

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Martin Štefl

**Kinetika interakce cytochromu P450 s oxidem
uhelnatým**

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2006

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením školitele
Doc. RNDr. Jiřího Hudečka, CSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 8.6.....2006

Podpis.....*Markin Štěp*.....

Úvodem bych rád poděkoval svému školiteli panu Doc. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc. za kvalitní vedení, zájem, připomínky a rady, které mi ochotně po celou dobu řešení bakalářské práce poskytoval.

Obsah

1. Seznam použitých zkratk a symbolů	5
2. Úvod a přehled literatury	6
2.1. Cytochrom P450.....	8
2.1.1. Klasifikace a struktura cytochromu P450	8
2.1.2. Funkce cytochromu P450.....	11
2.1.2.1. Katalytický cyklus cytochromu P450	12
2.1.3. Kinetika asociace a disociace oxidu uhelnatého s cytochromem P450	17
2.2. NO – synthasa (NOS).....	19
2.3. Ramanova spektroskopie	22
2.4. Vibrace vazby Fe-CO	26
3. Cíle bakalářské práce	32
4. Metody a postup práce	33
5. Výsledky.....	35
5.1. Série bez substrátu.....	35
5.2. Série se substrátem	40
5.3. Série s inhibitorem.....	41
6. Diskuse	46
6.1. Série bez substrátu.....	46
6.2. Série se substrátem	47
6.3. Série s inhibitory	48
7. Shrnutí	49
7.1. Série bez substrátu.....	49
7.2. Série se substrátem a inhibitory	49
8. Seznam použité literatury	50

1. Seznam použitých zkratek a symbolů

1,2-Me₂Im	1,2-dimethylimidazol
7-NI	7-nitroindazol
Arg	arginin
CO	oxid uhelnatý
*C*O	izotopový oxid uhelnatý (¹³ C ¹⁸ O)
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinadeninmononukleotid
H₄B	tetrahydrobiopterin
HMN-1180	1-(5-isochinolinylsulfonyl)-7-methylhomopiperazin)
IR	infračervená
N-MeIm	<i>N</i> -methylimidazol
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NO	oxid dusnatý
NOS	NO-synthasa
Py	pyridin
rpm	počet otáček za minutu
SERS	povrchem zesílený Ramanův rozptyl
SRS	místa pro rozpoznání substrátu
THF	tetrahydrofuran

2. Úvod a přehled literatury

Cytochromy P450 je označení pro velkou podskupinu hemových proteinů. Hemové proteiny, které ve své struktuře obsahují tetrapyrolové jádro v různých modifikacích, hrají velmi důležitou roli v životě každého živého organismu. Je až neuvěřitelné, jaký je možný rozsah funkcí těchto makromolekul; přenos a skladování kyslíku (hemoglobin a myoglobin), transport oxidu dusnatého (nitrophorin), produkce oxidu dusnatého (NO-synthasa), redukce peroxidů (katalasa a peroxidasa), aktivace molekulárního kyslíku pro oxygenaci organických substrátů (cytochrom P450) a v neposlední řadě i přenos elektronů (cytochrom c)⁽¹⁾. První možností pro vysvětlení takového rozsahu funkcí těchto enzymů je složení nebo uspořádání aktivního místa. Běžně se v aktivním místě nachází jeden ze čtyř různých typů hemů. Pro přiblížení popíši dva nejběžnější, tedy hem-b a hem-c (obr.1).

- Hem-b je charakteristický pro hemoglobiny, myoglobiny, nitrophoriny, cytochromy P450, katalasy, některé peroxidasy, NO-synthasy a cytochromy b. Hemová skupina je v proteinu ukotvena pomocí axiální ligace jednoho nebo dvou aminokyselinových postranních řetězců na atom železa. Orientace hemové skupiny vůči samotnému proteinu je dána ne vazebnými interakcemi vinylových a propionátových částí s „páteří“ proteinu⁽¹⁾.
- Hem-c je typický pro cytochromy c. Od hemu-b se liší zejména kovalentním ukotvením hemové skupiny do proteinu pomocí thioeterové vazby mezi thiolátovou skupinou postranního řetězce cysteinu a uhlíkem z vinylové skupiny porfyriu v pozicích 2 a 4. Dále je tato prostetická skupina axiálně ligována pomocí jednoho nebo dvou postranních řetězců z histidinu, cysteinu, methioninu, tyrosinu nebo lysinu⁽¹⁾.

Rozdíly v aminokyselinách ligovaných na atom železa výrazně ovlivňuje elektronové okolí, redukční potenciál a s tím spojenou termodynamickou kontrolu všech funkcí proteinu. Tyto změny lze využít pro studium kinetiky vazby buď oxidu uhelnatého, kyslíku, nebo oxidu dusnatého do aktivního centra (tedy na železo) proteinu.

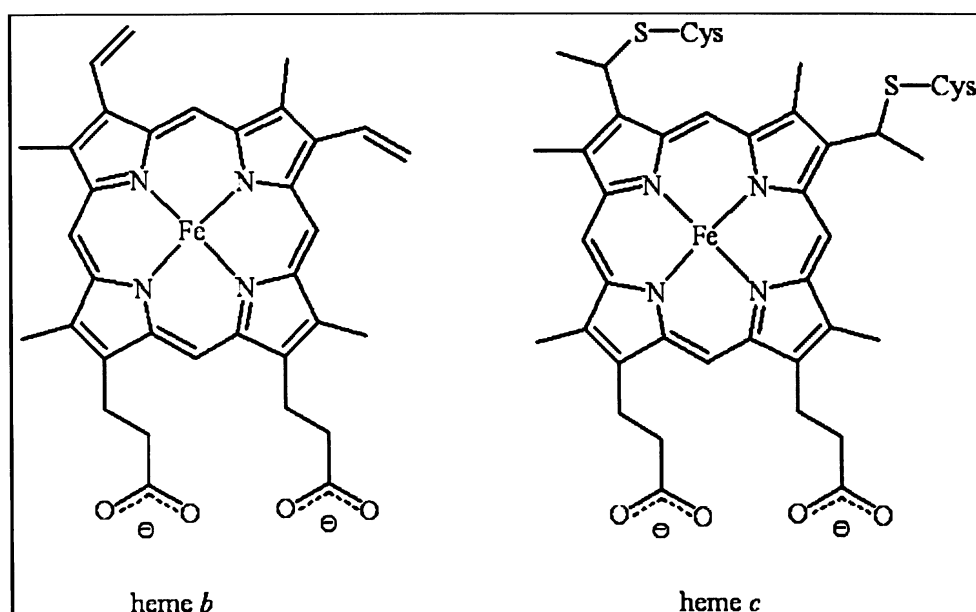
Jelikož aktivní místo tvoří kromě hemu i vlastní aminokyseliny proteinu, dělíme aminokyseliny blízké aktivnímu centru podle jejich důležitosti do několika skupin⁽²⁾:

- kontaktní – jsou v kontaktu se substrátem a jsou přímo v aktivním centru,

- posilovací – blízko nebo přímo v aktivním centru, avšak nejsou v kontaktu se substrátem,
- pomocné – nejsou v aktivním centru, ale pomáhají udržovat konformaci enzymu, tedy zajišťují funkčnost enzymu,
- aminokyseliny bez zjevné funkce.

Zaměněním kontaktních, posilovacích nebo pomocných aminokyselin můžeme tedy více či méně ovlivňovat funkci enzymu a kinetiku jím katalyzované reakce.

V neposlední řadě se pro studium hemových proteinů využívá právě oxidu uhelnatého jako nepřirozeného ligandu hemového železa, nebo oxidu dusnatého či kyslíku jako přirozených ligandů. Tyto malé molekuly (oproti aminokyselinám nebo hemu) slouží jako malé sondy, které je díky jejich specifickým absorpčním nebo vibračním spektrům možno sledovat relativně jednoduše. Každá změna v poloze, množství nebo pouze v poloze vůči pyrolovému jádru vede k odlišnému spektru.



Obr.1 Hem typu b a c (převzato z⁽¹⁾).

Jak již bylo zmíněno, mezi hemové proteiny patří cytochromy P450, NO-synthasy, katalasy, peroxidasy, hemoglobiny, myoglobiny, cytochromy c a b, nitroforiny. Tato práce je zaměřená na oxygenasovou doménu NO-synthasy (s vlastnostmi podobnými P450). Dále se tedy zaměřím na cytochromy P450 a NO-synthasy.

2.1. Cytochrom P450

2.1.1. Klasifikace a struktura cytochromu P450

Jelikož cytochrom P450 zasahuje do velmi mnoha procesů, které probíhají ať už v savcích, rostlinných či bakteriálních organismech, je jedním z nejvíce studovaných a nejlépe prostudovaných proteinů právě díky jeho nesmírné variabilitě funkcí a struktur.

Pro orientaci ve velkém množství druhů a typů cytochromů, které jsou kódovány více než 4000 geny, byla zavedena systematická nomenklatura. Tuto nomenklaturu definoval poprvé Nebert a jeho spolupracovníci⁽³⁾. Všechny známé cytochromy P450 fungují jako enzymové komplexy obsahující hemoprotein a reduktasové komponenty. Podle různé sekvenční homologie (aminokyselinového složení) hemové části enzymového komplexu dělíme cytochromy P450 do tzv.⁽¹⁾:

- superrodin (superfamilies), které mají sekvenční homologii menší jak 40%,
- rodin (families) majících sekvenční homologi větší jak 40 %,
- podrodin (subfamilies) majících sekvenční homologii větší jak 55%.

Standardní označení pro superrodinu je CYP, po něm následuje označení pro rodinu (např. CYP1), dále pak označení pro podrodinu (např. CYP1A) a poslední číslo označuje konkrétní cytochrom (např. CYP1A2). Pokud je tento symbol psán kurzívou, není označením pro konkrétní cytochrom, ale pro gen, který ho kóduje⁽⁴⁾.

Cytochromy patří do enzymové skupiny oxidoreduktas, tudíž další používané označení pro tyto enzymy je E.C.1.14.14.1.

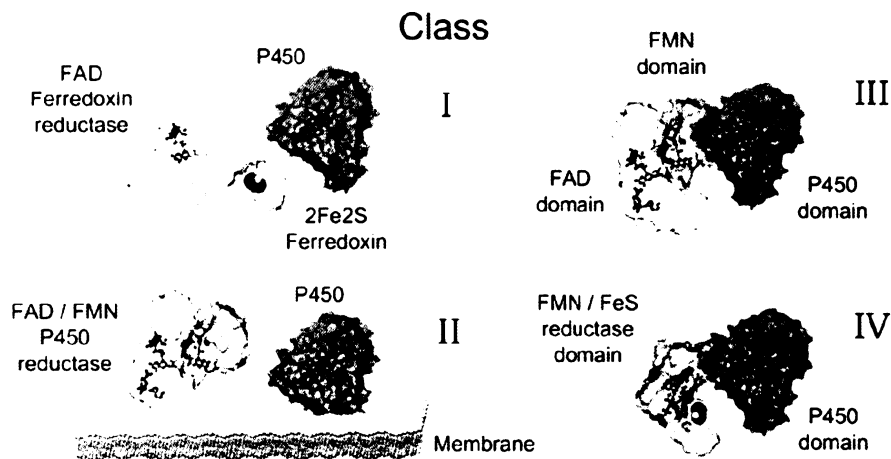
Dalším hlediskem pro klasifikaci může být rozdělení na:

- membránově vázané,
- volné cytochromy P450 (které jsou součástí cytoplasmy).

Mikrosomální, membránově vázané cytochromy P450, jsou mnohem méně prozkoumány z důvodu značných problémů v krystalizaci proteinu způsobených ukotvením proteinu do membrány. Vyjmutím těchto enzymových komplexů z membrány ztrácejí své přirozené prostředí, a tudíž se mohou chovat odlišně.

Dále je možné klasifikovat hemové proteiny v závislosti na systému přenosu elektronu. Z tohoto hlediska je dělíme na čtyři skupiny, dvě základní (I. a II.) a dvě méně časté (III. a IV. na obr.2)⁽¹⁾.

- I. Mitochondriální a většina bakteriálních – tyto cytochromy jsou složeny ze tří částí:
 - i. doména P450,
 - ii. ferredoxin,
 - iii. NADH dependentní ferredoxin – reduktasová doména obsahující FAD.
- II. Mikrosomální – složeny ze dvou částí, které jsou membránově vázané:
 - i. doména P450,
 - ii. NADPH dependentní diflavinová reduktasa (obsahuje FAD i FMN).
- III. Typická pro cytochrom P450 u bakterie *Bacillus megaterium* – složením obdobné s předchozí skupinou, ale není membránově vázaná a všechny části jsou součástí jednoho velkého polypeptidu.
- IV. Typická pro bakterii *Rhodococcus* – tato skupina byla objevena nedávno, složeny z následujících tří částí, které jsou součástí jednoho polypeptidu:
 - i. doména P450,
 - ii. NADPH dependentní reduktasa obsahující FMN,
 - iii. ferredoxin.



Obr.2 Klasifikace cytochromů P450 (převzato z⁽¹⁾).

Seznam cytochromů P450 je volně přístupný na internetových stránkách:

- <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html>,
- <http://www.icgeb.org/~p450srv/>.

Pro pochopení aktivity, funkce a metabolických pochodů P450 je nutné znát strukturu aktivního místa. Významným pokrokem v minulých letech bylo určení krystalové struktury savčích cytochromů (obr.3). Tento objev doplnily krystalové struktury cytochromů bakterií a hub.



Obr.3 Cytochrom P450 CYP2B4 (převzato z⁽⁵⁾).

Jádro cytochromu je tvořeno čtyřmi α -helixy (D-, L-, I-, E-helix), ze kterých první tři jsou uspořádány paralelně, a E-helix je uspořádán antiparalelně. Prostetická hemová skupina je umístěna mezi distálním I-helixem a proximálním L-helixem. Hem je vázán k cysteinu, který je součástí proteinové smyčky se specifickou aminokyselinovou sekvencí, prostřednictvím železa. Cystein je tedy pátý, proximální ligand vázaný na hemové železo a thiolátová skupina je původcem charakteristické pozice Soretova absorpčního pásu (o vlnové délce 450 nm) sledovaného pro Fe^{2+} -CO komplex (tedy komplex, ve kterém šestým ligandem na hemovém železnatém iontu je oxid uhelnatý). Podle této vlastnosti jsou pojmenovány cytochromy P450. Zmíněný cystein je velmi důležitý pro správnou funkci enzymu. Vedle elektron donačnických vlastností se uplatňuje také jeho interakce pomocí dvou vodíkových vazeb se sousedícími amidy glycinu či tryptofanu⁽⁵⁾.

I-helix prochází celým enzymem. Aminokyselinový zbytek threoninu v polovině tohoto helixu interaguje s aktivním místem a předpokládá se, že je nezbytný pro správné fungování katalytického cyklu⁽⁵⁾.

Díky velké různorodosti cytochromů je zřejmé, že i aktivní místo se mění v závislosti na substrátu, který je typický pro daný protein. Většina cytochromů je značně regio- i stereospecifická, avšak je zajímavé, že některé cytochromy mají dosti širokou specifitu (např. cytochrom lidských jater CYP3A4 je schopen metabolizovat přes 50 % běžně dostupných farmaceutik⁽⁵⁾).

