



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Ondřej Socha

**Charakterizace strukturních vlastností a
stability DNA vlásenek pomocí NMR
spektroskopie**

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Václav Římal

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2016

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou 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 má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Název práce: Charakterizace strukturních vlastností a stability DNA vlásenek pomocí NMR spektroskopie

Autor: Ondřej Socha

Katedra: Katedra fyziky nízkých teplot

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

Abstrakt: CArG box je velmi konzervovaná DNA sekvence nacházející se v Serum Response Elementu (SRE) regulujícím expresi genu *c-fos*. V této práci byly pomocí jaderné magnetické rezonance zkoumány krátké oligodeoxynukleotidy obsahující CArG box, za účelem ověření jeho schopnosti tvořit vlásenku. Byla změřena ^1H spektra v rozsahu teplot (274-360) K. Fitováním teplotních závislostí chemických posuvů byly určeny termodynamické parametry popisující tvorbu a rozpad vlásenky. Vlášenková struktura vzorků byla potvrzena na základě anomálií v NOESY spektru a nezávislosti teploty tání na koncentraci. Je tedy pravděpodobné, že CArG box skutečně tvoří neobvyklou konformaci, možná i kruciformy. To může být příčinou vysoké afinity mezi SRE a jeho transkripčním faktorem.

Klíčová slova: NMR, DNA, vlásenka, CArG box

Title: Structural properties and stability of DNA hairpins characterized by NMR spectroscopy

Author: Ondřej Socha

Department: Department of Low-Temperature Physics

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

Abstract: CArG box is a highly conservative DNA motif found in Serum Response Element (SRE), which regulates expression of *c-fos* gene. In this thesis, short oligodeoxynucleotides containing CArG box were measured using nuclear magnetic resonance spectroscopy to evaluate their ability to preferentially form hairpin over duplex. ^1H spectra were measured at temperature range (274-360) K. We acquired thermodynamic parameters of the transition between hairpin and single strand by fitting the temperature-dependent chemical shifts. The hairpin structure of our oligonucleotide samples was confirmed by non-B-DNA patterns in NOESY spectra, absence of concentration dependence of melting, and other pieces of evidence. Thus, occurrence of unusual DNA conformation of CArG box in native DNA, potentially even cruciform is highly possible. This could explain the high affinity between SRE and its transcription factor.

Keywords: NMR, DNA, hairpin, CArG box

Rád bych poděkoval svému vedoucímu diplomové práce Mgr. Václavu Římalovi za příkladné vedení, trpělivost, a zejména ochotu. Zvláště mu děkuji za uvedení do problematiky NMR, jak praktického, tak teoretického.

Děkuji také profesorce RNDr. Heleně Štěpánkové, CSc. a profesoru RNDr. Josefu Štěpánkovi, CSc. za cenné rady k interpretaci dat.

Poděkování patří také mé široké rodině za podporu po celou dobu studia.

Obsah

1	Úvod	3
2	Deoxyribonukleová kyselina	4
2.1	Primární struktura	4
2.2	Sekundární struktura	5
2.3	Interakce ovlivňující stabilitu DNA struktur	6
2.4	Termodynamika tvorby a rozpadu sekundárních struktur	6
3	Jaderná magnetická rezonance	10
3.1	Jaderný spin a magnetický moment	10
3.2	Fenomenologický popis NMR	11
3.2.1	Blochovy rovnice	11
3.2.2	Stacionární řešení Blochových rovnic	12
3.3	Pulsní metody NMR	13
3.3.1	Signál volné precese - FID	14
3.3.2	FT NMR	15
3.3.3	Spinové echo	15
3.3.4	Potlačení signálu rozpouštědla	16
3.4	Interakce	17
3.4.1	Chemický posuv	17
3.4.2	J-vazba	18
3.4.3	Přímá dipól-dipólová interakce, NOESY	18
3.5	Chemická výměna	19
4	Měření	22
4.1	Popis spektrometru	22
4.2	Příprava rozpouštědla a vzorků	22
4.3	Regulace teploty vzorku	23
4.4	Teplotní řada vodíkových spekter	24
4.5	Spektra ^1H - ^1H NOESY	25
5	Výsledky a diskuse	27
5.1	Přiřazení signálů v aromatické části spektra	27
5.2	Fitování spekter, vyhodnocení chemických posuvů	35
5.3	Fitování chemických posuvů	43
5.4	Vyhodnocení pološířek signálů	44
5.5	Potvrzení vlásenkové struktury	50
5.5.1	Srovnání s UV absorpcí	50

5.5.2	Rychlost výměny	50
5.5.3	NOESY spektrum	51
5.5.4	Fitování sigmoidálních závislostí posuvů	52
6	Závěr	55
	Seznam použité literatury	56
	Seznam obrázků	58
	Seznam tabulek	60
	Přílohy	61

1. Úvod

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je biopolymer nacházející se v jádru živých buněk, kde slouží jako prostředek uchovávající dědičnou informaci. DNA slouží také jako templát pro syntézu mRNA (messengerová ribonukleová kyselina) v procesu zvaném transkripce DNA, při kterém se patřičný úsek DNA zkopíruje pomocí RNA polymerázy. Podle mRNA se pak na ribozomech vytváří daný protein.

Aby mohla transkripce proběhnout, je potřeba ji iniciovat. Za tímto účelem jsou v buněčné DNA úseky obsahující speciální sekvence, tzv. promotory. Do těchto míst se pak váží transkripční faktory, což jsou proteiny tvořící tzv. preiniciační komplex. K tomuto komplexu se pak naváže samotná RNA polymeráza a započne transkripce. Do oblasti promotoru se mohou také vázat regulační faktory, které regulují transkripci genu [1].

Dosud není jasné, jakým způsobem transkripční faktory a regulační elementy rozpoznávají oblast promotoru. Vzhledem k délce DNA není příliš reálné, aby regulační elementy rozpoznávaly přímo specifickou sekvenci nukleotidů, jelikož by to znamenalo, že transkripční faktor by se musel postupně vázat ke všem nukleotidům, dokud by nenašel ten správný úsek. Vytvoření vazby a následná disociace by byla příliš pomalá. Jednou z možností tedy je, že transkripční faktor rozpoznává sekvenci nepřímo, skrze lokální konformaci a flexibilitu DNA, která je sekvencí určena. V promotoru genů se vyskytují oblasti, které jsou značně konzervované i napříč živočišnými druhy. Jeden takový úsek se nazývá CArG box a je součástí Serum Response Elementu (SRE) regulujícího expresi genu *c-fos* [2]. Tato sekvence má schopnost se samovolně ohýbat [3] a teoreticky umožňuje vytvářet vlásenky. Pokud by na obou komplementárních vláknech DNA byla vlásenka preferovanější než klasický duplex, mohlo by to vést až ke tvorbě tzv. kruciforem. To by znamenalo značnou lokální konformační změnu, kterou by pak rozeznával příslušný transkripční faktor.

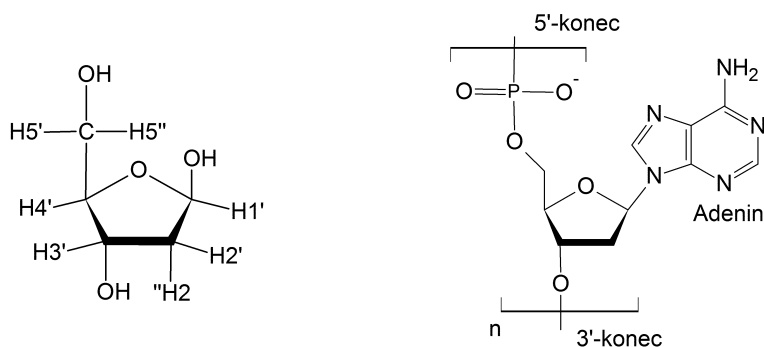
V práci jsou zkoumány krátké oligonukleotidy, které svou sekvencí odpovídají CArG boxu. Cílem práce je ověřit jejich schopnost tvořit vlásenku nebo duplex a kvantifikovat stabilitu takového útvaru.

2. Deoxyribonukleová kyselina

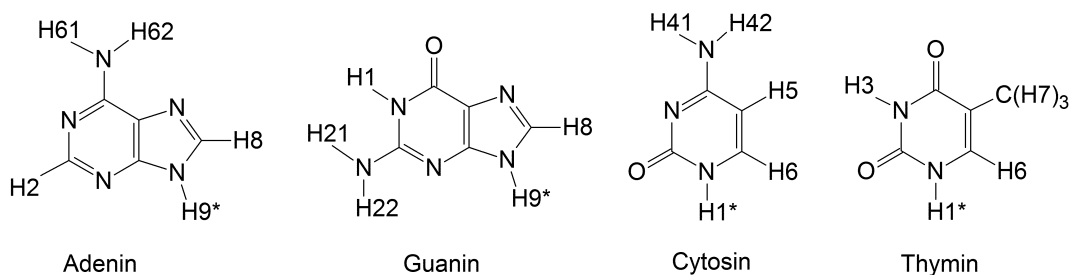
2.1 Primární struktura

DNA sestává z deoxyribonukleotidů, které se skládají z 2'-deoxyribózy (obr. 2.1), na kterou je navázána N-glykosidickou vazbou jedna z nukleových bází. Nukleové báze (obr. 2.2) jsou heterocyklické sloučeniny odvozené od purinu - adenin a guanin a pyrimidinu - cytosin a thymin. Na uhlík C5' deoxyribózy je navázán fosfát pomocí esterové vazby. Nukleotidy jsou řazeny za sebou vazbou mezi uhlíkem C3' deoxyribózy a fosfátem (obr. 2.1).

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 v souladu s obrázky 2.2 a 2.1. Vodíky deoxyribózy se uvádí s čárkou. Například označení A6-H8 značí vodík H8 adeninové báze šestého nukleotidu.



Obrázek 2.1: Chemická struktura deoxyribózy (vlevo) a adeninového deoxyribonukleotidu (vpravo).



Obrázek 2.2: Chemická struktura nejběžnějších bází DNA. Místo vodíků označených hvězdičkou je v DNA připojena deoxyribóza.

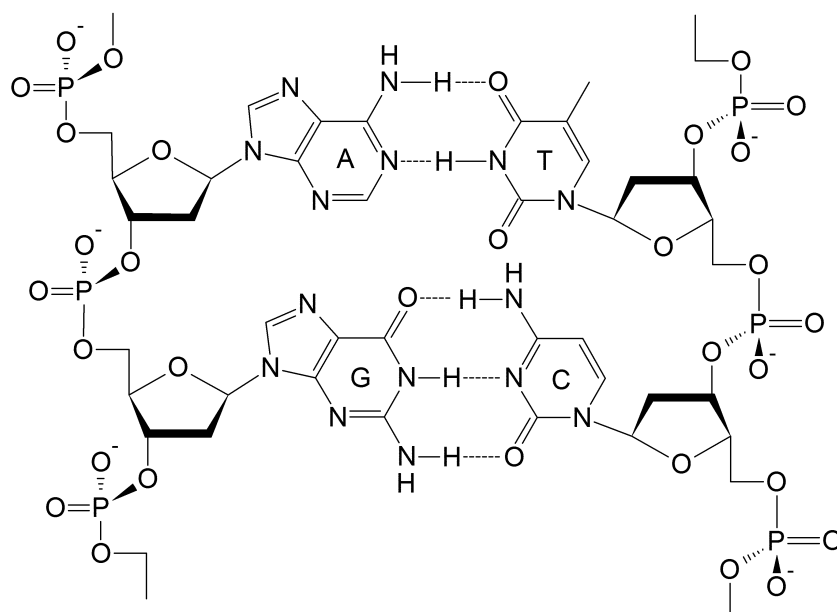
2.2 Sekundární struktura

Jedny z nejčastějších sekundárních struktur DNA jsou dvouvláknové šroubovice. Vznik těchto struktur je umožněn díky tzv. Watsonovu-Crickovu párování bází (obr. 2.3). Purinové i pyrimidinové báze mají potenciál tvořit vodíkové můstky. Je to dáno přítomností karbonylových kyslíků a aminoskupin na heterocyklech. Díky jejich prostorovému uspořádání vznikají mezi purinovou a pyrimidinovou bází vodíkové můstky. V případě guaninu a cytosinu jsou to tři vodíkové vazby a adenin a thymin tvoří můstky dva.

Tímto způsobem vzniká ze dvou komplementárních vláken dimer (duplex), jehož vlákna jsou orientována antiparalelně. Tento útvar pak tvoří šroubovici. 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 [4]. Tyto formy však nejsou tak běžné jako B-DNA.

Vlášenka je jednovláknový útvar, který vzniká díky flexibilitě řetězce. Ohnutá DNA se spáruje sama se sebou a vytvoří strukturu, která je podobná duplexu, ale na konci duplexové části je smyčka z nespárovaných, nebo jen částečně spárovaných nukleotidů.

Kromě šroubovic mohou vznikat také vícevláknové struktury např. triplexy nebo kvadruplexy. U nich často dochází k jinému párování než Watsonovskému-Crickovskému. Kvadruplexy se vyskytují v oblastech DNA bohatých na guanosin, což například jsou koncové sekvence buněčné DNA - telomery.



Obrázek 2.3: Watsonovo-Crickovo párování bází v DNA.

2.3 Interakce ovlivňující stabilitu DNA struktur

Je známo, že stabilitu různých sekundárních struktur ovlivňuje báze složení. Je také známo, že CG páry se třemi vodíkovými můstky jsou stabilnější než AT páry, které je mají jen dva. Jako hlavní stabilizující faktor se může zdát párování bází, a tedy tvorba vodíkových můstků. Vzhledem k tomu, že je na nich založena komplementarita DNA, je této interakci připisován velký význam. Proto se může zdát překvapivé, že z energetického hlediska není tato interakce nejvýznamnější.

Celkovou stabilitu DNA struktur z velké části ovlivňuje tzv. patrová interakce (stacking). Tato nekovalentní interakce vzniká mezi sousedními bázemi nebo bázeovými páry díky přítomnosti π orbitalů. Interakce způsobuje, že se bázeové páry vůči sobě rovnoběžně zarovnávají. Zahrnuje celou řadu interakcí, mimo jiné Van der Waalovu nebo elektrostatickou.

Teoretické i experimentální práce naznačují [5], že právě stacking je dominantní stabilizující faktor ve srovnání se samotným párováním. Jelikož báze mají možnost tvořit vodíkové můstky i s vodou, nepřináší párování dvou bází energetickou výhodu. Dokonce může být z tohoto pohledu destabilizující, což u AT páru ukazuje práce [6].

Sekundární struktury vznikají také proto, aby se optimalizovala interakce s vodou. Báze nukleových kyselin jsou hydrofobní povahy, naopak fosfátová páteř je hydrofilní. Je tedy žádoucí omezit styk vody s bázemi, což zajistí právě vhodná sekundární struktura.

Stabilita duplexů a dalších sekundárních struktur je ovlivněna také koncentrací kladných iontů [7].

2.4 Termodynamika tvorby a rozpadu sekundárních struktur

Kinetika tvorby a rozpadu různých sekundárních struktur DNA nemusí být stejná. Zásadní rozdíl bývá v molekularitě reakce. Zatímco tvorba duplexu D ze dvou samostatných vláken S je bimolekulární reakce



které se také říká reakce druhého řádu, tvorba vlásky H je konformační změna, a tedy se jedná o reakci monomolekulární neboli reakci prvního řádu.



Pro porovnávání energetické výhodnosti jedné či druhé formy DNA používáme rozdíl jejich Gibbsovy energie. Gibbsovu energii definujeme vztahem

$$\Delta G(T) = \Delta H - T\Delta S, \quad (2.3)$$

kde ΔH je rozdíl entalpie a ΔS rozdíl entropie. Gibbsova energie je funkcí termodynamické teploty T a často se udává při teplotě 37°C . Pokles entalpie je u DNA spojen s tvorbou mezibázových vodíkových můstků a řadou dalších interakcí (stacking, hydrofobní interakce). Změna entropie souvisí s uspořádaností struktury. Uspořádané sekundární struktury DNA (duplex, vlásenka) mají ΔS zápornou. To znamená kladný příspěvek ke Gibbsově energii, což zvyšuje energetickou nevýhodnost struktury. Ta je ale kompenzována zápornou změnou entalpie. Se zvyšující se teplotou však roste váha entropického členu, což vede k rozpadu uspořádané struktury.

Pro rovnovážné konstanty tvorby duplexu K_D , resp. vlásenky K_H dle rovnic 2.1 a 2.2 platí

$$K_D = \frac{c_D}{c_S^2}, \quad (2.4)$$

resp.

$$K_H = \frac{c_H}{c_S}. \quad (2.5)$$

Zde vystupují koncentrace c_D duplexů, koncentrace vlásenek c_H a koncentrace nespárovaných vláken c_S , které svazují rovnice

$$c_0 = c_S + 2c_D, \quad (2.6)$$

$$c_0 = c_S + c_H, \quad (2.7)$$

kde c_0 je celková koncentrace DNA.

Závislost Gibbsovy energie na rovnovážné konstantě K_D popisuje van't Hoffova rovnice

$$\Delta G(T) = -RT \ln(c_{ref}K), \quad (2.8)$$

přičemž R je univerzální plynová konstanta a c_{ref} je referenční koncentrace, kterou často volíme 1 M.

Obdobný vztah platí pro K_H

$$\Delta G(T) = -RT \ln(K). \quad (2.9)$$

Z rovnic (2.7), (2.4) a (2.3) lze odvodit vztah popisující podíl duplexů v roztoku selfkomplementárních oligonukleotidů s měnící se teplotou

$$p_D = \frac{c_D}{c_0} = \frac{1 + \alpha - \sqrt{1 + 2\alpha}}{\alpha}, \quad (2.10)$$

kde

$$\alpha = 4c_0 e^{-\frac{\Delta G}{RT}}. \quad (2.11)$$

Pro teplotní závislost relativního podílu vlásenek dostáváme vztah odvozený z rovnic (2.7), (2.5) a (2.3)

$$p_H = \frac{c_H}{c_0} = \frac{1}{1 + e^{\frac{\Delta G}{RT}}}. \quad (2.12)$$

Teplotou tání duplexu T_m^D pak rozumíme teplotu při níž je podíl spárovaných a nespárovaných vláken v roztoku stejný, tedy platí

$$c_S = 2c_D = \frac{1}{2}c_0. \quad (2.13)$$

Pro teplotu tání duplexu selfkomplementárních oligonukleotidů lze odvodit vztah

$$T_m^D = \frac{\Delta H}{R \ln \frac{c_0}{c_{ref}} + \Delta S}. \quad (2.14)$$

Teplota tání u vlásenek T_m^H znamená stejnou koncentraci nespárovaných vláken a složených vláken v roztoku, což můžeme zapsat jako

$$c_S = c_H = \frac{1}{2}c_0. \quad (2.15)$$

Pro teplotu tání vlásenek pak platí jednoduchý vztah

$$T_m^H = \frac{\Delta H}{\Delta S}. \quad (2.16)$$

Pro rychlostní konstanty při termodynamické rovnováze platí

$$k_S c_S^2 = k_D c_D, \quad (2.17)$$

$$k_S c_S = k_H c_H. \quad (2.18)$$

Teplotní závislost rychlostní konstanty je popsána Eyringovou rovnicí

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G_A}{RT}}, \quad (2.19)$$

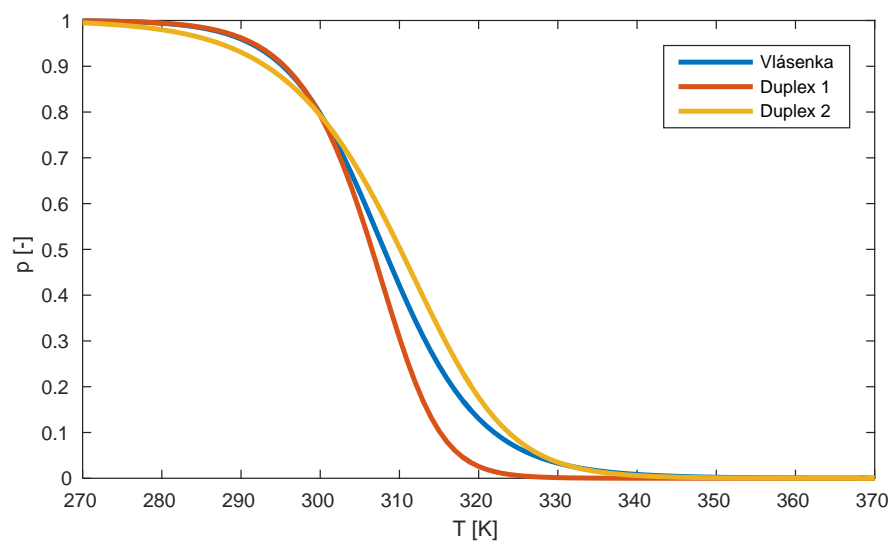
přičemž k_B je Boltzmannova konstanta, h je Planckova konstanta a ΔG_A nazýváme Gibbsova aktivační energie.

Na obrázku je vykreslen tvar teplotní závislosti relativního zastoupení vlásenek resp. duplexů v roztoku dle vztahů (2.10) a (2.12). Vidíme, že sigmoida vlásenky se svým tvarem liší od té, která popisuje tání duplexu. Parametry křivky:

$$\text{Vlásenka} \quad \Delta H = -130 \text{ kJ/mol}, \quad \Delta S = -400 \text{ J/mol/K}$$

$$\text{Duplex 1} \quad \Delta H = -260 \text{ kJ/mol}, \quad \Delta S = -700 \text{ J/mol/K}$$

$$\text{Duplex 2} \quad \Delta H = -170 \text{ kJ/mol}, \quad \Delta S = -400 \text{ J/mol/K}$$



Obrázek 2.4: Porovnání tvaru závislostí (2.10) a (2.12), popisující teplotní závislost podílu duplexů/vlásenek v roztoku.

3. Jaderná magnetická rezonance

Jaderná magnetická rezonance neboli NMR (z anglického Nuclear Magnetic Resonance) je metoda založená na interakci radiofrekvenčního pole s látkou v magnetickém poli. Jádra některých atomů mají nenulový spin, což v magnetickém poli způsobuje štěpení jejich energetických hladin známé jako Zeemanovo. Vzdálenost hladin je relativně malá a odpovídá fotonu z rádiové části elektromagnetického spektra. Při NMR spektroskopii pak měříme nejčastěji závislost absorpce radiofrekvenčního signálu na jeho frekvenci - absorpční spektrum. Z polohy absorpčních píků ve spektru pak můžeme získat informaci nejen o chemickém složení dané látky, ale také struktuře a dynamických procesech.

3.1 Jaderný spin a magnetický moment

Atomové jádro se skládá z protonů a neutronů. Tyto subatomární částice mají spin $1/2$. Jaderný spin souvisí s tím, jak nukleony obsazují jednotlivé energetické hladiny v jádře. Spinové číslo jádra l je dáno jak vlastními spiny jaderných částic, tak také jejich orbitálními momenty. Nukleony se však vzájemně párují (protony a neutrony zvlášť) a kompenzují tak nejen vlastní spiny, ale také orbitální momenty. Jádra se sudým počtem protonů a sudým počtem neutronů tak mají nulový jaderný spin. Magnetický moment jádra $\boldsymbol{\mu}$ je úměrný jeho spinu \boldsymbol{I} podle vztahu

$$\boldsymbol{\mu} = \gamma \boldsymbol{I},$$

přičemž konstantu úměrnosti γ nazýváme gyromagnetický poměr. Hodnota tohoto parametru se liší pro každý izotop. V tabulce 3.1 jsou NMR parametry nejčastěji měřených jader.

Průmět spinu do osy z je svázán s magnetickým spinovým číslem m vztahem

$$I_z = m\hbar. \tag{3.1}$$

Magnetické spinové číslo však může nabývat pouze hodnot

$$m = -l, -l + 1, \dots, l - 1, l, \tag{3.2}$$

Z toho plyne, že hodnota průmětu spinu do libovolného směru je kvantována.

Energie příslušející jednotlivým magnetickým spinovým číslům jsou stejné, dokud jádro nevložíme do magnetického pole, čímž dojde k sejmutí této degenerace a rozštěpení energetických hladin. Toto štěpení nazýváme Zeemanův jev. Vzdálenost rozštěpených hladin ΔE je úměrná intenzitě magnetického pole \boldsymbol{B}_0 a platí

$$\Delta E = \gamma B_0 \hbar. \tag{3.3}$$

Působením radiofrekvenčního pole o úhlové frekvenci ω_0 na jádro lze indukovat přechody mezi jednotlivými energetickými hladinami. Tento jev se nazývá jaderná magnetická rezonance. Rezonanční frekvenci ω_0 se říká Larmorova a platí pro ni vztah

$$\omega_0 = \gamma B_0. \quad (3.4)$$

Rezonanční frekvence je dána magnetickým polem v místě jádra. V látce běžně dochází k mnoha interakcím, které lokálně ovlivňují velikost a směr magnetického pole, což nám umožňuje rozlišit jádra s různým magnetickým okolím. Tyto interakce a jejich vliv jsou rozebrány dále.

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 3.1: NMR parametry vybraných izotopů. Rezonanční frekvence f odpovídají magnetickému poli o indukci 11,7 T.

3.2 Fenomenologický popis NMR

3.2.1 Blochovy rovnice

Úhrn všech magnetických momentů jader ve vzorku se nazývá jaderná magnetizace \mathbf{M} . Vložíme-li vzorek do magnetického pole \mathbf{B}_0 , dojde k reorientaci jaderných spinů tak, aby směřovala souhlasně s polem \mathbf{B}_0 . Fenomenologický popis NMR publikoval v roce 1946 švýcarský fyzik Felix Bloch. Po něm nazvané Blochovy rovnice popisují vývoj jaderné magnetizace \mathbf{M} pod vlivem časově proměnného magnetického pole \mathbf{B} se zahrnutím relaxačních procesů [8].

$$\frac{dM_x}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x}{T_2}, \quad (3.5)$$

$$\frac{dM_y}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y}{T_2}, \quad (3.6)$$

$$\frac{dM_z}{dt} = \gamma(\mathbf{M} \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z - M_0}{T_1}, \quad (3.7)$$

Konstanty T_1 a T_2 nazýváme podélná a příčná relaxační doba. Hodnoty T_1 a T_2 jsou obecně různé, což je dáno různými relaxačními mechanismy.

Rovnice platí za několika předpokladů. Prvním předpokladem je, že orientace jaderných momentů je závislá pouze na vnějším magnetickém poli. Tedy neuvažujeme magnetické pole vytvářené elektronovým obalem atomů a zanedbáváme vzájemnou interakci jader. Toto není za normálních okolností v experimentu splněno, což není ani žádoucí. Tyto interakce vedou k pozorovatelným jevům a přinášejí hlavní spektroskopickou informaci v běžném NMR experimentu. Pro základní náhled principu NMR však nejsou důležité a lze je zahrnout do výpočtu později.

Druhým předpokladem je dokonalá homogenita externího magnetického pole v celém objemu vzorku. V NMR spektroskopii se využívá pole \mathbf{B} tvořené dvěma složkami. První složka \mathbf{B}_0 je statická, časově nezávislá. Vytváří ji v dnešní době supravodivý permanentní magnet, ale může být generována obyčejným permanentním magnetem, elektromagnetem, nebo v případě magnetických látek i vlastními elektrony. Druhá složka $\mathbf{B}_1(t)$ je proměnná v čase a je vhodné, aby byla kolmá na pole \mathbf{B}_0 . Tato složka, generovaná elektrickým proudem v cívice, má nejčastěji harmonický průběh a bývá o několik řádů slabší než \mathbf{B}_0 . Jakákoli nehomogenita obou složek je v experimentu nežádoucí. Spektrometry využívají soustavu pomocných tzv. shimovacích cívek, které souží k eliminaci nehomogenit pole \mathbf{B}_0 . Nehomogenita \mathbf{B}_1 se výrazněji projevuje u některých pulsních experimentů a některé její projevy se dají částečně omezit vhodným návrhem pulsní sekvence.

