

## 7L-01 FLUORESCENCE MICROSCOPY OF BIOMOLECULES ON A SINGLE MOLECULE LEVEL

MARTIN HOF

*J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry v.v.i., Academy of Sciences of the Czech Republic, Dolejškova 3, 182 23 Prague  
hof@jh-inst.cas.cz*

Fluorescence microscopy (FM) is nowadays certainly one of the main tools in biological sciences. There are several reasons for the success of this technique: *a)* FM can be applied on a minimum-invasive way with high sensitivity even on living cells. *b)* FM has a good temporal and spatial resolution. *c)* FM is the basis and/or can be combined for a growing variety of single molecule approaches. One of the most popular single molecule techniques is Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). This method is based on the fact that when illuminating a *femtoliter* volume element containing *nanomolar* concentrations of fluorescently labeled molecules, the fluorescence of only a few molecules or even a single molecule is detected. Usually diffusion of those molecules in and out of the *femtoliter* detection volume leads to large fluctuation in the fluorescence signal. These fluctuations are monitored, correlated, and analyzed and give, in the simplest case, information on the diffusion coefficient and concentration of diffusing and fluorescing species. While the technique was originally suggested in the 70's, its first reasonable experimental realization appeared in the 90's. Though the method certainly went through a boom in the 90's, it became soon very clear that the original single-spot FCS method is heavily limited. Thus several groups started to develop new variants of that technique aiming for higher precision.

The fluorescence group located at the J. Heyrovský Institute of Physical Chemistry of the Academy of Sciences of the Czech Republic (<http://www.jh-inst.cas.cz/~fluorescence/>) was certainly significantly contributing to those developments. Specifically, in 2003 the group presented the first artifact-free measurements of diffusion coefficients by FCS<sup>1</sup>. The so-called „z-scan“ FCS does -in opposite to earlier approaches- not need external calibration. This method was then applied for answering fundamental questions in lipid bilayer research as well as for characterizing lipid „rafts“ smaller than the resolution of an optical microscope (< 200 nm). A further methodological achievement was the first experimental realization of a confocal microscope allowing to perform Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy (FLCS)<sup>2</sup>. This method is using the fluorescence lifetime information to distinguish the diffusion of different species. Most recently we have applied this method in for the elucidation of the DNA compaction mechanism.

That compaction of DNA plays a role in the nuclei of several types of cells and becomes important in the non-viral gene therapy. Using standard single molecule fluorescence microscopy it was shown in a series of contributions by the group of K. Yoshikawa from Kyoto, Japan ([http://www.chem.scphys.kyoto-u.ac.jp/index\\_e.html](http://www.chem.scphys.kyoto-u.ac.jp/index_e.html)), that spermine-induced compaction of large DNA molecules (30–170 kbp) occurs in a discrete "all-or-non" regime, where the coexistence of free and folded DNA molecules was observed. In the

case of intermediate-sized DNA molecules (~10 kbp), so far, it was stated that the mechanism of folding is continuous. We show that FLCS can for the first time decide what kind of mechanism is undertaken in the compaction process of those intermediate sized DNA. The method takes advantage of a subtle lifetime change of an intercalating dye PicoGreen® during the titration with the condensing agent and based on that, it reveals the mechanism of the process and gives information on the equilibrium state transition dynamics of the compaction process<sup>3</sup>. The method is used to compare the condensation process induced by different condensers.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR LC 06063.*

## REFERENCES

1. Benda A., Beneš M., Mareček V., Lhotský A., Hermens W., Hof M.: *Langmuir* 19, 4120 (2003).
2. Benda A., Hof M., Wahl M., Patting M., Erdmann R., Kapusta P.: *Rev. Sci. Instruments* 76, 033106 (2005).
3. Humpolíčková J., Benda A., Sykora J., Machán R., Kral T., Gasinska B., Enderlein J., Hof M.: *Biophys. J.* 94, L17 (2008).
4. Further contributions on this field see <http://www.jh-inst.cas.cz/~fluorescence/>