Předpokládá se, že cytochrom má šest „míst pro rozpoznání substrátu (SRS)“⁽⁵⁾:

- SRS1 – oblast B'-helixu
- SRS2 – F-helix
- SRS3 – G-helix
- SRS4 – I-helix
- SRS5 – β 4-hairpin
- SRS6 – K-helix β 2 připojovací oblast

Tyto části odpovídají za substrátovou specifitu. Mutací těchto oblastí můžeme navázat jiný substrát do enzymu. Navázáním substrátu se aktivní místo trochu změní, to spouští katalytické mechanismy, a tedy aktivuje enzym ke své funkci.

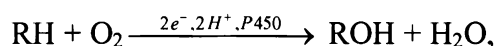
2.1.2. Funkce cytochromu P450

Cytochromy jsou unikátní enzymový systém, který je schopen plnit dvě základní funkce.

- 1) Metabolismus xenobiotik (látek pro organismus cizích) – cytochromy mají tzv. monooxygenasovou nebo dioxygenasovou aktivitu. Jsou schopny fixovat molekulu kyslíku, aktivovat ji a dále pak štěpit za vzniku dvou atomů kyslíku, ze kterých jeden atom zabudovávají do molekuly xenobiotika (většinou nepolární molekula) a druhý dává vzniku vody (u monooxygenas). U dioxygenas jsou oba atomy vloženy do molekuly xenobiotika za současného štěpení této molekuly (např. benzen)⁽⁶⁾. Tyto molekuly se stávají více polárními (rozpuštěnými ve vodě), díky čemuž mohou být dále metabolisovány a vylučovány močí ven z těla. Ovšem některá xenobiotika mohou být na druhou stranu aktivovány ke své toxické funkci (např. kancerogeny). Popisem mechanismu vkládání atomu (-ů) kyslíku do substrátu (tzv. katalytický cyklus) se budeme zabývat v dalším textu.
- 2) Biosynthesa významných signalizačních molekul, které se uplatňují při ontogenezi a homeostasi. Jde zejména o steroidní hormony. Dále P450 pak napomáhají konverzi nenasycených mastných kyselin na biologicky aktivní molekuly. Podobnou funkci mají i cytochromy rostlin (biosynthesa hormonů a degradace herbicidů) a hmyzu (biosynthesa hormonů pro kontrolu vývinu a napomáhání vzniku resistance proti insekticidům).

2.1.2.1. Katalytický cyklus cytochromu P450

Katalytický cyklus byl poprvé popsán u bakteriálního systému na přelomu 60. a 70. let minulého století. Jak již bylo řečeno výše, katalytický cyklus způsobuje vložení atomu kyslíku do nepolární molekuly (budeme se zabývat jen případem monooxygenasové aktivity enzymu). Chceme-li katalytický proces zapsat chemickou rovnicí, je to následovně:



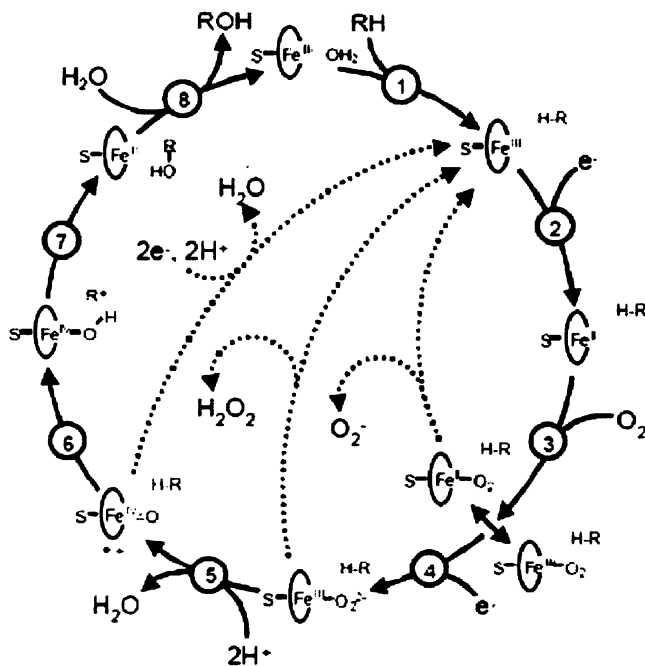
kde RH představuje nepolární substrát a ROH je substrát s vloženým atomem kyslíku. Celý mechanismus vyžaduje dvě redukce; zdroj elektronů je závislý na typu organismu, tedy typu cytochromu P450. V mitochondriálních a většině bakteriálních cytochrech je elektron přenášen z buď NADH, nebo NADPH na ferredoxin pomocí FAD dependentní reductasy. Avšak v mikrosomálních cytochrech je elektron přenášen z NADPH pomocí FAD- a FMN-obsahujících flavoproteinů, cytochromu P450 oxidoreduktasy, bez přítomnosti ferredoxinu. Někdy může být také donorem druhého elektronu cytochrom b_5 (tab.1).

Tab.1 Cesty elektronového transportu u různých typů cytochromů (převzato z^{(1) a (7)}).

<p>Bakteriální systém – Pseudomonas putida: NADH → putidaredoxin reductasa → putidaredoxin → CYP101</p> <p>Mitochondriální systém: NADPH → adrenodoxin reductasa → adrenodoxin → CYP11A1</p> <p>Bakteriální systém – Streptomyces carbophilus: NADH → cytochrom P450 reductasa → P450</p> <p>Mikrosomální systém: NADPH → cytochrom P450 reductasa → P450 NADH → cytochrom b_5 reductasa → cytochrom b_5 → P450</p> <p>Bakteriální systém – Bacillus megaterium: NADPH → reductasa obsahující FAD a FMN → CYP102</p>

Katalytický cyklus můžeme popsat v osmi krocích, ve kterých vzniká stejný počet (osm) intermediátů (obr.5). Volný enzym (bez substrátu) je axiálně ligován sírou z cysteinu a „hemová kapsa“ (aktivní místo s hemem) je zaplněna molekulami vody. Někdy se uvažuje,

že jedna molekula vody je vázána slabými interakcemi k trojmocnému hemovému železu, které je ve své nízkospinové formě ($S=1/2$).



Obr.4 Katalytický cyklus cytochromu P450 (převzato z⁽¹⁾).

Navázání substrátu

Obecně je známo, že navázání substrátu (krok číslo 1 na obr.4) je rychlý proces, který doprovázejí významné změny ve spektru. Nejvýraznější z těchto změn souvisejí s přechodem spinové formy železa z nízkospinové na vysokospinovou. Tato změna je dobře popsána především pro substráty typu I. Z hlediska termodynamického – navázání substrátu do aktivního místa vede k příznivým změnám v entropii a je předpokládáno, že navázání hydrofobního substrátu do cytochromu P450 je tedy entropicky řízený proces⁽⁷⁾.

Změna spinové formy železa má za následek snížení (respektive zvýšení) redoxního potenciálu železa přibližně o 100 mV. V nízkospinové formě se redukční potenciál $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ pohybuje v hodnotách od -400 mV do -170 mV. Zvýšení redoxního potenciálu usnadňuje přenos elektronu buď z flavoprotein reductasy, nebo z ferredoxinu.

Je předpokládáno, že navázání substrátu do aktivního místa enzymu vede ke změnám konformace enzymu, díky nimž dochází k interakcím mezi enzymem a redoxními částmi. Interakce redoxních částí způsobuje v podstatě substrátově vyvolané odtržení dvou komponent s charakteristickou sekundární strukturou (buď dvou α -helixů nebo dvou β -skládaných listů). U cytochromů P450 jde pravděpodobně o oddělení L a I helixů, které

mezi sebou svírají hemovou skupinu, nebo oddělení I helixu od β -skládaného listu. Tyto změny probíhají v okolí hemové skupiny. Toto rozdělení způsobuje snadnější interakci β -skládaného listu s redoxními komponenty a vede ke zvýšení flexibility v konformaci enzymu⁽⁷⁾.

Předpokládá se, že navázání substrátu vyvolává ještě další konformační změny, důležité pro oxygenační mechanismus, a tedy i pro celý katalytický cyklus. Vazbou substrátu na enzym dochází k „přepnutí“ konformace enzymu z otevřené formy na uzavřenou. Toto přepnutí má pak za následek změnu spinové formy železa, změnu redoxního potenciálu železa a také má vliv na navázání kyslíku, jeho aktivaci a vkládání do substrátu.

První redukce

Relativně rychlým krokem v katalytickém cyklu je první redukce hemového železa (krok číslo 2 na obr.4) z Fe^{3+} na Fe^{2+} . Tento proces v podstatě v sobě zahrnuje tři samostatné kroky a to:

- 1) přenos elektronu z NAD(P)H na reduktasu,
- 2) přenos elektronu z reduktasy na ferredoxin,
- 3) přenos elektronu z ferredoxinu na cytochrom P450.

V mikrosomálním systému, kde není žádný ferredoxin a reduktasa obsahuje jak FAD, tak i FMN, je tento proces dvoukrokový (tedy chybí přenos na ferredoxin a z ferredoxinu).

V bakteriálním systému je přenos elektronu z NADH na reduktasu velmi rychlý proces, avšak následné dva kroky přenosu elektronu jsou významně (20 krát) pomalejší. Naproti tomu v mikrosomálním systému je první krok relativně pomalý ($k = 28 \text{ s}^{-1}$) a druhý je ještě pomalejší ($k = 18 \text{ s}^{-1}$, pro redukci CYP2B4)⁽⁷⁾. Důvod pro nižší rychlost redukce mikrosomálních systémů může být ten, že tyto cytochromy obsahují dvě flavinové komponenty, které jsou blízko u sebe a rychlost přenosu elektronu mezi nimi je velmi rychlá. To by mohlo napomáhat účinnému párování elektronů.

Navázáním redoxních částí do cytochromu snižuje redoxní potenciál. Z tohoto lze předpokládat určitou spojitost mezi vazebnými interakcemi a přenosem elektronů⁽⁷⁾. Jde tedy o určité aminokyselinové zbytky, které hrají roli v transportu elektronů. Toto tvrzení bylo jednoduše ověřeno mutací těchto zbytků a následnými změnami elektronového přenosu. Příkladem může být CYP101, u kterého jsou předpokládány minimálně čtyři basické zbytky, jež formují elektrostatické interakce s komplementárními kyselými zbytky putidaredoxinu.

Navázání kyslíku

Navázání molekuly kyslíku (krok číslo 3 na obr.4) je dalším velice rychlým procesem ($k > 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) a dává možnost vzniku dvěma intermediátům. Nejdříve vzniká $\text{Fe}^{2+} - \text{OO}$ komplex, který se autooxidační reakcí formuje v superoxidový $\text{Fe}^{3+} - \text{OO}^-$ komplex. Superoxidový komplex je velmi stabilní a jeho stabilitu ještě umocňuje přítomnost vázaného substrátu. Tvorbu oxygenovaného komplexu je možno sledovat spektroskopicky, což je velice důležitá vlastnost uplatňující se při určování kinetiky dílčích reakcí katalytického cyklu. Komplexy poskytují v diferenčním spektru charakteristické pásy a to⁽⁷⁾:

- v mikrosomálním systému poskytují tři charakteristické pásy o vlnových délkách 440 nm, 560 nm a 590 nm,
- v bakteriálním systému CYP101 je to pás o vlnové délce 418 nm,
- v mitochondriálním systému CYP11A1 se pás vyskytuje při vlnové délce 555 nm.

Navázáním kyslíku se železnatý ion vrací do své nízkospinové formy a tím se také vrací atom železa zpátky do roviny porfyrinového cyklu (toto bylo sledováno hlavně pro myoglobin a hemoglobin).

Vysoká afinita kyslíku k železnatému iontu se vysvětluje pomocí spin – spin interakční energie, která je úměrná součinu dvou spinových kvantových čísel. Molekula kyslíku obsahuje dva nespárované elektrony a železnatý ion ve vysokospinové formě obsahuje čtyři nespárované elektrony. Z tohoto se dá uvažovat, že právě párovací spinové interakce hrají významnou roli a to může vysvětlovat přechod z nízkospinové formy na vysokospinovou při navázání substrátu. Dalším faktorem způsobujícím vysokou afinitu kyslíku k železu je negativní náboj na $\text{Fe}^{2+} - \text{cysteínovém}$ komplexu.

Je známo, že železnatý ion je velmi dobrým π -donorem, který usnadňuje silné vázání k π -akceptorovým ligandům jako molekula kyslíku, oxidu uhelnatého nebo oxidu dusnatého. Rychlost vazby oxidu uhelnatého do redukováného P450 je poněkud pomalejší než pro kyslík, ale afinita je asi desetkrát vyšší. Navázání oxidu uhelnatého je doprovázeno spektrální změnou, která poskytuje velice intenzivní Soretovo absorpční maximum okolo 450 nm.

To, že probíhá autooxidace z $\text{Fe}^{2+} - \text{OO}$ komplexu na $\text{Fe}^{3+} - \text{OO}^-$ komplex, bylo dokázáno právě absorpčním spektrem, které obsahuje pro neoxygenovaný komplex mikrosomálního systému pás o vlnové délce okolo 430 nm. Železnatý oxygenovaný komplex dává pás při

450 nm a ten prochází konverzí na železitý oxygenovaný komplex, který provází objevení se absorpčního pásu při 440 nm.

Navázání kyslíku může být „zvráceno“ v to, že se uvolní superoxidový anion a enzym se vrací do kroku jedna, jak je znázorněno na obr.4. Toto může být regulačním krokem pro kontrolu katalytického cyklu.

Druhá redukce

Předpokládá se, že druhá redukce (krok číslo 4 na obr.4) je rychlost limitujícím krokem celého katalytického cyklu. Toto poznání může být velmi důležité pro kinetiku uvedeného cyklu⁽⁷⁾.

Na druhé redukci se může podílet i cytochrom b_5 . Rychlostní konstanta přenosu elektronu z NADH na cytochrom b_5 pomocí cytochromu b_5 reduktasy je 30 s^{-1} , přenos z cytochromu b_5 na P450 má rychlostní konstantu mezi $2 - 7 \text{ s}^{-1}$. Rychlostní konstanta přenosu elektronu z NADPH na cytochrom P450 pomocí jeho reduktasy je okolo $1,1 \text{ s}^{-1}$.

Dodáním druhého elektronu do oxygenovaného komplexu P450 vznikají dva možné intermediáty; $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2^-$ nebo $\text{Fe}^{3+}\text{O}_2^{2-}$. V nepřítomnosti substrátu se ochotně formuje spíše superoxidový komplex s rychlostní konstantou 29 s^{-1} .

Dále se předpokládá, že se může rozpadem vzniklého komplexu formovat peroxid vodíku (obr.4), zvláště, je-li oxygenace substrátu z nějakého hlediska nepříznivá.

Tvorba produktu

Mechanismus formování produktu za současného rozkladu enzymového komplexu je nejméně prostudovaným krokem v celém katalytickém cyklu. Nejdříve se předpokládalo, že meziproductem formování substrátu je $\text{Fe}^{\text{V}}=\text{O}$, ale tento meziproduct nebyl nikdy zaznamenán. Proto tato hypotéza byla opuštěna. Další úvaha založená na analogii s peroxidasami je, že vznikajícím intermediátem může být $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$. Avšak Mössbauerovo spektrum odhalilo, že intermediát bude více podobný oxyhemoglobinu (signalizující přítomnost superoxidu) než peroxidasam. Přítomnost superoxidu potvrdilo i rezonanční Ramanovo spektrum⁽⁷⁾.

