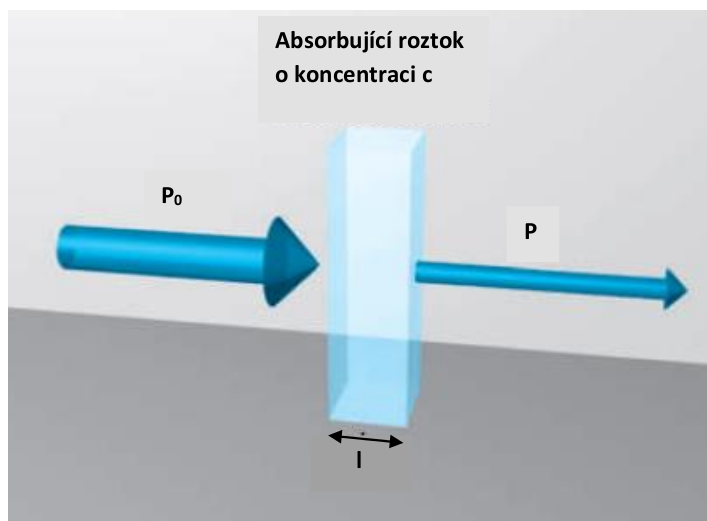


Úloha C3 – Studijní materiál

Spektrofotometrie

Spektrofotometrie využívá interakci elektromagnetického záření s molekulami vzorku. My se budeme bavit konkrétně o absorpci světla. Při průchodu světla o intenzitě p_0 absorbujičím vzorkem s optickou dráhou l dojde ke snížení intenzity prošlého světla na hodnotu p (obrázek 1).



Obr. 1: Schéma absorpce elektromagnetického záření. Převzato z [1] a upraveno

Poměr intenzity prošlého světla a původní intenzity (tedy p/p_0) se nazývá **transmitance**. Transmitance udává, jaká část intenzity záření byla vzorkem propuštěna, nabývá tedy hodnoty od 0 (záření bylo zcela absorbováno) do 1 (veškeré záření vzorkem prošlo).

Absorpce elektromagnetického záření vzorkem je popsána Lambert-Beerovým zákonem:

$$T = 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c}$$

kde T – transmitance, ε – absorpční koeficient, c – koncentrace a l – optická dráha paprsku.

Absorpční koeficient ε udává, jak moc látka při dané vlnové délce absorbuje (tedy čím větší ε , tím silnější je absorpce), jednotkou je $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nebo $\text{dm}^3 \text{ g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ při vyjádření koncentrace v g dm^{-3} .

Abychom nemuseli počítat s exponenciálami, zavedeme veličinu **absorbance**:

$$A = -\log T$$

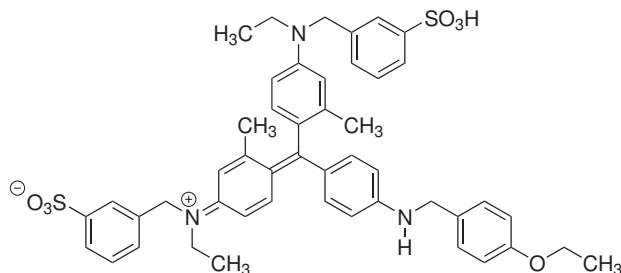
potom:

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

Závislost absorbance na koncentraci není lineární v celém rozsahu, mimo lineární části tudíž nelze spolehlivě určit koncentraci na základě absorbance. Měření je nejpřesnější v rozsahu $A = 0,3-0,7$.