## 7L-02 DYNAMIKA RELAXÁCIE FLUORESCENCIE KUMARÍNU C522 V CONFINED ŠTRUKTÚRACH

**MICHAL ŽITŇAN<sup>a</sup>, EDUARD JÁNÉ<sup>a</sup>, VOJTECH SZOCS<sup>a</sup>, TIBOR PÁLSZEGI<sup>c</sup>, OEGA GRANČIČOVÁ<sup>a</sup>, IGNÁC BUGÁR<sup>b</sup>, DUŠAN CHORVÁT<sup>b</sup> a DUŠAN VELIČ<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská Dolina, 842 15 Bratislava, <sup>b</sup> Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, <sup>c</sup> Slovenská Technická Univerzita, Radlinského 9, 842 37 Bratislava, SR  
[zitnan@fns.uniba.sk](mailto:zitnan@fns.uniba.sk)

Sledovali sme dynamiku fluorescencie kumarínu C522 v confined štruktúrach, teda v prostrediach obmedzujúcich voľný pohyb molekúl použitím femtosekundovej časovo-rozlišenej spektroskopie. Molekula kumarínu slúži ako fluorescenčná sonda. Rýchlosť deexcitácie sondy najviac ovplyvňuje prítomnosť voľnej vody<sup>1</sup>. Vyšetřovali sme dva typy confined štruktúr: v prvom prípade bol prístup vody k molekule kumarínu obmedzený adsorpciou kumarínu na povrch montmorillonitu, skúmala sa interakcia s disperziou montmorillonitu vo vode. Montmorillonity patria medzi vrstevnaté hliníto-kremičitany so záporným nábojom vrstiev. Záporný náboj je možné znižovať fixáciou lítiovými kationmi<sup>2</sup>. Veľkosť náboja ovplyvňuje adsorpciu kumarínu na povrch, čím sa znižuje možnosť kontaktu molekuly kumarínu s vodou. Prítomnosť záporne nabitého povrchu môže spomaliť solvatačnú odpoveď 3 až 5 krát v porovnaní s voľnou vodou<sup>3</sup>. Iným spôsobom obmedzenia prístupu voľnej vody k sonde je enkapsulácia sondy do cyklodextrínovej kavity<sup>4</sup>, prípadne uzavretie do reverznej micely rôznej veľkosti. Analýza deexcitačných

kriviek ukazuje až 1000 násobné spomalenie relaxačných časov v prostrediach obmedzujúcich prístup molekúl rozpúšťadla k molekule kumarínu v porovnaní s čistým rozpúšťadlom<sup>5</sup>.

*Táto práca vznikla za podpory grantov APVT-20-029804 a APVV-0491-07.*

#### LITERATÚRA

1. Jimenez R., Fleming G. R., Kumar P. V., Maroncelli M.: *Nature* 369, 471 (1994).
2. Zemanova M., Link G., Takayama S., Nuesch R., Janek M.: *App. Clay Sci.* 32, 271 (2006).
3. Benderskii A. V., Eienthal K. B.: *J. Phys. Chem., A* 106, 7482 (2002).
4. Douhal A.: *Chem. Rev.* 104, 1955 (2004).
5. Hazra P., Chakrabarty D., Sarkar N.: *Chem. Phys. Lett.* 358, 523 (2002).

#### 7L-03

### MĚŘENÍ PARAMETRŮ TRYPTOFANOVÉ FLUORESCENCE VE SPOJENÍ S MOLEKULÁRNĚ-DYNAMICKÝMI VÝPOČTY JAKO NÁSTROJ PRO SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY PROTEINŮ

**MARTIN KUBALA<sup>a</sup>, LENKA GRÝČOVÁ<sup>b</sup>, PETR SKLENOVSKÝ<sup>a</sup>, ZDENĚK LÁNSKÝ<sup>b</sup>, MICHAL OTYEPKA<sup>a</sup> a JAN TEISINGER<sup>b</sup>**

<sup>a</sup> Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup> Fyziologický ústav AV ČR, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4  
mkubala@prfnw.upol.cz

V současné strukturní biologii je nejpobulárnější metodou pro zkoumání proteinů krystalografie spojená s rentgenovou strukturní analýzou. Tato metoda má však některé zásadní nedostatky. Jednak proteiny krystalizují za podmínek, které bývají poměrně vzdálené těm fyziologickým, při nichž protein funguje, což může mít za následek deformaci výsledné struktury, jednak krystalografie není schopna postihnout dynamiku molekul, která je zásadní pro pochopení funkce enzymů.