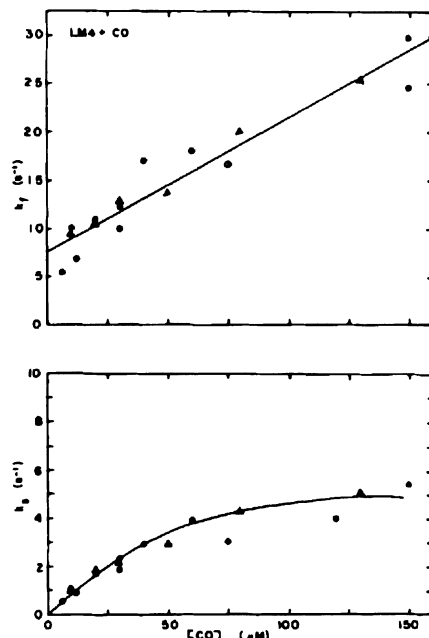
Přidávání elektronů na molekulu kyslíku prodlužuje vazbu mezi dvěma atomy kyslíku a tím snižuje energii vazby. Dochází tedy k oslabení této vazby, což usnadňuje její štěpení. Přijmutím dvou protonů se odděluje molekula vody (krok číslo 5 na obr.4). Pokud by

system přijal ještě další dva elektrony a dva protony, mohlo by dojít k uvolnění další molekuly vody, což by mělo za následek, že by se celý cyklus ocitl na začátku (obr.4).

Vložení molekuly kyslíku do substrátu (krok číslo 6-8 na obr.4) má pravděpodobně elektrofilní charakter, kdy se naváže substrátový vodík přímo na kyslík oxygenovaného enzymu a poté je tento komplex rozložen na volné pentakoordinované železo a oxygenovaný substrát. Tento substrát je nakonec vytěsněn molekulou vody, která zaujímá své místo v hemové kapse a stabilizuje ji.

2.1.3. Kinetika asociace a disociace oxidu uhelnatého s cytochromem P450

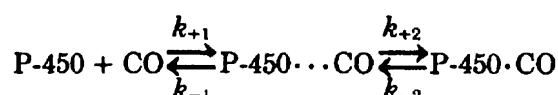
Vazba oxidu uhelnatého do cytochromu P450 se řídí kinetikou pseudo-prvního řádu⁽⁸⁾. Její časový průběh můžeme rozdělit na dva relativně velmi rychlé kroky, které závisí na koncentraci oxidu uhelnatého, a na jednu nebo dvě koncentračně nezávislé fáze, které jsou minoritní a o dost pomalejší. Koncentračně závislé části kinetiky vazby oxidu uhelnatého do cytochromu popisují dvě rychlostní konstanty, z nichž jedna odpovídá rychlejšímu ději (k_f) a poskytuje lineární závislost na koncentraci oxidu uhelnatého a druhá (k_s) závisí hyperbolicky (obr.5).



Obr.5 Závislost rychlostních konstant k_f a k_s na koncentraci CO v přítomnosti substrátu pro cytochrom CYP2B4-cytochrom králičích jater s 5,6-benzoflavonem jako substrátem (převzato z⁽⁸⁾).

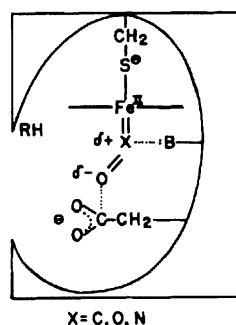
Byly navrženy dva mechanismy⁽⁸⁾.

- Dvoustavový mechanismus, kde se protein v bezligandovém stavu vyskytuje ve dvou konformacích s různou afinitou k oxidu uhelnatému. Tento mechanismus popisuje rychlostní konstanta k_s , která je tím vyšší, čím nižší je koncentrace oxidu uhelnatého v roztoku.
- V druhém mechanismu navázáním prvních molekul oxidu uhelnatého dojde k isomerizaci nebo ke konformačním změnám a tyto změny pravděpodobně zvyšují stabilitu komplexu. Mechanismus lze zapsat takto:



kde znázornění intermediátu P-450...CO vyjadřuje jeho nižší afinitu a stabilitu než rovnovážný komplex P-450 · CO.

Předpokládá se, že přístupu tak malé molekuly, jako je oxid uhelnatý nebo oxid dusnatý, by neměly bránit žádné sterické překážky v proteinu. Ovšem tyto předpoklady se neshodují s krystalografickými poznatky pro hemoglobin a myoglobin, kde přístup ligandů je bráněn postranními řetězci aminokyselin, které „trčí“ do hemové kapsy proteinu a významně omezují vstup ligandů. Z toho lze usuzovat, že molekula oxidu uhelnatého bude nějakým způsobem „ohnutá“ v aktivním místě, tzn., že vazby Fe = C = O nebudou lineární. Na druhou stranu toto „ohnutí“ stabilizuje enzymový komplex. Byly zjištěny dva typy interakce oxidu uhelnatého (také oxidu dusnatého a kyslíku) s postranními řetězci (obr.6). První je donor-akceptorová interakce mezi elektron-deficitním uhlíkem z malého ligandu a sousedícím elektrony-dávajícím atomem, např. histidylovým dusíkem. Druhá interakce je přesně opačného charakteru, přebývající elektrony má kyslík z axiálního ligandu a nedostatek elektronů má nějaká skupina na proteinu. Tyto interakce mohou být také charakteru vodíkových můstků.



Obr.6 Schematická interakce ligandu s cytochromem CYP2B4. Znázornění ohnutí ligandu v aktivním místě (převzato z⁽⁸⁾).

Rychlostní konstanty disociace oxidu uhelnatého z aktivního místa cytochromu P450 byly měřeny pomocí vytěšňování tohoto ligandu oxidem dusnatým. Tato „výměnná“ reakce odhalila, že limitující krok disociace popisuje rychlostní konstanta k_{-2} odpovídající zpětné reakci přeměny méně stabilního P-450...CO komplexu na stabilní komplex s vyšší afinitou k oxidu uhelnatému (P-450 . CO). Ovšem tyto konstanty jsou proti příslušným konstantám asociace téměř zanedbatelné (tab.2).

Tab.2 Rychlostní konstanty asociace (k_{+1} a k_{+2}) a disociace (k_{-1} a k_{-2}) oxidu uhelnatého pro dva různé cytochromy (převzato z⁽⁸⁾).

	$k_{+1} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{-1} (M^{-1}s^{-1})$	$k_{+2} (s^{-1})$	$k_{-2} (s^{-1})$
<i>CYP2B4</i>	$3,2 * 10^6$	18,2	53	0,11
<i>CYP2B1</i>	$1,9 * 10^6$	20	48	0,05

2.2. NO-synthasa (NOS)

Synthasa oxidu dusnatého je enzym, který v organismu napomáhá produkci oxidu dusnatého. Oxid dusnatý byl dlouhou dobu v biochemii neznámý. Bylo známo, že v těle se vyskytuje látka označovaná jako „endothelium-derived relaxing faktor“ (EDRF), která vzniká v endotheliu a způsobuje relaxaci buněk tvořících cévy. To znamená, že není-li tato látka přítomna, dochází ke smršťování cév, a pokud přítomna je, dochází k roztahování cév. V roce 1986 se zjistilo, že touto látkou je oxid dusnatý, což bylo pro biochemickou veřejnost velké překvapení. Díky této funkci má oxid dusnatý velký fyziologický význam. Působí tedy na systém kardiovaskulární (regulace krevního tlaku, vztah k septickému šoku), centrální nervový, periferní nervový, ledvinový, dýchací, endokrinní, imunitní a na komunikaci mezi buňkami (vazba na guanylátcyklasy)⁽⁹⁾. V roce 1992 byla molekula oxidu dusnatého vyhlášena za molekulu roku.

Nám známá NO-synthasa z biochemického hlediska není synthasa, ale oxidoreduktasa (E.C.1.14.13.39), ovšem špatný název se natolik vžil, že v odborné literatuře se se správným názvem téměř nesetkáme.

NOS má velmi široké zastoupení v organismech, její přítomnost byla prokázána u savců, hmyzu, bakterií i hub. Podle vlivu vápenatých iontů na produkci NOS rozeznáváme dvě základní isoformy⁽⁹⁾:

- konstitutivní – produkují neustále malé množství NO (řádově *pmol*), regulováno expresí,
- inducibilní – rychlá produkce velkého množství (řádově *nmol*).

Můžeme se také setkat s dělením savčí NOS na tři základní skupiny podle místa působení⁽¹⁾:

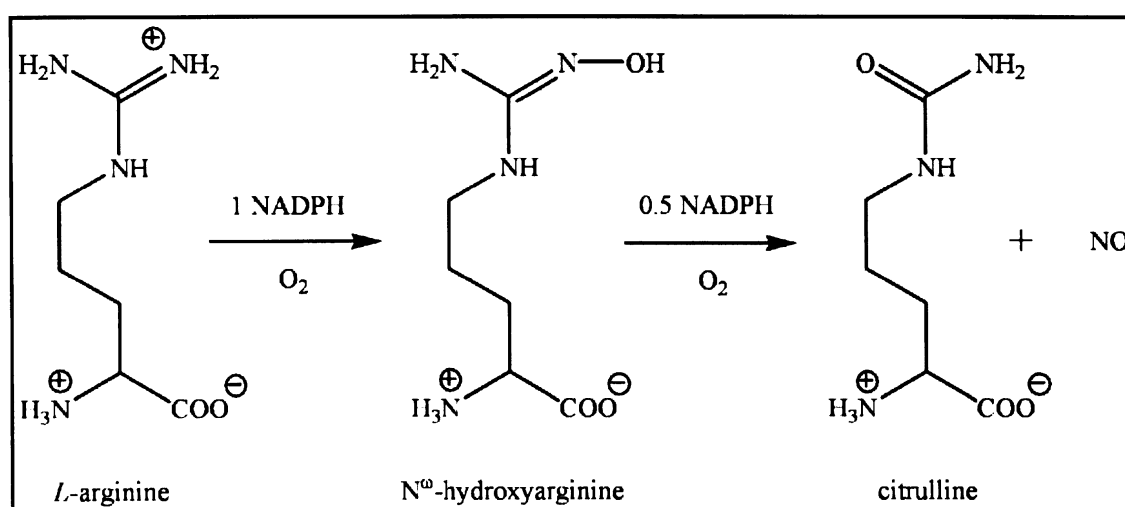
- nervová NOS (nNOS) – je vyžadována při nervovém přenosu,
- endoteliální NOS (eNOS) – odpovědná za stahování cév,
- inducibilní NOS (iNOS) – potřebná pro imunitní odpověď organismu.

Struktura NOS je velmi podobná se strukturou hemových oxygenas. Podobně jako cytochrom P450 obsahuje hem typu b, který je axiálně spojen s proteinem thiolatovou skupinou ze zbytku cysteinu. Dále pak zahrnuje NADPH – dependentní FAD a FMN obsahující reduktasu, která je trvale připojena ke své molekule (na rozdíl od cytochromu), kalmodulin (uplatňuje se při přenosu elektronu z FMN na hemovou prostetickou skupinu) a tetrahydrobiopterin. (Není přesně známa jeho funkce, pravděpodobně se jedná o allosterecký efekt. Chabin a jeho skupina^(9a) odhalili, že inhibitory, které kompetují s H₄B, způsobují změny v aktivaci enzymu. Z tohoto usoudili, že vazebná místa pro L-arginin a H₄B jsou velmi blízko hemové prostetické skupině). V organismu se NOS vyskytuje jako homodimer, kde všechny výše jmenované části jsou dvakrát (obr.7) a na jejich rozhraní je zinečnatý ion⁽¹⁾.



Obr.7 Krystalová struktura lidské iNOS (převzato z⁽¹⁾).

Jak již bylo řečeno výše, NOS se významně podílí na synthese oxidu dusnatého. Substrátem pro tuto reakci je L-arginin, který je nejdříve molekulou kyslíku za přítomnosti NADPH a NOS oxidován na *N*-hydroxyarginin. *N*-hydroxyarginin je následně opět oxidován molekulou kyslíku za přítomnosti 0,5 mol NADPH a NOS na L-citrulin (obr.8). Při této reakci se uvolní dvě molekuly vody a jedna molekula oxidu dusnatého. Je zajímavé, že označíme-li si každou molekulu kyslíku jinak, zjistíme, že první oxidací je vložen jeden atom kyslíku na atom dusíku, ovšem druhou oxidací je tento atom vytěsněn atomem kyslíku z druhé molekuly kyslíku a je vyloučen z reakce v podobě oxidu dusnatého⁽⁹⁾.



Obr.8 Reakce vzniku oxidu dusnatého pomocí NOS (převzato z⁽¹⁾).

Velice zvláštní a zajímavou částí této reakce je její druhá část. Reakce, do které vstupuje pouze jedna polovina molu NADPH, není doposud známa.

Označíme-li první reakci rychlostní konstantou k_1 a druhou reakci konstantou k_2 , pak platí, že $k_1 > k_2$.

Ačkoli je NOS velmi podobná cytochromu P450, existuje také několik významných rozdílů⁽⁴⁾:

- nízká sekvenční homologie,
- absorpční maximum Fe^{II}-CO komplexu je posunuto k vlnové délce 444 nm,
- substráty NOS (L-arginin a *N*-hydroxyarginin) jsou hydrofilní a polární,
- přítomnost a vliv tetrahydrobiopterinu a kalmodulinu na funkci enzymu.

2.3. Ramanova spektroskopie

Ramanova spektroskopie využívá interakci elektromagnetického záření s molekulami. V homogenním prostředí provází tuto interakcí řada jevů, které mohou být základem mnoha experimentálních technik. Může dojít k odrazu (měříme reflektanci), průchodu s částečnou absorpcí (transmittance, absorbance), luminiscenčním jevům (fosforescence, fluorescence), elastickému (Rayleighovu) rozptylu a samozřejmě také neelastickému Ramanovu rozptylu⁽¹⁰⁾.

Rayleighův rozptyl je způsobován pružnými srážkami fotonů s molekulami, a jestliže použijeme monochromatické záření, má rozptýlené záření stejnou frekvenci jako záření původní. Naproti tomu Ramanův rozptyl se vyznačuje tím, že frekvence rozptýleného záření má nižší a vyšší hodnoty frekvence než frekvence záření původního. Intenzita tohoto rozptýleného záření je asi 10^5 krát menší než intenzita dopadajícího záření⁽¹¹⁾. Klasická představa o podstatě Ramanova rozptylu je taková, že vibrační pohyb jader s frekvencí f mění mírně polarizovatelnost molekuly⁽¹⁰⁾. Proto indukovaný dipólový moment má vedle dominantní složky oscilující na frekvenci ν_0 optického záření i podstatně menší příspěvky představované dipólovými momenty oscilujícími na frekvencích $\nu_0 - f$ a $\nu_0 + f$. Dipólový moment lze zapsat jako:

$$\mathbf{d} = \alpha \mathbf{E}.$$

Směr tohoto dipólového momentu závisí na intenzitě elektrického pole E a polarizovatelnosti (definována jako dipólový moment indukovaný v molekule elektrickým polem jednotkové intenzity⁽¹²⁾) α . Intenzitu čar ve spektru a jejich závislost na teplotě nedokáže vysvětlit klasický výklad založený na modulaci záření vibracemi a rotacemi molekul, ale kvantový výklad, který vychází z nepružných srážek fotonů s molekulami doprovázených výměnou energie⁽¹¹⁾.