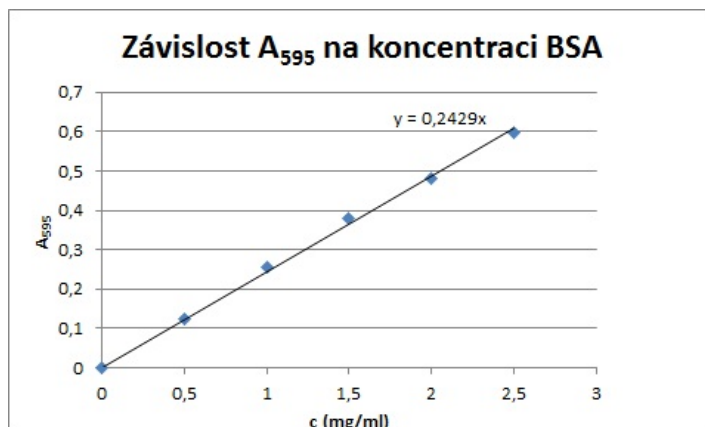
Stanovení koncentrace proteinů

Existuje několik metod pro spektrofotometrické určení koncentrace proteinů. Jednou z nejznámějších je metoda podle **Bradfordové**. Využívá se zde barvivo Coomassie Brilliant Blue G-250 (obrázek 2). Záporně nabitě sulfonové skupiny barviva elektrostaticky interagují s kladně nabitými postranními řetězci bazických aminokyselin (hlavně arginin). Kromě elektrostatické interakce zde hrají roli také hydrofobní interakce mezi nepolárními částmi proteinu a barviva.



Obr. 2: Struktura Coomassie Brilliant Blue G-250 [2]

Při interakci s proteinem se posune vlnová délka absorpčního maxima ze 470 nm na 595 nm. Tento posun se projeví změnou barvy z hnědavé na modrou. Měření probíhá při vlnové délce 595 nm. Po změření absorbance série standardů o známé koncentraci je sestavena kalibrační křivka, pomocí které lze určit koncentraci neznámého vzorku. Kalibrační křivku si můžeme snadno sestavit např. v MS Excel (obrázek 3).



Obr. 3: Příklad kalibrační křivky

Jednotlivé body grafu jsou hodnoty absorbance změřené při koncentraci uvedené na ose x . Pomocí lineární regrese můžeme těmito body proložit přímkou a zobrazit si rovnici této přímky. Po změření absorbance neznámého vzorku tedy jednoduše dosadíme do rovnice absorbanci (y) a spočítáme koncentraci (x).

Výhodou této metody je, že nedochází k rušení redukčními činidly (dithiotreitol, 2-sulfanylethanol), které se k roztokům proteinů běžně přidávají. Nevýhodou je závislost metody na sekvenci proteinu (kvůli výše zmíněné preferenci argininu).

Na podobném principu funguje **BCA** metoda. Při ní se využívá biuretové reakce Cu^{2+} iontů s páteří proteinu. Dochází k redukci Cu^{2+} na Cu^+ , Cu^+ poté tvoří barevný komplex s bicinchoninovou kyselinou (BCA). Tento komplex absorbuje při 562 nm. Ke zjištění koncentrace je třeba opět sestavit kalibrační křivku. Výhodou této metody je nižší závislost na sekvenci proteinu, reakce ale může být rušena výše uvedenými redukčními činidly.

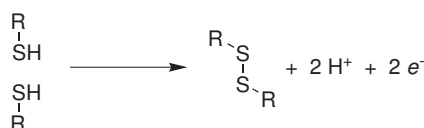
Velmi používaná metoda pro stanovení koncentrace proteinů je měření absorbance při **280 nm**. Při této vlnové délce absorbují postranní řetězce aromatických aminokyselin (tryptofan, tyrosin, fenylalanin) a cystein. Metoda je tedy opět závislá na aminokyselinovém složení proteinu. Pokud tedy protein obsahuje jen málo nebo žádnou aromatickou aminokyselinu, je pro stanovení jeho koncentrace tato metoda nevhodná.

Obrovskou výhodou této metody je oproti předchozím dvěma metodám nedestruktivnost, vzorky proteinů lze po měření dále využívat. Uživatelsky velice přívětivá je také možnost výpočtu absorpčního koeficientu ze sekvence, odpadá tedy nutnost tvorby kalibrační křivky. Výpočet absorpčního koeficientu lze rychle provést např. pomocí nástroje [ProtParam](#). Po zadání sekvence zobrazí program základní vlastnosti proteinu (molekulová hmotnost, odhad pI, procentuální zastoupení jednotlivých aminokyselin, atd.) včetně absorpčního koeficientu.

Při měření absorbance proteinů při 280 nm ruší nukleové kyseliny.