Naproti tomu klasické spektroskopické metody tato omezení nemají a zejména fluorescenční spektroskopie se jeví jako příhodná pro studování proteinů, a to především pro její vysokou citlivost a širokou škálu experimentálních technik. Přirozeným fluoroforem je na proteinech aminokyselina tryptofan. Zhášení fluorescence neutrálním zřášeďedlem (akrylamid) umožňuje sledování prostorové přístupnosti rezidua, použití zřášeďedla s nábojem (jodid) pak umožňuje získat i informaci o rozložení povrchového náboje v okolí rezidua. Informace o dynamice rezidua pak doplňují časově rozlišená měření intenzity a anizotropie fluorescence. Nevýhodou fluorescenčních měření je, že poskytují pouze lokální informace z okolí tryptofanového rezidua. Naše zkušenost ukazuje, že spektroskopické výsledky je vhodné doplnit informacemi z počítačových molekulárně-dynamických simulací enzymu. Tyto simulace jednak slouží jako vodičko při interpretaci spektroskopických dat, jednak pomáhají při návrhu dalších experimentů.

Předmětem našeho studia byla dynamika velké cytoplazmatické kličky Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasy po navázání přirozených ligandů (ATP, Mg<sup>2+</sup>). Pro spektroskopickou analýzu jsme připravili 9 jednotryptofanových mutantů, kdy jsme tryptofany vkládali na různá místa povrchu kličky. Naše studie ukázala, že bez ligandu, v přítomnosti samotného Mg<sup>2+</sup>, nebo při současné přítomnosti Mg<sup>2+</sup> i ATP se klička nachází v uzavřené konformaci, zatímco pokud je přítomno pouze ATP (bez Mg<sup>2+</sup>), nachází se klička v konformaci otevřené. Naše výsledky tedy naznačují, že zatímco vazba ATP kličku otevírá, následná vazba Mg<sup>2+</sup> ji zase uzavírá, což je v rozporu s dosavadní představou, že nukleotid se váže na enzym jako komplex MgATP. Analýza povrchového náboje pak ukázala velké změny v okolí rezidua 648 a tyto změny mohou sloužit jako signál při komunikaci kličky s C-terminální částí enzymu.

*Tato práce vznikla za podpory grantu GA ČR 203/07/0564.*

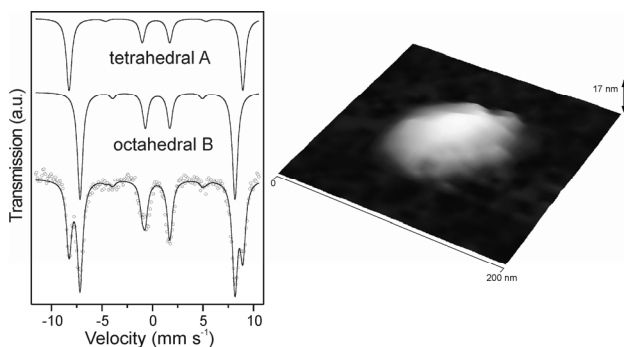
#### 7L-04

### NANOČÁSTICE OXIDŮ ŽELEZA Z TERMICKY INDUKOVANÝCH REAKCÍ V PEVNÉ FÁZI – SYNTÉZA, VLASTNOSTI A APLIKACE

#### RADEK ZBORIL

*Katedra fyzikální chemie a Centrum výzkumu nanomateriálů, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc  
zboril@prfnw.upol.cz*