3.2.2 Stacionární řešení Blochových rovnic

Zvolíme-li soustavu souřadnou tak, aby vektor \mathbf{B}_0 směřoval v kladném směru osy z , pak celkové pole \mathbf{B} bude ve tvaru

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

Očekáváme, že v ustáleném stavu bude vektor magnetizace \mathbf{M} precesovat okolo okolo osy z , přičemž M_z bude konstantní v čase. Hledáme tedy řešení Blochových rovnic ve tvaru [8]

$$M_x = u \cos \omega t + v \sin \omega t, \quad (3.8)$$

$$M_y = -u \sin \omega t + v \cos \omega t, \quad (3.9)$$

$$M_z = \textit{konst.} \quad (3.10)$$

Dosazením předpokládaného tvaru řešení do Blochových rovnic určíme jednotlivé koeficienty

$$u = \frac{\gamma B_1 T_2^2 (\omega - \omega_0)}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad (3.11)$$

$$v = \frac{\gamma B_1 T_2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0, \quad (3.12)$$

$$M_z = \frac{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2 + \gamma^2 B_1^2 T_1 T_2} M_0. \quad (3.13)$$

Magnetizaci \mathbf{M} můžeme rozdělit na složku podélnou M_{\parallel} , ta je rovnoběžná s polem \mathbf{B}_0 , a na ni kolmou příčnou složku M_{\perp} , kterou můžeme zapsat v komplexním tvaru

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

Reálná část příčné magnetizace preceduje ve fázi s radiofrekvenčním polem a říká se jí disperzní, zatímco imaginární je vůči němu opožděná o $\frac{\pi}{2}$ a nazýváme ji absorpční. Celkový fázový posun příčné magnetizace vůči radiofrekvenčnímu poli \mathbf{B}_1 závisí na jeho frekvenci ω . V rezonanci tj. $\omega = \omega_0$ disperzní složka vymizí a příčná magnetizace vzorku bude zpožděná o $\frac{\pi}{2}$.

Frekvenční závislost amplitudy indukovaného napětí v cívice popisuje vztah odvozený z výrazů pro příčné složky magnetizace (3.11) a (3.12)

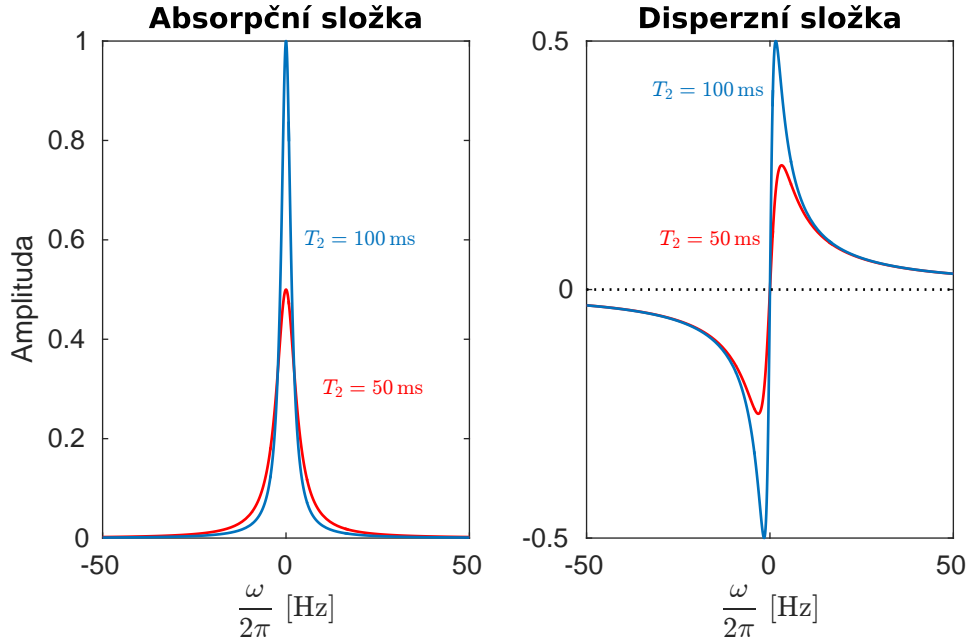
$$S(\omega) = \frac{T_2}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2} + i \frac{T_2^2 (\omega - \omega_0)}{1 + T_2^2 (\omega - \omega_0)^2}. \quad (3.14)$$

Reálná část odpovídá absorpčnímu signálu, zatímco imaginární část popisuje napětí indukované disperzní složkou magnetizace. Zde byly zanedbány členy s γB_1 ve jmenovateli, jelikož předpokládáme velmi slabé pole $\gamma^2 B_1^2 T_1 T_2 \ll 1$. Stejně tak jsou vynechány konstanty v čitateli, které mají vliv jen na škálování křivek, jejichž průběh je na obr 3.1.

Při řešení jsme předpokládali kontinuální ozařování vzorku radiofrekvenčním polem \mathbf{B}_1 v ustáleném stavu. Toto stacionární řešení je významné z historického hlediska, kdy se vzorek ozařoval radiofrekvenčním signálem a měřila se absorpce. Frekvence rf. signálu byla konstantní a pomalu se měnila hodnota pole \mathbf{B}_0 elektromagnetu tak, aby byl splněn předpoklad ustáleného stavu. Tento způsob záznamu spektra, označovaný jako CW z angl. continuous wave, byl vytlačen pulsními metodami. Stále se však používá s jistými obdoby u některých pomocných funkcích moderního spektrometru.

3.3 Pulsní metody NMR

Pulsní metody jsou založeny na vychylování magnetizace vzorku přesně definovanými pulsy radiofrekvenčního pole \mathbf{B}_1 a následné detekci tzv. signálu volné



Obrázek 3.1: Absorpční a disperzní část signálu.

precese. Výhodou tohoto přístupu oproti CW je, že jsme zpravidla schopni vyexcitovat a změřit celé spektrum najednou a s daleko lepším poměrem signálu k šumu.

3.3.1 Signál volné precese - FID

Budeme-li řešit Blochovy rovnice bez přítomnosti radiofrekvenčního pole B_1 a s počátečními podmínkami odpovídající magnetizaci vychýlené z rovnováhy, pak dostaneme pro průběh příčné a podélné magnetizace

$$M_{\perp}(t) = M_{\perp}(0)e^{i\omega t}e^{-\frac{t}{T_2}}, \quad (3.15)$$

$$M_{\parallel}(t) = M_{\parallel}^0 - [M_{\parallel}^0 - M_{\parallel}(0)]e^{-\frac{t}{T_1}}. \quad (3.16)$$

Magnetizace bude tedy precedovat okolo osy určené vektorem B_0 s Larmorovou frekvencí určenou vztahem (3.4). Relaxační procesy pak postupně navrátí magnetizaci do rovnováhy ($M_{\perp} = 0$, $M_{\parallel} = M_{\parallel}^0$). Tomuto se říká volná precese a využívá se jí v dnešní NMR spektroskopii. Příčná složka magnetizace M_{\perp} generuje v detekčních cívkách signál volné precese nebo také FID (free induction decay). Ten se digitalizuje a zaznamenává. Následně se provede inverzní Fourierova transformace a získáme spektrum složené z Lorentzových křivek, které jsou stejné jako u stacionárního řešení (3.14). Každá křivka přísluší jednomu signálu o úhlové frekvenci ω_0 .

3.3.2 FT NMR

Pro naměření signálu volné precese je potřeba magnetizaci vzorku nejprve vychýlit z rovnováhy. To se provádí krátkým radiofrekvenčním pulsem. Předpokládejme, že statické magnetické pole B_0 míří ve směru osy z . Pro názornost budeme sledovat vývoj magnetizace v soustavě souřadné rotující kolem této osy s úhlovou rychlostí ω , která je stejná jako u radiofrekvenčního pole \mathbf{B}_1 . V takové soustavě pozorujeme tzv. efektivní pole

$$\mathbf{B}(t) = (B_1, 0, \frac{\omega - \omega_0}{\gamma}), \quad (3.17)$$

kde radiofrekvenční složka \mathbf{B}_1 je nezávislá na čase a pole B_0 se zmenšuje s tím, jak se s úhlovou frekvencí ω blížíme té rezonanční ω_0 . V rezonanci bude magnetizace vzorku precesovat kolem pole B_1 , které směřuje v ose x . Ze vztahu pro Larmorovu frekvenci (3.4), lze odvodit úhel θ , o který se stočí magnetizace vzorku vlivem radiofrekvenčního pulsu s dobou trvání τ

$$\theta = B_1 \gamma \tau. \quad (3.18)$$

Předpokládáme, že doba τ je velmi krátká, a proto se nestihnou výrazněji uplatnit relaxační procesy.

Nejjednodušší měření probíhá tak, že je nejdříve magnetizace vzorku sklopena radiofrekvenčním pulsem o $\frac{\pi}{2}$ do příčné roviny. Následně se detekuje signál volné precese - FID. Spektrum se získá inverzní Fourierovou transformací tohoto signálu - odtud označení FT NMR. Pro zlepšení odstupů signálu od šumu se používá tzv. koherentní sumace. Spočívá v opakovaném měření signálu volné precese a sečtením. Intenzita signálu roste s počtem opakování N , zatímco intenzita náhodného šumu roste jako \sqrt{N} . Pro zdvojnásobení poměru signálu k šumu je proto potřeba 4x zvýšit počet opakování měření tzv. scanů. Pro velmi koncentrované vzorky běžně stačí jeden scan pro naměření vodíkového spektra, u koncentrací řádu jednotky mM jsou potřeba desítky až stovky scanů. Je potřeba mít na paměti, že experiment lze opakovat až po zrelaxování vzorku, jinak dochází k úbytku signálu.

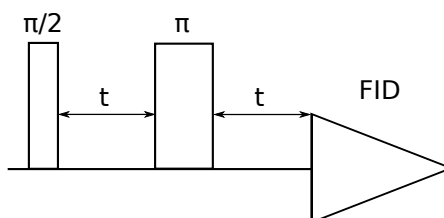
3.3.3 Spinové echo

V pulsních experimentech se často využívá tzv. spinového echa. Nejjednodušší sekvence pro vytvoření spinového echa je znázorněna na obrázku 3.2. 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 $2t$ pak dojde k obnovení signálu volné precese.

Vysvětlení spočívá v tom, že magnetizace je složena z mnoha různých příspěvků z různých oblastí vzorku. Magnetické pole však není všude úplně 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 začnou opět sbíhat sbíhat, což zaznamenejme jako rostoucí signál volné precese. Po úplném sfázování se jednotlivé příspěvky k příčné magnetizaci začnou opět rozbíhat a signál volné precese 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 zaznamenávat FID. Tento typ pulsní sekvence bývá součástí složitějších pulsních sekvencí, protože refokusuje také magnetizaci signálů s různým chemickým posuvem. Ve spektru je samozřejmě žádoucí aby všechny signály měly stejnou fázi odpovídající absorpční Lorentzově křivce.



Obrázek 3.2: Pulsní sekvence pro měření spinového echa.

3.3.4 Potlačení signálu rozpouštědla

V běžném experimentu měříme vzorky, jejichž dominantní složkou je rozpouštědlo. Ve spektru pak signál rozpouštědla může přehlušit signály zkoumaných látek. Je proto vhodné, aby rozpouštědlo neobsahovalo izotopy, které mají být měřeny. Často se tak místo vody používá voda těžká D_2O , aby nebyla vidět ve vodíkovém spektru. Těžká voda se však z chemického hlediska chová mírně odlišně než obyčejná voda. Zejména při měření biomolekul však chceme vytvořit co nejpřirozenější prostředí a nezbývá než je rozpustit ve vodě. Potom ale musíme použít některou z metod pro odstranění signálu vody z vodíkového spektra.

Tyto metody jsou založeny na použití selektivních pulsů k manipulaci s magnetizací rozpouštědla. Selektivní puls je dlouhý radiofrekvenční puls s nízkým výkonem a frekvencí odpovídající přesně skupině jader, na něž chceme působit. Dlouhé trvání pulsu pak zajistí, že jádra s blízkou frekvencí nebudou ovlivněna.

Jedna z nejznámějších metod je sekvence watergate, kdy za pomoci uměle vytvořených gradientů magnetického pole rozfázujeme příčnou složku magnetizace všech signálů a následně aplikujeme π puls na všechna jádra kromě jader vody. Opětovným gradientem pak sfázujeme jen požadovanou magnetizaci, která přísluší zkoumaným látkám.

Další technikou je tzv. presaturace. Spočívá v ozařování rozpouštědla dlouhotrvajícím radiofrekvenčním pulsem před samotnou pulsní sekvencí. Tím dojde k narušení zrelaxovaného stavu rozpouštědla a nekoherentnímu rozfázování jeho magnetizace. Následná pulsní sekvence tento stav již nijak nezvrátí a při akvizici detekujeme jen signál žádaných jader a zbytkový signál rozpouštědla.

3.4 Interakce

Při řešení Blochových rovnic byly zanedbány veškeré interakce vyjma interakce jaderného spinu s externím magnetickým polem. Spousta z nich má však vliv na tvar spektra a mnohdy přináší další informaci o vzorku.

3.4.1 Chemický posuv

Velikost magnetické indukce v místě jádra je ovlivněna stíněním elektronového obalu atomu. Elektrony kolem jádra vytvářejí v magnetickém poli sekundární pole opačného směru. Tomuto se říká diamagnetické stínění. Pro rezonanční frekvenci jádra pak můžeme psát

$$\omega = \gamma(1 - \sigma)B_0$$

Parametr σ nazýváme stínění a závisí na rozložení elektronové hustoty kolem jádra. Zjednodušeně můžeme říci, že vyšší elektronová hustota okolo jádra snižuje magnetické pole na jádře a posouvá tak rezonanční frekvenci k nižším hodnotám. Naopak atomy, které přišly o část elektronového obalu například v důsledku chemické vazby, budou mít rezonanční frekvenci jádra vyšší. Jaderná magnetická rezonance je tedy citlivá na chemické okolí jader, čehož se využívá pro identifikaci látek nebo k studiu lokální konformace molekul.

Veličinu chemický posuv δ zavádíme vztahem

$$\delta = \frac{\omega - \omega_s}{\omega_s}, \quad (3.19)$$

kde ω_s je rezonanční frekvence NMR standardu. To je chemické látka přidávaná do vzorku za účelem kalibrace chemického posuvu. Často používaný je TMS (tetrametylsilan), který je však velmi špatně rozpustný ve vodě. Proto se pro měření ve vodných roztocích používá DSS (4,4-Dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina), jež se rozpouští ve vodě lépe.

Hodnotu chemického posuvu uvádíme v jednotkách ppm. Výhodou takto zavedeného chemického posuvu je, že jeho hodnota je nezávislá na velikosti magnetického pole B_0 . To je důležité při porovnávání výsledků naměřených na různých spektrometrech.

3.4.2 J-vazba

Jedná se v podstatě o dipól-dipólovou interakci mezi jádry, která je zprostředkována elektrony, a proto se také nazývá nepřímá dipól-dipólová interakce. Aby se J-vazba projevila, musí tedy existovat mezi příslušnými atomy chemická vazba. Nemusí však být jen přímá, ale tato interakce se propaguje i přes více vazeb. S rostoucím počtem vazeb mezi atomy však tato interakce slábne.

Pro jádro se spinem $\frac{1}{2}$ jsou možné dvě hodnoty průmětu tohoto spinu do zvoleného směru, a to $\frac{1}{2}$ a $-\frac{1}{2}$. Na orientaci jednoho spinu reagují blízké elektrony. Tak se informace o orientaci spinu prvního jádra přenesou k jádru druhému. To se v místě druhého jádra projeví drobnou změnou intenzity magnetického pole vlivem jiného rozložení nábojové hustoty elektronového obalu.

Ve spektru lze pak pozorovat rozštěpení spektrální čáry na dublet, nebo obecně na multiplet v případě více interagujících jader. Velikost štěpení je dána J-konstatou, která závisí zejména na počtu chemických vazeb mezi jádry, typu vazeb, typu jader (izotopy), ale také na geometrii vazeb (dihedrální úhly). Naopak nezávisí na velikosti pole B_0 , a proto se udává v přímo v jednotkách Hz a nikoli ppm.

Decoupling: Ne vždy jsou rozštěpené čáry ve spektru žádoucí. Běžné organické molekuly obsahují velké množství vodíkových atomů a ty často interagují pomocí J-interakce mezi sebou nebo typicky s uhlíkovými jádry. Ve spektrech pak bývá velké množství čar příslušící jednotlivým multipletům. Pro odstranění štěpení a tedy zpřehlednění spektra se používá tzv. decoupling.

Spočívá v tom, že jádra způsobující štěpení jsou kontinuálně ozařována radiofrekvenčním polem, čímž se u nich vyvolají rychlé přechody mezi možnými průměty spinu. Partnerská jádra pak zaznamenají jen časově vystředovanou hodnotu. Ta je nulová nezávisle na spinu jádra, jak můžeme nahlédnout ze vztahu (3.2).

Této techniky se využívá zejména při měření spekter uhlíku ^{13}C , která obsahují uhlíkové signály rozštěpené blízkými vodíky. V takovém případě aplikujeme na vodíky tzv. heteronukleární decoupling, který se od homonukleárního decouplingu liší v tom, že měříme a ozařujeme rozdílné izotopy.

3.4.3 Přímá dipól-dipólová interakce, NOESY

Přímá dipól-dipólová interakce se na rozdíl od té nepřímé projevuje i bez existence chemické vazby mezi jádry. Jde o přímou interakci dvou magnetických dipólů přes prostor. Pole dipólu klesá s třetí mocninou vzdálenosti. Velikost interakce dipól-dipól pak klesá se šestou mocninou vzdálenosti mezi dipóly. Je tedy relativně krátkodosahová. V izotropních kapalinách se její vliv středuje k nule a

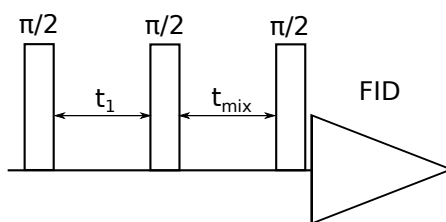
ve spektru se přímo neprojevuje.

Důsledkem přímé dipól-dipólové interakce je jaderný Overhauserův jev, zkráceně NOE (z anglického nuclear Overhauser effect). Ten nastává tehdy, když je ozářeno jedno jádro a v efektivním dosahu přímé dipól-dipólové interakce je druhé jádro. Radiofrekvenčním polem jsou u prvního jádra narušeny rovnovážné populace stavů s různým průmětem spinu. Vlivem relaxačních procesů dochází k návratu populací do původního stavu. Relaxace obou jader je však svázána, a proto pozorujeme snížení, nebo navýšení magnetizace druhého jádra. Navýšení, nebo snížení je dáno zejména poměrem gyromagnetických poměrů obou jader a jejich vzdáleností. NOE je pozorovatelný mezi jádry, jejichž vzdálenost nepřesahuje zhruba 5 Å.

Jaderného Overhauserova jevu se využívá při měření NOESY spekter. Tato nejčastěji dvourozměrná spektra slouží k nalezení korelovaných signálů ve spektru. Pokud jsou dva signály korelovány pomocí NOE, můžeme usuzovat, že jim příslušná jádra jsou blízko sebe v prostoru.

Základní pulsní sekvence 2D NOESY je na obrázku 3.3 a skládá se ze tří pulsů. Prodlevu t_{mix} mezi druhým a třetím pulsem nazýváme směšovací čas (mixing time). Během ní probíhají výše zmíněné relaxační procesy a buduje se NOE. Poslední puls je čtecí, po něm následuje detekce signálu volné precese a po inverzní Fourierově transformaci obdržíme spektrum. Toto se pak opakuje s jiným časem t_1 až získáme sadu desítek až stovek jednorozměrných spekter. Následně se provede druhá Fourierova transformace vůči t_1 (tzv. nepřímá dimenze), čímž se získá dvourozměrné NOESY spektrum. To znázorňujeme jako vrstevnicovou mapu, na jejíž osách jsou posuvy jednotlivých signálů.

Ve spektru pak vidíme diagonální píky a mimodiagonální píky, tzv. krosníky. Přítomnost krosníku znamená, že mezi jádry s příslušnými posuvy dochází k NOE, a tedy jsou blízko sebe v prostoru. Spektrum je symetrické vůči diagonále.



Obrázek 3.3: Základní pulsní sekvence pro měření homonukleárního 2D NOESY spektra.

3.5 Chemická výměna

U jader, u nichž probíhá chemická výměna, se opakovaně mění magnetické okolí. To bývá způsobeno často chemickými reakcemi, konformačními změnami

molekuly nebo jinými interakcemi.

Předpokládejme výměnu mezi dvěma stavy A a B, kterou můžeme zapsat ve tvaru



kde k_A a k_B jsou rychlostní konstanty výměny. Pro ty v rovnováze platí

$$k_A[A] = k_B[B], \quad (3.21)$$

přičemž $[A]$ a $[B]$ je zastoupení (koncentrace) forem A a B .

Jak se v takovém případě vyvíjí magnetizace, popisují Blochovy-McConnellovy rovnice [9]

$$\frac{dM_x^A}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x^A}{T_2} - \frac{M_x^A}{\tau^A} + \frac{M_x^B}{\tau^B}, \quad (3.22)$$

$$\frac{dM_y^A}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y^A}{T_2} - \frac{M_y^A}{\tau^A} + \frac{M_y^B}{\tau^B}, \quad (3.23)$$

$$\frac{dM_z^A}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^A \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z^A - M_0^A}{T_1} - \frac{M_z^A}{\tau^A} + \frac{M_z^B}{\tau^B}, \quad (3.24)$$

$$\frac{dM_x^B}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B})_x - \frac{M_x^B}{T_2} - \frac{M_x^B}{\tau^B} + \frac{M_x^A}{\tau^A}, \quad (3.25)$$

$$\frac{dM_y^B}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B})_y - \frac{M_y^B}{T_2} - \frac{M_y^B}{\tau^B} + \frac{M_y^A}{\tau^A}, \quad (3.26)$$

$$\frac{dM_z^B}{dt} = \gamma(\mathbf{M}^B \times \mathbf{B})_z - \frac{M_z^B - M_0^B}{T_1} - \frac{M_z^B}{\tau^B} + \frac{M_z^A}{\tau^A}. \quad (3.27)$$

Tyto rovnice se od Blochových rovnic pro dva nezávislé spiny A a B liší posledními dvěma členy, které magnetizaci obou spinů svazují pomocí časových konstant τ^A a τ^B chemické výměny. Pro ně platí

$$\tau^A = \frac{1}{k_A} \quad \text{a} \quad \tau^B = \frac{1}{k_B} \quad (3.28)$$

O symetrické dvoustavové výměně mluvíme, pokud

$$k_A = k_B = k, \quad (3.29)$$

což s ohledem na vztah (3.21) znamená, že musí platit také

$$M_0^A = M_0^B = M^0.$$

Budeme-li předpokládat, že $T_2 \gg \tau^{A,B}$, můžeme členy s T_2 v Bloch-McConnellových rovnicích zanedbat. Následným řešením dostaneme vztah popisující tvar spektra při symetrické dvoustavové výměně [10]

$$S(\omega_S) = \frac{4M_0k\delta^2}{(\delta - \omega_S)^2(\delta + \omega_S)^2 + 4k^2\omega_S^2}, \quad (3.30)$$

kde

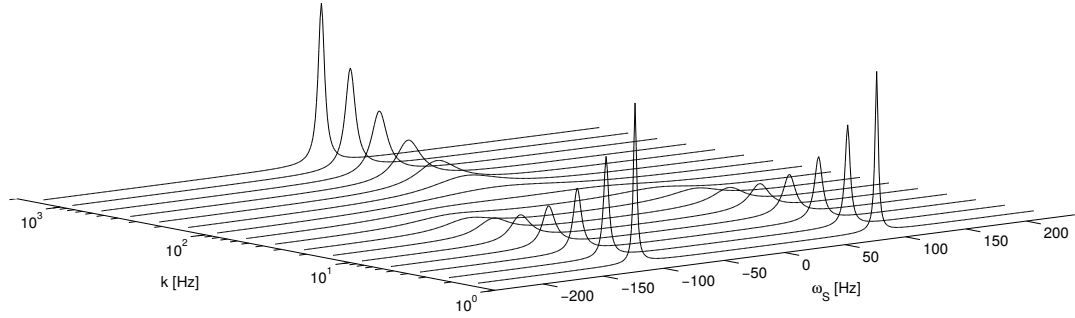
$$\delta = \frac{\omega_A - \omega_B}{2} \quad (3.31)$$

a ω_S je úhlová frekvence vztažená k aritmetickému průměru frekvencí obou stavů

$$\omega_S = \omega - \frac{\omega_A + \omega_B}{2}. \quad (3.32)$$

Tvar spektra je na obrázku (3.4). Vidíme, že s rostoucí rychlostí chemické výměny se obě spektrální čáry rozšiřují a posouvají k sobě. Po dalším zvýšení rychlosti výměny dojde k jejich splynutí – koalescenci. Při rychlé chemické výměně pak pozorujeme pouze jeden signál s frekvencí odpovídající průměru původních signálů. Rychlost výměny při koalescenci je

$$k_{koal} = \frac{\delta}{\sqrt{2}}. \quad (3.33)$$



Obrázek 3.4: Tvar spektra při symetrické dvoustavové výměně v závislosti na rychlosti této výměny. Vypočteno dle vztahu (3.30) pro $\delta = 100$ Hz

Pokud opustíme předpoklad (3.29) mluvíme o obecné asymetrické výměně, která je běžnější než ta symetrická. Tvar spektra popisuje vztah [11]

$$S(\omega) = \frac{M_0^A k_A + M_0^B k_B + M_0^A \alpha_B + M_0^B \alpha_A}{\alpha_A \alpha_B - k_A k_B}, \quad (3.34)$$

kde

$$\alpha_A = R_A + k_A - i(\omega - \omega_A), \quad (3.35)$$

$$\alpha_B = R_B + k_B - i(\omega - \omega_B), \quad (3.36)$$

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

4. Měření

4.1 Popis spektrometru

K měření byly použity NMR spektrometry AVANCE a AVANCE III vyrobené firmou Bruker. Supravodivý magnet spektrometru pracuje s magnetickým polem o indukci 11,7 T, což odpovídá protonové rezonanční frekvenci 500 MHz. Samozřejmou součástí magnetu jsou pomocné cívky korigující nehomogenitu magnetického pole uvnitř vzorku. Tyto cívky jsou jak supravodivé, tj. pracují v permanentním režimu, tak klasické, u nichž regulujeme velikost magnetického pole elektrickým proudem. Spektrometr AVANCE III je k tomuto vybaven systémem TopShim, jenž na základě mapování magnetického pole vypočítá proudy pro tyto tzv. shimovací cívky. Cívky mohou být navíc chlazeny proudem vzduchu pro zajištění vyšší stability magnetického pole.

K spektrometru přísluší kompresorové chladicí zařízení, které u spektrometru AVANCE pracuje v režimech vypnuto/zapnuto a je ovládáno manuálně. V případě spektrometru AVANCE III pracuje chladicí jednotka ve 3 výkonnostních režimech, přičemž nejvýkonnější režim by měl zajistit chlazení na teplotu až -80°C . Jednotka je ovládána z počítače.

Sonda s ozančením BBFO, která byla použita pro měření na spektrometru AVANCE III, obsahuje mimo kanálů vodíku ^1H a deuteria ^2H pro LOCK také širokopásmový kanál laditelný od jádra ^{19}F do ^{15}N , to odpovídá frekvenčnímu rozsahu 471 MHz – 51 MHz při 500 MHz na ^1H . Výhodou této sondy je automatické ladění a impedanční přizpůsobení jednotlivých kanálů.

Na spektrometru AVANCE byla použita dvoukanálová sonda BBO. Ta je vybavena kromě vodíkového ^1H a deuteriového ^2H kanálu také kanálem laditelným v rozsahu ^{31}P – ^{109}Ag , což odpovídá 203 MHz – 23 MHz při 500 MHz na ^1H

4.2 Příprava rozpouštědla a vzorků

Měření jsme prováděli na třech vzorcích oligonukleotidů různé délky (tabulka 4.1). Oligonukleotidy byly nasyntetizovány společností ATDBio. Byla požadována co nejvyšší čistota, jelikož vyšší koncentrace nečistot by se projevila v NMR spektrech, což by ztížilo či znemožnilo jejich vyhodnocení. Zároveň je však potřeba mít co největší množství vzorku, s ohledem na relativně nízkou citlivost NMR spektroskopie. Dodané oligonukleotidy obsahují jen zanedbatelné množství nečistot v porovnání se samotnou DNA.

Lyofilizované oligonukleotidy byly rozpuštěny ve vodném roztoku fosfátového pufru (tabulka 4.2) s pH 7,0 a celkovou koncentrací fosfátů 25 mM. Roztok také

obsahoval mimo jiné 10% D₂O pro systém LOCK na NMR spektrometru a DSS (4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid) jako NMR standard. Rozpouštědlo bylo vyrobeno smícháním dvou složek obsahujících H₂PO₄⁻ resp. HPO₄²⁻. V průběhu mísení bylo měřeno pH a poměr obou složek byl pak nastaven tak, aby výsledné pH pufru bylo 7,0.

