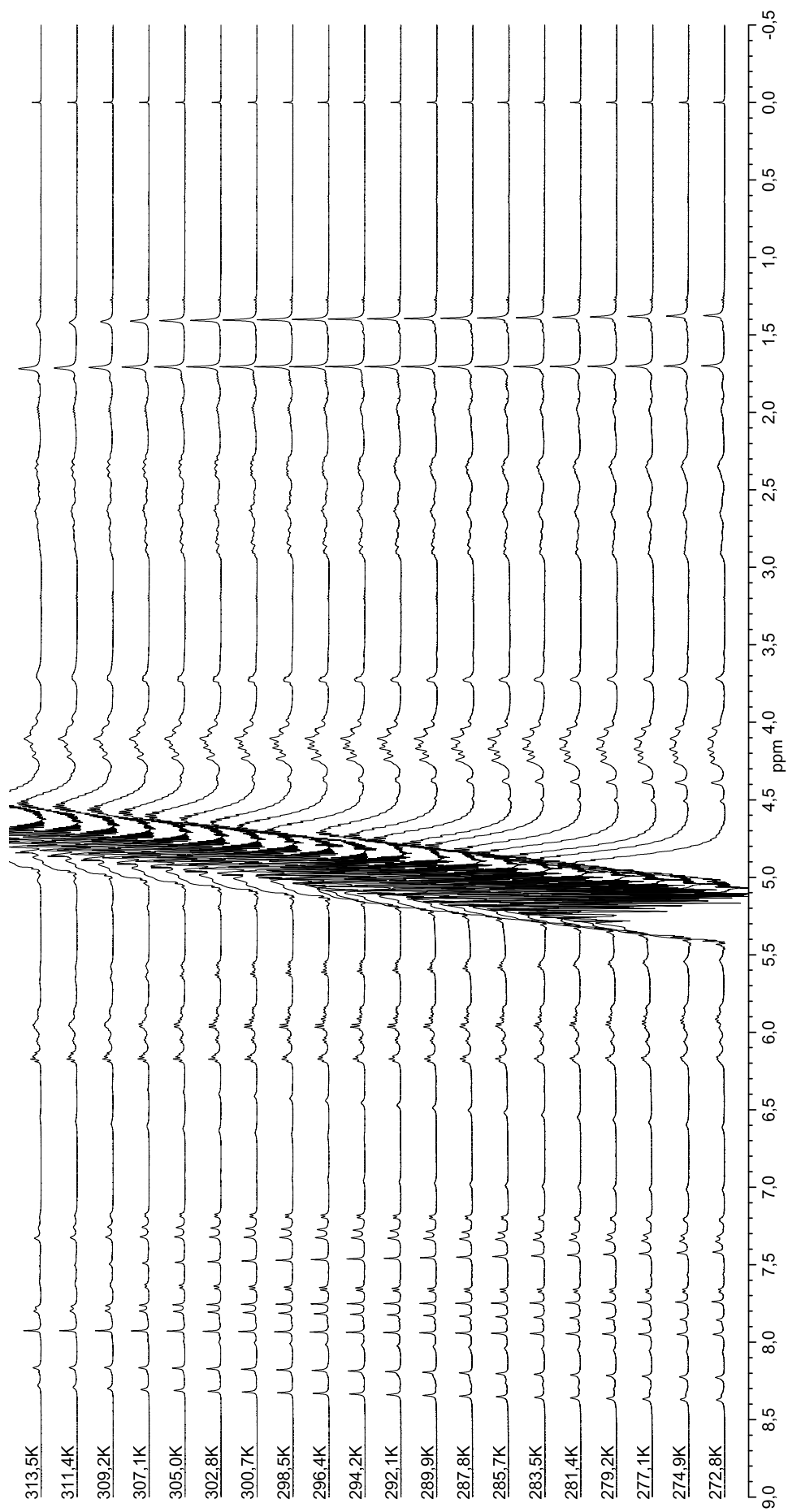
Seznam tabulek

2.1	Přehled parametrů vybraných izotopů	8
3.1	Hmotnosti látek použitých při přípravě 20 ml rozpouštědla.	15
3.2	Nastavení parametrů pro měření 1D spekter.	17
3.3	Nastavení parametrů pro měření ^1H NOESY spekter.	18
4.1	Hodnoty chemických posuvů obou vzorků	26
4.2	Termodynamické parametry vzorku CG	36
4.3	Termodynamické parametry vzorku $m^5\text{CG}$	37
4.4	Srovnání termodynamických parametrů obou vzorků	37