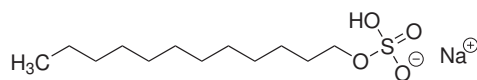
Oligomerní stav proteinu

Jednotlivé molekuly proteinů mohou v roztoku interagovat a tvořit oligomery. Pokud se jedná o komplex 2 stejných molekul, mluvíme o homodi(-tri,-tetra,atd.)meru, pokud se asociují různé proteiny jedna se o heterodi(-tri,-tetra,...)mery. Oligomery jsou pohromadě drženy vodíkovými můstky, van der Waalsovými silami a disulfidickými můstky. Disulfidické můstky jako jediné z těchto interakcí tvoří kovalentní vazbu. Vznikají mezi -SH skupinami cysteinu (obrázek 4). Disulfidické můstky můžeme naopak rozrušit přidáním redukčních činidel (DTT, BME), dojde k jejich redukcí zpět na thiolové skupiny.



Obr. 4: Schéma vzniku disulfidického můstku

Vznik oligomerů lze studovat pomocí SDS-PAGE (polyakrylamidová gelová elektroforéza v přítomnosti dodecylsírany sodného) nebo nativní elektroforézy. Principy SDS-PAGE jsou podobné jako u elektroforézy nukleových kyselin vysvětlené v studijním materiálu první úlohy. Přídavek SDS (obrázek 5) má za následek to, že je proteinu udělen záporný náboj přímo úměrný molekulové hmotnosti proteinu.



Obr. 5: Molekula SDS

SDS-PAGE probíhá za denaturačních podmínek – k proteinu se přidává vzorkový pufr obsahující SDS, redukční činidlo (DTT, BME) a vzorek se několik minut povaří při 95 °C. Proteiny je třeba denaturovat proto, aby jejich mobilita v gelu odpovídala skutečně jejich hmotnosti a nebyla narušena přítomností sekundárních a vyšších strukturních elementů.

Pokud chceme elektroforeticky studovat přítomnost oligomerů proteinu, můžeme provést nativní elektroforézu – při ní chybí SDS i redukující činidla, nedochází tedy k destrukci komplexů a elektroforetická mobilita je ovlivněna i hydrodynamickými vlastnostmi komplexu.

V případě přítomnosti více cysteinových residuí můžeme identifikovat ty, které se podílí na vzniku disulfidických vazeb pomocí mutací. Nahradíme cystein jinou aminokyselinou a pozorujeme, jestli dochází k tvorbě komplexu. Mutaci zapisujeme např. jako C17S (cystein číslo 17 byl zaměněn za serin).