Oxid železitý představuje typickou polymorfní sloučeninu nabízející řadu strukturních forem v závislosti na podmínkách přípravy či na geofyzikálních a geochemických parametrech při kterých vzniká v přírodě. V nanokrystalickém stavu vykazují všechny strukturní formy řadu unikátních vlastností, které jsou využitelné v různých oblastech moderních nanotechnologií. Termodynamicky nejstabilnější hexagonální  $\alpha$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> modifikace (hematit) je, ve formě nanočástic, velmi účinný katalyzátor v řadě procesů heterogenní katalýzy a také velmi perspektivní materiál pro fotokatalytické štěpení vody. Druhá nejčastější strukturní forma, kubický  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (maghemit), reprezentuje společně s magnetitem (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) strategický materiál v řadě diagnostických i terapeutických lékařských aplikací. Díky kombinaci vhodných magnetických (ferimagnetických, superparamagnetických), povrchových a velikostních charakteristik je vhodně funkcionalizovaný (povrchově upravený) nanomaghemit používán pro vylepšení kontrastu při zobrazování metodou magnetické rezonance, jako magnetický nosič pro cílený transport léčiv, při léčbě nádorových onemocnění metodou hypertermie nebo při magnetickém značení a separaci buněk. Kosočtverečná  $\varepsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> modifikace byla doposud připravena téměř výhradně ve formě asymetrických tyčinkovitých nanočástic, které vykazují obrovskou koerzivní sílu okolo 2T při pokojové teplotě. Tato hodnota, která je nejvyšší naměřená mezi všemi oxidy kovů, činí  $\varepsilon$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> velmi perspektivní fází pro vývoj nové generace magnetických záznamových médií. Poslední a nejvzácnější strukturní formou je kubický  $\beta$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, který lze připravit metodou chemické depozice par (CVD) ve formě unikátních dutých nanočástic tvořených několika slupkami s tloušťkou 3-



Obr. 1. Mössbauerovo spektrum (2K/5T) a AFM snímek nanočástic maghemitu funkcionalizovaných kyselinou palmitovou

5 nm. Kromě zmíněných (nano)krystalických fází existuje oxid železitý i ve formě ultramalých (1–3 nm) nedifrakujících amorfních nanočástic s neperiodickou mříží, které, zejména ve formě nanokompozitů s SiO<sub>2</sub> a Au, fungují jako velmi účinné senzory vlhkosti a magneto-optické senzory<sup>1,2</sup>.

Široký aplikační potenciál všech strukturálních modifikací Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> indukoval, zejména v posledních letech, extenzivní vývoj nových syntetických postupů směrem k monodisperzním nanočásticím s definovanou strukturou, velikostí a morfologií. Tyto preparační postupy zahrnují například sol-gel, sonochemické, depoziční, precipitační a pyrolytické syntézy. Termicky indukované dekompozice vhodných Fe-prekurzorů v pevné fázi („prekurzorové syntézy“) představují jednoduchý, levný a technologicky nejatraktivnější syntetický přístup, neboť umožňují jedнокrokovou přípravu velkého množství produktu. Navíc mohou být vlastnosti nanočástic úspěšně řízeny volbou reakčních podmínek (teplota, tlak, atmosféra, čas) a použitého prekurzoru (struktura, velikost, morfologie). Na příkladech teplotních dekompozicí hexakynoželeznatanu železitého, šřavelanu a octanu železitého na vzduchu bude demonstrován mnohdy složitý mechanismus tvorby nanočástic, způsob řízení jejich krystalinity, struktury a velikosti, stejně jako možnost přípravy oxidické fáze striktně kopírující morfologii prekurzoru („šablonové syntézy“) <sup>3–5</sup>. Jestliže je dekompozice prováděna v přítomnosti vhodné biokompatibilní fáze, lze jedнокrokově připravit povrchově modifikované magnetické nanočástice, jak bude uvedeno na příkladu nanomaghemitu funkcionalizovaného kyselinou palmitovou<sup>6</sup> (obr. 1).

V rámci přednášky budou diskutovány i některé mimořádné vlastnosti environmentálních a mimozemských nanočástic na bázi oxidů železa. Budou zmíněny například nejnovější výsledky v bioaplikacích nanočástic magnetitu z magnetotaktických bakterií nebo pozoruhodné magnetické vlastnosti ilmeno-hematitových lamelárních nanostruktur, které se vyskytují také na Marsu, a které vykazují neobvykle intenzivní magnetismus<sup>7</sup>. Nanokrystalické oxidy železa srážející se z kyselých důlních vod lze zase využít jako vysoce čisté prekurzory pro termickou syntézu nanočástic nulocného železa, reprezentujících ekologicky akceptovatelný a přitom neobyčejně efektivní materiál pro reduktivní technologie sanace podzemních vod<sup>8</sup>.