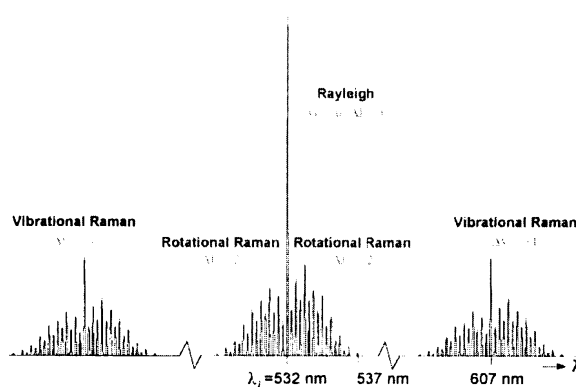
Proces Ramanova rozptylu musíme chápat jako dvoufotonový, ve kterém jeden foton zaniká a druhý vzniká⁽¹³⁾. Ovšem tento proces je tak rychlý, že jednotlivé kroky nelze od sebe oddělit. Při tomto procesu tedy dochází k vyrazení fotonu z určitého elektronového a vibračního stavu na nějaký mezielektronový (metastabilní) stav, ze kterého se ten nově vzniklý foton vrátí na stejný elektronový stav, ale na odlišnou vibrační hladinu. Pokud jde o vibrační hladinu vyšší (s vyšším vibračním číslem) než byla hladina původní, říkáme, že se jedná o Stokesův přechod a příslušné linie ve spektru se nazývají Stokesovy. Pokud se

vrátí na vibrační hladinu nižší, než byla hladina původní, jedná se o anti-Stokesův přechod a analogicky příslušné linie nazýváme anti-Stokesovy.

Díky Ramanovu rozptylu sledujeme jaderný pohyb pomocí elektronového pohybu závislého na jaderných souřadnicích (Born – Oppenheimerova aproximace). Získáme tím elektronovou vlnovou funkci, kterou rozvineme do Taylorova rozvoje odpovídajícímu rovnovážné poloze jader. Úpravou tohoto rozvoje získáme tři členy, z nichž nejdůležitější jsou první dva. První odpovídá Condonově aproximaci (A-term) a druhý Herzberg-Tellerově opravě (B-term). Použitím této aproximace dostaneme dvě přibližná řešení⁽¹³⁾.

- Neresonanční přiblížení – v elektronovém stavu se zanedbává jemná vibrační struktura a nahradí se nějakou střední. Toto přiblížení nenese informaci o elektronových stavech. Zjednodušíme-li Condonovu aproximaci, zjistíme, že nepřispívá k Ramanovu rozptylu, ale pouze k Rayleighovu rozptylu. Tedy se uplatňuje jen B-term. Povoleny jsou pouze fundamentální přechody, tedy takové, kde právě jeden z normálních módů změní kvantové číslo o jednotku, ostatní kvantová čísla zůstávají stejná. Podle pravděpodobnosti obsazení hladin dostaneme poměr intenzity sobě odpovídajících Stokesových a anti-Stokesových pásů. Dají se pozorovat vibrační pásy všech aktivních vibrací molekuly⁽¹³⁾.
- Resonanční přiblížení – resonance budícího záření s elektronovým přechodem (projevujícím se v absorpčním spektru). Výrazně se zvýší intenzita některých Ramanových přechodů, díky čemuž může být nižší koncentrace vzorku. A-term dominuje pro úplně symetrické módy, a B-term tedy popisuje neúplně symetrické módy. U tohoto přiblížení pozorujeme jen selektivní zesílení vibračních pásů souvisejících s rezonančně vzbuzeným elektronovým přechodem, při změně excitace se změní i Ramanovo spektrum⁽¹³⁾.

Příklad Ramanova spektra je znázorněn na obrázku číslo 9.

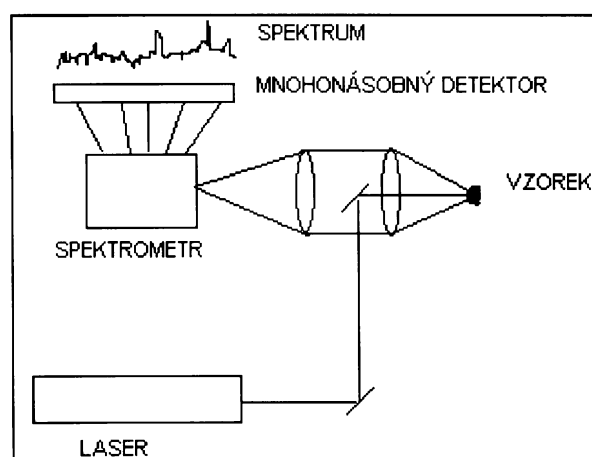


Obr.9 Ramanovo spektrum molekuly dusíku (převzato z⁽¹⁴⁾).

Výběrová pravidla pro Ramanovu spektroskopii vyplývají ze symetrie, která vychází z vibrační vlnové funkce. U molekul se středem symetrie pro žádnou z Ramanových linií nenalezneme odpovídající pás v infračerveném spektru. Tedy tyto dvě spektroskopie jsou si navzájem doplňkovými.

Přístroje pro měření Ramanových spekter lze rozdělit do tří tříd podle typu přístroje.

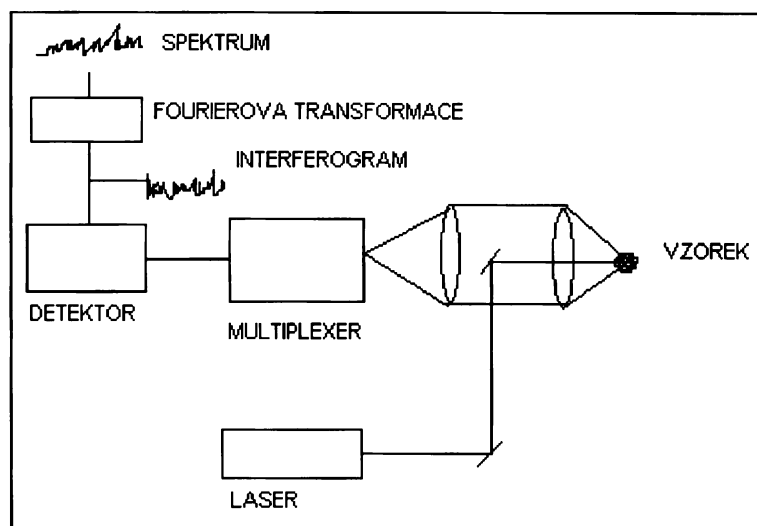
- 1) Disperzní mnohokanálové přístroje – schéma tohoto spektroskopu je zobrazeno na obr.10. Výhodou přístroje je vyšší poměr signál/šum a jeho excitační vlnová délka, která se pohybuje mezi 200 – 800 nm. Mezi nevýhody patří obtíž s odstraněním fluorescence, nelineárně proměnné spektrální rozlišení, nutnost zvolit vhodný kompromis mezi rozlišením a pokrytím⁽¹³⁾.



Obr.10 Schéma Ramanova disperzního mnohokanálového spektroskopu.

- 2) Nedisperzní Ramanův spektroskop s Fourierovou transformací – schéma tohoto spektroskopu je zobrazeno na obr.11. Výhodou jsou vysoká přesnost určení frekvence, vyšší světelnost, excitační vlnová délka vyšší než 1064 nm, díky níž se ve spektru téměř vůbec neprojeví fluorescence. Nevýhodou jsou pak horší poměr signál/šum a potřeba vysokého výkonu budícího laseru, nižší účinný průřez rozptylu a nižší pozadí⁽¹³⁾.
- 3) Skenující přístroje s fotonásobičem – tento typ je postupně stále méně používán, jeho nevýhodou je nízký odstup signálu od šumu, resp. nutnost dlouhé akumulace spekter a časová náročnost měření.

Pro odstranění nežádoucích emisí (jako Rayleighův rozptyl, fluorescence, emise laseru) se používají různé filtry (notch-filtry, holografické filtry), mřížky a skleněné krychle.



Obr.11 Schéma nedisperzního FT Ramanova spektroskopu.

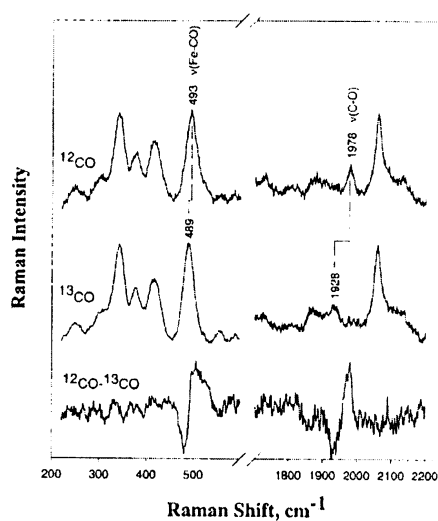
Možné je také využití povrchem zesíleného Ramanova rozptylu (SERS), který lze vysvětlit dvěma základními mechanismy. Jak bylo řečeno výše, dipólový moment je popsán jako:

$$\mathbf{d} = \alpha \mathbf{E},$$

závisí tedy na polarizovatelnosti a intenzitě elektromagnetického pole. Tyto dva mechanismy využívají změny vždy jedné složky. Prvním mechanismem je elektromagnetický efekt (mění se \mathbf{E}), ve kterém vlastní záření pohlcují povrchové plasmony kovu. Ty jsou pak zdrojem dalšího záření. Dochází k dvojnásobnému zesílení (dopadajícího i indukovaného záření). Druhým výkladem zesílení je tzv. chemický mechanismus, založený na změně polarizovatelnosti molekuly α v blízkosti povrchu. Excitované záření vyráží elektrony z kovu, ty jdou na vyšší energetickou hladinu, a pokud je této hladině blízko námi sledovaná molekula, jdou vyražené elektrony na hladinu této molekuly. Díky uvedenému mechanismu se vyzáří více energie. Výhody SERS jsou velké zesílení (stačí daleko menší koncentrace látky), zhášení fluorescence, povrchová selektivita a možnost určit orientaci molekul na povrchu. Nevýhodami jsou nižší reprodukovatelnost experimentů, možnost rozkladu nebo jiného ovlivnění sledované látky, a omezení efektu zesílení jen na některé molekuly⁽¹⁵⁾.

2.4. Vibrace vazby Fe-CO

Navázání ligandu (oxidu dusnatého, kyslíku nebo oxidu uhelnatého – zbytek práce se bude zabývat především tímto ligandem) je doprovázeno změnami v Ramanově spektru. Proto se Ramanova spektroskopie spolu s infračervenou spektroskopií hojně využívá právě pro studium kinetiky vazby těchto aduktů. Pro popis této kinetiky si vystačíme se třemi vibračními módy, kterými jsou Fe-CO „stretching“ (vibrace vazby mezi železem a uhlíkem, označováno jako $\nu_{(\text{Fe-CO})}$), Fe-C-O „bending“ (vibrace popisující změnu vazebného úhlu Fe-C-O, označováno jako $\delta_{(\text{Fe-C-O})}$) a C-O „stretching“ (vibrace vazby mezi kyslíkem a uhlíkem, označováno jako $\nu_{(\text{C-O})}$, většinou měřeno pomocí IR spektroskopie). Pokud by nic nebránilo přístupu ligandu k železu, byla by pravděpodobně vazba oxidu uhelnatého na železo lineární a kolmá k rovině porfyrinového skeletu. Odchytky od tohoto uspořádání se výrazně projevují v poloze vibračních pásů. Dále jsou pozice jednotlivých vibračních módů velmi citlivé na izotopové substituce oxidu uhelnatého a to umožňuje jejich lokalizaci v jinak dosti komplikovaném spektru. Např. vazba mezi železem a uhlíkem vibruje s určitou frekvencí. Nahradíme-li CO těžšími izotopy ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}$), celá skupina je daleko těžší, takže logicky vibruje s menší frekvencí (obr.12). Ve spektru se tato změna promítne snížením vlnočtů pík u izotopového ligandu. Vlnočty se snižují ve směru záměny $^{12}\text{C}^{18}\text{O} \rightarrow ^{13}\text{C}^{16}\text{O} \rightarrow ^{12}\text{C}^{18}\text{O} \rightarrow ^{13}\text{C}^{18}\text{O}$. Tato substituce je hojně využívána pro identifikaci pík příslušných módů (a tedy i rozlišení či oddělení od vibrací porfyrinu)⁽¹⁷⁾.



Obr.12 Spektra izotopové záměny. Horní spektrum pro izotop ^{12}CO , prostřední pro izotop ^{13}CO a dolní spektrum je rozdílové spektrum ^{12}CO - ^{13}CO (převzato z⁽¹⁶⁾).

Velký vliv na pozici píků má bezpochyby další ligand vázaný na železo. Tyto ligandy ovlivňují distribuci elektronů v celé skupině hemu a tím i sílu vazby Fe-CO, která je také závislá na délce vazby. Silnější vazba je většinou kratší a vibruje s vyšší frekvencí. Naopak slabší vazba je delší, a tudíž vibruje s frekvencí nižší. Z tohoto důvodu dělíme také proximální ligandy na tzv. slabé a silné. Mezi slabé ligandy patří např. tetrahydrofuran, naopak zástupcem silných ligandů jsou např. *N*-methylimidazol nebo pyridin. Čím slabší je proximální trans ligand, tím silnější je vazba železa s oxidem uhelnatým a s tím vyšší frekvencí tento ligand vibruje. Vlnčet $\nu_{(\text{Fe-CO})}$ pro modelový komplex (tetrahydrofuran)(karbonyl)mesotetra($\alpha\alpha\alpha$ -*O*-pivalamidofenylporphinato)železa, (viz obr. 13) $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TpivPP})(\text{THF})\text{CO}$, je přibližně 527 cm^{-1} . Změnou ligandu z tetrahydrofuranu na *N*-methylimidazol se sníží vlnčet $\nu_{(\text{Fe-CO})}$ na $489 \text{ cm}^{-1(17)}$. Naproti tomu zesílením vazby mezi železem a uhlíkem z oxidu uhelnatého se oslabí vazba mezi uhlíkem a kyslíkem v CO. Toto bylo pozorováno infračervenou spektroskopií v $\text{Fe}(\text{deutero})(\text{THF})\text{CO}$, jehož $\nu_{(\text{C-O})}$ byla 1955 cm^{-1} a v $\text{Fe}(\text{deutero})(\text{Py})\text{CO}$, s vlnčetem $\nu_{(\text{C-O})}$ $1973 \text{ cm}^{-1(14)}$ (příklady dalších enzymových komplexů a jejich vlnčetů pro $\nu_{(\text{Fe-CO})}$ a pro $\nu_{(\text{C-O})}$ jsou uvedeny v tab.3).

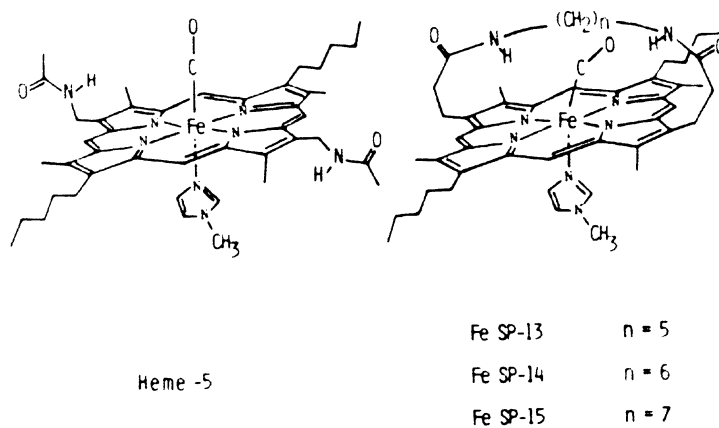
Tab.3 Vlnčety vybraných enzymových systémů (převzato z⁽¹⁷⁾).