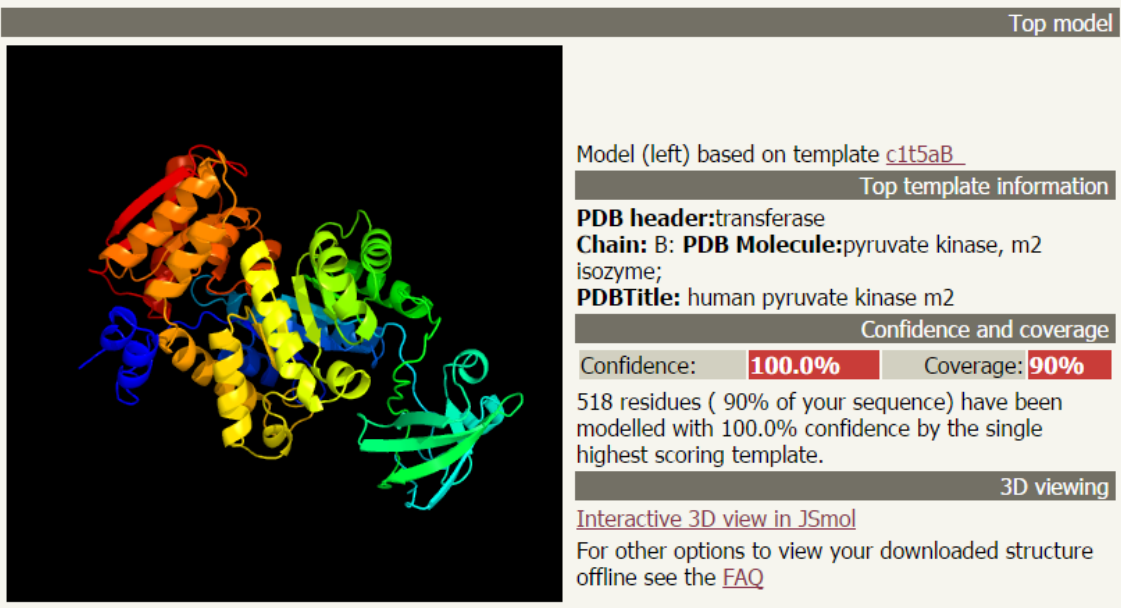
3D struktura proteinu

Určení struktury proteinu je nezbytné, pokud chceme popsat jeho funkci na molekulární úrovni. Po zjištění struktury můžeme například navrhnout molekulu, která daný protein bude inhibovat nebo aktivovat. Struktury biomolekul jsou ukládány do databází, nejznámější je [Protein Data Bank](#) (PDB). Každá struktura má své PDB ID – čtyřmístný kód, podle kterého lze záznamy rychle hledat (např. 5AJB). V současnosti obsahuje přes 110 000 struktur, drtivá většina z nich je určena rentgenovou krystalografií. Druhou nejpoužívanější metodou je NMR spektroskopie, třetí je elektronová mikroskopie.

Zjištění struktury pomocí kterékoliv z výše uvedených metod je ale často velmi zdlouhavé a někdy ani nemusí být proveditelné. Pokud chceme alespoň orientačně popsat strukturu studovaného proteinu, můžeme využít tzv. **homologní modelování**. Jeho podstatou je fakt, že struktura proteinu je evolučně více konzervována než jeho sekvence. Nalezneme-li tedy experimentálně vyřešenou strukturu proteinu s podobnou sekvencí, můžeme očekávat i jistou strukturní podobnost. Na internetu nalezneme velké množství programů pro homologní modelování, my si krátce představíme program [Phyre2](#).

Rozhraní Phyre je uživatelsky přívětivé, v podstatě jen zadáme sekvenci a svůj mail, zvolíme mód (normální/intenzivní) a po nějaké době (mohou to být i desítky hodin) nám na mail přijde odkaz s výsledky. Program Phyre2 na základě sekvence predikuje sekundární strukturu proteinu a vyhledává různé domény. Strukturu srovnává s templátem (homologický protein s vyřešenou strukturou) a úseky, které se neshodují, modeluje *ab initio*. Modelování smyček pomocí algoritmu Poing ukazuje toto [video](#).

Po dokončení modelů vám na mail přijde odkaz na stránku s výsledky (obrázek 6). Na stránce vidíte jako první model s nejvyšší shodou včetně číselného vyjádření. 3D strukturu modelu si můžete stáhnout ve formátu .pdb. Vedle struktur jsou uvedeny také informace o modelech, můžete se proklikat například na jednotlivé záznamy struktur na Protein Data Bank (PDB).



Top model

Model (left) based on template [c1t5aB](#)

Top template information

PDB header:transferase
Chain: B: **PDB Molecule:**pyruvate kinase, m2 isozyme;
PDBTitle: human pyruvate kinase m2

Confidence and coverage

Confidence: **100.0%** Coverage: **90%**

518 residues (90% of your sequence) have been modelled with 100.0% confidence by the single highest scoring template.

3D viewing

[Interactive 3D view in JSmol](#)

For other options to view your downloaded structure offline see the [FAQ](#)

Image coloured by rainbow N → C terminus

Model dimensions (Å): **X:**54.102 **Y:**56.287 **Z:**83.668

Obr. 6: Příklad výsledku homologního modelování. Vstupní sekvencí byla lidská pyruvát kinasa

Literatura

1. SKOOG, Douglas A. *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th Ed. Belmont, CA: Cengage – Brooks/Cole, 2012. ISBN 9780495558286.
2. *Coomassie Brilliant Blue* [online]. 2016 [vid. 1. březem 2016]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Coomassie_Brilliant_Blue&oldid=705614045