Po rozpuštění vzorků v pufru bylo změřeno jejich pH přímo v NMR kyvetě pH metrem Cole Parmer s elektrodou Spintode od firmy Rototec-Spintec. U všech vzorků se pH ustálilo na hodnotě 6,9. Kyvety pro vzorky byly skleněné o vnějším průměru 5 mm a byly vymyty destilovanou vodou a následně sušeny po dobu 1,5 h při teplotě 150 °C

Název	Délka	Sekvence
s1fos12	12 nukl.	TCC ATATTA GGA
s1fos14	14 nukl.	GTCC ATATTA GGAC
s1fos16	16 nukl.	TGTCC ATATTA GGACA

Tabulka 4.1: Sekvence jednotlivých vzorků.

Látka	Koncentrace
H ₂ PO ₄ ⁻ + HPO ₄ ²⁻	25 mM
Na ⁺	200 mM
Cl ⁻	160 mM
D ₂ O	10 vol. %
DSS ^a	< 1 mM

Pozn: ^a 4,4-dimethyl-4-silapentan-1-sulfonová kyselina.

Tabulka 4.2: Složení rozpouštědla.

4.3 Regulace teploty vzorku

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

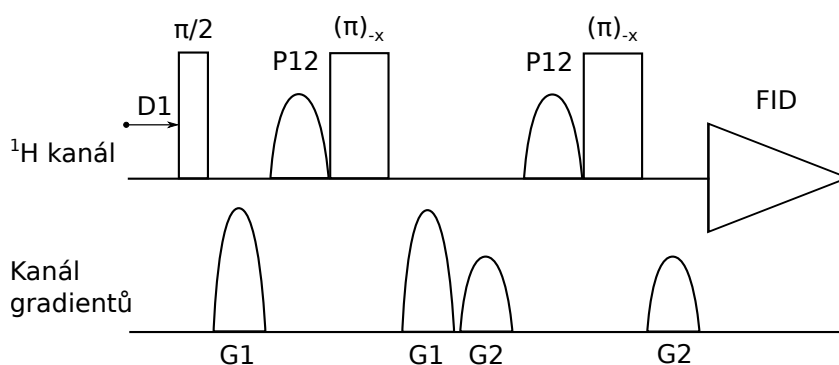
Vlastní měření teplotní série spekter probíhalo za dané teploty, která byla udržována konstantní po dobu měření příslušného spektra. Spektra byla měřena od nejvyšší teploty k nejnižší s krokem 2 °C. Po nastavení dané teploty byl vzorek

po dobu 15 minut temperován a až poté spuštěno samotné měření. Vzhledem k tomu, že teplotní čidlo bylo umístěno mimo vzorek v měřící sondě, neodpovídala skutečná teplota vzorku teplotě čidla. U spektrometru AVANCE byla k dispozici teplotní kalibrace sondy, která se použila k přesnějšímu stanovení teploty vzorku. U spektrometru AVANCE III byla příslušná korekce již zahrnuta do nastavení teplotní jednotky.

4.4 Teplotní řada vodíkových spekter

Pro každý vzorek byla naměřena série vodíkových spekter v rozmezí teplot 274 K – 360 K (1 °C – 87 °C) s krokem 2 °C. U vzorku s1fos16 byl rozsah teplot zvýšen na 274 K – 370 K (1 °C – 97 °C) a to z důvodu jeho vyšší stability. Nastavení spektrometru a parametrů pulsní sekvence je v tabulce 4.3.

Pulsní sekvence zgesgp obsahuje blok na potlačení signálu rozpouštědla [12]. Schéma sekvence je na obrázku 4.1. Po prvním $\frac{\pi}{2}$ pulsu je příčná magnetizace rozfázována gradientním pulsem. Následují dva π pulsy. První je dlouhý, selektivní na frekvenci signálu vody a druhý je normální širokopásmový. Po těchto dvou pulsech je magnetizace vodíků vody otočena o 2π , zatímco u ostatních spinů došlo k otočení o π . Voda tedy prošla touto částí beze změny a další gradientní puls ji dále rozfázuje. U ostatních jader bude mít druhý gradient přesně opačný účinek než první a tedy dojde k znovuobjevení příčné magnetizace těchto spinů. Tento postup se ještě jednou opakuje s jinou hodnotou gradientů pro odstranění zbytkového signálu vody. Po tomto pak následuje samotná akvizice signálu volné precese.



Obrázek 4.1: Pulsní sekvence zgesgp pro měření vodíkového spektra s potlačěním signálu rozpouštědla.

Parametr		Vzorky	
		s1fos12	s1fos14 s1fos16
Spektrometr	–	AVANCE	AVANCE III
Sonda	–	BBO	BBFO
Pulsní sekvence	–	zgesgp	
Základní frekvence [MHz]	BF1	500,13	500,13
Počet scanů	NS	256/1024	128/256
Počet dummy scanů	DS	0	4
Šířka spektra [ppm]	SW	24	24
Odsazení středu spektra [Hz]	O1	2350	2360
Počet bodů FIDu	TD	65536	65536
Relaxační prodleva mezi scany [s]	D1	1,0	1,0
Akviziční doba [s]	AQ	2,7300	2,7300
Délka $\frac{\pi}{2}$ pulsu [μ s]	P1	11	8,5
Útlum/výkon $\frac{\pi}{2}$ pulsu	PL1	5 dB	29 W
Délka selektivního π pulsu [μ s]	P12	4000	4000
Útlum/výkon selektivního π pulsu	SP1	43,4 dB	0,0031 W
Délka gradientního pulsu [μ s]	P16	1000	1000

Tabulka 4.3: Parametry měřící sekvence a spektrometru při měření teplotních řad.

4.5 Spektra ^1H - ^1H NOESY

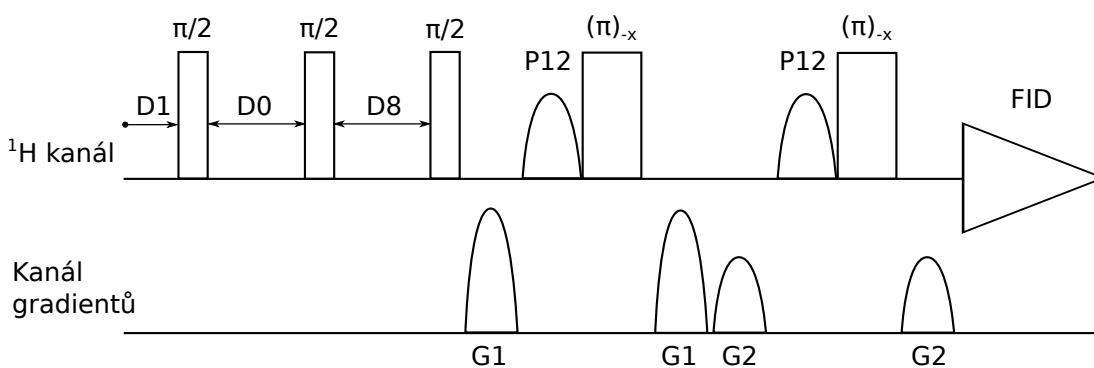
Pro přiřazení zejména signálů z aromatické části spektra byla změřena NOESY spektra. Nastavení parametrů spektrometru a pulsni sekvence (obr. 4.2) je v tabulce 4.4. Pulsni sekvence se skládá ze základni sekvence pro NOESY a před akvizicí je vložen blok pro potlačení signálu vody. Teplota experimentů byla volena pro každý vzorek individuálně především s ohledem na minimalizaci překryvů signálů.

Další procesování bylo provedeno v programu NMRPipe [13]. Spektra byla měřena Statesovou metodou, což pak umožnilo manuální fázování spektra v obou dimenzích a získání píků absorpčního charakteru. Pro zlepšení rozlišení spektra byl zdvojnásoben počet bodů v přímé i nepřímé dimenzi a doplněn nulami. Při procesování spekter byla použita exponenciální apodizace v přímé dimenzi a apodizace funkcí cosine-bell v dimenzi nepřímé.

Parametr		Vzorky	
		s1fos12	s1fos14 s1fos16
Spektrometr	–	AVANCE	AVANCE III
Sonda	–	BBO	BBFO
Pulsní sekvence	–	noesyegpph	
Teplota [K]	TE	300	284 ^a , 286 ^b
Základní frekvence [MHz]	BF1	500,13	500,13
Počet scanů	NS	256	128
Počet dummy scanů	DS	16	16
Počet experimentů	TD1	512	512
Šířka spektra v nepřímé dimenzi [ppm]	SW1	20	20
Šířka spektra v přímé dimenzi [ppm]	SW2	20	20
Odsazení středu spektra [Hz]	O1, O2	2350	2360
Počet bodů FIDu	TD2	4096	4096
Relaxační prodleva mezi scany [s]	D1	1,0	1,0
Akviziční doba [s]	AQ	0,2047	0,2047
Délka $\frac{\pi}{2}$ pulsu [μ s]	P1	11	8,5
Útlum/výkon $\frac{\pi}{2}$ pulsu	PL1	5 dB	29 W
Délka selektivního π pulsu [μ s]	P12	4000	4000
Útlum/výkon selektivního π pulsu	SP1	43,4 dB	0,0031 W
Délka gradientního pulsu [μ s]	P16	1000	1000
Směšovací čas [ms]	D8	250	200

Pozn: ^a Vzorek s1fos14, ^b Vzorek s1fos16.

Tabulka 4.4: Parametry měřicí sekvence a spektrometru při měření NOESY spekter.



Obrázek 4.2: Pulsní sekvence noesyegpph pro měření ^1H - ^1H NOESY spektra s potlačením signálu rozpouštědla.

5. Výsledky a diskuse

Na obrázku 5.1 je změřené ^1H spektrum vzorku s1fos14. Jsou na něm vyznačeny předpokládané oblasti posuvů jednotlivých vodíkových atomů. Nejvyšší posuv mají iminovodíky, které jsou navázány přímo na dusík heterocyklu. Vyskytují se jen u thyminových a guaninových bází. K dalšímu vyhodnocení jsou nevhodné, protože se při vyšších teplotách intenzivně vyměňují s vodou a jejich signál se vytrácí ze spektra. Stejně se chovají i aminovodíky Cyt-H41/H42, které mají nižší posuv. Ostatní aminovodíky Ade-H61/H62 a Gua-H21/H22 často ve spektru zcela chybí.

V aromatické oblasti spektra (7 – 9ppm) jsou signály, které nás zajímají nejvíce. Od každého nukleotidu je v této oblasti minimálně jeden signál, píky navíc nejsou štěpeny na multiplety s výjimkou cytosinového dubletu a slabě štěpeného thyminového kvartetu. I v této oblasti dochází k překryvům signálů, zejména u delších vzorků. Je jich však několikanásobně méně než v ostatních částech spektra.

Další signály vhodné k dalšímu zpracování jsou thyminové metyly. Mají velmi nízký posuv, a přestože se částečně překrývají s vodíky $\text{H}2'/\text{H}2''$ deoxyribózy, lze je odlišit na základě intenzity.

V ostatních oblastech jsou zejména signály vodíků deoxyribózy, které se vyznačují mnohačetným štěpením a malým rozsahem posuvů. To nevyhnutelně vede k neustálým překryvům, které znemožňují další analýzu. Vodíky $\text{H}3'$ mají navíc posuv podobný vodě, takže jejich signál bývá potlačen spolu s ní.

Další zpracování se tedy týká pouze signálů $\text{H}6/\text{H}8$ a $\text{H}2$ z aromatické oblasti spektra a signálů thyminových metylů.

5.1 Přiřazení signálů v aromatické části spektra

Přiřazování NOESY spekter bylo provedeno v programu Sparky [14]. Na obrázcích 5.2 - 5.4 jsou výřezy z oblasti NOESY spektra s kroskíky mezi vodíky $\text{H}6/\text{H}8$ x $\text{H}1'$. Na základě znalosti meziatomových vzdáleností v duplexu DNA [15] lze předvídat kroskíky vždy mezi vodíkem $\text{H}1'$ deoxyribózy a vodíky $\text{H}6/\text{H}8$ z navázané báze a báze následujícího nukleotidu. Tímto způsobem lze protrasovat celou sekvenci, jak je naznačeno v příslušných obrázcích. Stejně lze využít i vodíků $\text{H}2''$ a $\text{H}2'$. To se hodí v případě, kdy je přiřazení pomocí $\text{H}1'$ nejednoznačné.

V případě měřených vzorků byly kroskíky $\text{H}6/\text{H}8$ x $\text{H}1'$ relativně slabé, zejména u oligonukleotidu s1fos12. Dle [15] jsou vzdálenosti mezi $\text{H}1'$ a $\text{H}6/\text{H}8$ navázané báze a předchozí báze téměř stejné. Očekáváme tedy stejnou intenzitu obou kroskíků. Z přiložených obrázků vidíme, že tomu tak skutečně je u bází ve stonku s výjimkou kroskíku $\text{G}2\text{H}8$ s $\text{T}1\text{H}1'$, jenž je slabší než kroskík s $\text{G}2\text{H}1'$. Daleko výraznější rozdíly mezi kroskíky $\text{N}i\text{H}6/\text{H}8$ s $\text{N}i\text{H}1'$ a $\text{N}(i-1)\text{H}1'$ jsou u nukleotidů

tvořících smyčku, přičemž označení Ni znamená i-tý nukleotid v sekvenci. Krosník NiH6/H8 s NiH1' je daleko silnější než ten s N(i-1)H1', který mnohdy vůbec není vidět. Nejlépe pozorovatelné to je u T10. To značí odlišnou konformaci oligonukleotidu v této oblasti.

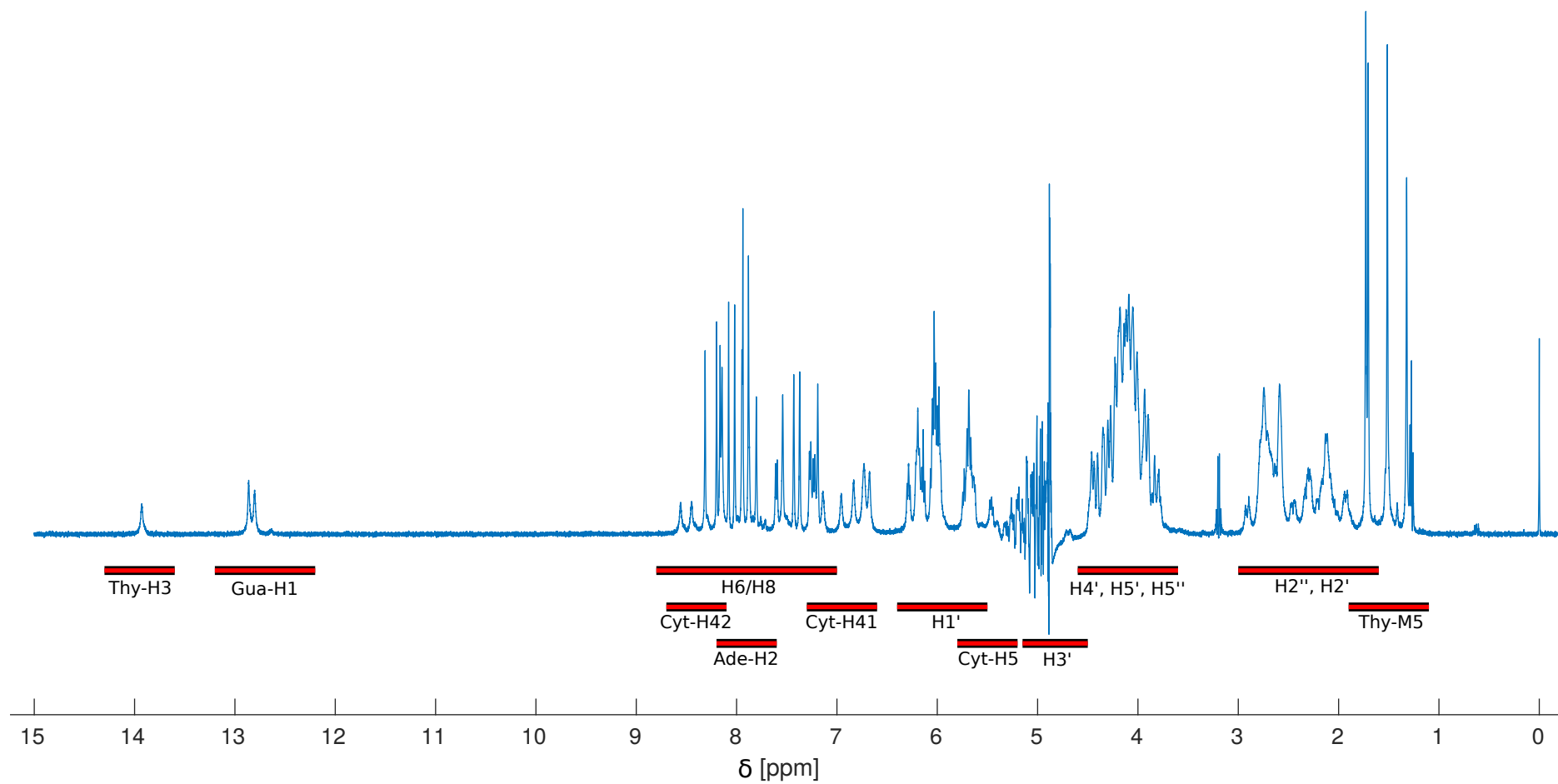
Intenzita krosníku NiH6/H8 x NiH1' závisí na dihedrálním úhlu N-glykosidické vazby mezi bází a deoxyribózou. V duplexu se vyskytuje konformace označovaná jako *anti*. Konformaci, kdy je báze vůči *anti* otočená o 180° kolem N-glykosidické vazby, nazýváme *syn*. Intranukleotidová vzdálenost mezi vodíky H1' a H6/H8 je největší při konformaci *anti* – 3,6Å a nejmenší při konformaci *syn* – 2,5Å. Vyšší intenzitu příslušných krosníků lze vysvětlit tím, že báze smyčkových nukleotidů jsou flexibilnější a náhodně se reorientují v prostoru. Střední hodnota vzdálenosti mezi H1' a H6/H8 je pak menší než odpovídá čistě konformaci *anti*. Nukleotid T10, který má příslušný krosník nejsilnější, má rozsah úhlů v rámci kterých se může pohybovat největší. To potvrzuje i skutečnost, že ve spektru není krosník T10M5 x T10H1', který by měl být vidět jen v *anti* konformaci a který je přítomen u ostatních smyčkových thymínů.

Krosníky H6/H8 s H2' a H2'' potvrzují správnost přiřazení. Anomálie v intenzitách se zde také vyskytují, ale spektrum je příliš nepřehledné na detailní analýzu (časté jsou překryvy zejména adeninových vodíků H2'/H2'').

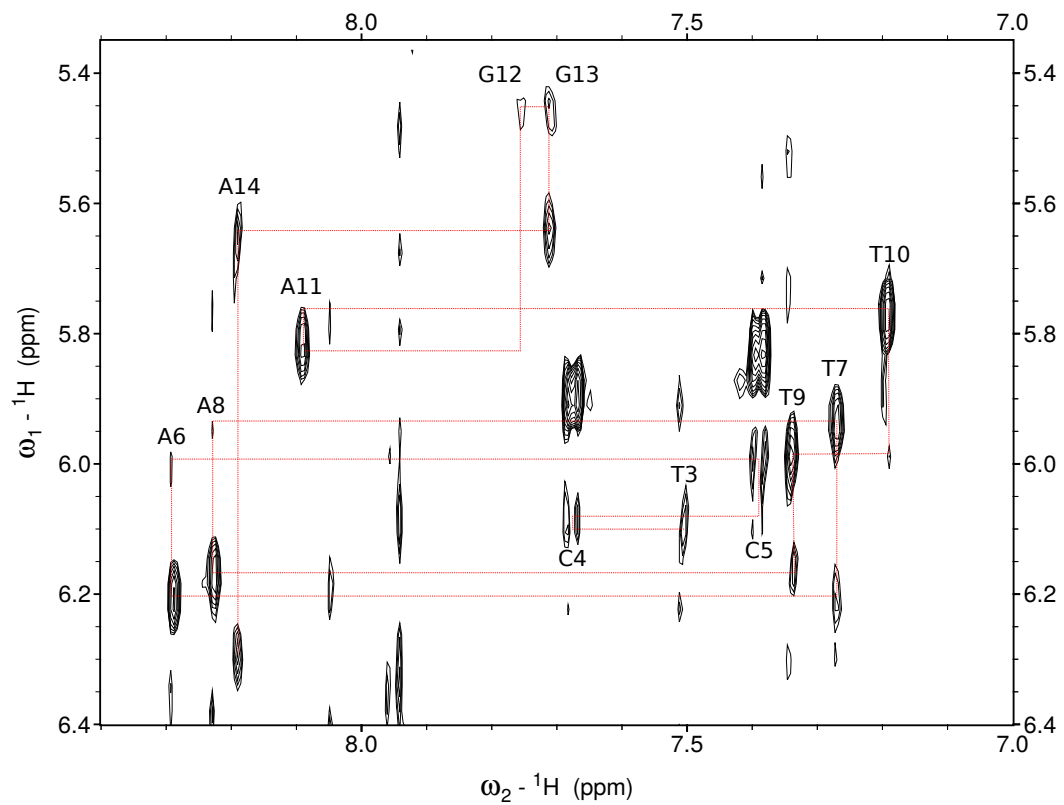
Obtížné bylo přiřazení adeninových H2. Vodíky A14H2 a A16H2 tvoří stonek vlásenky a mají dostatek krosníků s okolím, zejména s iminovodíky okolních bází. Naopak vodíky A6H2, A8H2 a A11H2, které přísluší nukleotidům ve smyčce, mají krosníků málo, ty jsou velmi slabé a ne zcela jednoznačné. Proto byly příslušné signály vytrasovány do oblasti vysokých teplot a přiřazeny s pomocí predikcí posuvů v single strandové DNA [16, 17].

Po základním přiřazení lze nalézt další zvláštnosti. Velmi nízký posuv C5H2' a C5H2'' značí zvláštní konformaci v oblasti mezi nukleotidy C5 a A6 (deoxyribóza C5 je mezi nimi) nacházejícími se na rozhraní smyčky a stonku vlásenky. Další zvláštností je přítomnost krosníků adeninových H2 se signály thyminových methylů M5 u nukleotidů ve smyčce. Zvláště výrazný je krosník T10M5 x A11H2. To může být způsobeno vybočením obou nukleotidů do stran, nebo výše zmíněným natočením báze T10.

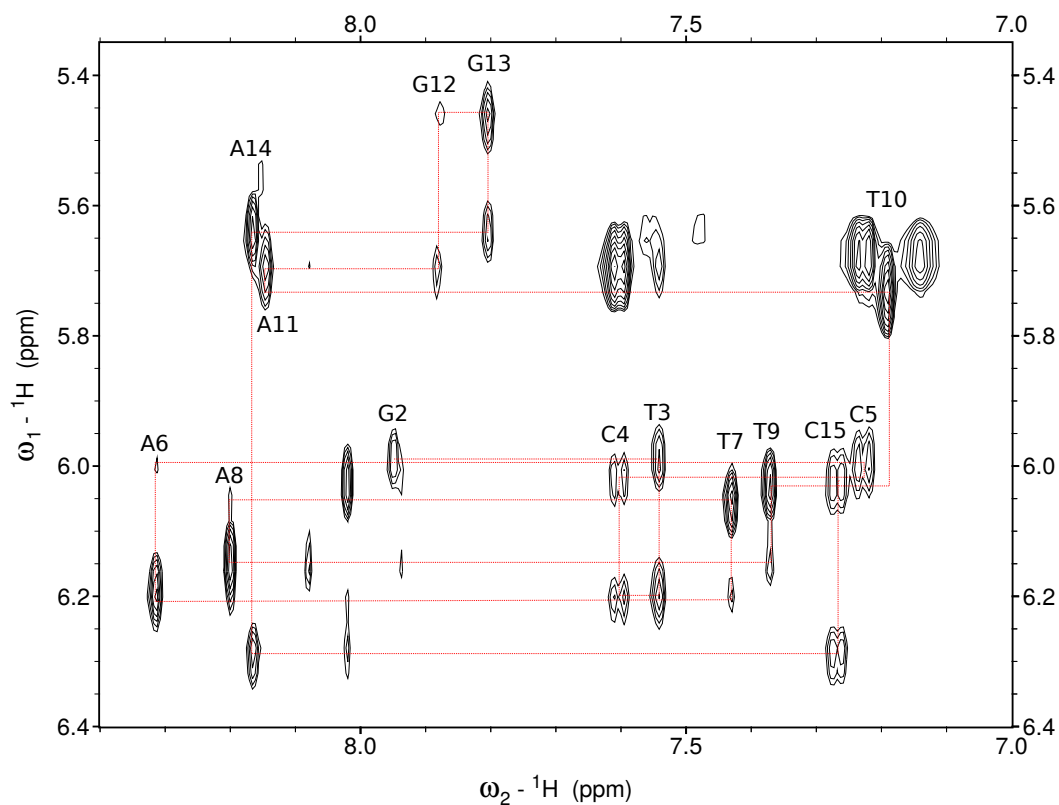
Přiřazené signály v aromatické oblasti spektra jsou na obrázcích 5.5 až 5.7



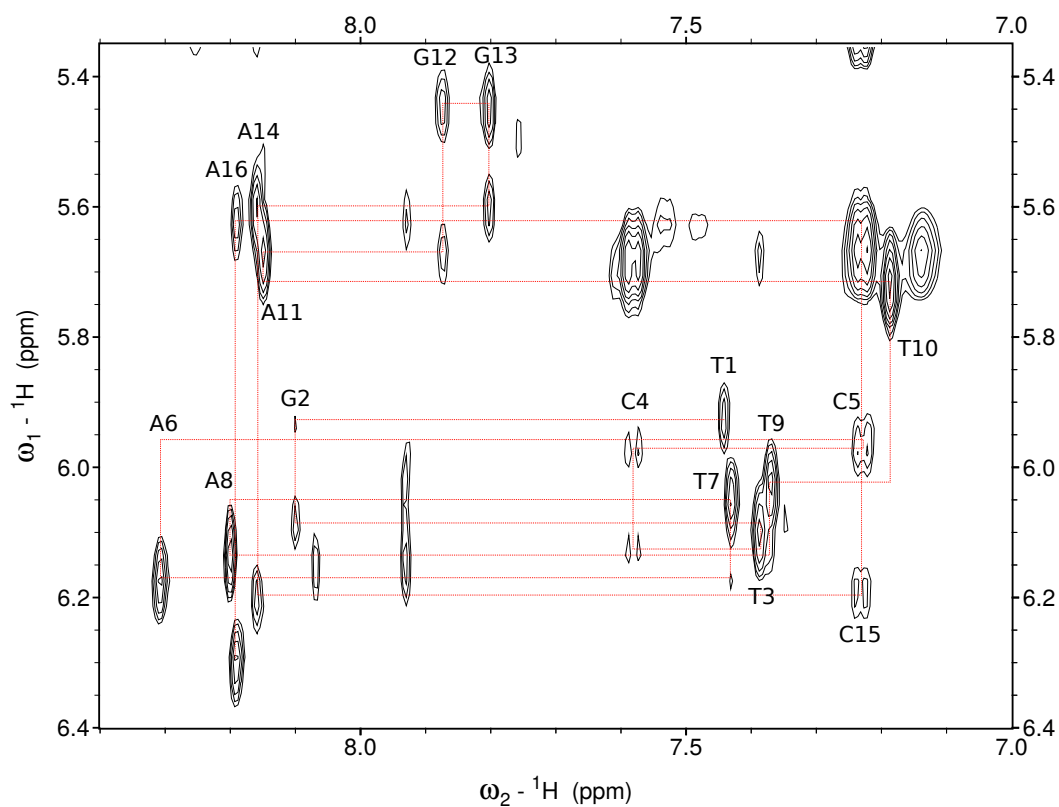
Obrázek 5.1: Spektrum vzorku s1fos14 při teplotě 284 K s vyznačenými oblastmi posuvů jednotlivých vodíků.