$\nu_{(\text{Fe-CO})} [\text{cm}^{-1}]$	$\nu_{(\text{C-O})} [\text{cm}^{-1}]$	enzymové komplexy
512	1944	<i>myoglobin izolovaný ze spermií velryb</i>
507	1951	<i>lidský hemoglobin typu A</i>
495	1954	<i>Hem-5 (N-MeIm)</i>
496	1962	<i>Fe (TpivPP)(1,2-Me₂Im)</i>
489	1966	<i>Fe (TpivPP)(N-MeIm)</i>
484	1976	<i>Fe (TPP)(Py)</i>
526	1957	<i>Fe (TpivPP)(THF)</i>

Afinita oxidu uhelnatého k hemu také jednoznačně závisí na typu proximálního trans ligandu a to tím způsobem, že ligand, který brání přístupu axiálního ligandu (tzv. bránící ligand), snižuje afinitu axiálního ligandu. Tento předpoklad potvrzuje fakt, že afinita komplexu $\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TpivPP})(1,2\text{-Me}_2\text{Im})$ s oxidem uhelnatým (kde dimethylimidazol je bránící ligand) je 400 krát nižší, než afinita nebráněného komplexu meso-tri($\alpha\alpha\alpha$ -*O*-pivalamidofenyl)- β -*O*-5-(1-imidazolyl)-(valeramidofenylporfynato)železo^(II) ($\text{Fe}^{\text{II}}(\text{Piv}_3)(5\text{CImP})$)⁽¹⁷⁾.

Dalšími pokusy bylo zjištěno, že afinita ligandu k hemovému železu nijak nesouvisí se silou vazby Fe-C. Tím pádem také nesouvisí s frekvencí vibrace této vazby⁽¹⁷⁾.

Předpokládá se, že pokud není něčím ovlivňována a bráněna vazba oxidu uhelnatého k hemovému železu, vazba CO je kolmá na rovinu porfyrinového kruhu (s odchylkou max. 2°). Krystalografické studie ovšem odhalily, že CO může být ohýbán či odkloňován z kolmého směru pomocí interakcí s různými distálními zbytky aminokyselin v hemové kapse (nejčastěji histidinu, valinu, leucinu nebo isoleucinu). Tento ohyb lze sledovat také pomocí Ramanovy spektroskopie sérií pokusů, kdy hem je propojen uhlovodíkovým řetězcem s různým počtem uhlíků (obr.13), který interaguje s axiálním ligandem. Jako proximální ligand byl použit *N*-methylimidazol. Vlnočet $\nu_{(\text{Fe-CO})}$ nebráněného komplexu byl 495 cm^{-1} , ale pro bráněný komplex s $n = 6$ se zvýšil počet píků z jednoho na dva o vlnočtech 504 a 512 cm^{-1} . Tyto dva píky se dají vysvětlit tím, že v jednom případě je proximální ligand (*N*-methylimidazol) na straně bráněné uhlovodíkovým řetězcem (pík 504 cm^{-1}), kdežto v druhém případě je na bráněné straně axiální ligand oxid uhelnatý (pík 512 cm^{-1}). Zvýšením počtu uhlíků v bránícím uhlovodíkovém řetězci se snižují vlnočty píků (struktura není tak stěsnaná, proto vibruje s nižší frekvencí)⁽¹⁸⁾.

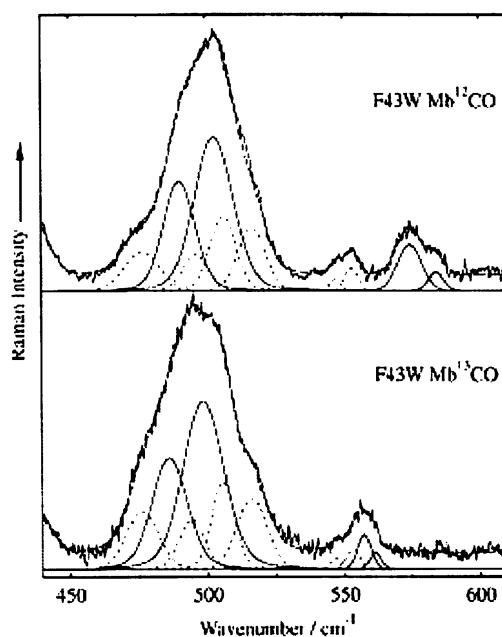


Obr.13 Struktura hemového komplexu s oxidem uhelnatým pro nebráněný (hem-5) a bráněný hem s *N*-methylimidazolem jako axiální bází (převzato z⁽¹⁷⁾).

Snižování, respektive zvyšování vlnočtu v Ramanově spektru v závislosti na úhlu ohybu axiálního ligandu souvisí s tzv. efektivní hmotností CO kladenou na vazbu Fe-CO. To je v podstatě analogie izotopové záměny. Čím vyšší je efektivní hmotnost na vazbě Fe-CO, tím tato vazba vibruje s nižší frekvencí. Naopak čím nižší je uvedená hmotnost, tím vyšší je frekvence vibrace. Je-li tedy vazba Fe-C-O v kolmém směru na rovinu porfyrinového

kruhu s úhlem 180° , kyslík maximálně přispívá svou hmotností do efektivní hmotnosti, tedy vlnčet je nejnižší. Snižuje-li se úhel Fe-C-O, kyslík přispívá méně a méně do efektivní hmotnosti, tedy vlnčet se zvyšuje⁽¹⁹⁾.

Ve spektru je možno sledovat, že pík odpovídající Fe-CO „stretching“ vibraci je rozšířený a pravděpodobně neodpovídá pouze jedné vibraci. Pomocí techniky tzv. spektrálního rozkladu tohoto píku se dá zjistit počet komponent zahrnutých v tomto píku. Většinou podobný vlnčet mají tzv. skeletální vibrace porfyrinového kruhu. Dále pak do tohoto píku spadají i různé konformery komplexu hem-CO, ty tedy odpovídají přímo za vibrace Fe-CO. Anderton a jeho skupina prováděli spektrální rozklad tohoto píku v různých mutantních typech myoglobinu izolovaných ze spermií velryb a ligovaných oxidem uhelnatým. Zjistili šest komponent (obr.14), ze kterých čtyři popsali jako skeletální vibrace, a zbylé dva přiřadili dvěma různým konformerům⁽²⁰⁾.



Obr.14 Spektrální separace píků Ramanova spektra mutantní formy myoglobinu. Čárkované píky odpovídají skeletálním vibracím, plné píky pak konformerům hem-CO (převzato z⁽²⁰⁾).

2.5. Funkce pro spektrální rozklad píkú⁽²¹⁾(22)

Pro spektrální rozklad píkú se obecně používají tři přístupy, založené na předpokládaném tvaru spektrálních křivek. Základem je použitá spektrální funkce: Lorentzova, Gaussova a Voigtova. Jednotlivé funkce se liší podstatou rozšíření spektrálního pásu: vlivem neidealit v chování přístroje, srážek mezi molekulami, Dopplerovým efektem. Lorentzova funkce je „nejstíhlejší“, „nejširší“ je funkce Gaussova. Voigtova funkce leží mezi těmito dvěma funkcemi. Z praktického hlediska, chovaly-li by se přístroje zcela ideálně, popisovala by Ramanovo spektrum v roztoku Lorentzova funkce. Ve skutečnosti tomu tak není, a proto se podle míry neidealit a vlivu přístroje používá buď Voigtova či Gaussova funkce. Nezávisle proměnná souřadnice při spektrálním rozkladu by měla být úměrná buď frekvenci, vlnové délce, nebo energii. Druhá souřadnice by měla být kvantitativním vyjádřením výsledku měření.

Gaussova funkce

S Gaussovou funkcí se můžeme setkat téměř všude. Základní funkce pro výpočet amplitudy a plochy pod křivkou jsou:

$$y = a_0 \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - a_1}{a_2} \right)^2 \right] \text{ pro amplitudu,}$$

kde a_0 – amplituda, a_1 – střed amplitudy a a_2 – šířka amplitudy.

$$y = \frac{a_0}{\sqrt{2\pi a_2}} \exp \left[-\frac{1}{2} \left(\frac{x - a_1}{a_2} \right)^2 \right] \text{ pro plochu pod křivkou,}$$

kde a_0 – plocha amplitudy, a_1 – střed amplitudy a a_2 – šířka amplitudy.

Funguje jako klasická statistická funkce pro rozklad. Ve spektroskopii k rozšíření této funkce napomáhají efekty spojené s optickými a elektrickými částmi přístroje. Ovšem rozšíření píkú nemusí být spojeno vždy jen s přístroji. Gaussovo rozšíření bylo pozorováno u všech optických spekter plynů. Toto je vysvětlováno Dopplerovým efektem, kdy záření molekul pohybujících se směrem k pozorovateli je posunuto k vyšším frekvencím a záření molekul pohybujících se od pozorovatele je posunuto k nižším frekvencím.

Lorentzova funkce

Lorentzova funkce je o poznání „štíhlejší“ než Gaussova. Příslušné funkce pro amplitudu a plochu pod křivkou jsou:

$$y = \frac{a_0}{1 + \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2} \text{ pro amplitudu,}$$

kde a_0 – amplituda, a_1 – střed amplitudy a a_2 – šířka amplitudy.

$$y = \frac{a_0}{\pi a_2 \left[1 + \left(\frac{x - a_1}{a_2}\right)^2\right]} \text{ pro plochu pod křivkou,}$$

kde a_0 – plocha amplitudy, a_1 – střed amplitudy a a_2 – šířka amplitudy.

Přirozené rozšíření této funkce je spojeno s životností energetických stavů a s Heisenbergovým principem, kde energetická neurčitost je nepřímo úměrná době obsazení konkrétního energetického stavu. Vyšší a nižší energetické stavy jsou spojeny s určitým přechodem, v němž je foton absorbován či emitován. V optických spektrech plynů může být tato funkce ještě rozšiřována tzv. kolizním rozšířením, které je způsobeno nárazy mezi molekulami plynu. Šířka tohoto píku je pak výrazně vyšší než bez kolizního rozšíření.

Voigtova funkce

Tato funkce je velmi složitým teoretickým modelem, který v sobě zahrnuje jak Gaussovo rozšíření díky Dopplerovu efektu a díky působení přístrojů, tak Lorentzovo přirozené a kolizní rozšíření.

3. Cíle bakalářské práce

Cílem této bakalářské práce bylo vyhodnotit data pořízená Doc. Hudečkem na disperzním Ramanově spektrometru pro CO adukt hemové domény NO-synthasy, především nalézt pro Ramanův pás přiřazený Fe-CO „stretching“ vibraci příspěvky jednotlivých odlišných komponent. Podrobněji to znamená otestovat varianty s různým celkovým počtem komponent a rozlišit, které píky popisují skeletální vibrace a které píky náleží opravdu Fe-CO „stretching“ vibraci. Dále se pokusit vysvětlit rozdíly v různých polohách Fe-CO „stretching“ vibraci u jednotlivých spekter.

Data byla naměřena pro cytochrom hemovou (P450-podobnou) doménu NO-synthasy, ligovanou oxidem uhelnatým, která byla buď bez substrátu, nebo se substrátem či inhibitorem, totiž:

- Arg
- HMN-1180
- 7-NI

Pro volnou doménu (bez substrátu) byla k dispozici také spektra, kde byl místo lehkého ligandu oxidu uhelnatého (CO) použit izotopový ligand těžkého oxidu uhelnatého ($^{13}\text{C}^{18}\text{O}$) a dále spektra, kdy byl do měřené směsi přidán tetrahydrobiopterin, který jako kofaktor také může potenciálně ovlivňovat strukturu aktivního místa.

Měření probíhalo v závislosti na dvou parametrech:

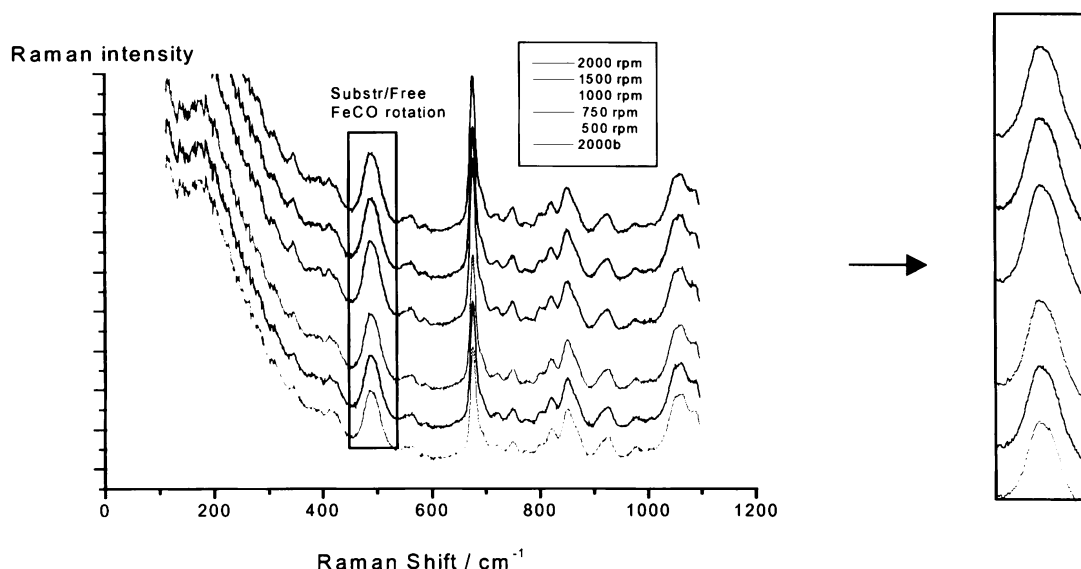
- na intenzitě laseru,
- na otáčkách kyvety.

Paprsek laseru přerušuje vazbu mezi Fe-CO, tedy čím vyšší intenzita laseru, tím méně oxidu uhelnatého v komplexu s enzymem a tedy také tím nižší intenzita odezvy ve spektru. Toto ovšem platí pro upravená spektra, která jsou srovnatelná (vydělená konstantou odpovídající intenzitě laseru), jelikož čím více „svítíme“ na vzorek, tím vyšší celkovou intenzitu odezvy můžeme naměřit.

U spekter měřených v závislosti na otáčkách kyvety, platí jednoduchá úměra; čím vyšší otáčky, tím vyšší intenzita odezvy pro pásy Fe-CO ve spektru, jelikož laser na to určité místo „svítí“ při vyšších otáčkách kratší dobu, a tedy odštěpí méně oxidu uhelnatého.

4. Metody a postup práce

Všechny operace s grafy byly prováděny v programu Origin 6.0. Nejprve bylo z příslušných grafů vyjmuto rozmezí pouze toho píku, který zodpovídal za Fe-CO „stretching“ vibraci, tedy o vlnočtech v rozmezí 460-520 cm^{-1} (obr.15).



Obr.15 Graf celého spektra a vyjmutá část odpovídající Fe-CO „stretching“ vibraci.

Tento pík, který byl vystřižen z kontextu spektra, musel být „srovnán“ tak, aby základní linie (baseline) byla rovnoběžná s x-ovou souřadnicí. Tato funkce je v programu Origin pod záložkou Tools → Baseline → Automatic → Modify → Subtract. Tímto jednoduchým způsobem byla srovnána základní linie.