## LITERATURA

- Zboril R., Mashlan M., Petridis D.: *Chem. Mater.* **14**, 969 (2002).
- Machala M., Zboril R., Gedanken A.: *J. Phys. Chem., B* **111**, 4003 (2007).
- Hermanek M., Zboril R., Mashlan M., Machala L., Schneeweiss O.: *J. Mater. Chem.* **16**, 1273 (2006).
- Zboril R., Machala M., Mashlan M., Sharma V. K.: *Crystal Growth & Design* **4**, 1317 (2004).
- Hermanek M., Zboril R., Medrik I., Pechousek J., Gregor C.: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 10929 (2007).
- Zboril R., Bakandritsos A., Mashlan M., Tzitzios V., Dallas P., Trapalis Ch., Petridis D.: *Nanotechnology* **19**, 095602 (2008).
- Robinson P., Harrison R. J., McEnroe S. A., Hargraves R. B.: *Nature* **418**, 517 (2002).
- Filip J., Zboril R., Schneeweiss O., Zeman J., Cernik M., Kvapil P., Otyepka M.: *Environ. Sci. Technol.* **41**, 4367 (2007).

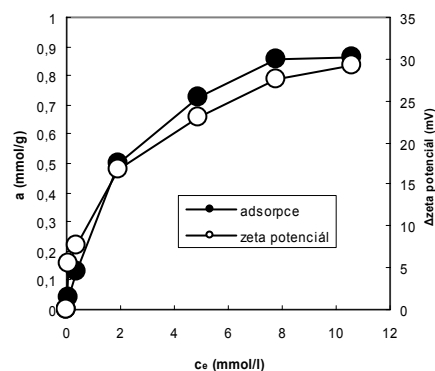
## 7L-05

### VYUŽITÍ ZETA POTENCIÁLU K POSTIHNUTÍ JEVŮ NA FÁZOVÉM ROZHRANÍ

ROMAN MARŠÁLEK

*Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita v Ostravě,  
30. dubna 22, 701 03 Ostrava  
roman.marsalek@osu.cz*

Příspěvek se zabývá využitím zeta potenciálu jako veličiny, která má své místo při studiu jevů na fázovém rozhraní, v tomto případě především adsorpce z vodných roztoků na uhlíkatých materiálech. Změny zeta potenciálu byly sledovány ve dvou základních systémech. A to adsorpce iontů těžkých kovů na uhlíkatých materiálech a na jílových minerálech. Dále pak při studiu adsorpce tenzidů na různých typech uhlí. V obou případech naměřené hodnoty zeta potenciálu (resp. jeho změn) korespondují s naadsorbovaným množstvím těžkého kovů či povrchově aktivní látky.



Obr. 1. Adsorpční izoterma dodecylsulfátu sodného (SDS) na černém uhlí a vyvolané změny zeta potenciálu

Výše uvedené skutečnosti dokumentuje obr. 1, na kterém je patrné, že naadsorbované množství SDS (a) při dané rovnovážné koncentraci ( $c_e$ ) je „přímo úměrné“ změně zeta potenciálu. Tento fakt je možné využít při hodnocení mechanismu adsorpce tenzidů. Výsledky lze dále aplikovat při odstraňování tenzidů z odpadních vod (adsorpcí na vhodných sorbentech) nebo při studiu flotačního procesu, ve kterém se tenzidy uplatňují jako tzv. sběrače. V případě adsorpce iontů těžkých kovů byl, mimo jiné, kladen důraz na vliv pH na adsorpční proces. A také zde je možné nalézt souvislost mezi adsorpční kapacitou a zeta potenciálem. Mezi další studované případy využití měření zeta potenciálu lze jmenovat hodnocení oxidických katalyzátorů či anorganických pigmentů.

*Tato práce vznikla za podpory grantu MPO č. 2A-ITP1/083 a GA ČR č. 105/07/P041.*

#### 7L-06 VYUŽITIE TERAHERTZOVEJ SPEKTROSKOPIE PRI CHARAKTERIZÁCI DIELEKTRICKÝCH VLASTNOSTÍ VRSTEVNATÝCH FYLOSILIKÁTŮV

**MARIÁN JANEK<sup>a,b</sup>, IGNÁC BUGÁR<sup>c</sup>, DUŠAN  
LORENC<sup>c</sup>, VOJTECH SZÓCS<sup>d</sup>, DUŠAN VELIČ<sup>b,c</sup>  
a DUŠAN CHORVÁT<sup>c</sup>**