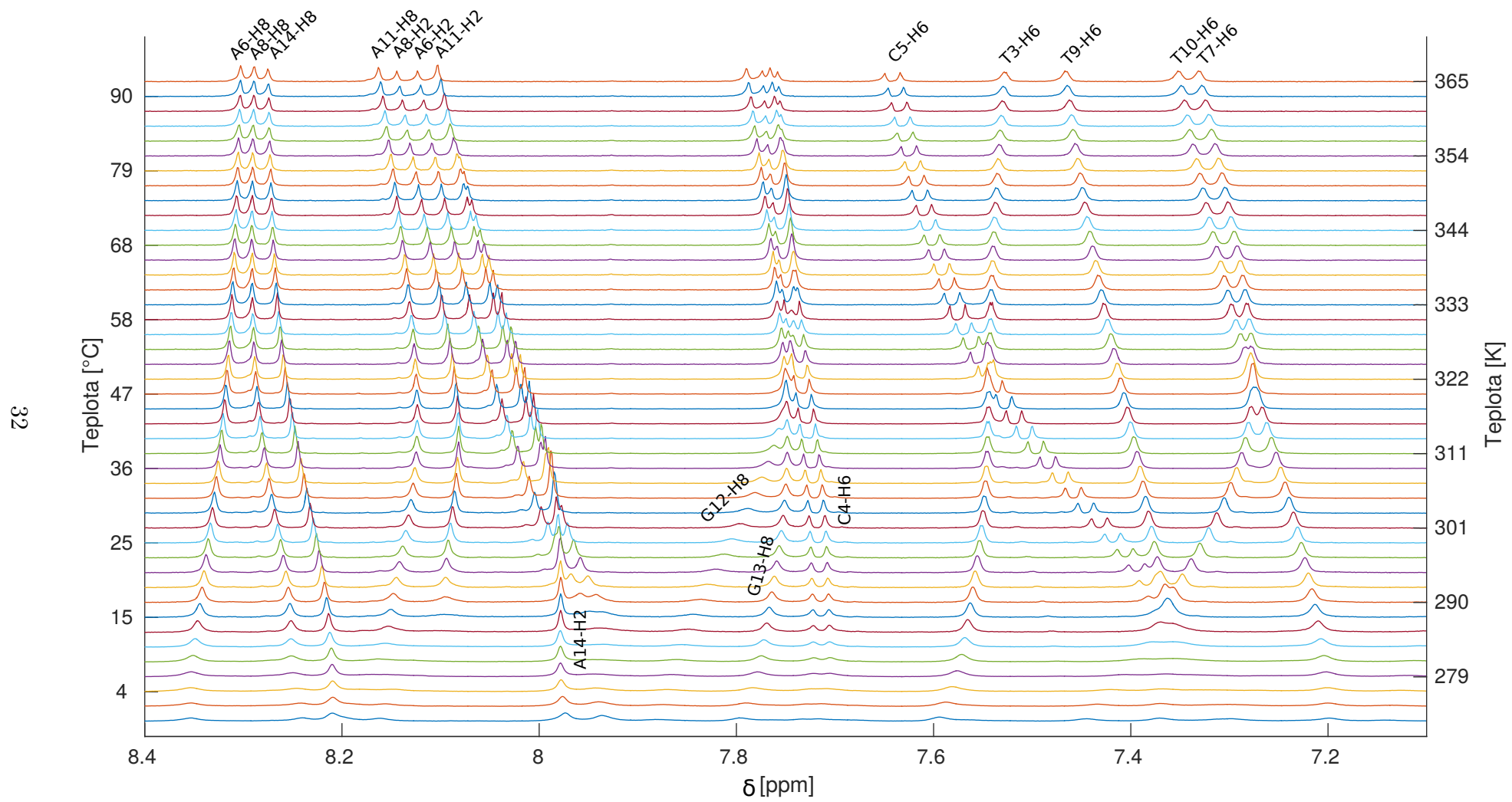
Obrázek 5.2: Výřez z NOESY spektra vzorku s1fos12 při teplotě 301 K (28 °C). Oblast s krosníky H6/H8 x H1'.



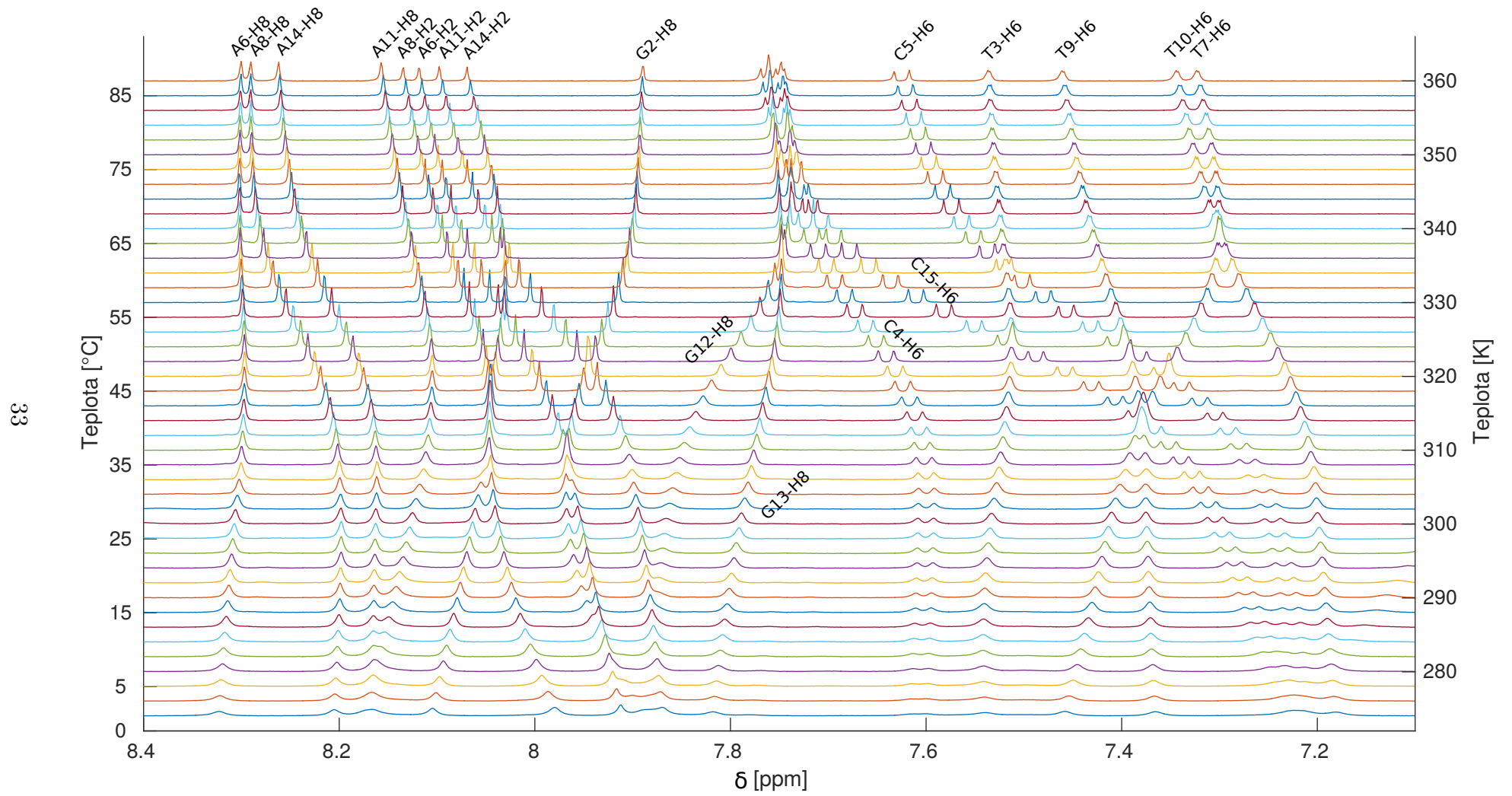
Obrázek 5.3: Výřez z NOESY spektra vzorku slfos14 při teplotě 284 K (11 °C). Oblast s krospekty H6/H8 x H1'.



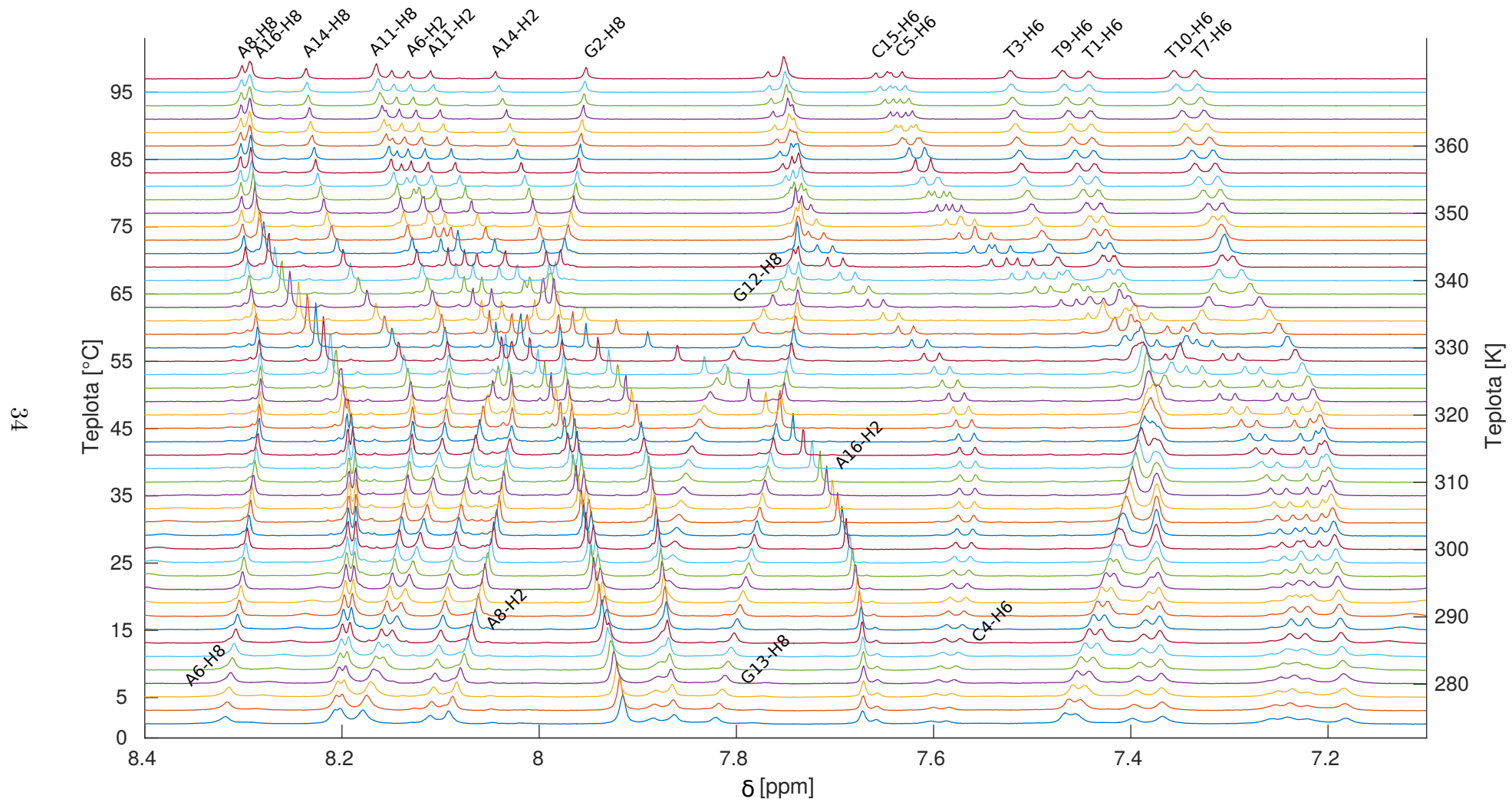
Obrázek 5.4: Výřez z NOESY spektra vzorku slfos16 při teplotě 286 K (13 °C). Oblast s krospekty H6/H8 x H1'.



Obrázek 5.5: Přirazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos12.



Obrázek 5.6: Přiřazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos14.



Obrázek 5.7: Přiřazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos16.

5.2 Fitování spekter, vyhodnocení chemických posuvů

V naměřených spektrech vidíme změny chemických posuvů s teplotou, což značí přítomnost chemické výměny. Vzhledem k tomu, že signály se nerozšiřují, ale naopak jsou relativně úzké v téměř celém rozsahu teplot, můžeme předpokládat rychlou chemickou výměnu. Při nejnižších teplotách je rozšíření signálů způsobeno spíše vyšší viskozitou roztoku, což zrychluje příčné relaxace a to pak vede k širším píkům.

K fitování spekter byl použit program MATLAB s toolboxem Asymexfit [11], který umí fitovat spektra tvarem při chemické výměně. Spektra však byla fitována obyčejnými Lorentzovskými křivkami, jelikož změna pološířek signálů způsobená výměnou je tak malá, že nemůže být spolehlivě zachycena. Z toho plyne, že nelze určit kinetické veličiny chemické výměny, zejména aktivační energii ΔG_A . Z teplotní závislosti hodnoty chemického posuvu lze však určit změnu Gibbsovy energie při tvorbě nebo rozpadu vlásenky a další rovnovážné termodynamické parametry.

Chemické posuvy aromatických vodíků H6/H8 a H2 a methylů M5 všech tří vzorků jsou vyneseny na obrázcích 5.11 až 5.15. Také je na nich vyznačen předpokládaný posuv jednotlivých signálů v B-duplexu [18]. Vidíme, že nukleotidy ve stonku vlásenky poměrně dobře souhlasí s predikcí pro posuvy v duplexu (obr. 5.11, 5.13). Výjimku tvoří poslední bázeový pár před smyčkou C5·G12, který se odchyľuje o téměř 0,3 ppm. U něj se to však dá předpokládat.

U adeninových vodíků H8 ve smyčce (obr. 5.12) taktéž vidíme dobrou shodu s predikcí. Naopak thyminové H6 se odchyľují od předpovědi o zhruba 0,2 ppm, tedy značně.

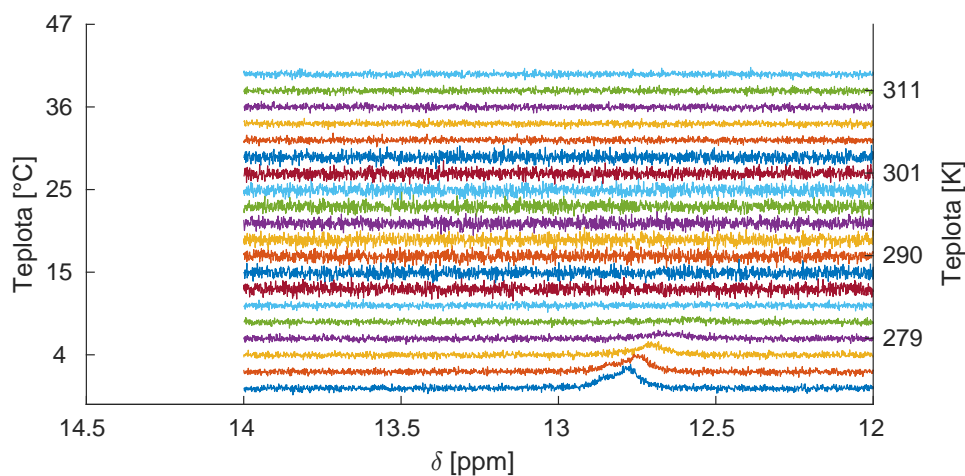
Ze struktury jednotlivých bází lze předpokládat, že adeninové a guaninové vodíky H8 budou méně citlivé k případným vodíkovým vazbám mezi nukleotidy. Naopak vodíky H2 jsou v blízkosti dusíku N3, jenž přímo tvoří vodíkový můstek, a jsou tedy velmi citlivým ukazatelem párování bází. Pohledem na obrázek 5.14 s posuvy adeninových H2 se můžeme přesvědčit, že tomu tak skutečně je. Posuvy v duplexu by měly být značně odlišné oproti těm naměřeným, až o 0,7 ppm. A to i v případě adeninů ve stonku, které by strukturu podobnou duplexu měly tvořit, a přesto se liší od predikce o přibližně 0,2 ppm. Největší rozdíly jsou však u A8H2 a A11H2. U A8, který je ve středu smyčky, to překvapivé není, avšak u A11H2, jenž je na konci smyčky, bychom čekali, že rozdíl bude menší, podobný jako u A6H2, což je také nukleotid na konci smyčky, ale od predikce se odchyľuje jen o 0,3 ppm.

Thyminové metyly (obr. 5.15) také vykazují značné odchylky od předpovědi. Nejvýraznější je to u smyčkových nukleotidů T7 a T9 ($> 0,2$ ppm). Naopak T10, přestože je druhý od konce smyčky, se shoduje nejlépe. Zajímavá je však výrazná

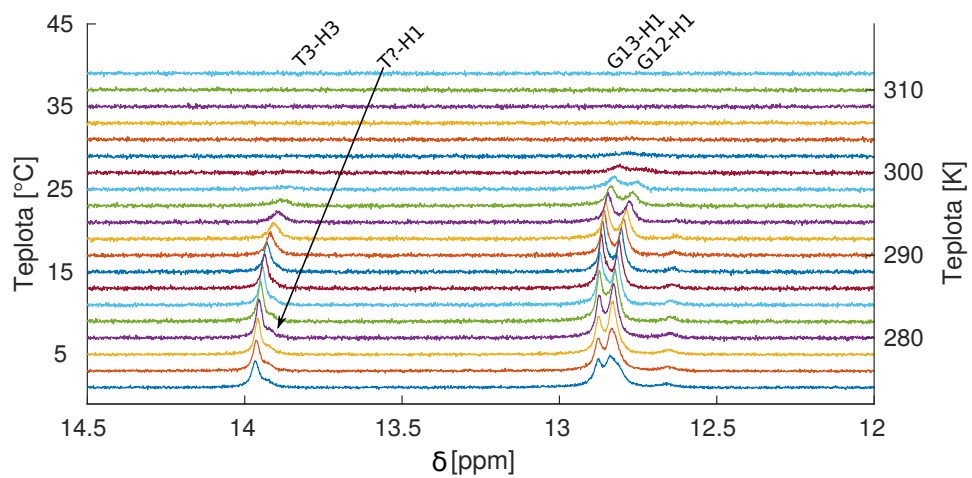
změna směrnice posuvů při nízkých teplotách u T3M5 po zkrácení vzorku na 14 nukleotidů.

Obecně můžeme říci, že posuvy vodíků H6/H8 u nukleotidů ve smyčce nejsou příliš závislé na délce vzorku, samozřejmě se ale liší v oblasti tání. Naopak ve stonku dochází při zkracování vzorku ke značným změnám. Zvláštní chování vykazuje T3H6. Po zkrácení vzorku ze 16 nukleotidů na 14 dochází k velké změně v posuvu. Při dalším zkrácení na 12 nukleotidů se posuv prakticky nezmění.

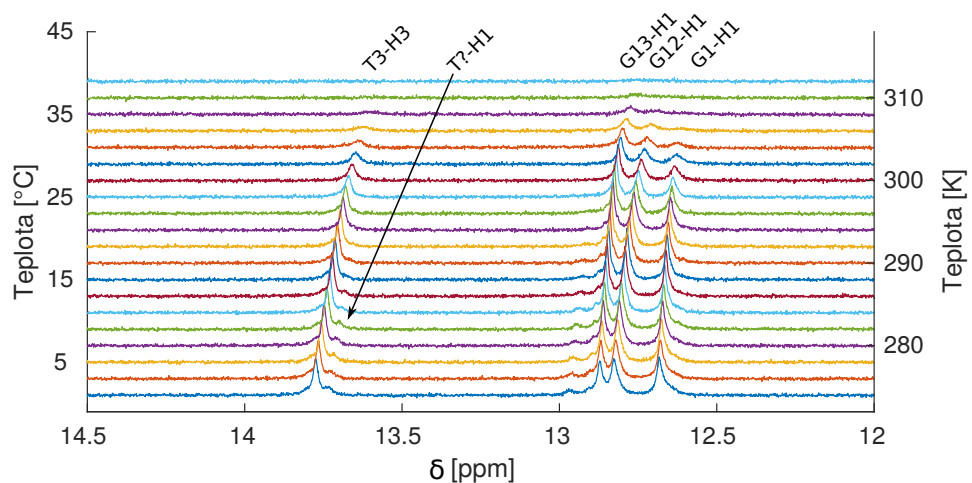
Na obrázcích 5.8 až 5.10 je oblast spekter se signály iminodíků. U nich dochází k chemické výměně s vodou, a proto se při vyšších teplotách vytrácejí ze spektra. V případě vzorku s1fos12 lze vidět pouze slabý signál. U zbylých vzorků pozorujeme všechny tři guaninové vodíky H1, přičemž u vzorku s1fos14 je signál příslušející koncovému nukleotidu G2H1 velmi slabý. Což se dá vysvětlit rychlejší výměnou s vodou, jelikož je jí vystaven více než ostatní guaniny. Z thyminových vodíků H3 vidíme pouze jeden signál odpovídající thyminu T3. Lze si také všimnout náznaku dalšího píku. Ten se nepodařilo přiřadit pomocí NOESY spekter a zároveň nepřísluší koncovému T1, protože je pozorovatelný i u kratšího vzorku. Jeho přítomnost může ukazovat na párování některého z thyminů ve smyčce, nebo obecně horší přístup vody ke smyčkovým nukleotidům.



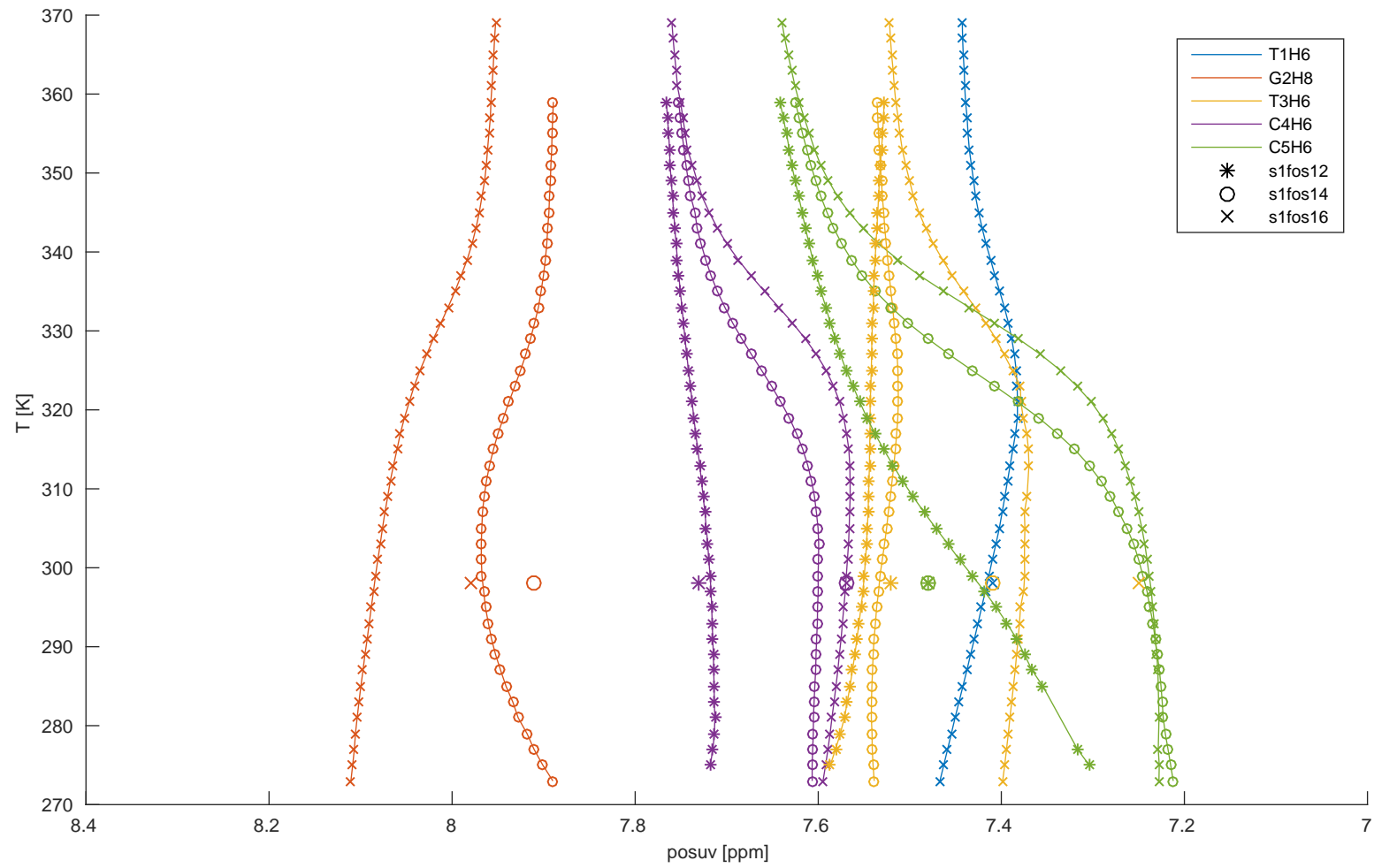
Obrázek 5.8: Výřez ze spekter vzorku s1fos12 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.



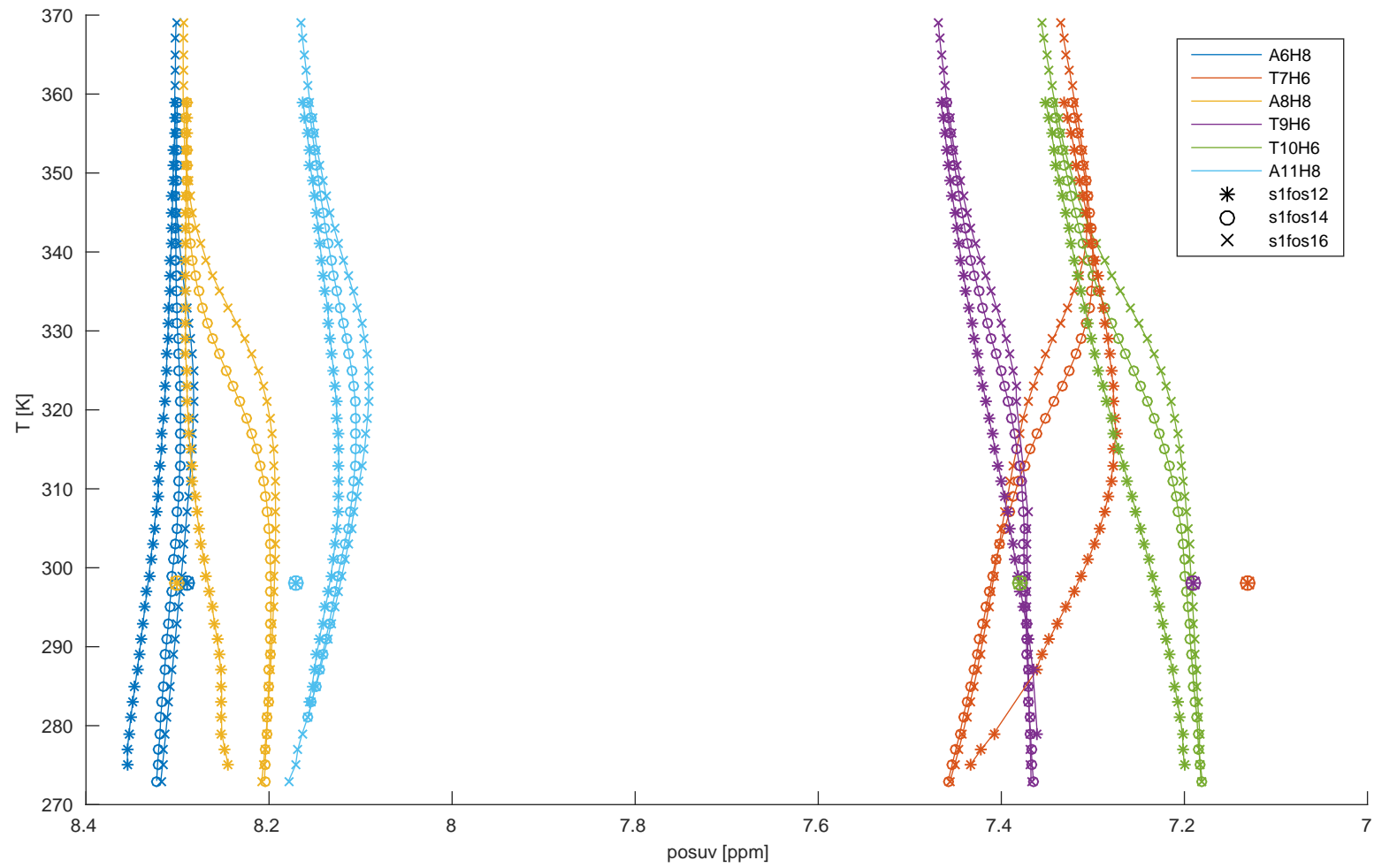
Obrázek 5.9: Výřez ze spekter vzorku s1fos14 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.