Takto srovnaný pík byl v dalším postupu spektrálně analyzován pomocí funkce, která se v programu nachází pod záložkou Analysis → Non-linear Curve Fit. Jako funkce pro rozklad byla vybrána Lorentzova funkce, jelikož měřením na Ramanově spektroskopu nedochází k výraznému rozšiřování píků. Může se tedy počítat s ideálním chováním přístroje. Dále byl vybrán počet spektrálních komponent (Option → Replicas → 4 pro 5 komponent). V nabídce Action → Dataset byla data pro spektrální rozklad. Tato data byla vybírána pro jednotlivé křivky a postupně byly přidávány další křivky, takže výsledek vždy odpovídal optimálnímu řešení pro celý soubor měření. Separace spektrálních píků pro více křivek najednou je značně nepřesná. V nabídce Option → Constraints byly omezeny

amplitudy píků pro $A > 0$, tedy aby amplitudy nebyly záporné. Takto byly určeny i intervaly pološířek píků. Tím byly získány vstupní hodnoty parametrů, které byly dále optimalizovány.

Při této optimalizaci byla uvolněna výše popsaná omezení v nabídce Action → Fit, tedy byly optimalizovány hodnoty následujících parametrů: základní linie, poloha píků, pološířka píků a amplituda píků. (Čím více parametrů se může měnit, tím přesnější jsou získaná data ze spektrálního rozkladu.) Dále byly zadány vstupní hodnoty všech parametrů uvedených výše a zahájena iterace. Iteruje se tak dlouho, dokud se žádný z parametrů nemění. Shodu spektrálního rozkladu s naměřenými daty odráží hodnota χ^2 .

Pro přidání další křivky se v nabídce Action → Dataset zaškrtně položka Fit Multiple Datasets a v okénku Parameter Sparing se zaškrtnou všechny polohy a pološířky píků. Tím je zajištěno, aby všechny křivky během separace spektrálních píků měly stejné právě tyto parametry. Pro další práci jsou důležité polohy píků, které jsou pro danou sérii stejné, a amplitudy jednotlivých píků (tedy plochy pod nimi), které se v dané sérii mění s intenzitou laseru nebo s rychlostí otáčení kyvety.

Tímto způsobem byly zpracovány tyto série dat:

- 1) Bez substrátu – a) ligováno CO – i) závislost na energii
ii) závislost na otáčkách
iii) závislost na otáčkách - přítomnost H₄B
- b) ligováno *C*O – i) závislost na otáčkách
- 2) Se substrátem – a) ligováno CO – i) substrátem je Arg – α) otáčky
- 3) S inhibítorem – a) ligováno CO – i) inhibítorem je HMN-1180 – α) otáčky
β) energie
ii) inhibítorem je 7-NI – α) otáčky
β) energie

Dohromady tedy bylo rozloženo 9 sérií měření.

Získané parametry pro amplitudy bylo potřeba zpracovat na procentuální zastoupení ploch jednotlivých spektrálních křivek (ω_i). Toto bylo počítáno dle vzorce:

$$\omega_i = \frac{A_i}{\sum_{j=1}^n A_j} \times 100\%,$$

kde A_j jsou jednotlivé plochy.

5. Výsledky

5.1. Série bez substrátu

V první sérii (bez substrátu, ligováno CO, energetická závislost) bylo použito osm možných energií (0,25 mW, 0,65 mW, 1,3 mW, 5 mW, 10 mW, 20 mW, 38-40 mW a znovu 0,25mW pro kontrolu). Vlnočty vyhledaných píků byly následující: 473 cm⁻¹, 481 cm⁻¹, 489 cm⁻¹, 499 cm⁻¹ a 512 cm⁻¹ (obr.16, tab.4).

Druhá série představovala závislost první série na šesti různých otáčkách kyvety (2000 rpm, 1600 rpm, 1200 rpm, 800 rpm, 400 rpm a znovu 2000 rpm pro kontrolu). Vlnočty píků byly: 480 cm⁻¹, 487 cm⁻¹, 495 cm⁻¹, 502 cm⁻¹ a 513 cm⁻¹ (obr.17, tab.5).

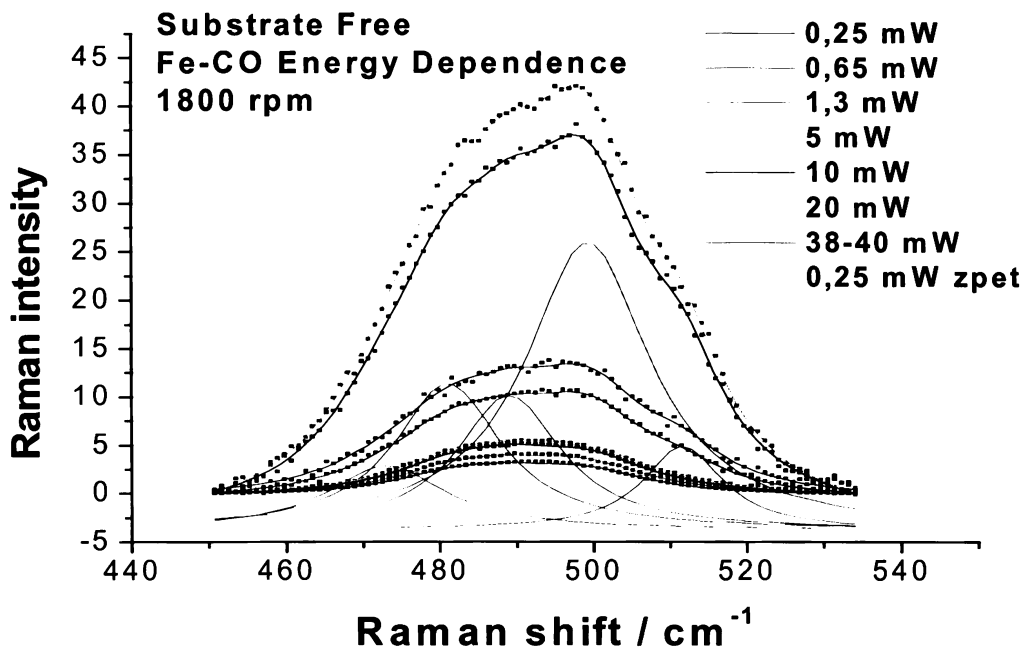
Třetí naměřená a spektrálně separovaná série odpovídá enzymu bez substrátu, ligovanému oxidem uhelnatým v přítomnosti tetrahydrobiopterinu. Pro tuto sérii byla měřena závislost na pěti různých otáčkách kyvety (2000 rpm, 1500 rpm, 1000 rpm, 750 rpm a 500 rpm). Separací těchto píků byly zjištěny vlnočty: 476 cm⁻¹, 484 cm⁻¹, 493 cm⁻¹, 503 cm⁻¹ a 514 cm⁻¹ (obr.18, tab.6).

Poslední série bez substrátu byla ligována izotopovým oxidem uhelnatým (¹³C¹⁸O). Data byla měřena při čtyřech odlišných otáčkách kyvety (2000 rpm, 1500 rpm, 1000 rpm a 750 rpm). Zjištěné polohy píků byly posunuty díky výše uvedeným efektům k nižším hodnotám vlnočtů: 463 cm⁻¹, 470 cm⁻¹, 477 cm⁻¹, 485 cm⁻¹ a 502 cm⁻¹ (obr.19, tab.7).

Tab.4 Poloha píků a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v první sérii (bez substrátu, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na energii).

Označení série		Vlnočet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnočet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnočet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)
SF/ED	0,25 mW	473	9,47	481	19,66	489	17,57
	0,65 mW		6,83		22,11		18,96
	1,3 mW		6,16		22,72		19,96
	5 mW		2,84		24,24		26,44
	10 mW		1,86		25,54		26,44
	20 mW		1,23		26,32		26,82
	38/40mW		1,14		26,67		27,54
	0,25 mW zpět		9,52		20,52		17,70

Vlnočet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnočet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)
499	44,94	512	8,35
	44,67		7,42
	45,44		5,72
	44,28		2,19
	45,33		0,83
	45,00		0,63
	44,65		0,00
	45,78		8,24

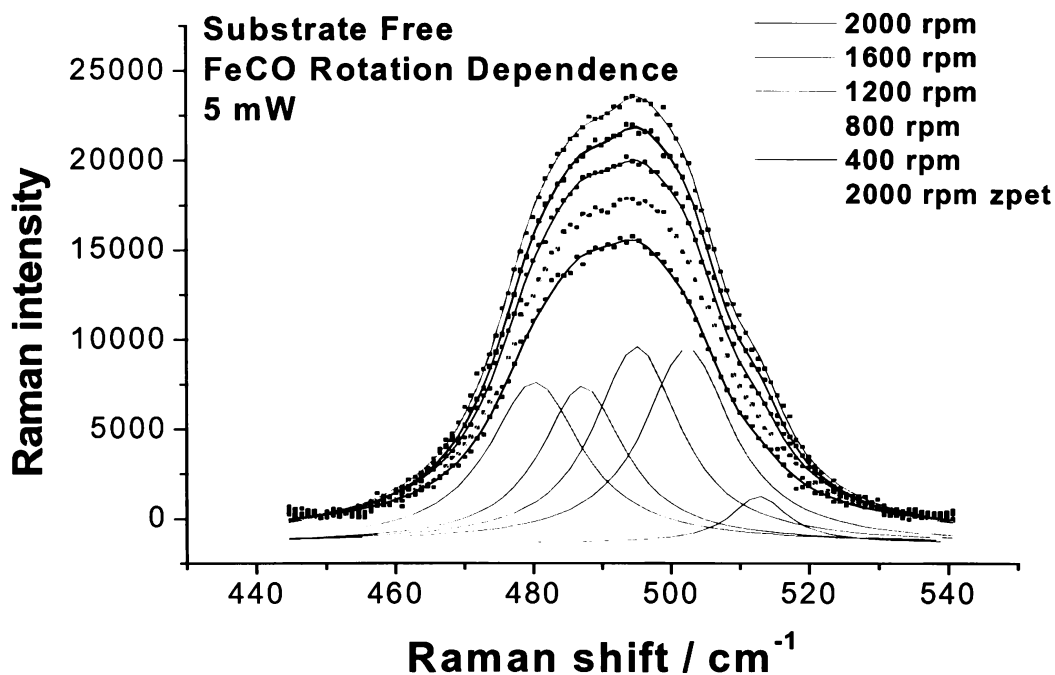


Obr.16 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym bez substrátu, ligovaný CO, závislost na energii excitace. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.5 Poloha píkú a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v druhé sérii (bez substrátu, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

Označení série		Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SF/RD zpět	2000 rpm	480	23,12	487	20,36	495	25,98
	1600 rpm		23,23		20,30		26,00
	1200 rpm		22,33		22,00		25,84
	800 rpm		21,47		23,05		26,79
	400 rpm		21,94		23,30		28,84
	2000 rpm		24,11		19,26		25,95

Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
502	26,51	513	4,03
	26,48		3,98
	26,71		3,12
	26,22		2,47
	24,19		1,73
	26,26		4,41

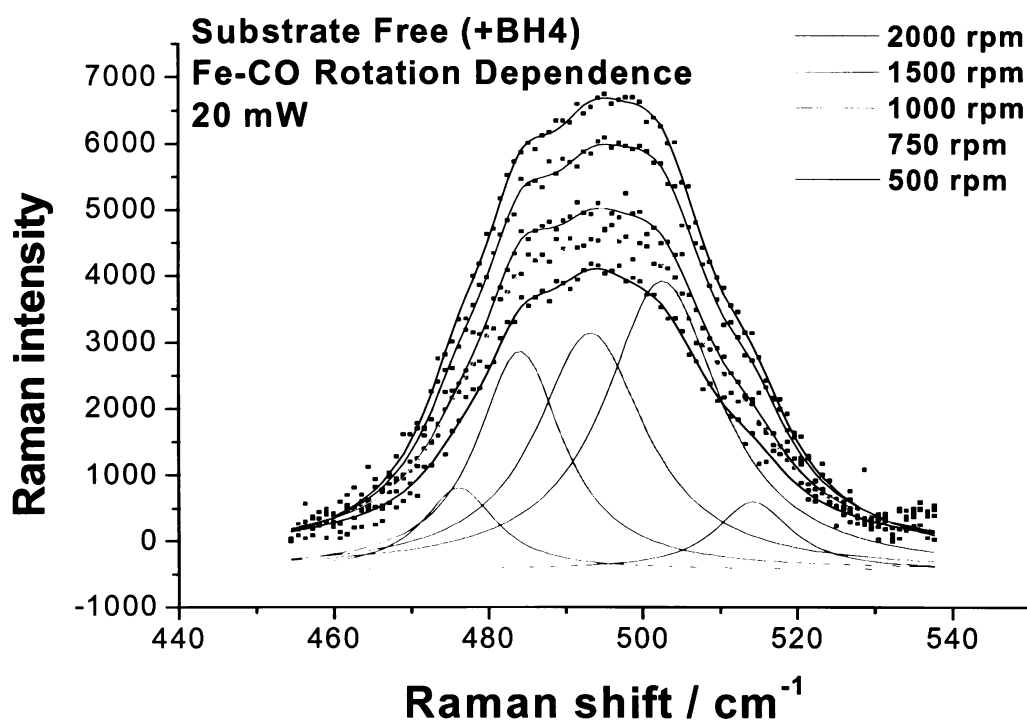


Obr.17 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym bez substrátu, ligovaný CO, závislost na otáčení kyvety. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.6 Poloha píkú a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami ve třetí sérii za přítomnosti tetrahydrobiopterinu (bez substrátu, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

Označení série		Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SF/RD/ BH ₄	2000 rpm	476	6,76	484	21,11	493	29,11
	1500 rpm		6,08		21,53		28,74
	1000 rpm		4,49		23,35		30,12
	750 rpm		5,71		22,08		31,63
	500 rpm		3,78		22,27		34,95

Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
503	37,25	514	5,76
	37,83		5,82
	37,28		4,56
	35,38		5,20
	34,56		4,44

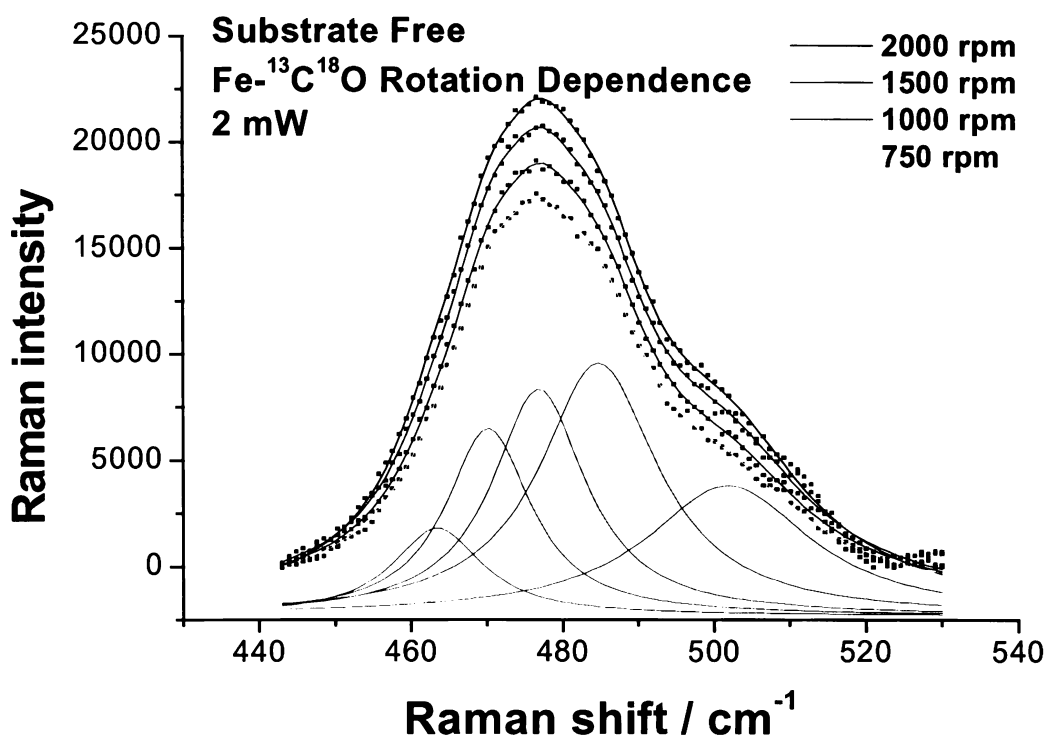


Obr.18 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym bez substrátu, ligovaný CO, závislost na otáčkách kyvety, v přítomnosti tetrahydrobiopterinu. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.7 Poloha píkú a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami ve čtvrté sérii (bez substrátu, ligováno izotopovým oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