<sup>a</sup> Technologický inštitút, Slovenská akadémia vied, Dúbravská cesta 9, 845 13 Bratislava, <sup>b</sup> Univerzita Komenského, Prírodovedecká fakulta, Katedra fyzikálnej a teoretickej chémie, Mlynská dolina CH1, 842 15 Bratislava, Medzinárodné laserové centrum, Ilkovičova 3, 812 19 Bratislava, <sup>d</sup> Chemický ústav, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina CH2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika  
marian.janek@savba.sk

Dynamický rozvoj terahertzovej spektroskopie v časovej doméne, využívajúcej optoelektronické spínače na báze femtosekundových laserov (THz-TDS) zabezpečuje jej nasadenie pri charakterizácii dielektrických materiálov<sup>1</sup>, polovodičov, tuhých látok napr. skiel ale aj organických zlúčenín ako polymérov a biomolekulárnych systémov<sup>2</sup> v ďalekej infračervenej oblasti. Ďalšie oblasti intenzívneho nasadenie tejto techniky sú pri obrane proti terorizmu, topografického zobrazovania, kontrole objemových materiálov a detekcie chemických zlúčenín.

Terahertzovú spektroskopiu v časovej doméne sme použili na charakterizáciu ílových minerálov zo skupiny slúď pre stanovenie ich dielektrických vlastností. Použitie optoelektronické spínače na báze nízkoteplotného GaAs nám umožnili detekciu vlnočtov v ďalekej infračervenej oblasti od 3,3 do 40,0  $\text{cm}^{-1}$  ktorá zodpovedá frekvenciám 0,1 až 1,2 THz. Skúmané vzorky boli vybrané tak aby sa líšili svojím kryštalochemickým zložením jednak v izomorfných substitúciách jednotlivých vrstiev ale aj v obsahu medzivrstvových kationov. Merdživrstvové kationy boli ďalej jednak hydratované napríklad  $\text{Mg}^{2+}$  kation v prípade vermikulitu a dehydratované kationy napríklad  $\text{K}^+$  a  $\text{Mg}^{2+}$  v prípade flogopitu, biotitu and muskovitu. Pre tieto prírodné vrstevnaté materiály bola stanovená frekvenčná závislosť komplexného indexu lomu zahŕňajúca porovnanie reálnej časti indexu lomu a absorpčného in-

dexu. Koherentná detekcia THz pulzov umožnila výpočet hrúbok použitých slúď priamo z jednotlivých meraní použitím iterácie z fixného bodu<sup>3</sup>.

*Táto práca je podporovaná vedeckou grantovou agentúrou VEGA číslo 1/4457/07.*

#### LITERATÚRA

1. Dai J., Zhang J., Zhang W., Grischkowsky D.: J. Opt. Soc. Am. B7, 1379 (2004).
2. Fischer B. M., Walther M., Jepsen P. U.: Phys. Med. Biol. 47, 3807 (2002).
3. Whitayachumnankul W., Ferguson B., Rainsford T., Mickan S. P., Abbott D.: Electronics Lett. 41, 800 (2005).

#### 7L-07 PŘESNÉ STABILIZAČNÍ ENERGIE STAVEBNÍCH BLOKŮ BIOMAKROMOLEKUL: KVANTOVĚ- CHEMICKÉ VÝPOČTY

**PAVEL HOBZA**

*Ústav organické chemie a biochemie, AV ČR, 166 10 Praha 6  
pavel.hobza@uochb.cas.cz*

Pomocí nejpřesnějších metod kvantové chemie (metoda spřažených klastrů se zahrnutím tříelektronových excitací, CCSD(T) a poruchové metody, MPn) byly studovány struktury a stabilizační energie molekulárních komplexů, které hrají významnou roli v biodisciplínách. Zvláštní pozornost byla věnována párům basí nukleových kyselin a to jak vázaných vodíkovou vazbou, tak i patrových. Stabilizační energie byly určeny na CCSD(T) úrovni při uvažování velkých basí atomových orbitalů, případně na úrovni limitu kompletní base. Výsledné stabilizační energie komplexů s vodíkovými vazbami a zvláště patrových komplexů jsou velké (30 a 15  $\text{kcal mol}^{-1}$ ), mnohem větší než bylo dosud známo. Analýza energetických příspěvků (pomocí poruchové metody SAPT) ukázala, že dominantním členem u patrových komplexů je Londonova dispersní energie, zatímco elektrostatická energie určuje orientaci basí v páru. Teoretický popis dispersní energie je velmi náročný a některé metody zcela selhávají (např metody DFT). Dispersní energie hraje v biologických systémech jedinečnou úlohu a bude ukázáno, že dvoušroubovicová struktura DNA je jednoznačně určena dispersními interakcemi. Podobný závěr platí i o struktuře hydrofobního jádra bílkovin.