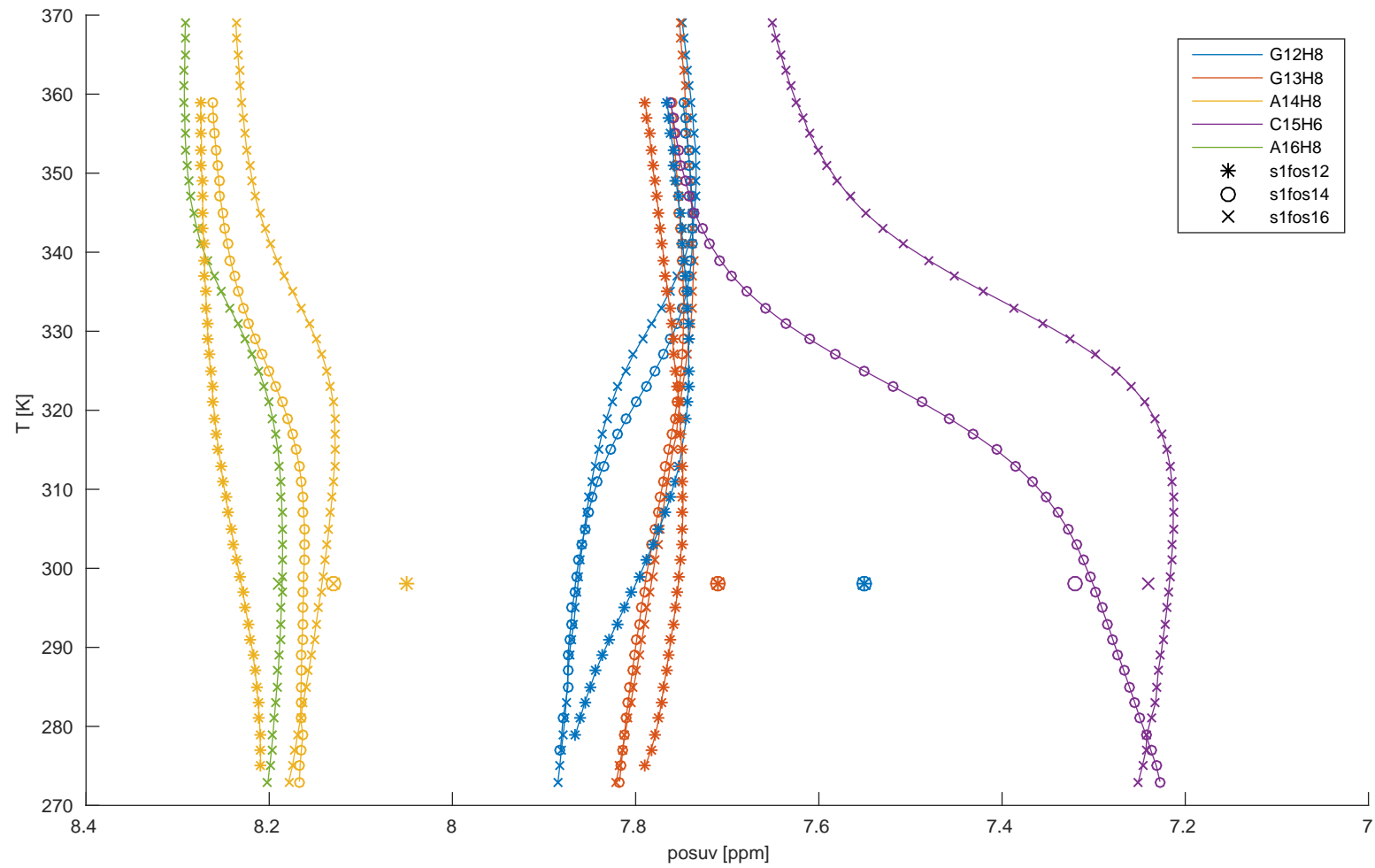
Obrázek 5.10: Výřez ze spekter vzorku s1fos16 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.



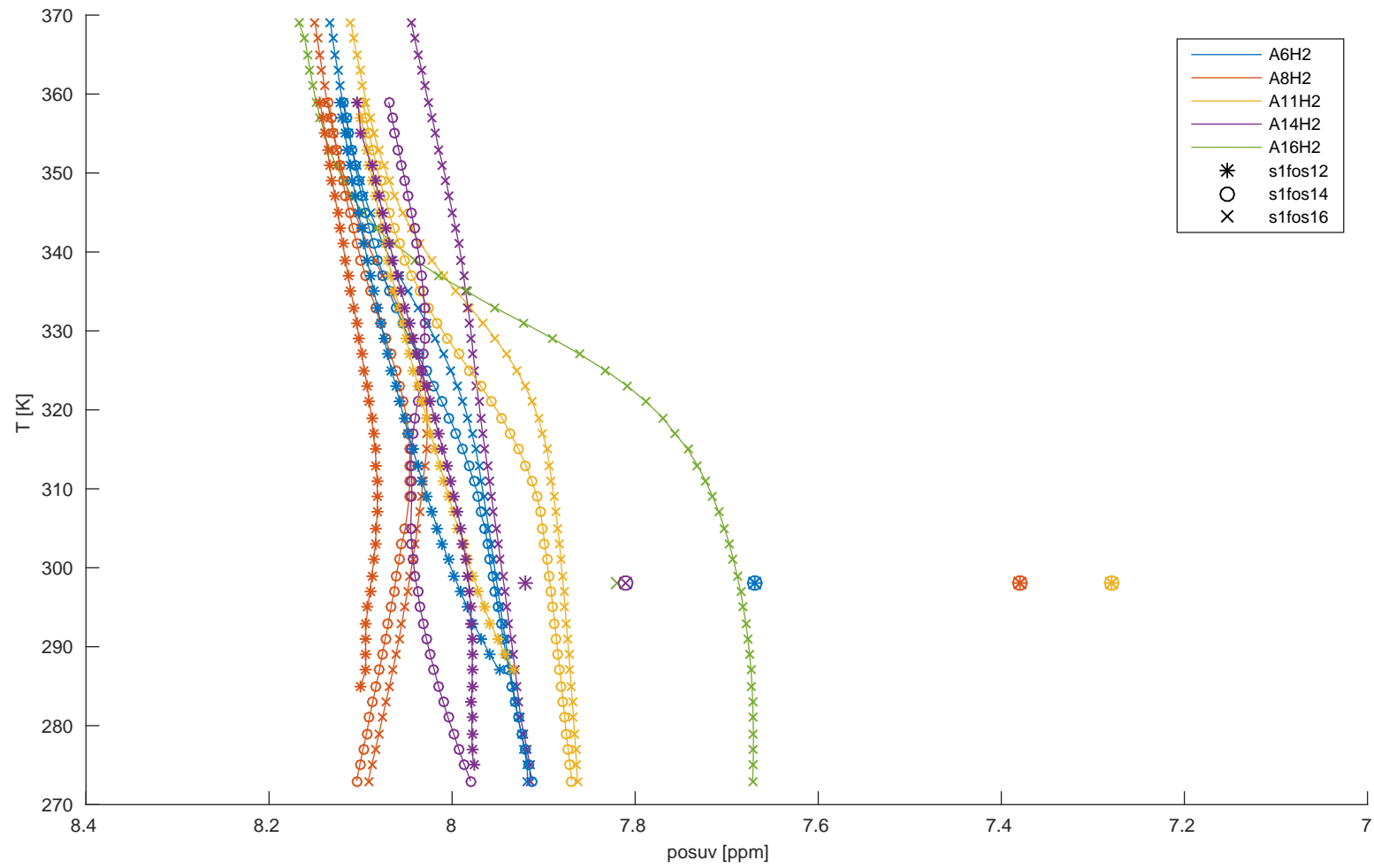
Obrázek 5.11: Srovnání posuvů H6/H8 ve stonku. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].



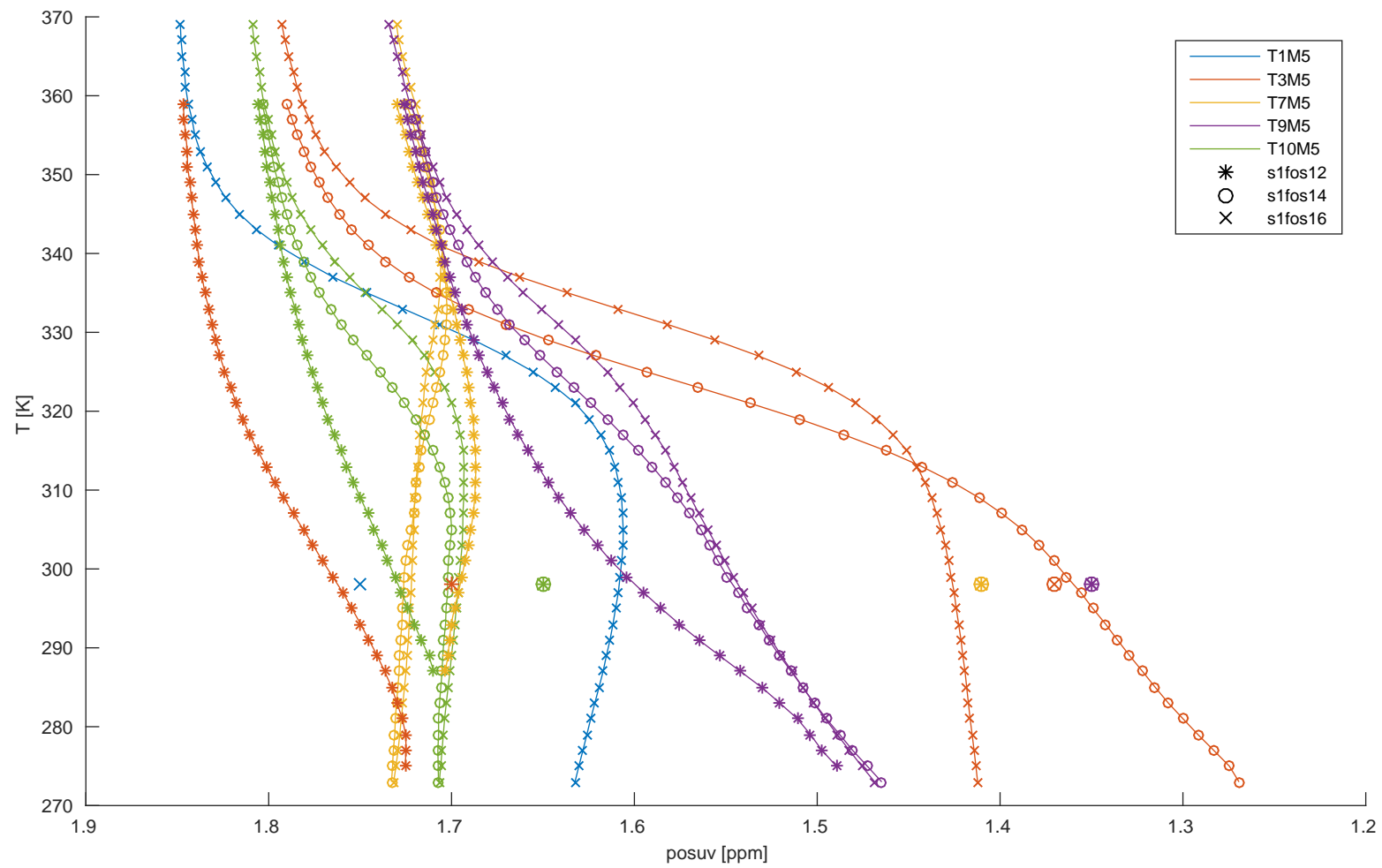
Obrázek 5.12: Srovnání posuvů H6/H8 ve smyčce vlásenky. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].



Obrázek 5.13: Srovnání posuvů H6/H8 ve stonku vlásenky. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].



Obrázek 5.14: Srovnání posuvů AXH₂. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].



Obrázek 5.15: Srovnání posuvů methylů TXM5. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].

5.3 Fitování chemických posuvů

Chemické posuvy δ byly fitovány sigmoidální teplotní závislostí odvozené ze vztahu (2.12)

$$\delta = \frac{\delta_H(T) - \delta_S(T)}{1 + e^{\frac{\Delta H}{RT} - \frac{\Delta S}{R}}} + \delta_S(T), \quad (5.1)$$

kde

$$\delta_H(T) = a + bT \quad (5.2)$$

je nízkoteplotní asymptota popisující chemický posuv vlásenek a

$$\delta_S(T) = c + dT \quad (5.3)$$

je asymptota vysokoteplotní a přísluší posuvům nespárovaných vláken. Koeficienty $a, b, c, d, \Delta H, \Delta S$ se fitují.

Ze získaných parametrů ΔH a ΔS byla určena teplota tání vlásenky T_m a změna Gibbsovy energie ΔG_{37} pro každý signál zvlášť. Špatně se fitoval vzorek s1fos12. Ten má nízkou teplotu tání, a tudíž neznáme hodnoty posuvů, které by odpovídaly složené vlásence bez chemické výměny. Fitovací procedura tak musí tuto nízkoteplotní asymptotu určit z tvaru sigmoidy. Problém je, že zhruba za inflexním bodem sigmoidy má na její tvar hlavní vliv směrnice vysokoteplotní asymptoty a termodynamické parametry.

Získané hodnoty T_m a ΔG_{37} jsou srovnány na obrázcích 5.16 až 5.18. Na nich je vidět, že hodnoty těchto parametrů se shodují v rámci celého oligonukleotidu. Signály, jejichž posuvy se se změnou teploty příliš nemění, byly ze srovnání vyřazeny, jelikož chyba fitu je v takovém případě značná.

Z těchto výsledků lze usoudit, že hairpin se rozpadá najednou koordinovaně, což se dá vzhledem k jeho velikosti očekávat. Je možné, že některé části vlásenky jsou o trochu stabilnější, avšak menší rozdíly než zhruba 1°C nejsme schopni spolehlivě detekovat.

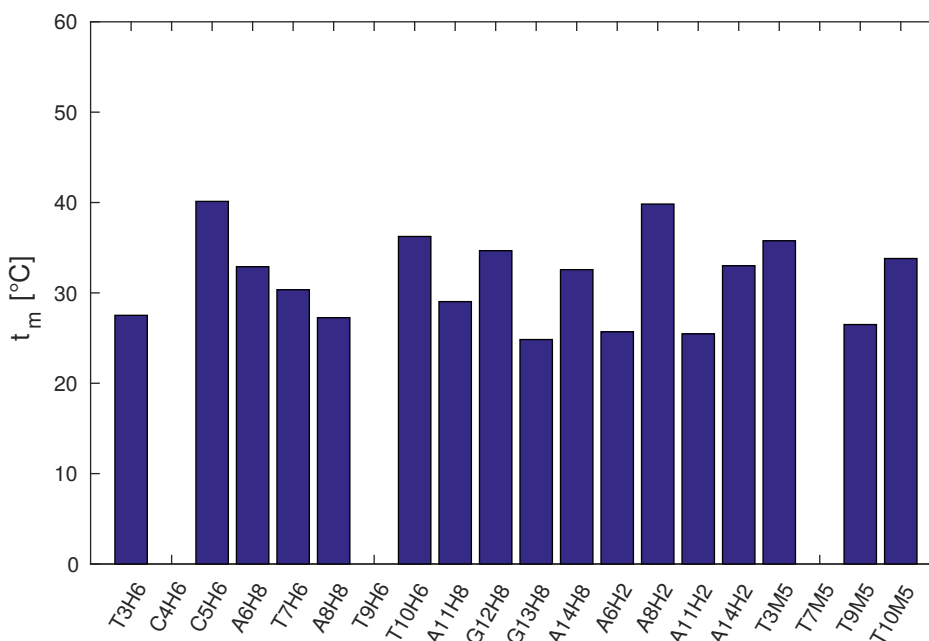
Na základě tohoto předpokladu byly sigmoidy každého vzorku nafitovány globálně, přičemž sdílenými parametry byly změna enthalpie ΔH a entropie ΔS . Tento postup by měl vést k přesnějšímu stanovení těchto parametrů ve srovnání s nezávislým fitováním každého nukleotidu. V tabulce 5.1 jsou pak příslušné parametry včetně teploty tání T_m a změny Gibbsovy energie ΔG_{37} . Nafitované závislosti jsou pak v příloze. Je obecně známo, že parametry ΔH a ΔS vykazují značnou korelaci. Chyba proto byla určena z matice kovariancí jednotlivých parametrů a příslušných reziduí fitu. Proto vychází chyba ΔG_{37} a T_m menší než bychom očekávali při zjednodušeném přenosu chyb, který nebere do úvahy korelace jednotlivých veličin. Chyby byly dále navýšeny o nejistotu v určení teploty $\pm 0,5^\circ\text{C}$.

Na první pohled je zvláštní, že zkrácení sekvence délky 16 o koncové nukleotidy vede jen k mírné destabilizaci. Naopak při zkrácení z 14 nukleotidů na 12

je ztráta stability značná. Srovnání změřených termodynamických parametrů s predikcí dává dobrou shodu u vzorku s1fos16 a s1fos12. Vzorek s1fos14 se zdá být stabilnější než je předpověď. To může souviset s nějakou konformační změnou ve stonku po odejmutí koncového bázevého páru, což by také vysvětlovalo anomální chování nukleotidu T3, které bylo zmíněno v předchozí sekci.

Vzorek	t_m [°C]	ΔG_{37} [J/mol]	ΔH [J/mol]	ΔS [J/mol/K]
s1fos12	29 ± 2	$1,8 \pm 0,5$	-63 ± 1	-210 ± 4
s1fos14	$52,8 \pm 0,6$	$-6,4 \pm 0,2$	-131 ± 1	-401 ± 2
s1fos16	$60,6 \pm 0,6$	$-10,0 \pm 0,2$	-141 ± 1	-422 ± 2
s1fos16-UV [2]	57,3	-8,7	-140	-426

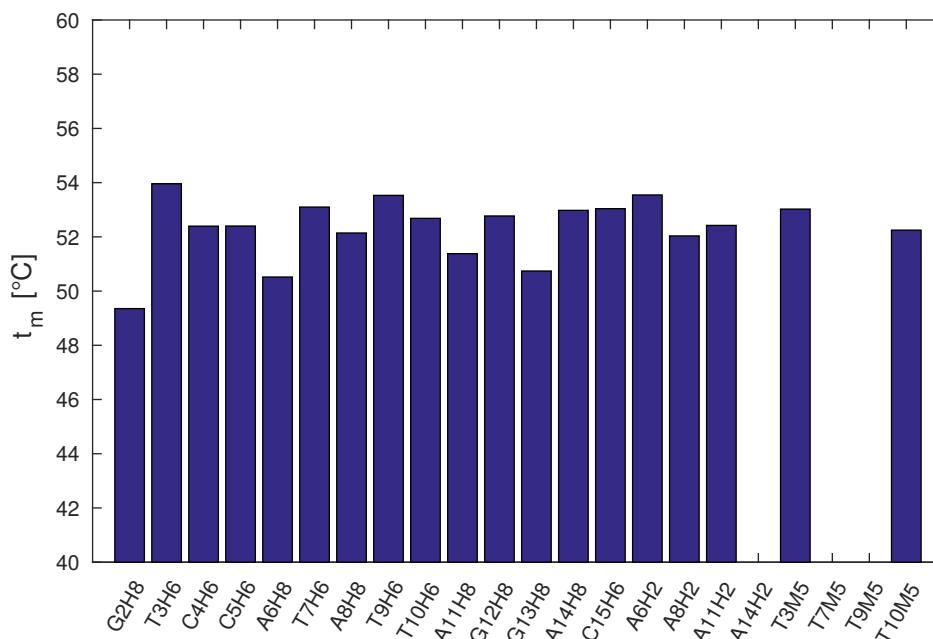
Tabulka 5.1: Shrnutí termodynamických parametrů získaných z globálního fitování. K chybám byla připočtena nejistota v určení teploty $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Na poselndním řádku jsou pro srovnání termodynamické hodnoty sekvence s1fos16 naměřené v práci [2] pomocí UV spektroskopie.



Obrázek 5.16: Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos12 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů.

5.4 Vyhodnocení pološířek signálů

Na obrázcích 5.19 až 5.21 je srovnání převrácených hodnot pološířek signálů T_2^* při vybraných teplotách pro každý vzorek. Některé hodnoty mohou být špatně

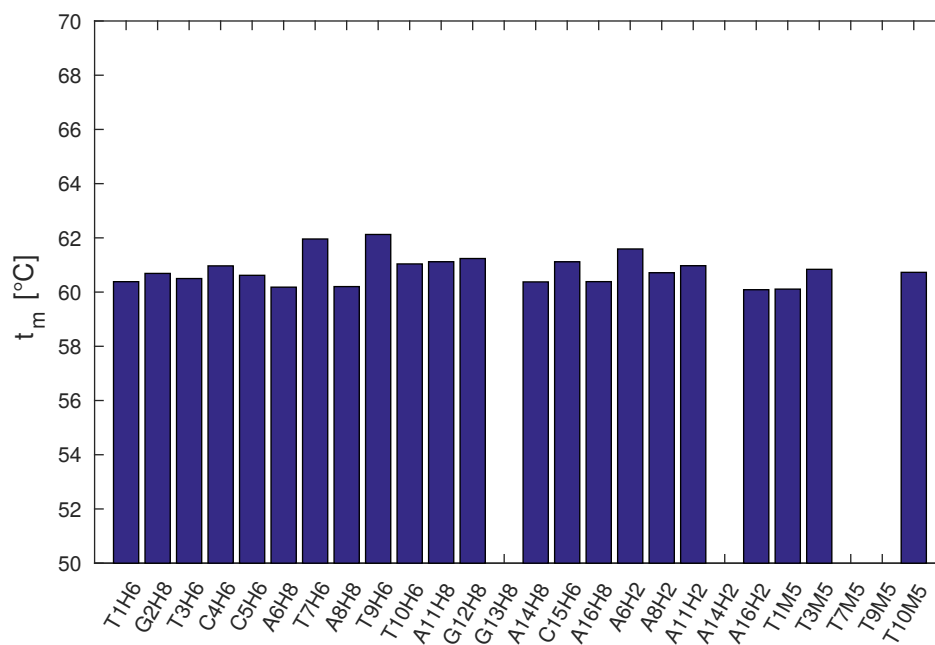


Obrázek 5.17: Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos14 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů.

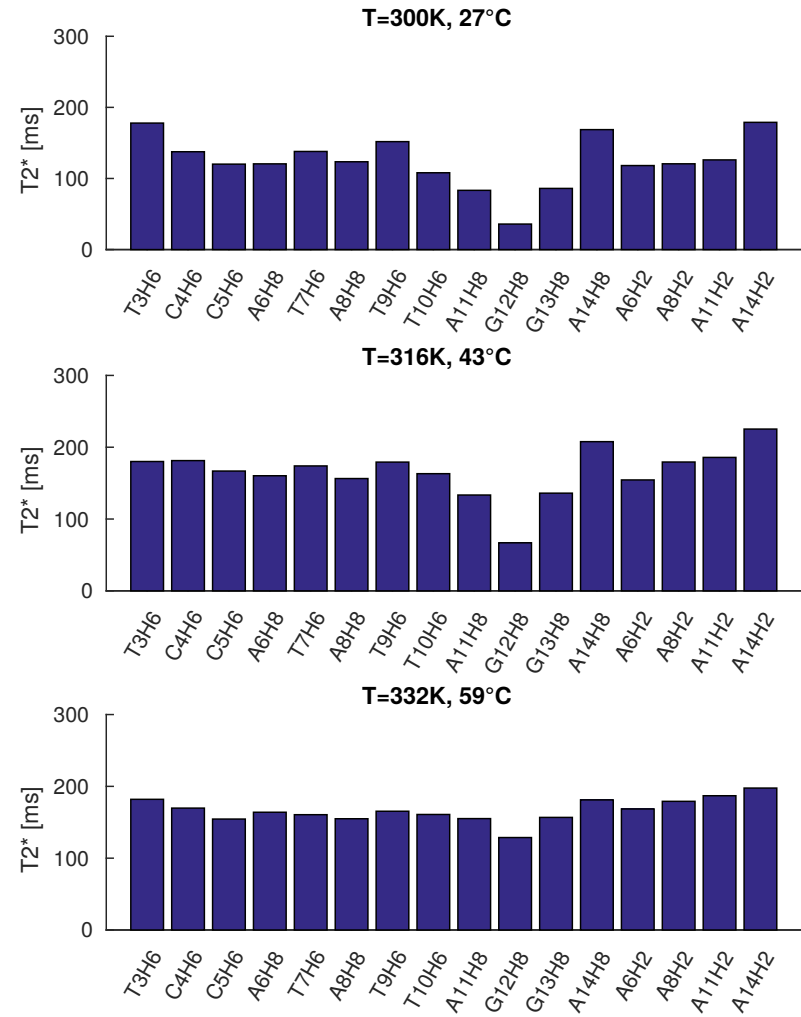
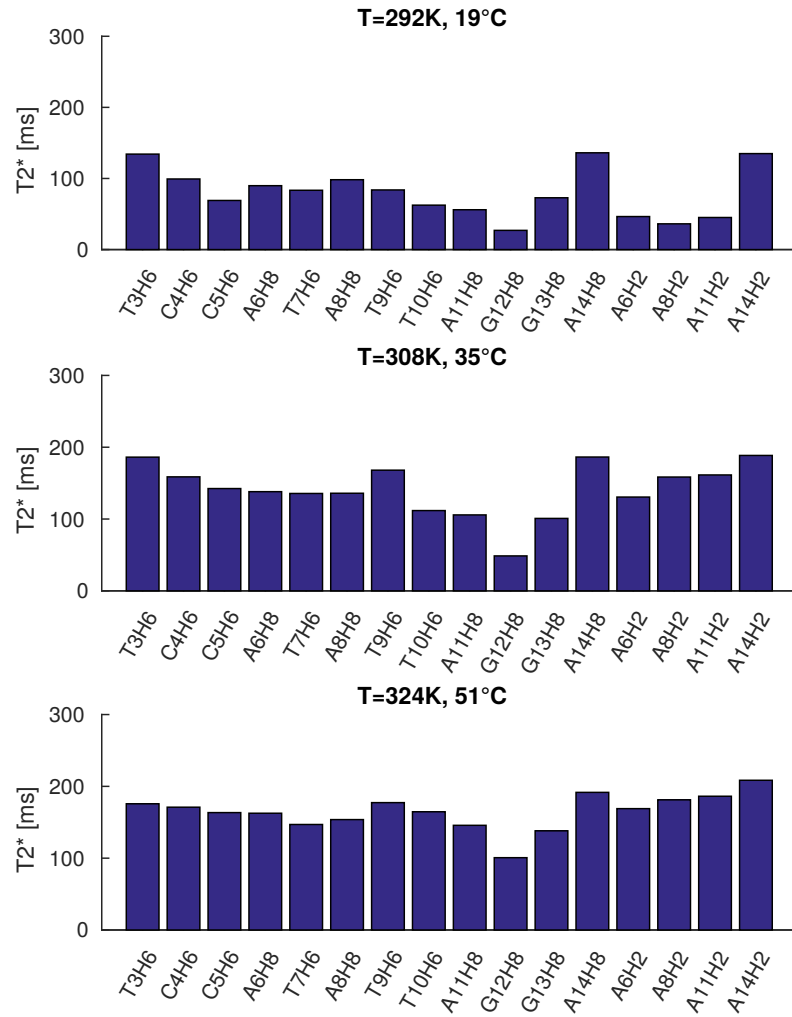
určeny z důvodu náhodného překryvu. Absolutní hodnoty T_2^* se nedají mezi vzorky příliš porovnávat. Vzorky se liší velikostí molekuly, a tedy mají různé relaxační časy T_2 . Navíc byl vzorek s1fos12 měřen na jiném spektrometru a nepodařilo se ho manuálně nashimovat tak dobře jako zbylé dva, které byly shimovány automaticky. Zároveň se homogenita pole může měnit mezi různými teplotami v rámci jednoho vzorku.

Je možné si však všimnout, že některé signály jsou systematicky širší než jiné. Nejširší signál mají vodíky G12H8 a C5H6. Naopak nejúžší jsou signály u konce oligonukleotidu a okolo středu smyčky. Toto může částečně souviset s vyšší flexibilitou konců a smyčky. Vyšší pohyblivost znamená pomalejší relaxace a tedy užší signál. Nejširší píky se však odlišují příliš na to, aby rozdíl ve flexibilitě byl jediný faktor.