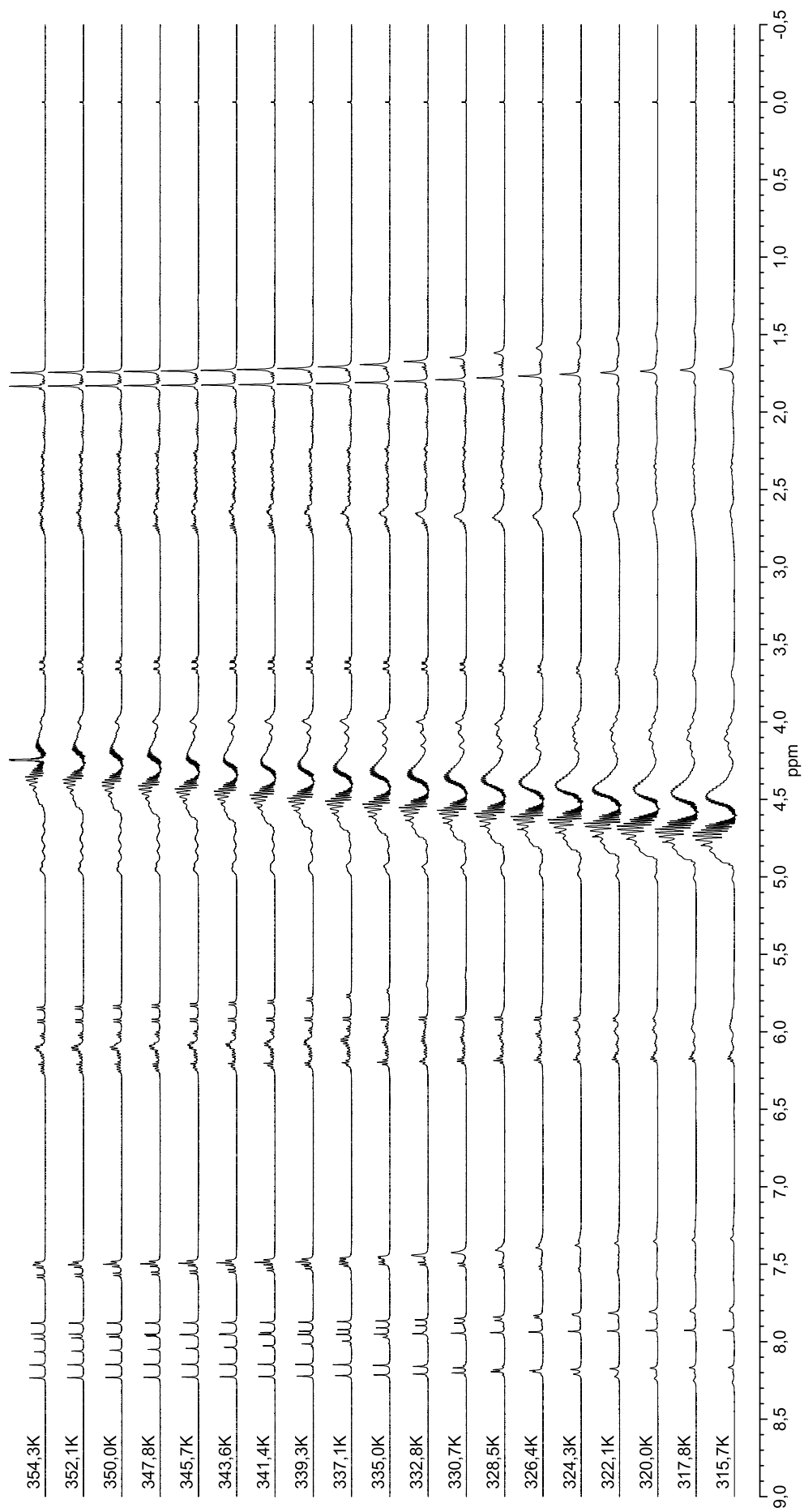
Seznam použitých zkratek

NMR	jaderná magnetická rezonance
RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FID	free induction decay, signál volné precese
NOE	nuclear Overhauser effect, jaderný Overhauserův jev
NOESY	nuclear Overhauser effect spectroscopy