## 7L-08

STABILITA NEGLOBULÁRNÍHO PROTEINU P18<sup>INK4c</sup> A JEHO FRAGMENTŮ

PETR SKLENOVSKÝ, KATEŘINA KUBEŠOVÁ, PAVEL BANÁŠ a MICHAL OTYEPKA\*

Katedra fyzikální chemie, Univerzita Palackého v Olomouci, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc  
 michal.otyepka@upol.cz

Protein p18<sup>INK4c</sup> (p18) z rodiny inhibitorů proteinových kinás (INK) je modulární protein složený z pěti ankyrinových (ANK) motivů. Proteiny tvořené ANK motivy jsou předmětem intenzivního zájmu, protože jejich struktura je stabilizována zejména lokálními kontakty<sup>1</sup> a slouží tak jako modelové systémy pro hlubší pochopení stability a mechanismu skládání modulárních proteinů. Z hlediska biomechanických vlastností jde rovněž o velmi atraktivní biomolekuly<sup>2</sup>. Zásadní otázkou stále zůstává, jakou roli hrají jednotlivé strukturální motivy v celkové stabilitě proteinu a co ji vlastně určuje.

Věnovali jsme se studiu stability p18 (156 reziduí) a jeho různě velkých fragmentů, tedy celkem 55 peptidovým fragmentům od velikosti jedné  $\alpha$ -šroubovice (~10 reziduí) až po dva ANK motivy (~55 reziduí), metodou klasické molekulové dynamiky v explicitním solventu (detaily simulací programem AMBER 8.0 s použitím silového pole *parm99* jsou uvedeny v literatuře<sup>3</sup>). Stabilita p18 byla dále studována simulací tepelné denaturace (4×20 ns simulace za 500 K) podle Daggettové<sup>4</sup>. Celková délka simulací činila 3,2  $\mu$ s.

Simulace různě velkých fragmentů umožňuje posoudit stabilitu jednotlivých strukturálních motivů a také vliv strukturálního kontextu na stabilitu. Výpočty ukazují, že  $\alpha$ -šroubovice, páry  $\alpha$ -šroubovic a motivy  $\alpha$ -šroubovice-otočka- $\alpha$ -šroubovice nejsou stabilní. Minimální stabilní motiv je tvořen alespoň systémem dvou motivů  $\alpha$ -šroubovice-otočka- $\alpha$ -šroubovice. Toto zjištění koresponduje s experimentálním pozorováním, že nejmenší známý protein tvořený ANK motivy musí být vystavěn alespoň ze dvou ANK motivů. Simulace dále prokázaly, že stabilita N- a C-terminálních motivů je významně větší než stabilita stejných vnitřních motivů. To naznačuje, že na stabilitu proteinů tvořených ANK motivy mají významný vliv terminální ANK motivy.

Vysokoteplotní simulace ukázaly mechanismus teplem indukované denaturace p18, kde C-terminální ANK motivy (ANK III, IV a V) jsou na vysokou teplotu méně citlivé než N-terminální (ANK I a II). Systém má tendenci se denarovat ve směru od N-konce k C-konci.

Práce byla podpořena granty LC512 a MSM6198959216.

## LITERATURA

1. Main E. R. G., Jackson S. E., Regan L.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13, (2003).
2. Lee G., Abdi K., Jiang Y., Michaely P., Bennett V., Marszalek P. E.: *Nature* 440, 9 (2006).
3. Sklenovský P., Banáš P., Otyepka M.: *J. Mol. Model.*, v tisku (2008).
4. Daggett V.: *Chem. Rev.* 106, 5 (2006).