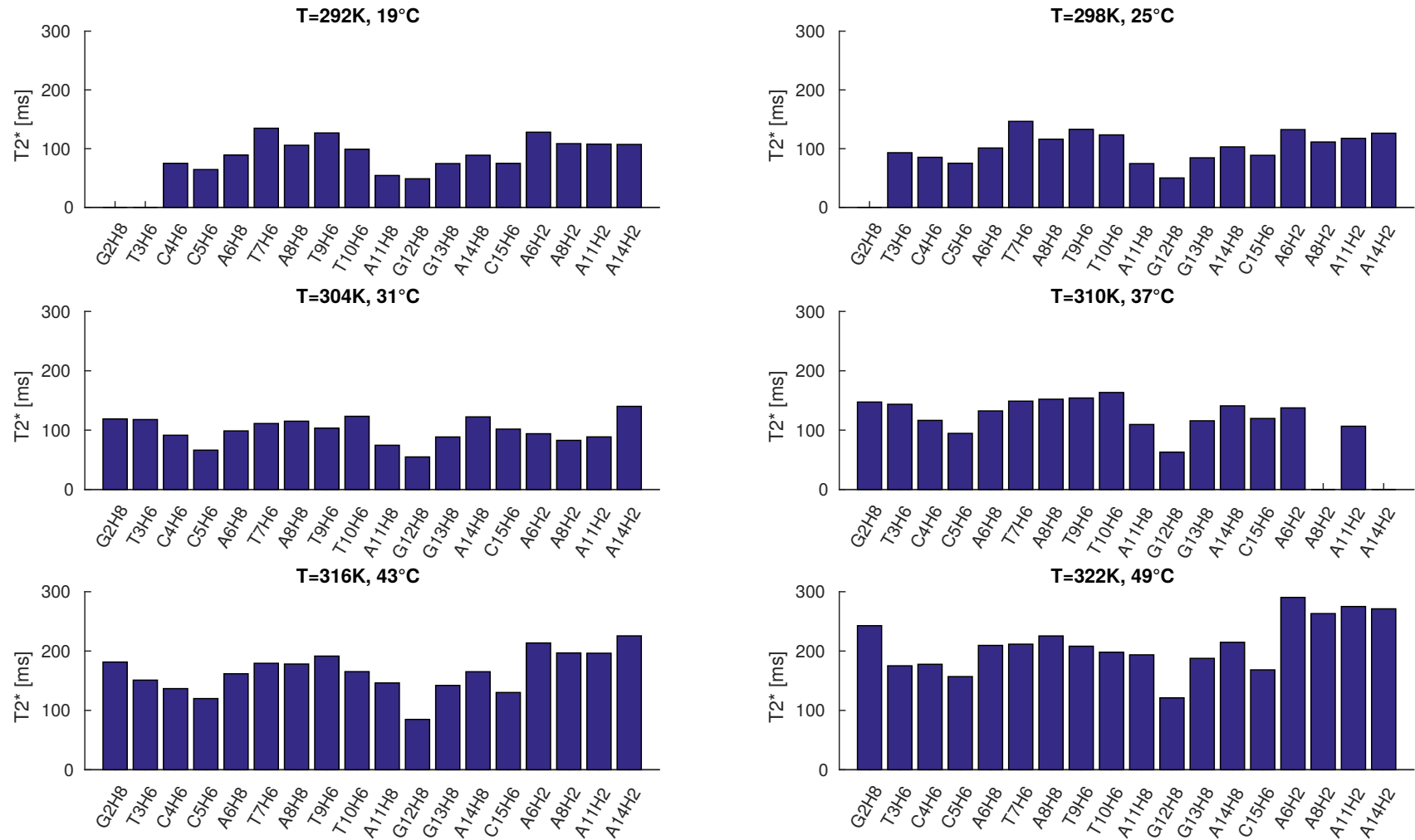
Je pravděpodobné, že rozšíření píků je způsobeno chemickou výměnou. Jedna z možností je vysoká aktivační energie tvorby a rozpadu páru C5 · G12, což může být způsobeno blízkostí smyčky. Zvýšení aktivační energie způsobuje zpomalení chemické výměny a rozšíření píku. Další možností je, že se jedná o zcela jinou chemickou výměnu v oblasti přechodu mezi smyčkou a stonkem vlásenky.



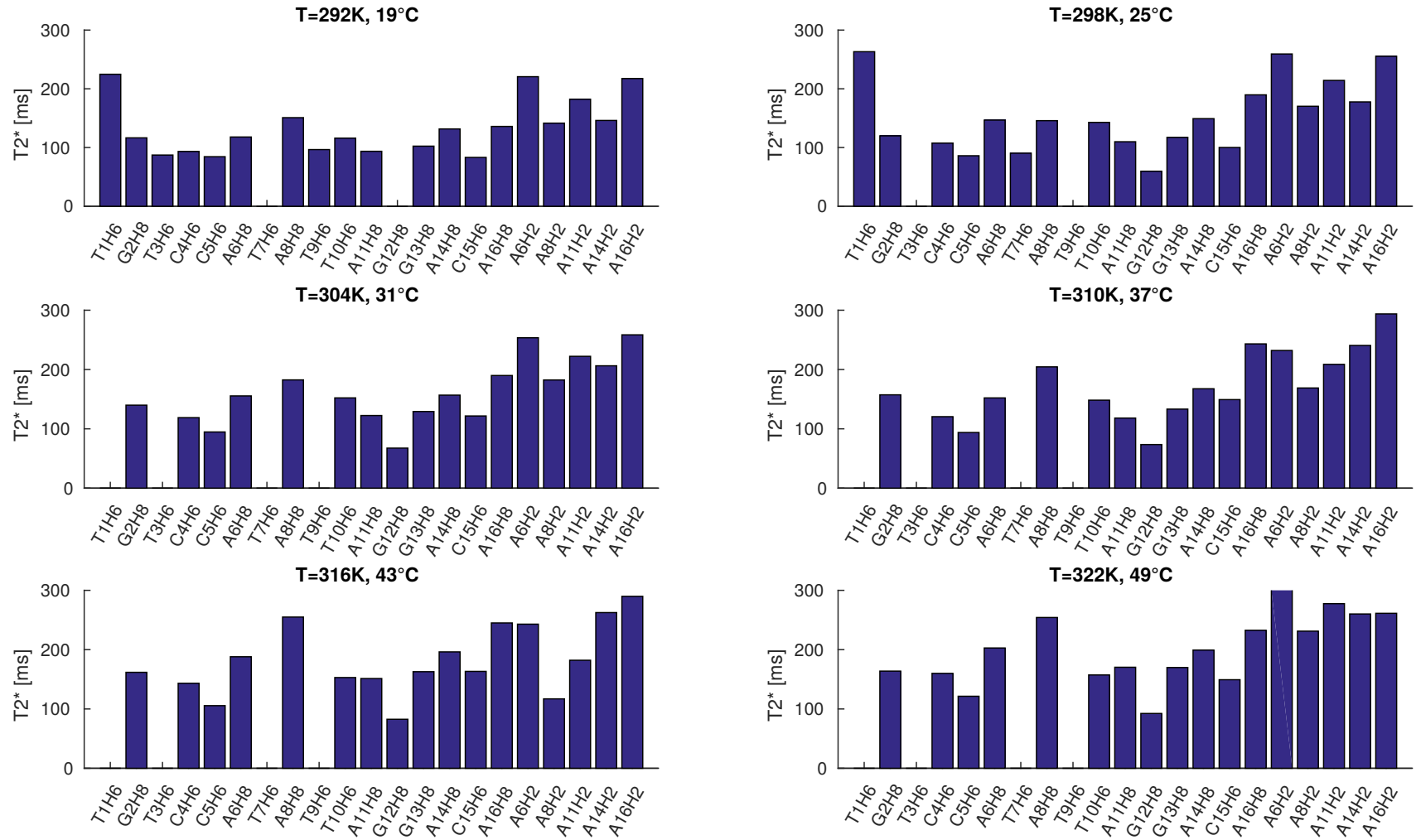
Obrázek 5.18: Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos16 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů.



Obrázek 5.19: Srovnání hodnot převrácených pološířek signálů u vzorku s1fos12



Obrázek 5.20: Srovnání hodnot převrácených pološírek signálů u vzorku s1fos14



Obrázek 5.21: Srovnání hodnot převrácených pološírek signálů u vzorku s1fos16

5.5 Potvrzení vlásenkové struktury

Jeden z cílů práce je rozhodnout, zda měřené oligonukleotidy vytvářejí vlásenky nebo duplexy. Výpočty pro tyto sekvence předpovídají [19], že by měla být stabilnější vlásenka a k tvorbě duplexů by mělo docházet jen velmi málo a za nízkých teplot. Kvantitativně Na následujících odstavcích je rozebráno, jakým způsobem lze tyto dva stavy odlišit a jak byla vlásenková struktura potvrzena našimi experimenty

5.5.1 Srovnání s UV absorpcí

V práci [2] byla pomocí UV absorpce měřena teplota tání oligonukleotidu, jehož sekvence je shodná se vzorkem s1fos16. Díky vyšší citlivosti UV spektroskopie však byla koncentrace vzorku o několik řádů nižší. Konkrétně $3\ \mu\text{M}$, oproti tomu koncentrace NMR vzorku byla $1\ \text{mM}$. Přesto, porovnáme-li výsledky obou metod (tab. 5.1), zjistíme velmi dobrou shodu. Rozdíl v teplotě tání je jen $3\ ^\circ\text{C}$.

Uvažme případ, kdy skutečně dochází k tvorbě duplexů. Změnu entalpie ΔH odhadneme na dvojnásobek změřené hodnoty (vodíkových můstků je zhruba dvojnásobek) a změnu entropie dopočítáme tak, aby duplex měl stejnou teplotu tání jako námi změřená vlásenka, pak

$$\Delta H = -260\ \text{kJ/mol}, \quad \Delta S = -782\ \text{J/mol/K}.$$

Pak podle vztahu (2.14) dostáváme teplotu tání takového duplexu $61\ ^\circ\text{C}$ při koncentraci $1\ \text{mM}$ a $42\ ^\circ\text{C}$ při koncentraci $3\ \mu\text{M}$. Takto velký rozdíl však zdaleka nepozorujeme.

Lze tak prohlásit, že teplota tání měřené struktury je nezávislá na koncentraci DNA. Což vylučuje bimolekulární reakci a s ní výměnu duplex \rightleftharpoons nespárované vlákno.

5.5.2 Rychlost výměny

Jelikož duplex by obsahoval (alespoň) dvojnásobný počet bázeových párů oproti vlásence, lze u něj tedy čekat vyšší aktivační energii, a tedy nižší rychlost výměny než u vlásenek podobné délky.

U duplexů, jejichž délka byla srovnatelná či dokonce menší než u našich vzorků, byla již dříve prováděna NMR měření [20, 21]. U nich skutečně dochází k signifikantnímu rozšíření signálů ve spektru v důsledku chemické výměny. My ve spektru žádné rozšíření nepozorujeme, což indikuje přítomnost vlásenek.

V námi změřených spektrech nepozorujeme ani náznak rozšíření, které by souviselo s chemickou výměnou. Víme tedy, že rychlost chemické výměny, kterou pozorujeme ve spektru, je řádově vyšší než rychlost výměny všech píků při koalescenci. V okolí teploty tání můžeme předpokládat symetrickou výměnu. Užitím

vztahů (3.31) a (3.33) lze spočítat rychlost výměny při koalescenci pro daný pík charakterizovaný rozdílem frekvencí obou stavů—vlásenky f_H a nespárovaného vlákna f_S .

$$k \gg k_{koal} = \frac{|f_S - f_H|}{\sqrt{8}} \quad (5.4)$$

Největší rozdíl posuvů ve vlásence a nespárovaném vlákne má u vzorku s1fos16 signál A16H2 (zhruba 0,3 ppm=150 Hz). Tomu odpovídá rychlost výměny při koalescenci $k_{koal} \approx 50$ Hz. Rychlost pozorované výměny musí být minimálně řádově vyšší $k_{min} = 500$ Hz.

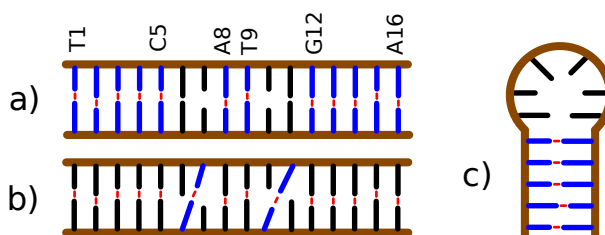
5.5.3 NOESY spektrum

V případě, že by sekvence tvořila duplex, mělo by docházet vzhledem k částečné selfkomplementaritě sekvence k párování bází na koncích a také u centrálního dinukleotidu, jak ukazuje obrázek 5.22.a. Zároveň je možná tvorba párů u bází, které nejsou přesně naproti sobě (obr. 5.22.b). V případě vlásenky (obr. 5.22.c) není párování centrálního dinukleotidu možné z topologických důvodů.

Pokud by k takovému párování docházelo, lze očekávat přítomnost sekvencních krosníků mezi A8H8 a T9H6. Překvapivě, tyto krosníky jsou v změřeném spektru přítomny u všech nukleotidů i u těch nespárovaných (nukleotidy smyčky). U těchto nukleotidů jsou však krosníky trochu slabší oproti těm v selfkomplementární části. Intenzita krosníků nukleotidů A8 a T9 není vyšší než u ostatních nespárovaných nukleotidů.

Ve vyhodnocení NOESY spekter byly zmíněny silné intranukleotidové krosníky H6/H8 x H1' značící vyšší flexibilitu nukleotidů ve smyčce. V případě párování bází lze očekávat snížení flexibility bází s konformací blízkou *anti* u nukleotidů A8 a T9. To by se projevilo nižší intenzitou příslušných intranukleotidových píků ve srovnání s ostatními nukleotidy ve smyčce. Toto však v NOESY spektru nepozorujeme.

Nic v NOESY spektru nenaznačuje, že by docházelo k párování A8 a T9. Přesto to nelze zcela vyloučit. Stejně tak nelze vyloučit existenci duplexu, u kterého k tomuto párování z nějakého důvodu nedochází.



Obrázek 5.22: Možné sekundární struktury vzorku.

5.5.4 Fitování sigmoidálních závislostí posuvů

Na obrázku 2.4 vidíme, že tvar sigmoidy se mírně liší, pokud uvažujeme reakci prvního řádu nebo řádu druhého. Můžeme tedy zkusit nafitovat změřené body oběma modely–funkcí (5.1) a závislostí popisující změnu posuvu při tání duplexů

$$\delta = (\delta_D(T) - \delta_S(T))p_D(T, \Delta H, \Delta S) + \delta_S(T), \quad (5.5)$$

kde

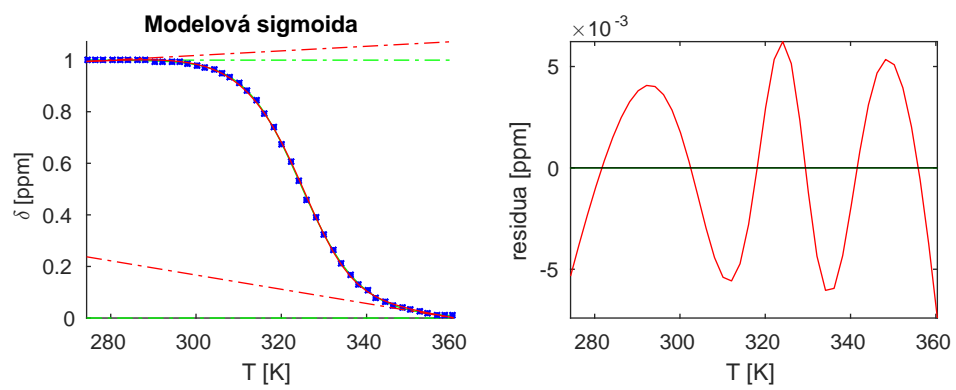
$$\delta_D(T) = a + bT \quad (5.6)$$

je nízkoteplotní asymptota popisující chemický posuv duplexů a

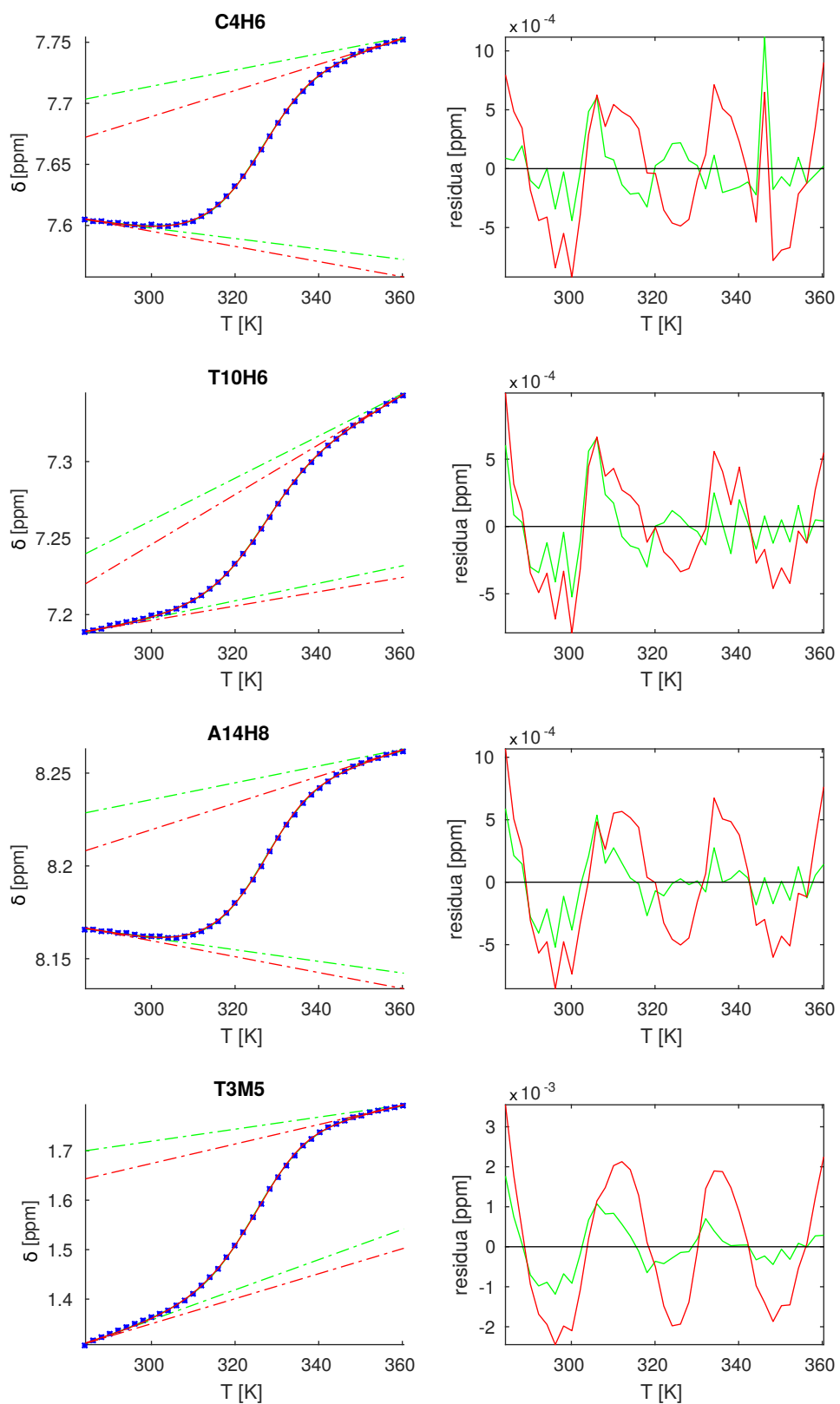
$$\delta_S(T) = c + dT \quad (5.7)$$

je asymptota vysokoteplotní příslušející posuvům nespárovaných vláken. V obou případech fitovací procedura úspěšně zkonverguje. Dostaneme samozřejmě různé termodynamické parametry, ale jejich hodnoty jsou takové, jaké bychom očekávali v případě, kdy by docházelo ke vzniku duplexu resp. vlásenky. Na základě tohoto nelze jednoznačně rozhodnout, zda je správný model který odpovídá přítomnosti vlásenek, nebo ten, který předpokládá výskyt duplexů.

Z hlediska výsledného χ^2 si oba modely také vedou stejně. Na obrázku 5.23 je modelová sigmoida, která odpovídá tání vlásenek, nafitovaná závislostí popisující tání duplexů. Modelová sigmoida má konstantní asymptoty (zeleně), ale nafitovaná sigmoida má asymptoty zřejmě nekonstantní. Nesprávný tvar samotné sigmoidy je tak kompenzován dalšími volnými parametry, což jsou v tomto případě asymptoty. Toto se však projevuje na grafu residuí, kde vidíme oscilující závislost, a takový fit tedy není dobrý. Stejný charakter vykazují rezidua při fitování skutečných naměřených bodů funkcí předpokládající přítomnost duplexů (obr. 5.24). Červeně jsou vyvedeny rezidua duplexového modelu, zeleně modelu vlásenkového. Ty duplexové jsou očividně nenáhodné a mají všechny podobný průběh, který se shoduje s modelovým případem (obr. 5.23). Je pravda, že i u reziduí, které odpovídají vlásenkovému modelu je podobné zvlnění. Je však menší a vyskytuje se v části odpovídající nízkým teplotám. To signalizuje, že levá asymptota není zcela správně určená, což je důsledek další chemické výměny v oblasti nízkých teplot, která nelineárně posouvá signály.



Obrázek 5.23: Modelová sigmoida vypočtená podle vztahu (2.12). Fitováno funkcí (5.5) (červená). Vpravo jsou residua fitu.



Obrázek 5.24: Srovnání fitování modelem pro vlásenky (5.1) (zeleně) a duplexy (5.5) (červeně). Vpravo jsou residua fitu.

6. Závěr

V rámci diplomové práce byly studovány DNA oligonukleotidy se sekvencí odpovídající CArG boxu v serum response elementu SRE buněčné DNA. Shrnutí výsledků:

- Byla změřena teplotní závislost vodíkových spekter NMR tří vzorků oligonukleotidů, jejichž sekvence odpovídá CArG boxu. Oligonukleotidy by měly být schopny tvořit vlásenku.
- Naměřili jsme NOESY spektra a provedli přiřazení NMR signálů ve spektru jednotlivým vodíkům v molekule.
- Spektra byla nafitována, čímž byly získány chemické posuvy a pološířky jednotlivých signálů
- Fitováním teplotních závislostí chemických posuvů jednotlivých signálů křivkou popisující tvorbu a rozpad vlásenky byly určeny termodynamické parametry tání vlásenky, které ukazují na vysokou kooperativitu bází při tomto procesu.
- Přítomnost vlásenek ve vzorku je podpořena několika argumenty.
 - Termodynamické parametry popisující rozpad a tvorbu vlásenky jsou nezávislé na koncentraci vzorku.
 - Rychlost chemické výměny je vyšší, než jaká se dá očekávat u duplexů.
 - Křivka popisující tání duplexů není dobrým fitem naměřených bodů.
 - V NOESY spektrech pozorujeme kroszíky, které neodpovídají B-duplexu.
- Byla pozorována další chemická výměna při velmi nízkých teplotách. Nelze však s určitostí říci, zda souvisí s tvorbou duplexu nebo jinou změnou.

Z výsledků tedy plyne možnost, že u regulačního elementu SRE skutečně dochází k lokální změně DNA konformace. Potvrzení této domněnky vyžaduje další studium směsi obou komplementárních vláken SRE.

Seznam použité literatury

- [1] D. L. Nelson and M. M. Cox. *Lehninger Principles of Biochemistry*. W.H.Freeman&Co., 2005.
- [2] B. Řezáčová. Strukturní flexibilita regulačního segmentu DNA. Master's thesis, Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, 2009.
- [3] J. Stepanek, M. Vincent, P.-Y. Turpin, D. Paulin, S. Fermandjian, B. Alpert, and C. Zentz. C - G base mutations in the CArG box of c-fos serum response element alter its bending flexibility: Consequences for core-SRF recognition. *FEBS Journal*, 274(9):2333–2348, 2007. cited By 10.
- [4] G. M Blackburn. *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*, chapter 2, pages 13–43. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2006.
- [5] Michal Kolář and Pavel Hobza. Jsou to opravdu vodíkové vazby, které stabilizují DNA? *Vesmír*, 92:140–141, 2013.
- [6] Peter Yakovchuk, Ekaterina Protozanova, and Maxim D. Frank-Kamenetskii. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. *Nucleic Acids Research*, 34(2):564–574, 2006.
- [7] Richard Owczarzy, Yong You, Bernardo G Moreira, Jeffrey a Manthey, Lingyan Huang, Mark a Behlke, and Joseph a Walder. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 43(12):3537–54, mar 2004.
- [8] F. Bloch. Nuclear induction. *Phys. Rev.*, 70:460–474, Oct 1946.
- [9] H. M. McConnell. Reaction rates by nuclear magnetic resonance. *The Journal of Chemical Physics*, 28(3):430–431, 1958.
- [10] Alex D. Bain. Chemical exchange in NMR. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 43(3–4):63 – 103, 2003.
- [11] Václav Římal, Helena Štěpánková, and Josef Štěpánek. Analysis of NMR spectra in case of temperature-dependent chemical exchange between two unequally populated sites. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, 38A(3):117–127, 2011.
- [12] T.L. Hwang and A.J. Shaka. Water suppression that works. Excitation sculpting using arbitrary wave-forms and pulsed-field gradients. *Journal of Magnetic Resonance, Series A*, 112(2):275 – 279, 1995.

- [13] F. Delaglio, S. Grzesiek, G. W. Vuister, G. Zhu, J. Pfeifer, and A. Bax. NMR-Pipe: a multidimensional spectral processing system based on unix pipes. *J. Biomol. NMR*, 6:277–293, 1995.
- [14] T. D. Goddard and D. G. Kneller. SPARKY 3. *University of California, San Francisco*.
- [15] K. Wüthrich. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*, chapter NOE-Observable H- H Distances in Nucleic Acids, page 203–219. Chichester: John Wiley & Sons, 1986.
- [16] Sik Lok Lam, Lai Nang Ip, Xiaodai Cui, and Cheuk Nang Ho. Random coil proton chemical shifts of deoxyribonucleic acids. *Journal of Biomolecular NMR*, 24(4):329–337, 2002.
- [17] Sik Lok Lam. Dshift: a web server for predicting dna chemical shifts. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl 2):W713–W717, 2007.
- [18] Cornelis Altona, Dirk H. Faber, and Aldert J. A. Westra Hoekzema. Double-helical DNA ¹H chemical shifts: an accurate and balanced predictive empirical scheme. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 38(2):95–107, 2000.
- [19] Nicholas R. Markham and Michael Zuker. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Research*, 33:W577 – W581, 2005.
- [20] V. Římal. NMR studium lokální strukturní stability v molekule DNA. Master’s thesis, Univerzita Karlova v Praze, Matematicko-fyzikální fakulta, 2009.
- [21] V. Římal, O. Socha, J. Štěpánek, and H. Štěpánková. Spectroscopic study of cytosine methylation effect on thermodynamics of dna duplex containing CpG motif. *Journal of Spectroscopy*, 2015.