Označení série		Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SF/RD/ *C*O	2000 rpm	463	8,14	470	16,55	477	22,08
	1500 rpm		6,75		17,64		22,94
	1000 rpm		5,62		18,05		24,00
	750 rpm		4,80		19,61		23,58

Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
485	30,94	502	22,28
	31,41		21,26
	32,45		19,89
	33,21		18,80



Obr.19 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym bez substrátu, ligovaný izotopovým ¹³C¹⁸O, závislost na otáčkách kyvety. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

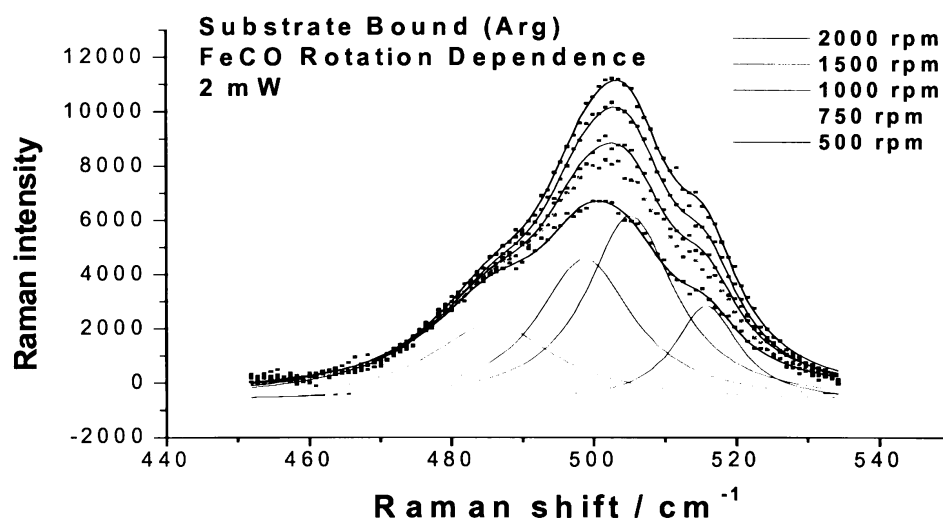
5.2. Série se substrátem

Pouze jediná série byla měřena a vyhodnocována se substrátem. Tímto substrátem byl arginin. Spektrum se měřilo pro závislost rychlosti na otáčkách kyvety, enzym byl ligován oxidem uhelnatým. Spektrálním rozkladem píků byly nalezeny pouze čtyři komponenty o vlnočtech: 486 cm^{-1} , 499 cm^{-1} , 505 cm^{-1} a 516 cm^{-1} (obr.20, tab.8).

Tab.8 Poloha píků a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v páté sérii (s argininem jako substrátem, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

Označení série	Vlničet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlničet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlničet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)
SB/RD/ Arg	2000 rpm	není	486	21,15	499	29,78
	1500 rpm			22,65		30,54
	1000 rpm			25,42		31,21
	750 rpm			27,54		32,67
	500 rpm			32,64		34,30

Vlničet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlničet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)
505	35,73	516	13,34
	34,71		12,10
	32,16		11,21
	29,12		10,68
	24,05		9,00



Obr.20 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym se substrátem, ligovaný CO, závislost na otáčkách kyvety. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

5.3. Série s inhibítorem

První takovouto sérií byla naměřena série dat s HMN-1180 jako inhibítorem. Tento komplex byl ligován oxidem uhelnatým a data byla měřena v závislosti na rychlosti otáček kyvety (2500 rpm, 2000 rpm, 1500 rpm, 1000 rpm, 750 rpm, 500 rpm, 250 rpm a opět 2000 rpm jako kontrolní měření). Pro tato data byly nalezeny píky o těchto vlnóčtech: 477 cm^{-1} , 485 cm^{-1} , 494 cm^{-1} , 502 cm^{-1} a 513 cm^{-1} (obr.21, tab.9).

Druhá série s inhibítorem HMN-1180 byla měřena v závislosti na energii laseru (1 mW a 2 mW). Axiálním ligandem byl opět oxid uhelnatý. Spektrálním rozkladem byly nalezeny tyto vlnóčty komponent: 479 cm^{-1} , 487 cm^{-1} , 495 cm^{-1} , 502 cm^{-1} a 513 cm^{-1} (obr.22, tab.10).

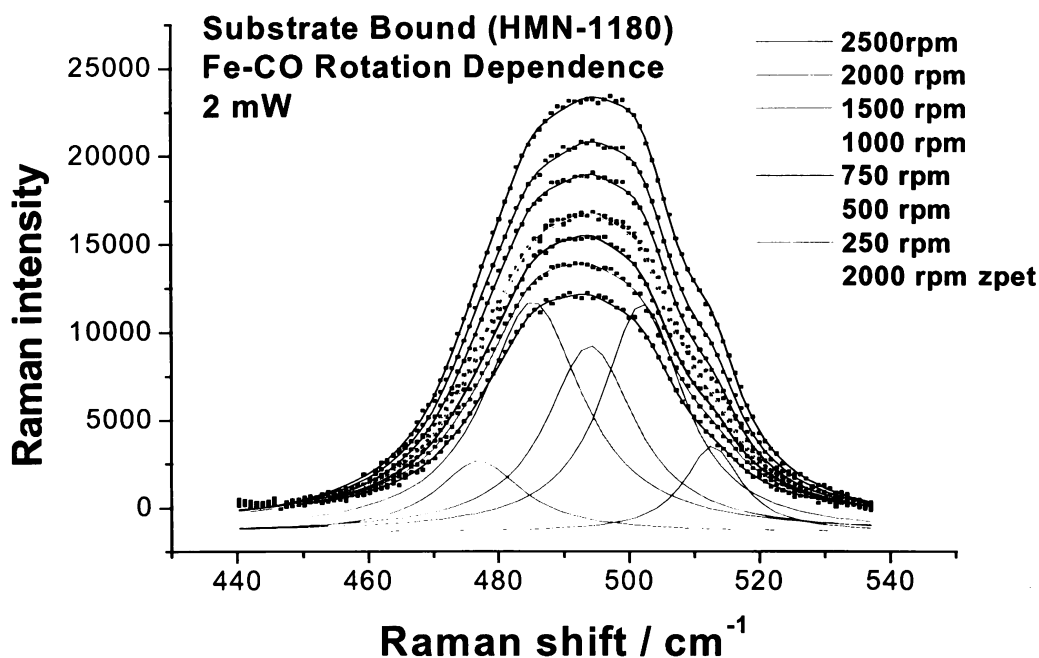
Třetí série dat byla naměřena pro enzymový komplex inhibovaný 7-nitroindazolem. Axiálním ligandem byl opět oxid uhelnatý. Tato série byla měřena v závislosti na rychlosti otáčení kyvety (2500 rpm, 2000 rpm, 1500 rpm, 1000 rpm, 750 rpm, 500 rpm a 250 rpm). Polohám spektrálních komponent odpovídaly tyto vlnóčty: 477 cm^{-1} , 484 cm^{-1} , 493 cm^{-1} , 501 cm^{-1} a 512 cm^{-1} (obr.23, tab.11).

Poslední sérií byla série v přítomnosti 7-nitroindazolu (ligovaná CO), ale v závislosti na intenzitě laseru (0,35 mW, 1 mW, 2 mW, 10 mW a 38 mW). Vlnóčty komponent byly následující: 479 cm^{-1} , 485 cm^{-1} , 494 cm^{-1} , 502 cm^{-1} a 513 cm^{-1} (obr.24, tab.12).

Tab.9 Poloha píkú a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v šesté sérii (s HMN-1180 jako inhibitelem, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

Označení série		Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SB/RD/ HMN	2500 rpm	477	8,87	485	32,88	494	24,11
	2000 rpm		9,14		32,86		25,01
	1500 rpm		8,03		34,76		25,33
	1000 rpm		6,96		35,67		26,62
	750 rpm		6,39		36,77		27,57
	500 rpm		5,33		39,01		26,52
	250 rpm		4,91		39,38		27,71
zpět	2000 rpm	8,76	33,55	25,17			

Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnočet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
502	27,05	513	7,09
	26,77		6,22
	26,47		5,41
	26,07		4,69
	25,05		4,21
	25,44		3,70
	25,12		2,87
	26,50		6,02

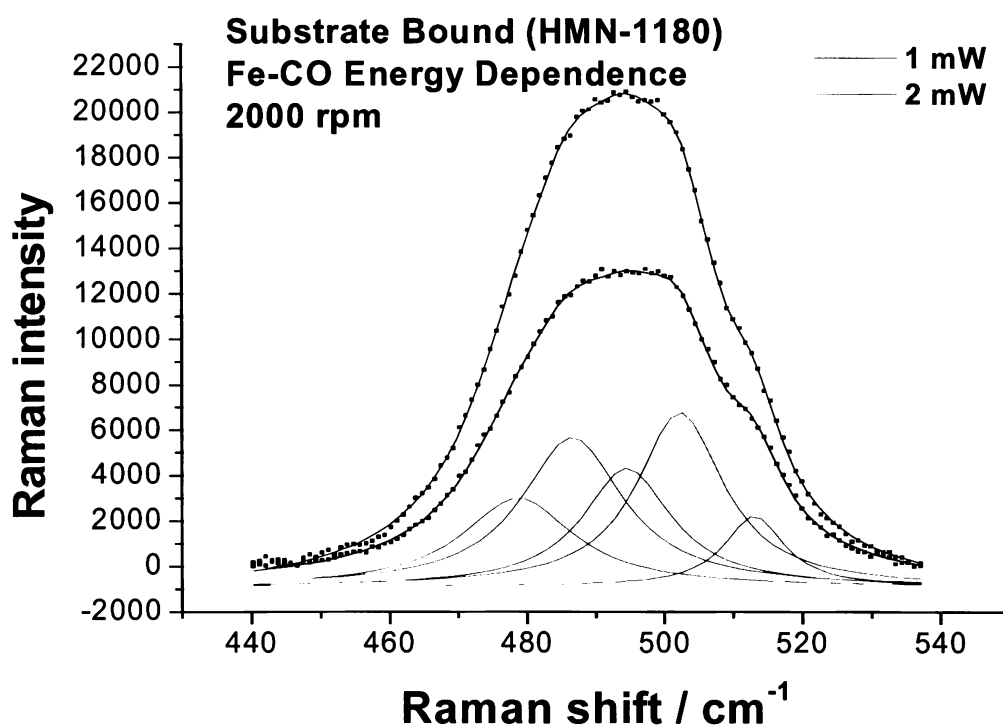


Obr.21 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym s HMN-1180 jako inhibitelem, ligovaný CO, závislost na otáčkách kyvety. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.10 Poloha píků a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v sedmé sérii (s HMN-1180 jako inhibítorem, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na energii laseru).

Označení série		Vlnóčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnóčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnóčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SB/ED/ HMN	1 mW	479	17,82	487	27,70	495	19,24
	2 mW		17,11		29,04		20,80

Vlnóčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnóčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
502	27,51	513	7,74
	26,93		6,13

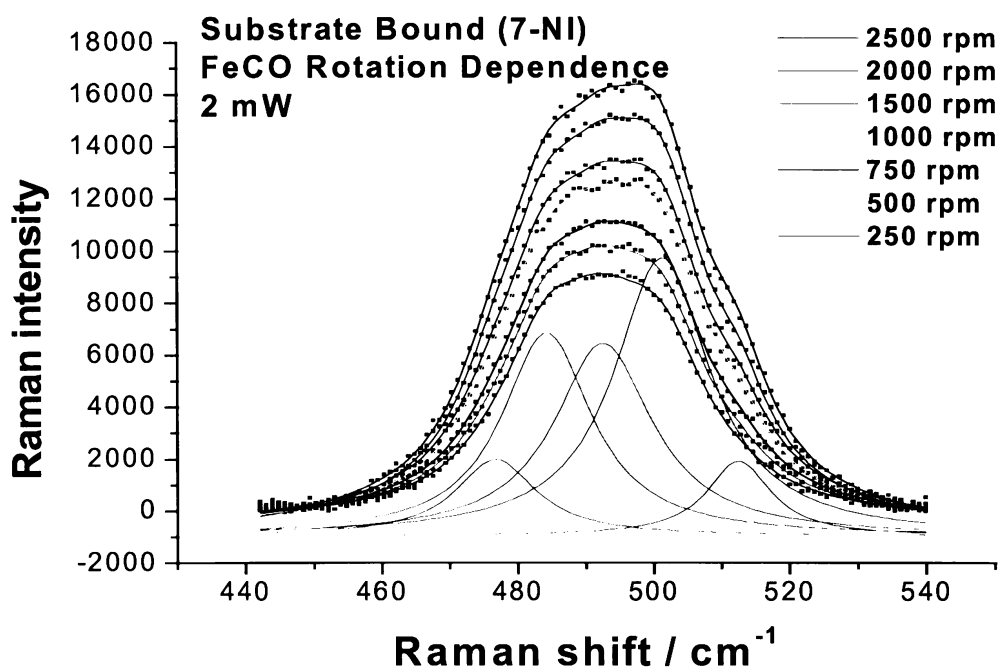


Obr.22 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym s HMN-1180 jako inhibítorem, ligovaný CO, závislost na excitační energii laseru. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.11 Poloha píků a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v osmé sérii (s 7-NI jako inhibitelem, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na rychlosti otáčení květy).