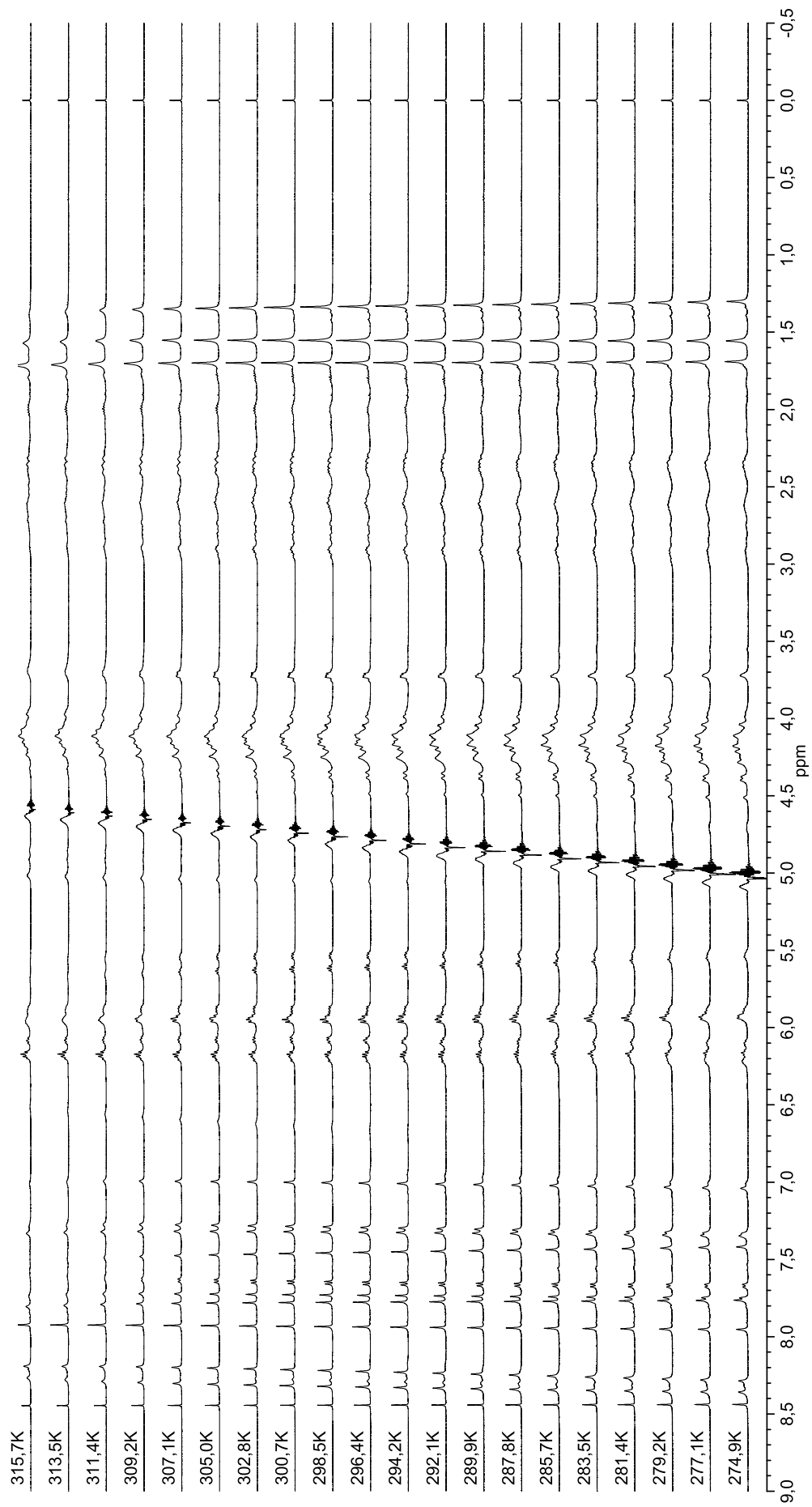
Přílohy



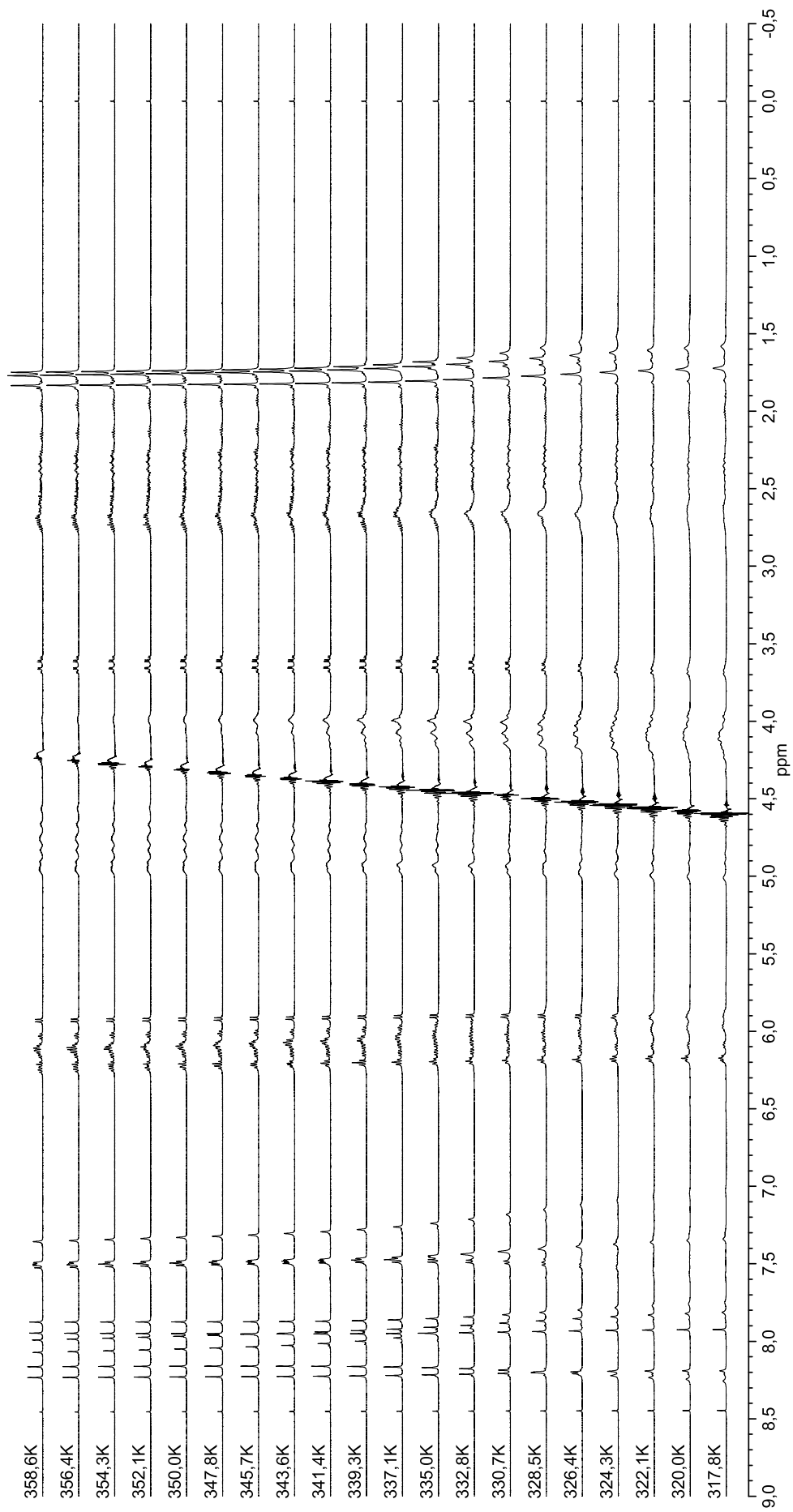
Obrázek P1: Změřená spektra vzorku CG, oblast od -0,5 do 9 ppm, část 1.