Seznam obrázků

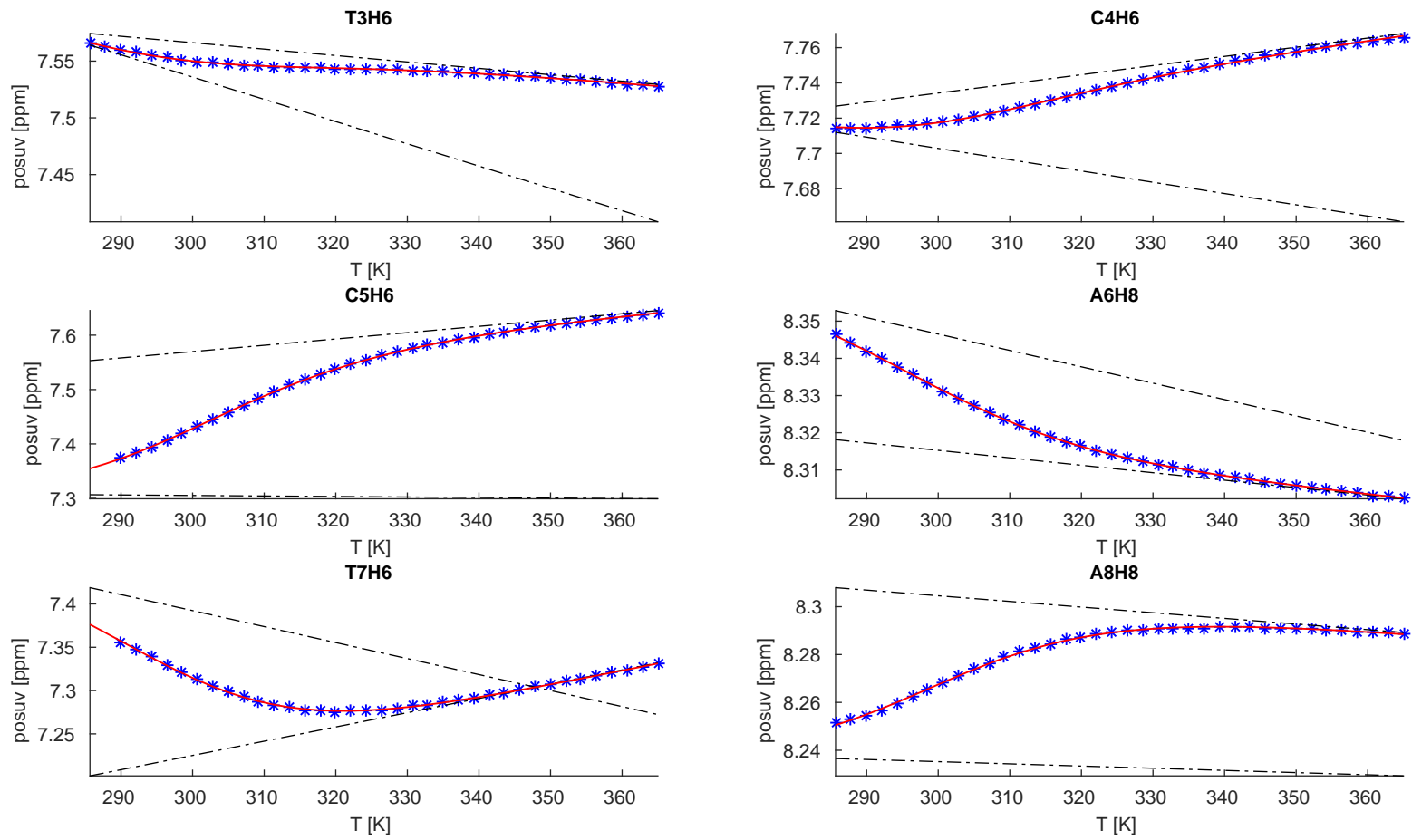
2.1	Chemická struktura deoxyribózy (vlevo) a adeninového deoxyribonukleotidu (vpravo).	4
2.2	Chemická struktura nejběžnějších bází DNA. Místo vodíků označených hvězdičkou je v DNA připojena deoxyribóza.	4
2.3	Watsonovo-Crickovo párování bází v DNA.	5
2.4	Porovnání tvaru závislostí (2.10) a (2.12), popisující teplotní závislost podílu duplexů/vlások v roztoku.	9
3.1	Absorpční a disperzní část signálu.	14
3.2	Pulsní sekvence pro měření spinového echa.	16
3.3	Základní pulsni sekvence pro měření homonukleárního 2D NOESY spektra.	19
3.4	Tvar spektra při symetrické dvoustavové výměně v závislosti na rychlosti této výměny. Vypočteno dle vztahu (3.30) pro $\delta = 100$ Hz	21
4.1	Pulsni sekvence zgesgp pro měření vodíkového spektra s potlačením signálu rozpouštědla.	24
4.2	Pulsni sekvence noesyegpph pro měření ^1H - ^1H NOESY spektra s potlačením signálu rozpouštědla.	26
5.1	Spektrum vzorku s1fos14 při teplotě 284 K s vyznačenými oblastmi posuvů jednotlivých vodíků.	29
5.2	Výřez z NOESY spektra vzorku s1fos12 při teplotě 301 K (28 °C). Oblast s krosníky H6/H8 x H1'.	30
5.3	Výřez z NOESY spektra vzorku s1fos14 při teplotě 284 K (11 °C). Oblast s krosníky H6/H8 x H1'.	31
5.4	Výřez z NOESY spektra vzorku s1fos16 při teplotě 286 K (13 °C). Oblast s krosníky H6/H8 x H1'.	31
5.5	Přiřazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos12.	32
5.6	Přiřazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos14.	33
5.7	Přiřazené signály v aromatické části spektra vzorku s1fos16.	34
5.8	Výřez ze spektra vzorku s1fos12 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.	36
5.9	Výřez ze spektra vzorku s1fos14 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.	37
5.10	Výřez ze spektra vzorku s1fos16 v oblasti posuvů iminodíků Thy-H3 a Gua-H1.	37

5.11	Srovnání posuvů H6/H8 ve stonku. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].	38
5.12	Srovnání posuvů H6/H8 ve smyčce vlásenky. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].	39
5.13	Srovnání posuvů H6/H8 ve stonku vlásenky. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].	40
5.14	Srovnání posuvů AXH2. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].	41
5.15	Srovnání posuvů methylů TXM5. Samostatným symbolem je označena predikce chemického posuvu signálu v duplexu [18].	42
5.16	Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos12 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů. . .	44
5.17	Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos14 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů. . .	45
5.18	Srovnání parametrů odpovídajících teplotě tání vzorku s1fos16 získaných fitováním chemických posuvů jednotlivých nukleotidů. . .	46
5.19	Srovnání hodnot převrácených pološířek signálů u vzorku s1fos12 .	47
5.20	Srovnání hodnot převrácených pološířek signálů u vzorku s1fos14 .	48
5.21	Srovnání hodnot převrácených pološířek signálů u vzorku s1fos16 .	49
5.22	Možné sekundární struktury vzorku.	51
5.23	Modelová sigmoida vypočtená podle vztahu (2.12). Fitováno funkcí (5.5) (červená). Vpravo jsou residua fitu.	53
5.24	Srovnání fitování modelem pro vlásenky (5.1) (zeleně) a duplexy (5.5) (červeně). Vpravo jsou residua fitu.	54
P.1	s1fos12 - globální fitování sigmoid.	62
P.2	s1fos12 - globální fitování sigmoid.	63
P.3	s1fos12 - globální fitování sigmoid.	64
P.4	s1fos12 - globální fitování sigmoid.	65
P.5	s1fos14 - globální fitování sigmoid.	66
P.6	s1fos14 - globální fitování sigmoid.	67
P.7	s1fos14 - globální fitování sigmoid.	68
P.8	s1fos14 - globální fitování sigmoid.	69
P.9	s1fos16 - globální fitování sigmoid.	70
P.10	s1fos16 - globální fitování sigmoid.	71
P.11	s1fos16 - globální fitování sigmoid.	72
P.12	s1fos16 - globální fitování sigmoid.	73
P.13	s1fos16 - globální fitování sigmoid.	74

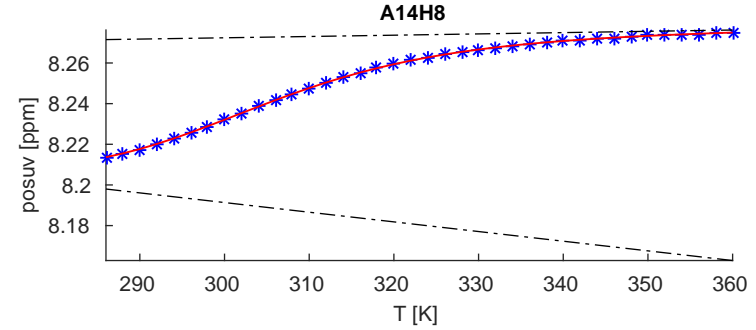
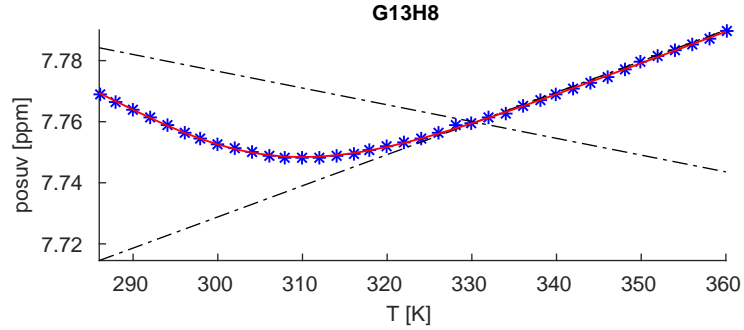
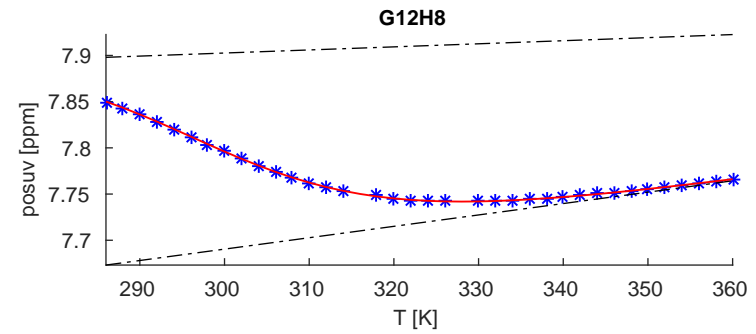
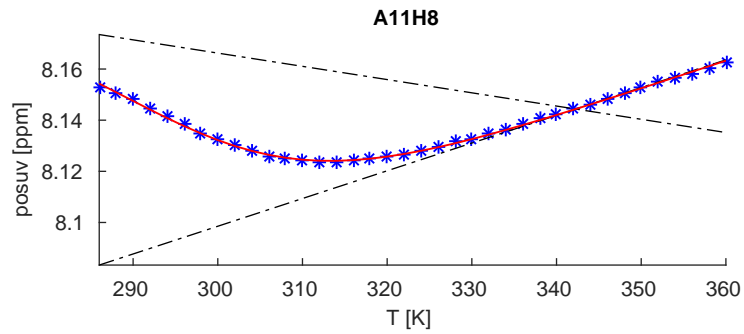
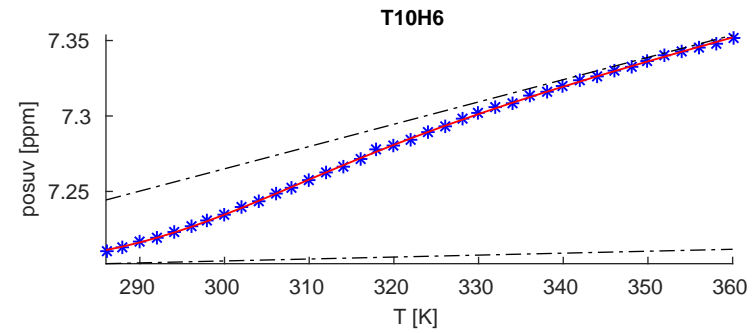
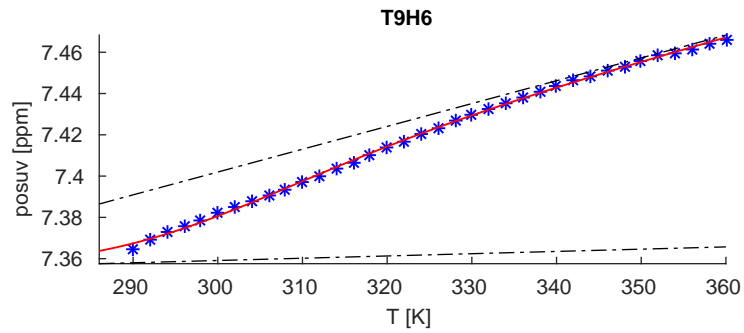
Seznam tabulek

3.1	NMR parametry vybraných izotopů. Rezonanční frekvence f odpovídají magnetickému poli o indukci 11,7 T.	11
4.1	Sekvence jednotlivých vzorků.	23
4.2	Složení rozpouštědla.	23
4.3	Parametry měřicí sekvence a spektrometru při měření teplotních řad.	25
4.4	Parametry měřicí sekvence a spektrometru při měření NOESY spekter.	26
5.1	Shrnutí termodynamických parametrů získaných z globálního fitování. K chybám byla připočtena nejistota v určení teploty $\pm 0,5^\circ\text{C}$. Na poseltním řádku jsou pro srovnání termodynamické hodnoty sekvence s1fos16 naměřené v práci [2] pomocí UV spektroskopie. .	44

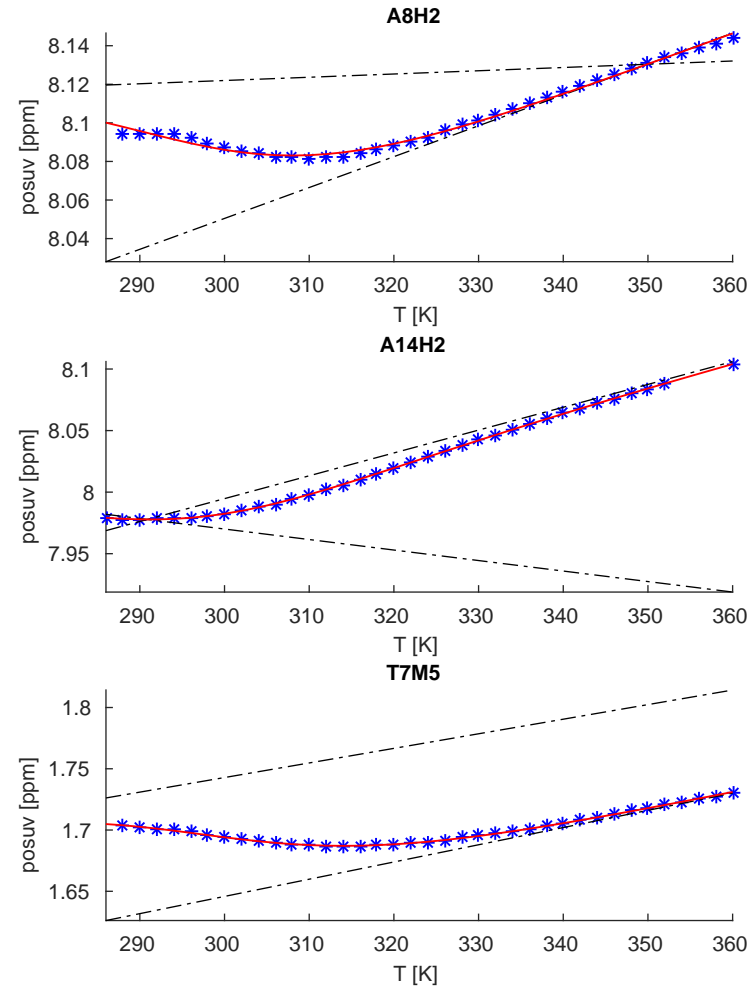
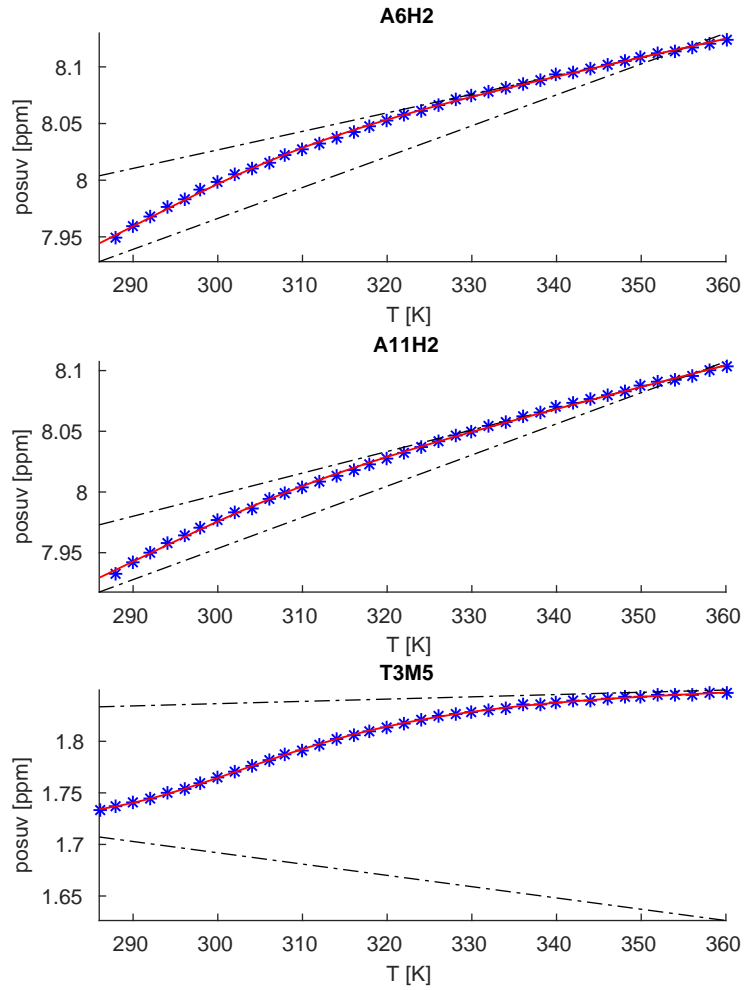
Přílohy



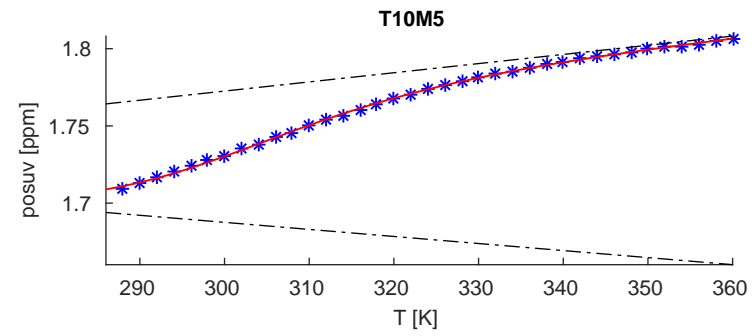
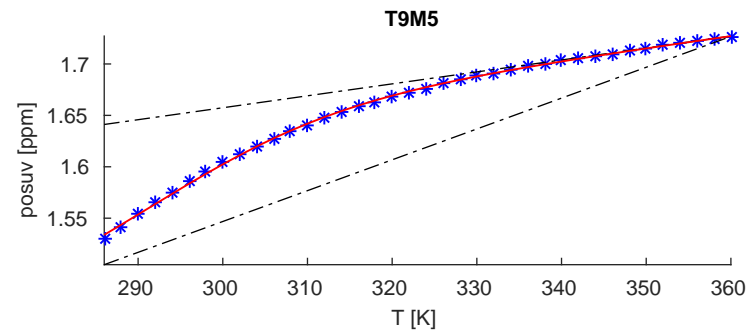
Obrázek P.1: s1fos12 - globální fitování sigmoid.



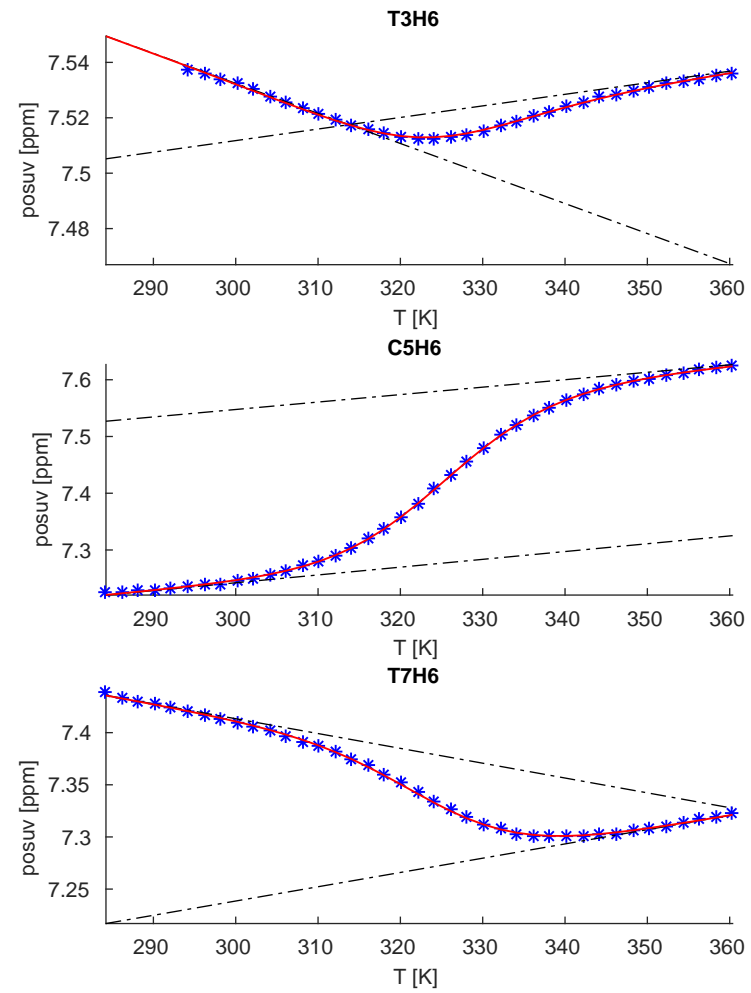
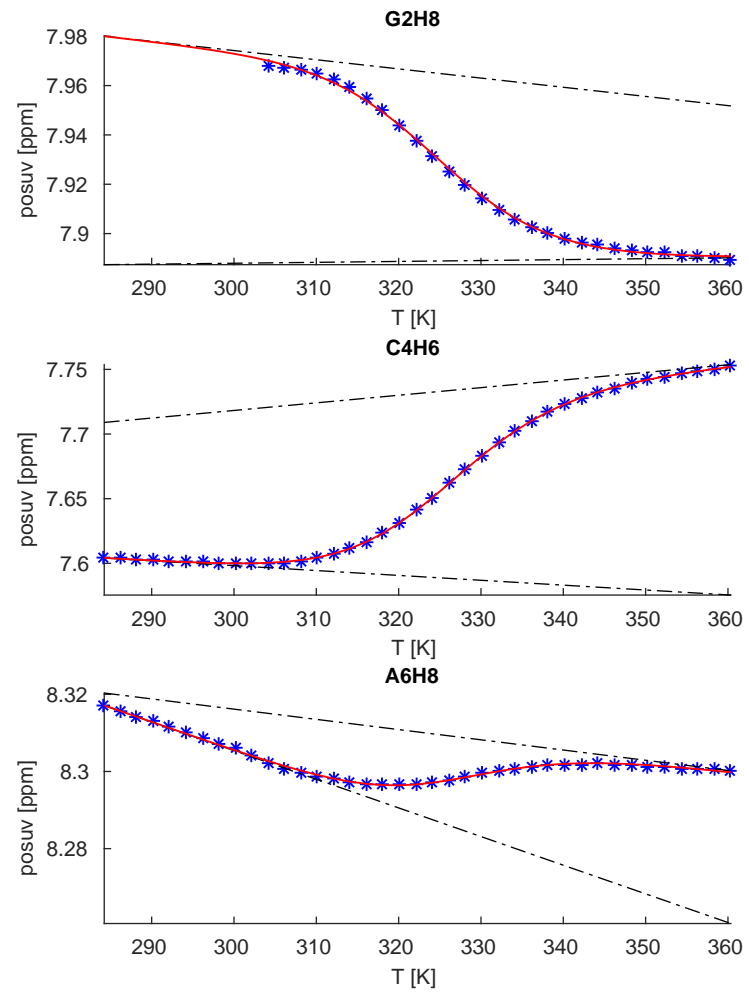
Obrázek P.2: sfos12 - globální fitování sigmoid.



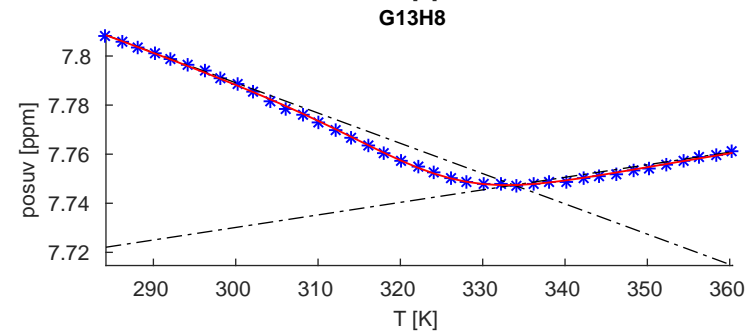
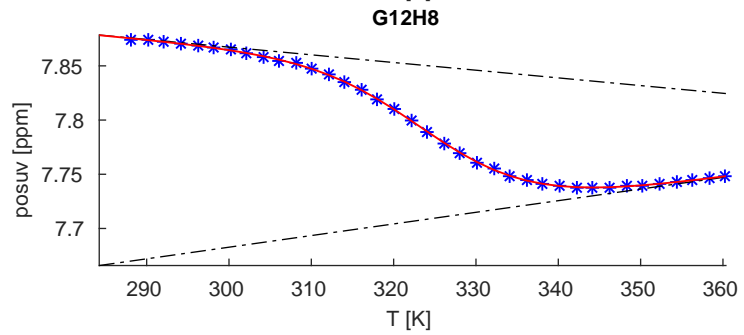
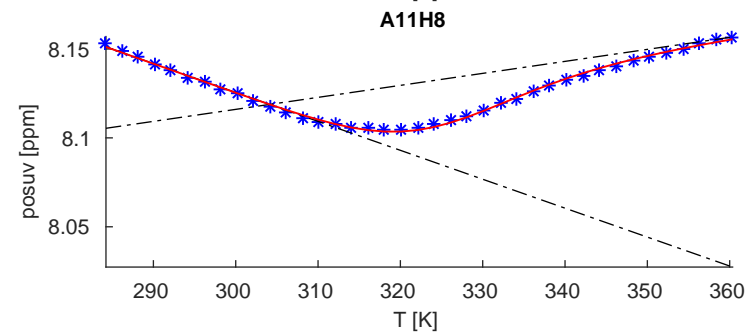
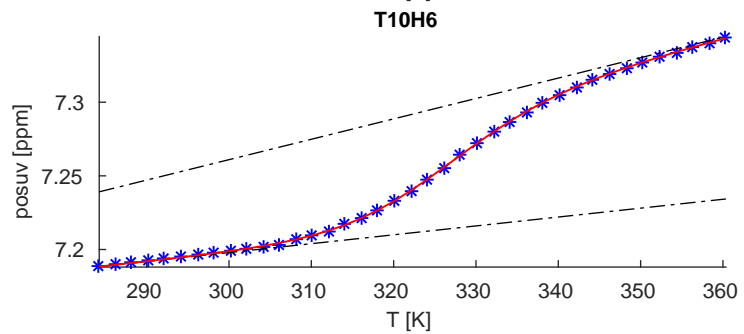
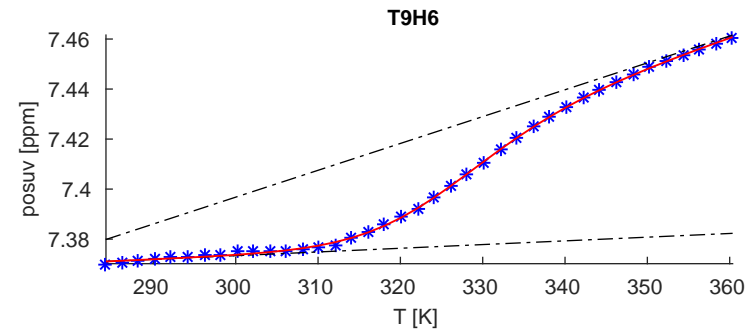
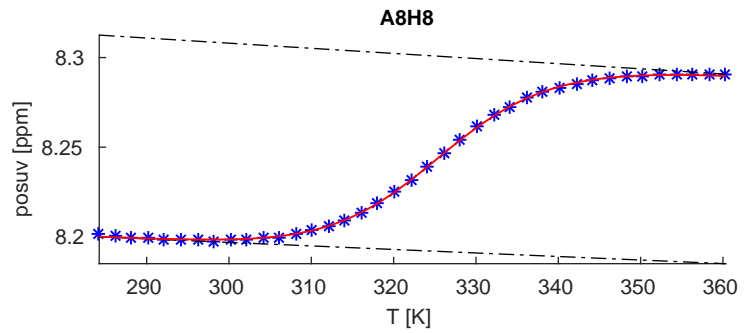
Obrázek P.3: s1fos12 - globální fitování sigmoid.