Označení série	Vlnčet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnčet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnčet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	
SB/RD/ 7-NI	2500 rpm	477	8,23	484	24,40	493	25,30
	2000 rpm		7,88		24,74		26,30
	1500 rpm		6,88		25,83		27,01
	1000 rpm		6,79		26,00		27,51
	750 rpm		4,94		27,81		29,04
	500 rpm		4,13		29,22		29,71
	250 rpm		3,44		30,47		30,64

Vlnčet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)	Vlnčet cm^{-1}	Zastoupení piku (%)
501	35,68	512	6,39
	35,51		5,58
	35,52		4,76
	35,37		4,33
	35,36		2,85
	35,02		1,93
	34,52		0,92

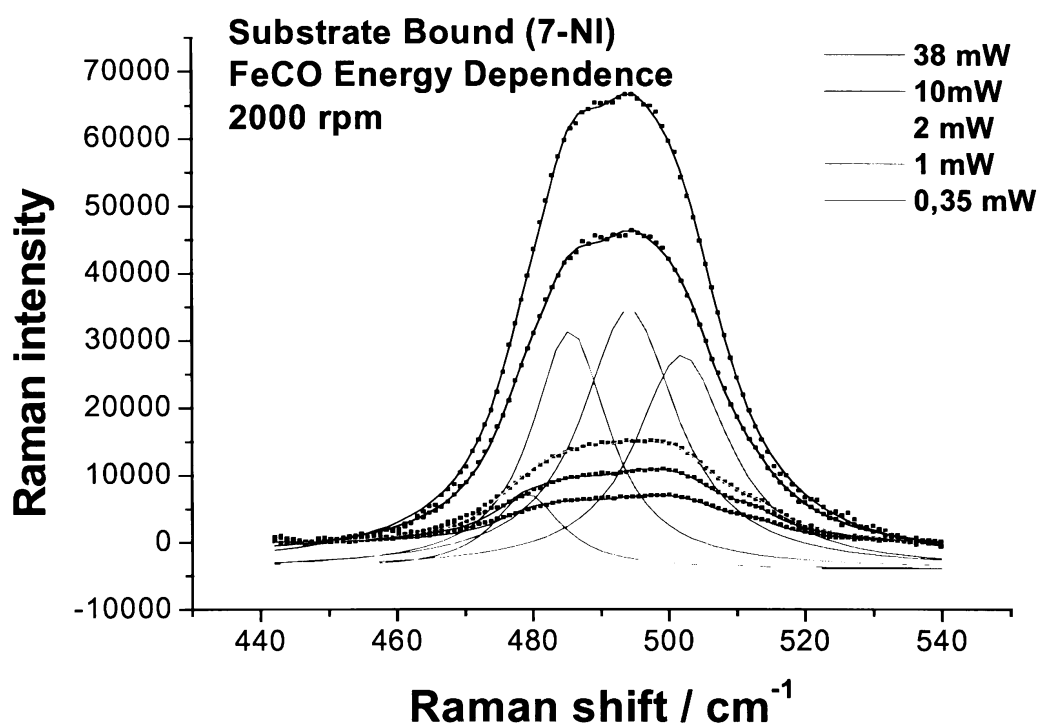


Obr.23 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym s 7-NI jako inhibitelem, ligovaný CO, závislost na otáčkách květy. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

Tab.12 Poloha píkú a procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami v deváté sérii (s 7-NI jako inhibitorem, ligováno oxidem uhelnatým, závislost na energii laseru).

Označení série		Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
SB/ED/ 7-NI	0,35 mW	479	14,85	485	17,69	494	25,50
	1 mW		14,16		18,13		27,23
	2 mW		13,01		19,73		30,81
	10 mW		9,07		24,93		35,02
	38 mW		7,51		26,71		36,25

Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)	Vlnčet cm ⁻¹	Zastoupení píku (%)
502	34,70	513	7,25
	34,11		6,37
	31,71		4,74
	29,81		1,17
	29,53		0



Obr.24 Grafické znázornění rozkladu spektrálních křivek: enzym s 7-NI jako inhibitorem, ligovaný CO, závislost na energii laseru. Body odpovídají exp. hodnotám, plynulé křivky součtovým funkcím. Zeleně znázorněny jednotlivé spektrální komponenty.

6. Diskuse

Obecně lze všechny výsledky rozdělit do dvou skupin. Do první skupiny spadají ty komponenty, jejichž procentuální zastoupení ploch jednotlivých křivek stoupá nebo zůstává přibližně stejné při změnách intenzit laseru nebo při změnách rychlosti otáčení kyvety. Vlnočty odpovídající těmto komponentám pravděpodobně popisují skeletální vibrace hemu. Druhá skupina zahrnuje ty spektrální komponenty, ve kterých procentuální zastoupení ploch jednotlivých křivek klesá. Příslušné vlnočty odpovídají vibračním vazby mezi železem a oxidem uhelnatým.

6.1. Série bez substrátu

Z tab.4, která popisuje výsledky z první série (bez substrátu, ligováno CO, závislost na energii laseru), je patrné, že skeletálním vibračním odpovídají tyto vlnočty: 481 cm^{-1} , 489 cm^{-1} a 499 cm^{-1} .

Zbylé dva vlnočty (473 cm^{-1} a 512 cm^{-1}) odpovídají za vibrace vazby oxidu uhelnatého a železa. Existující dvě komponenty lze vysvětlit jako důsledek dvou různých poloh a náklonů oxidu uhelnatého vzhledem k rovině porfyrinového cyklu. Nižší vlnočtet bude pravděpodobně odpovídat nebráněnému komplexu a vyšší vlnočtet bráněnému.

Druhá série (bez substrátu, ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety) se značně liší od první. (Tato odlišnost se dá vysvětlit tím, že tyto dvě série byly měřeny s odlišnými vzorky ve dvou různých měřeních. Další možné vysvětlení je to, že první série byla vydělena konstantou odpovídající intenzitě laseru, tedy mohlo dojít k zanášení chyby do vyhodnocovaných dat.) Jednak jsou polohy komponent posunuty k vyšším hodnotám vlnočtů, jednak procentuální zastoupení ploch pod jednotlivými spektrálními křivkami výrazně klesá jen v jednom případě (513 cm^{-1}). Pro tento spektrální příspěvek lze jednoznačně říci, že odpovídá vibračním Fe-CO a díky vyššímu vlnočtu lze usoudit, že vazba Fe-C bude „ohnutá“.

Další dvě komponenty (487 cm^{-1} a 495 cm^{-1}) stoupají, jedná se tedy určitě o vlnočty skeletálních vibrací.

Poslední dvě komponenty (480 cm^{-1} a 502 cm^{-1}) klesají pouze o 2%, z čehož nelze jasně určit, jedná-li se o skeletální vibrace (pravděpodobnější), či o vibrace Fe-CO.

Třetí série (bez substrátu, ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety, v přítomnosti H_4B) je značně ovlivňována přítomností tetrahydrobiopterinu. Vibraci Fe-CO můžeme jednoznačně přiřadit pouze pík s vlnočtem 476 cm^{-1} . Pík s vlnočtem 514 cm^{-1} pravděpodobně odpovídá také této vibraci, ovšem není tak průkazný. Příčina vzniku těchto dvou píků je shodná s první sérií.

Zbylé tři píky (484 cm^{-1} , 493 cm^{-1} , 503 cm^{-1}) popisují skeletální vibrace.

Čtvrtá série (bez substrátu, ligováno izotopovým $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$, závislost na rychlosti otáčení kyvety) je jednoznačně ovlivněna izotopovou záměnou atomů oxidu uhelnatého za těžší atomy. Vibrace Fe-CO popisují píky o vlnočtech 463 cm^{-1} a 502 cm^{-1} , důvody různých vlnočtů jsou shodné s první a třetí sérií.

Zbylé tři píky (470 cm^{-1} , 477 cm^{-1} a 485 cm^{-1}) odpovídají skeletálním vibracím.

6.2. Série se substrátem

Pátá série (s argininem jako substrátem, ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety) poskytovala pouze čtyři komponenty. Skeletálním vibracím odpovídají píky o vlnočtech 486 cm^{-1} a 499 cm^{-1} .

Zbylé dva píky (505 cm^{-1} a 516 cm^{-1}) jednoznačně odpovídají vibracím vazby Fe-CO. Z blízkosti těchto dvou vlnočtů lze usoudit, že ohyby oxidu uhelnatého vůči rovině porfyrinového cyklu budou velmi podobné. Z výše uvedených údajů vyplývá, že elektron deficitní uhlík z oxidu uhelnatého bude přitahován k dusíku argininu. A jelikož arginin má na svém konci dva dusíkové atomy, je jasné, že uhlík oxidu uhelnatého bude přitahován k oběma těmto dusíkům. Z toho vyplývají dva různé ohyby oxidu uhelnatého s podobnými vlnočty. Nižší vlnočtet má ohyb, který svírá větší úhel s rovinou porfyrinového cyklu.

6.3. Série s inhibitory

Šestá série (s HMN-1180 jako inhibítorem, ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety) poskytuje celkem jednoznačné výsledky. Píky s vlnočty 477 cm^{-1} a 513 cm^{-1} odpovídají vibracím vazby oxidu uhelnatého a železa. Opět důvody pro tyto dva píky jsou shodné s důvody v první, třetí a čtvrté sérii.

Ostatní tři píky (485 cm^{-1} , 494 cm^{-1} a 502 cm^{-1}) popisují skeletální vibrace.

Sedmá série (s HMN-1180 jako inhibítorem, ligováno CO, závislost na intenzitě laseru) byla měřena pouze pro závislost na dvou hodnotách. Nemůžeme tedy získaná data brát jako dostatečná pro vytvoření nějakých závěrů.

V osmé sérii (s 7-NI jako inhibítorem, ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety) můžeme vibracím Fe-CO jednoznačně přiřadit píky s vlnočty 477 cm^{-1} a 512 cm^{-1} . Opět důvody pro tyto dva píky jsou shodné s důvody v sériích jedna, tři, čtyři a šest.

Skeletálním vibracím odpovídají píky o vlnočtech 484 cm^{-1} , 493 cm^{-1} a 501 cm^{-1} .

Poslední devátá série (s 7-NI jako inhibítorem, ligováno CO, závislost na energii laseru) poskytuje tři píky popisující vibrace Fe-CO. Těmito píky jsou píky o vlnočtech 479 cm^{-1} , 502 cm^{-1} a 513 cm^{-1} . Pík s nejnižším vlnočtem odpovídá vibraci nebráněného aduktu. Jelikož 7-nitroindazol má, podobně jako arginin, dva dusíky na svém konci, můžeme polohu dvou píků o podobném vlnočtu odůvodnit velmi podobným způsobem jako v případě dvou píků v substrátovém komplexu s argininem (pátá série).

Zbylé dva píky (485 cm^{-1} a 494 cm^{-1}) odpovídají skeletálním vibracím.

7. Shrnutí

Spektrálním rozkladem píků o vlnočtu přibližně odpovídajícímu vibraci vazby mezi železem a aduktem oxidem uhelnatým byla zjištěna přítomnost pěti spektrálních komponent ve většině případů. Jediná výjimka byla série s argininem jako substrátem, kde jsou rozlišitelné pouze čtyři komponenty.

7.1. Série bez substrátu

Detekcí spektrálních komponent bylo zjištěno, že vibracím Fe-CO jednoznačně odpovídaly tyto vlnočty:

- 473 cm^{-1} a 512 cm^{-1} pro první sérii (ligováno CO, závislost na intenzitě laseru),
- 513 cm^{-1} pro druhou sérii (ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety),
- 476 cm^{-1} pro třetí sérii (ligováno CO, závislost na rychlosti otáčení kyvety, v přítomnosti tetrahydrobiopterinu),
- 463 cm^{-1} 502 cm^{-1} pro čtvrtou sérii (ligováno $^{13}\text{C}^{18}\text{O}$, závislost na rychlosti otáčení kyvety).

V druhé sérii byly nalezeny dvě spektrální komponenty o vlnočtech 480 cm^{-1} a 502 cm^{-1} a ve třetí sérii jedna komponenta o vlnočtu 514 cm^{-1} , u kterých není možno přesně určit, zda se jedná o vibrace Fe-CO nebo o skeletální vibrace.

Ostatní vlnočty odpovídaly skeletálním vibracím.

7.2. Série se substrátem a inhibitory

Spektrálním rozložením sérií se substrátem a s inhibitory (vždy ligováno CO) byly zjištěny tyto vlnočty, které odpovídají vibracím Fe-CO:

- 505 cm^{-1} a 516 cm^{-1} pro pátou sérii (s argininem jako substrátem, závislost na rychlosti otáčení kyvety),
- 477 cm^{-1} a 513 cm^{-1} pro šestou sérii (s HMN-1180 jako inhibítoem, závislost na rychlosti otáčení kyvety),
- 477 cm^{-1} a 512 cm^{-1} pro osmou sérii (s 7-NI jako inhibítoem, závislost na rychlosti otáčení kyvety),
- 479 cm^{-1} , 502 cm^{-1} a 513 cm^{-1} pro devátou sérii (s 7-NI jako inhibítoem, závislost na intenzitě laseru).

Ostatní píky popisují skeletální vibrace.

8. Seznam použité literatury:

1. Anderson, J.L.R., Chapman, S.K.: *Dalton Trans*, 13-24, (2005)
2. Barthová, J.: Biochemie II, přednáška na PřF UK (2005)
3. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Axman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.: *Pharmacogenetics* 6, 1-42 (1996)
4. Gregořicová, J. Studium kinetiky redukce vybraných hemthiolátových enzymů: Diplomová práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 8 (2004)
5. Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G., Schlichting, I.: *Chem. Rev.* 105, 2253-2277 (2005)
6. Stiborová, M.: Biochemie II, přednáška na PřF UK (2005)
7. Lewis, D.F.V.: *Cytochromes P450*. Taylor&Francis, London, Bristol (1996)
8. Gray, R.D.: *J. Biol. Chem.* 257, 1086 – 1094 (1982)
9. Větrovský, P., Entlicher, G.: *Coll. Czech. Chem. Communi.* 62, 1355-1383 (1997)
10. Štěpánek P.: Přednáška v rámci v rámci kurzu Ramanovy spektroskopie a mikroskopie pořádaný pod záštitou Pražského analytického centra informací na České zemědělské univerzitě (20.-24.3.2006)
11. Fišer, J., Zemánek., F.: *Struktura látek; atomy, molekuly, krystaly*. Univerzita Karlova, Karolinum, Praha (1994)
12. Jandera, P.: *Atomová a molekulová spektroskopie*. Vysoká škola chemicko-technologická v Pardubicích (1984)
13. Baumruk V.: Přednáška v rámci v rámci kurzu Ramanovy spektroskopie a mikroskopie pořádaný pod záštitou Pražského analytického centra informací na České zemědělské univerzitě (20.-24.3.2006)
14. Uhlík, F.: *Chemická struktura, přednáška na PřF UK (2005)*
15. Procházka M.: *Kurz Ramanovy spektroskopie a mikroskopie pořádaný pod záštitou Pražského analytického centra informací na České zemědělské univerzitě (2005)*
16. Moffet, D.A., Case, M.A., House, J.C., Vogel, K., Williams, R.D., Spiro, T.G., McLendon, G.L., Hecht, M.A.: *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 2109-2115 (2001)
17. Yu, N.-T., Kerr, E.A, v knize: *Biological Applications of Raman Spectroscopy*. 3, 39-95, (Spiro, T.G. ed), Wiley-Interscience, New York (1988)
18. Yu, N.-T., Kerr, E.A., Ward, B., Chang, C. K.: *Biochemistry*, 22, 4534 (1983)
19. Chabin, R.M., McCauley, E., Calaycay, J.R., Kelly, T.M., McNaul, K.L., Wolfe, G.C., Hutchinson, N.I., Madhusudanaraju, S., Schmidt, J.A., Kazarich, J.W., Wong, K.K.: *Biochemistry* 35, 13-34 (1996)

-
19. Yu, N.-T., Thompson, H.M., Chang, C.K.: *Biophys. J.* 51, 283-287 (1987)
 20. Anderton, C.L., Hester, D.E., Moore, J.N.: *Biochim. Biophys. Acta* 1338, 107-120 (1997)
 21. PeakFit, User's Manual. SPSS Science, Chicago (1997)
 22. Horák, M., Vitek, A.: Zpracování a interpretace vibračních spekter. SNTL – Nakladatelství technické literatury, Praha (1980)