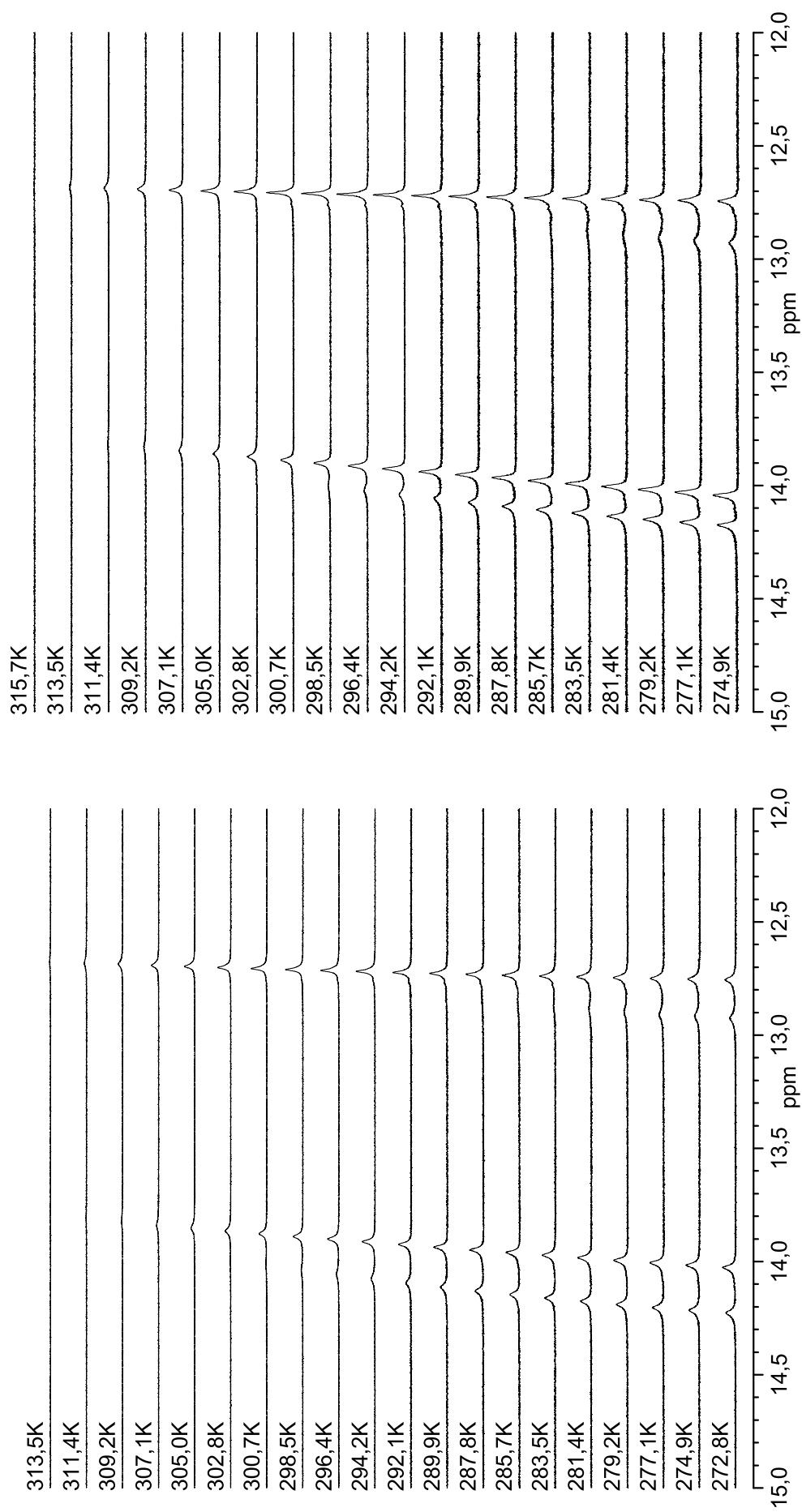
Obrázek P2: Změřená spektra vzorku CG, oblast od -0,5 do 9 ppm, část 2.



Obrázek P3: Změřená spektra vzorku m⁵CG, oblast od -0,5 do 9 ppm, část 1.



Obrázek P4: Změřená spektra vzorku m⁵CG, oblast od -0,5 do 9 ppm, část 2.



Obrázek P5: Změřená spektra vzorku CG (vlevo) a m⁵CG (vpravo), oblast od 12 do 15 ppm.