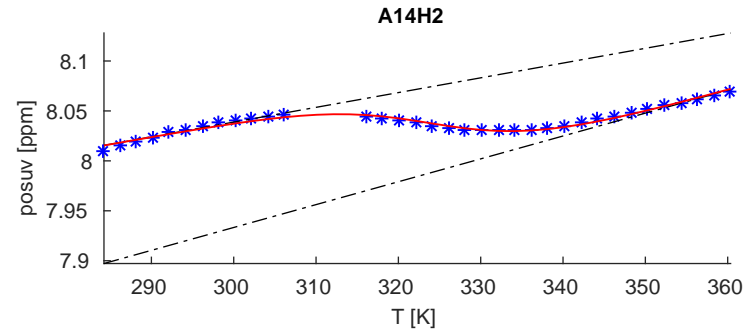
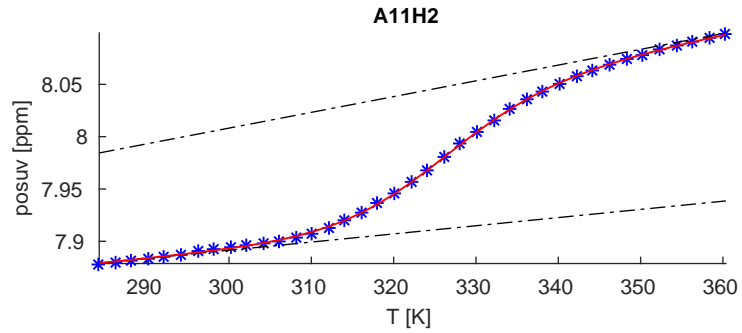
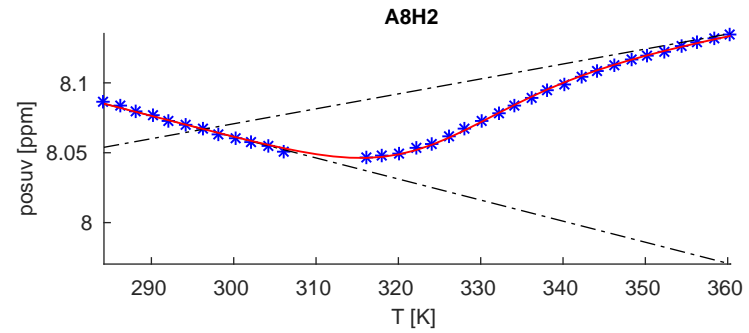
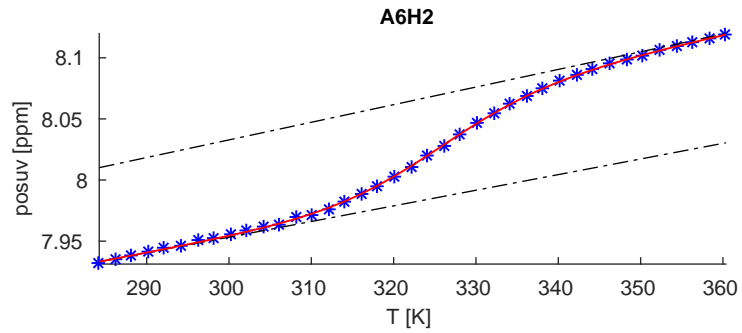
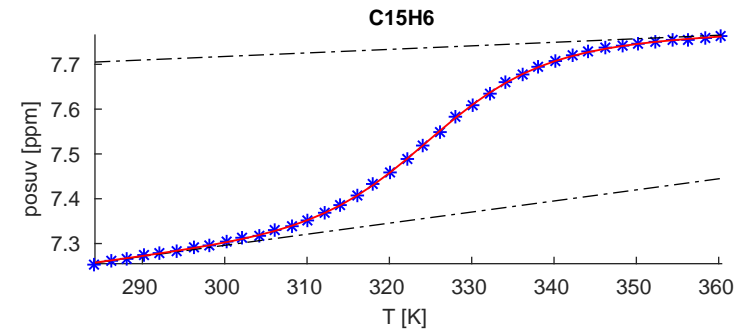
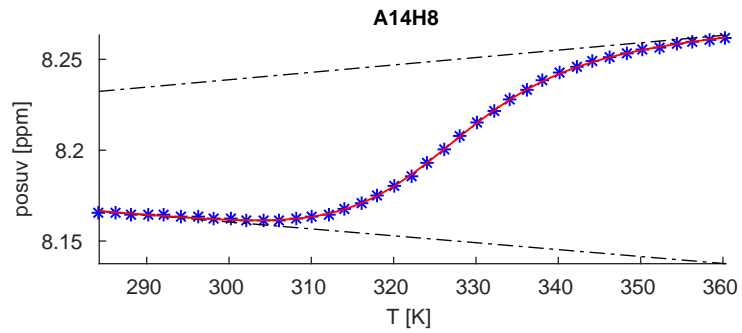
Obrázek P.4: s1fos12 - globální fitování sigmoid.



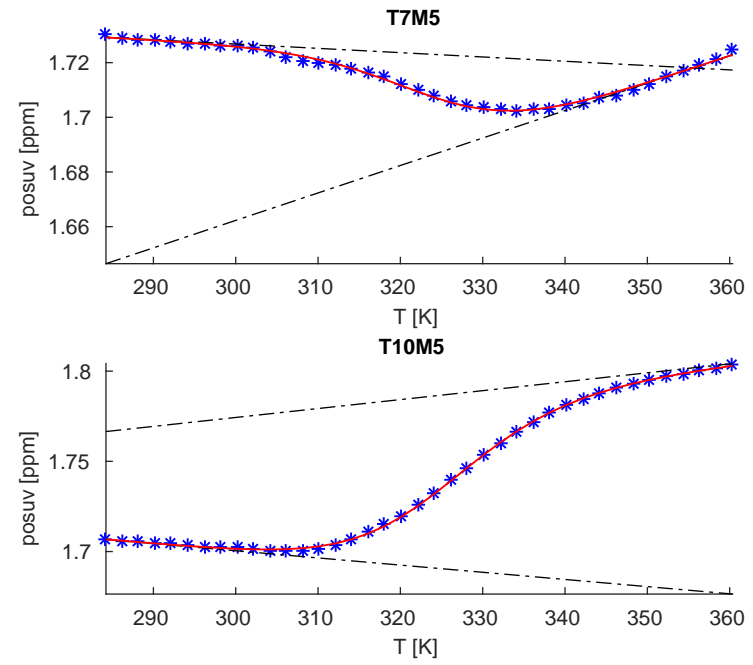
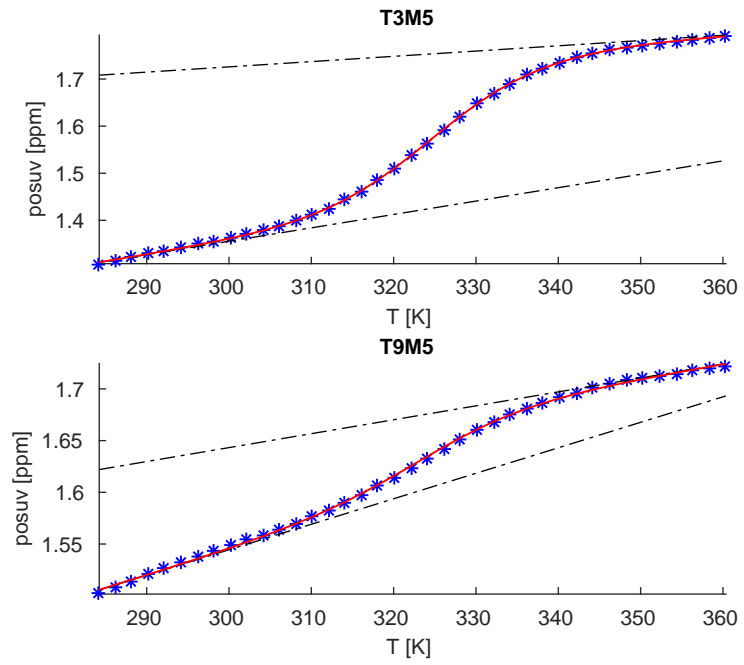
Obrázek P.5: s1fos14 - globální fitování sigmoid.



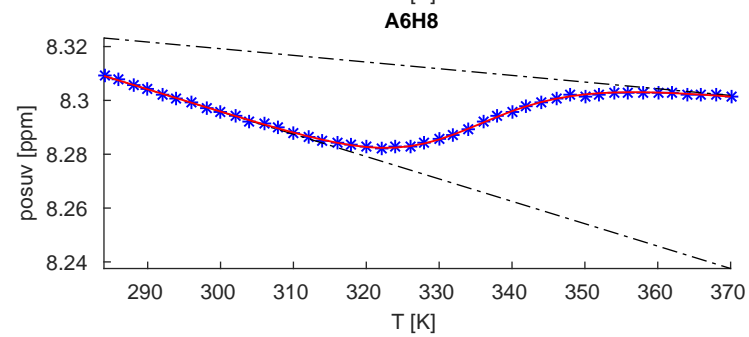
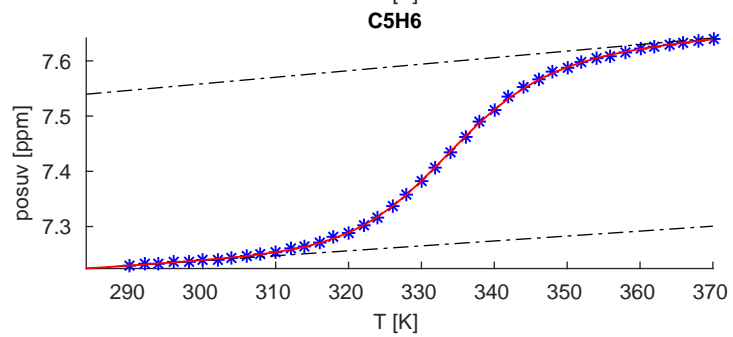
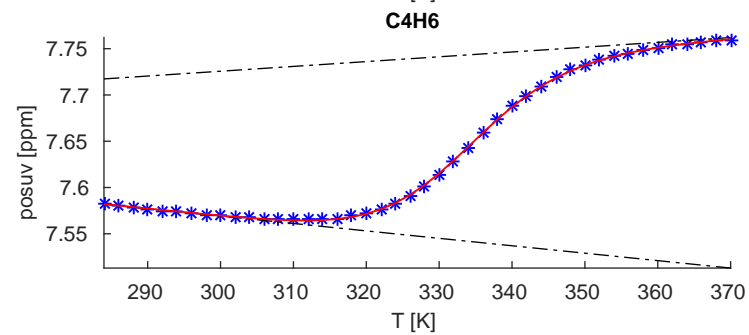
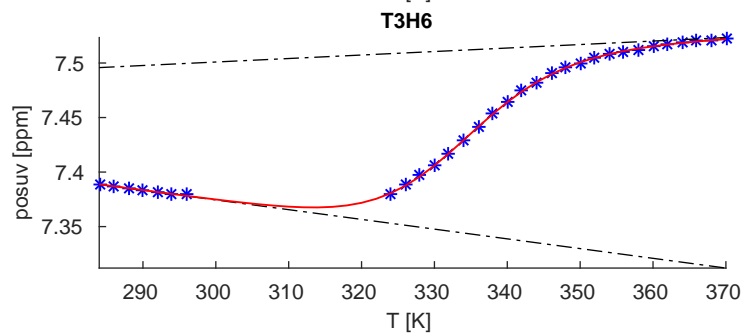
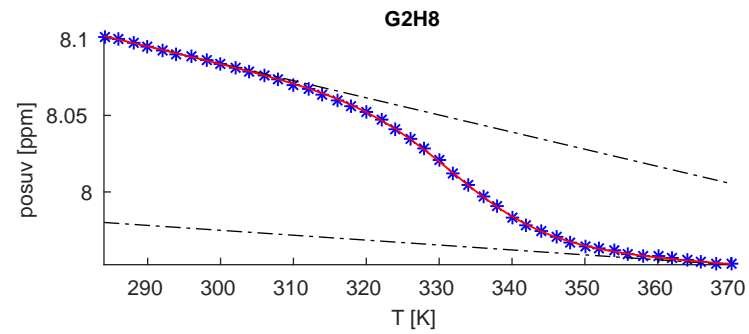
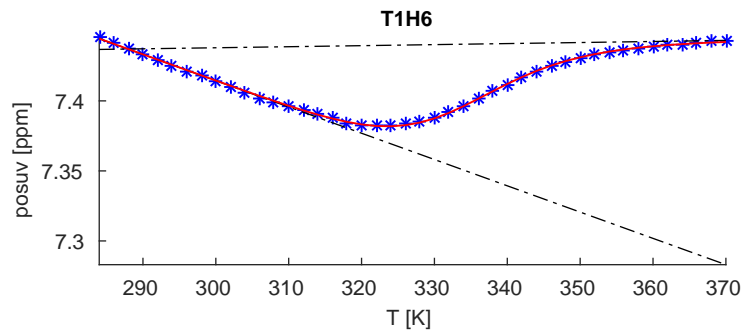
Obrázek P.6: s1fos14 - globální fitování sigmoid.



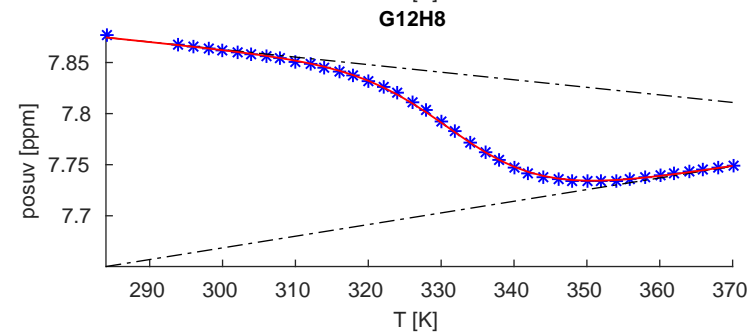
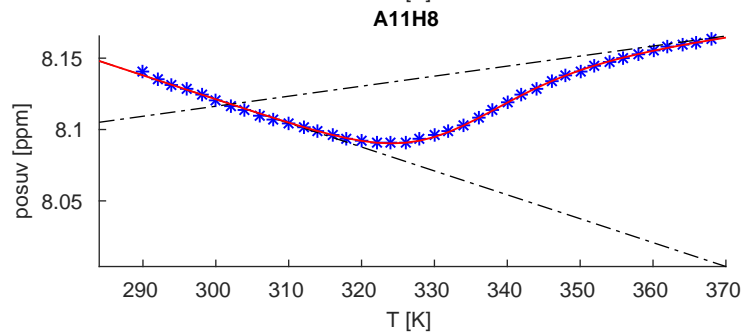
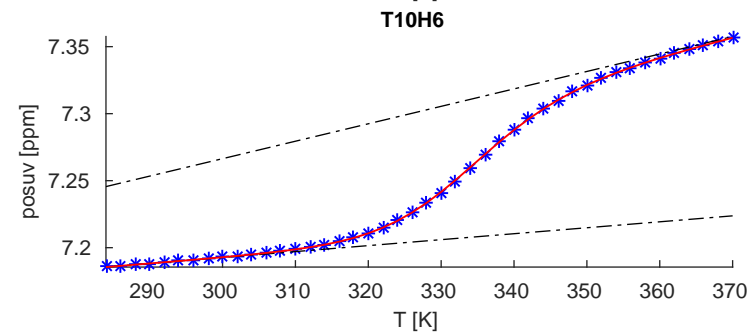
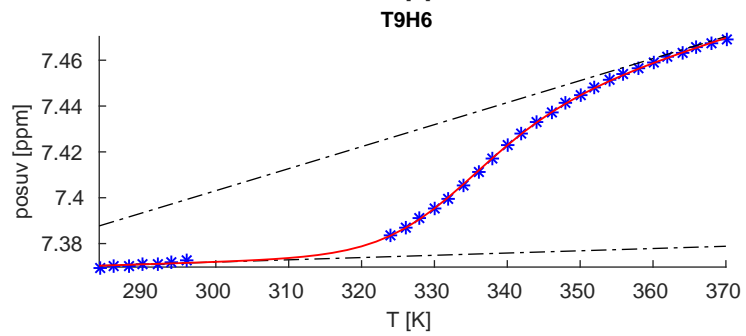
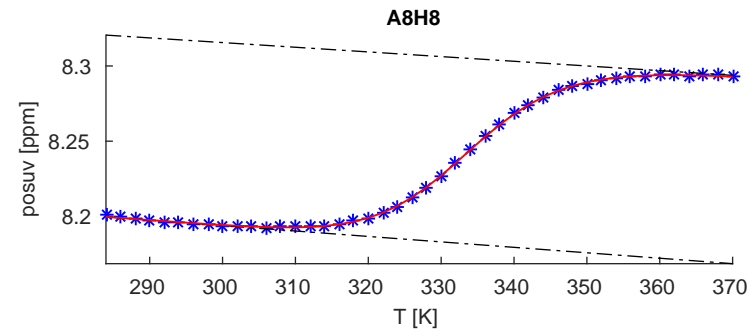
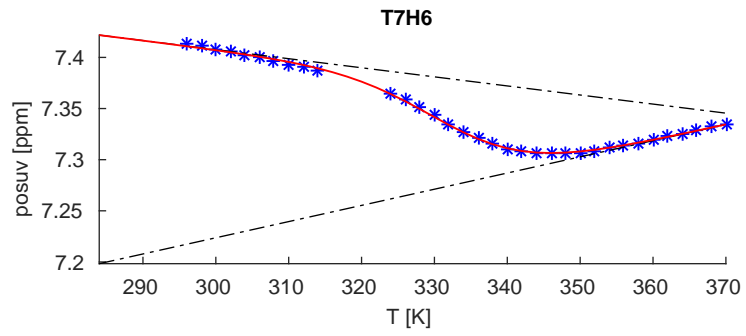
Obrázek P.7: s1fos14 - globální fitování sigmoid.



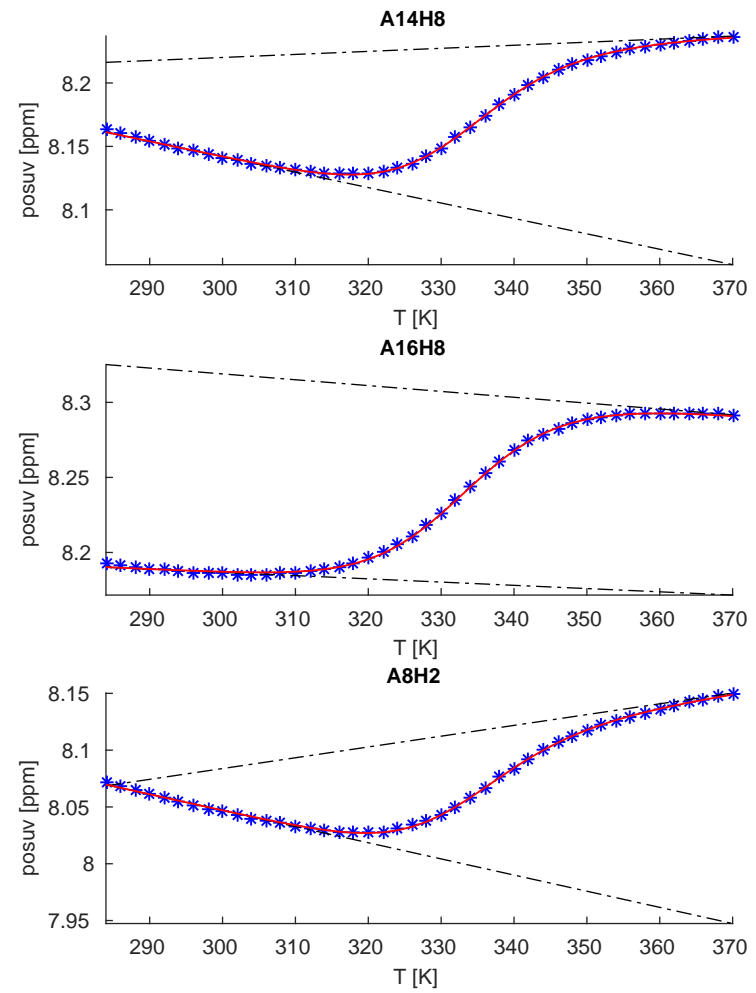
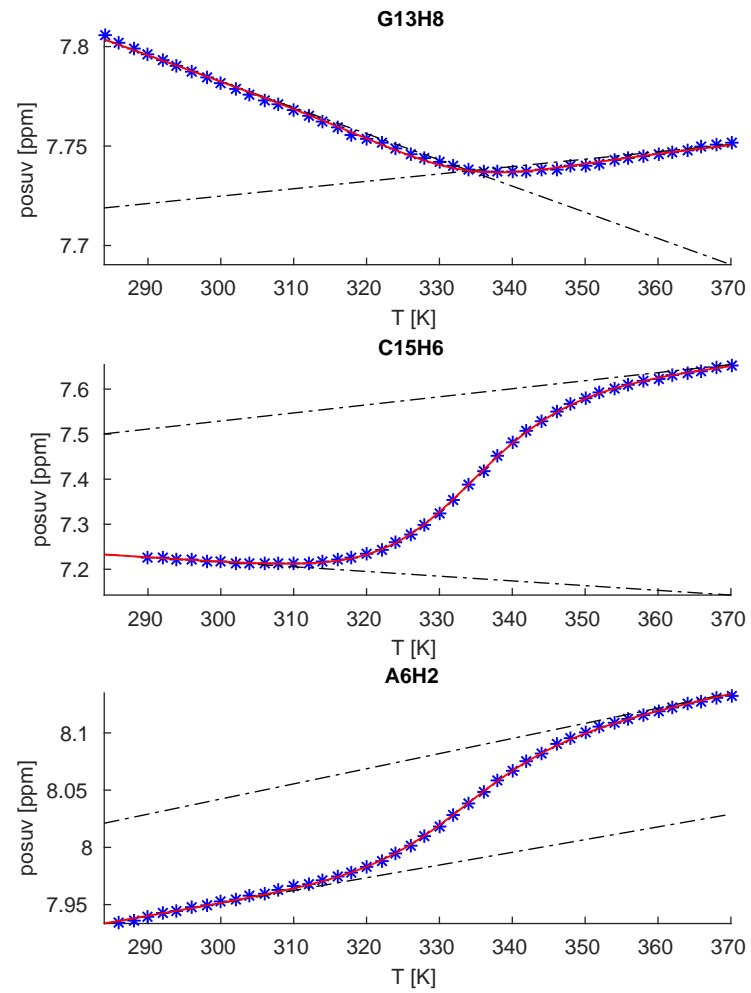
Obrázek P.8: s1fos14 - globální fitování sigmoid.



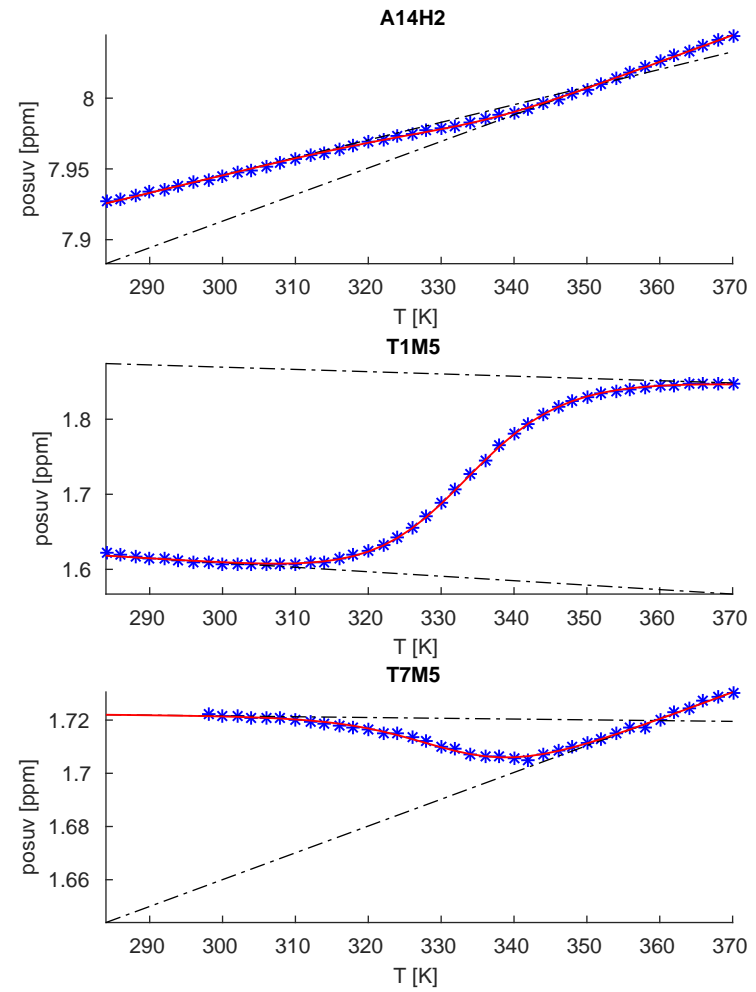
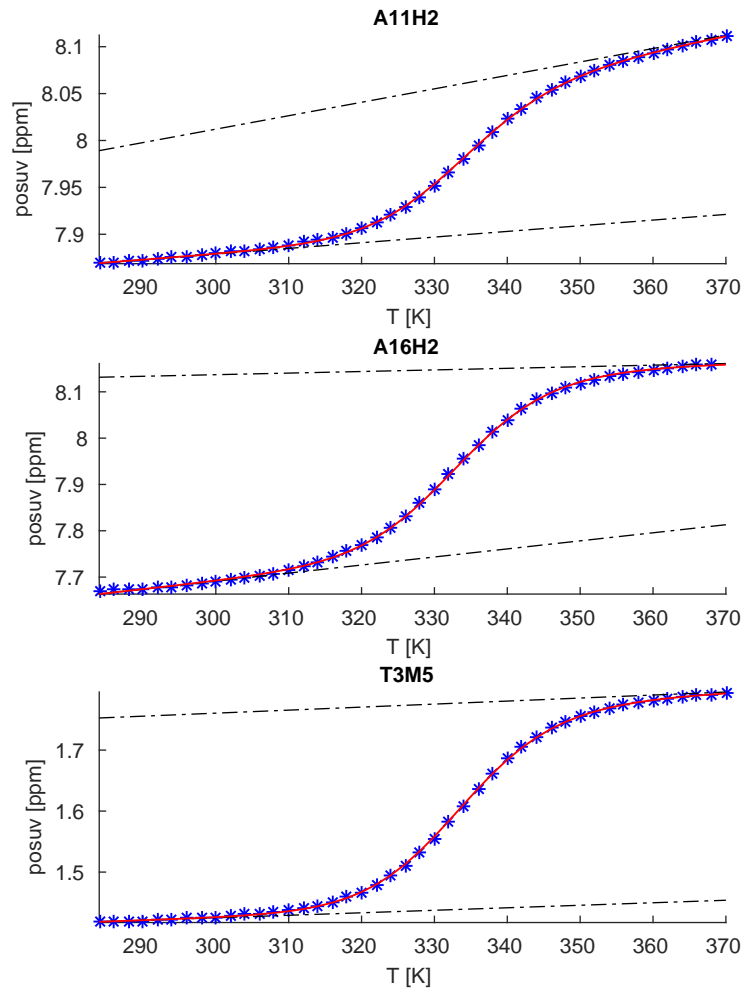
Obrázek P.9: s1fos16 - globální fitování sigmoid.



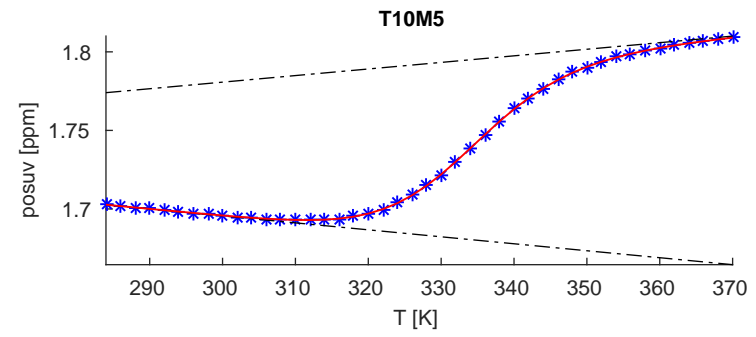
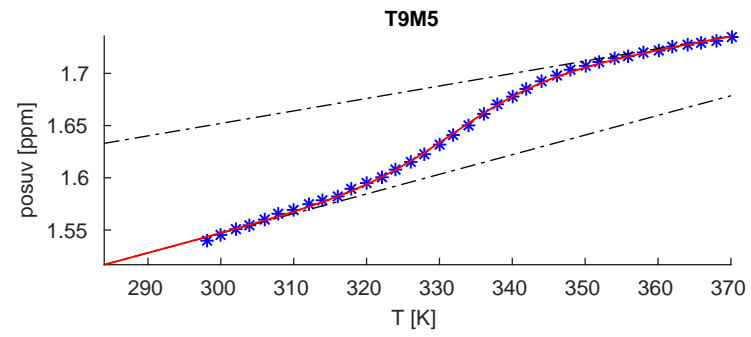
Obrázek P.10: s1fos16 - globální fitování sigmoid.



Obrázek P.11: s1fos16 - globální fitování sigmoid.



Obrázek P.12: s1fos16 - globální fitování sigmoid.



Obrázek P.13: s1fos16 - globální fitování sigmoid.