## 7L-09

## TEORIE FUNKCIONÁLU HUSTOTY DOPLNĚNÁ EMPIRICKÝM DISPERZNÍM ČLEMEM – DFT-D. RYCHLÝ A PŘESNÝ NÁSTROJ PRO VÝPOČET MEZIMOLEKULOVÝCH INTERAKCÍ

PETR JUREČKA<sup>a,b</sup>, JIŘÍ ČERNÝ<sup>b</sup>, PAVEL HOBZA<sup>a,b</sup> a DENNIS R. SALAHUB<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup> Ústav organické chemie a biochemie, v.v.i. a Centrum biomolekul a komplexních molekulových systémů, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, ČR, <sup>c</sup> University of Calgary, Faculty of Science, 2500 University Drive NW, Calgary, Alberta, Canada, T2N 1N4  
 petr.jurecka@upol.cz

Teorie funkcionálu hustoty – DFT – se v krátké době prosadila jako jeden z nejužitečnějších a nejpoužívanějších nástrojů teoretické chemie. Vedle nesporných výhod v rychlosti a přesnosti popisu kovalentních systémů trpí ale i nedostatky, hlavně v oblastech excitovaných stavů a mezimolekulových interakcí. Nedávno bylo ukázáno, že jeden z těchto nedostatků – neschopnost popsat dlouhodobou disperzní interakci – může být efektivně odstraněn přidáním empirické disperzní korekce<sup>1</sup>. Ta je založena na asymptotickém vztahu pro disperzní energii  $C_6/r^6$ , který je pro malé vzdálenosti zatlučen. Navrhli jsme vylepšený tvar tlumící funkce s korektním chováním pro velké vzdálenosti a jednoduchým empirickým škálováním omezujícím dvojí započítání korelačních efektů<sup>2</sup>. Škálovací parametry byly získány fitováním na vysoce kvalitní referenční výpočty. S rostoucím počtem aplikací DFT-D se postupně přesvědčujeme o kvalitě metody a přenositelnosti navržených parametrů. Umožňuje nám s výbornou přesností vypočítat nejen interakční energie, ale i geometrie. Přestože byly parametry původně navrženy pro popis nevazebných interakcí v molekulárních komplexech, ukazují se vhodnými i pro intramolekulovou disperzní interakci<sup>3</sup>. Spolehlivě předpovídají energeticky nejvýhodnější konformery malých peptidů a poskytují pro ně také kvalitnější geometrie, než náročnější metoda MP2. Vibrační frekvence jsou v lepší shodě s MP2, než samotná DFT (cit.<sup>4</sup>). Přestože je disperzní korekce v DFT-D empirická a je tedy třeba ji dále pečlivě testovat, prozatím se profiluje jako přesná a spolehlivá metoda spojující rychlost DFT s kvalitou výsledků jinak dostupnou pouze podstatně náročnějšími výpočty.

Tato práce vznikla za podpory grantu MŠMT ČR MSM 6198959216 a grantu LC 512.

## LITERATURA

1. Grimme S.: *J. Comput. Chem.* 25, 1463 (2004).
2. Jurečka P., Černý J., Hobza P., Salahub D. R.: *J. Comput. Chem.* 28, 555 (2007).
3. Valdés H., Klusák V., Pitoňák M., Exner O., Starý I., Hobza P., Rulišek L.: *J. Comput. Chem.* 29, 861 (2007).
4. Černý J., Jurečka P., Hobza P., Valdés H.: *J. Phys. Chem., A* 111, 1146 (2007).

## 7L-10

**MECHANISMUS RNA KATALÝZY SAMOŠTĚPÍ  
REAKCE RIBOZYMU VIRU HEPATITIDY D**

**PAVEL BANÁŠ<sup>a,c,d</sup>, LUBOMÍR RULÍŠEK<sup>c,d</sup>,  
VERONIKA HÁNOŠOVÁ<sup>a</sup>, DANIEL SVOZIL<sup>c</sup>, NILS G.  
WALTER<sup>c</sup>, JIŘÍ ŠPONER<sup>b,c</sup> a MICHAL OTYEPKA<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> Katedra fyzikální chemie a Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, Univerzita Palackého, tř. Svobody 26, 771 46 Olomouc, <sup>b</sup> Biofyzikální ústav, Akademie věd České republiky, Královopolská 135, 612 65 Brno, <sup>c</sup> Ústav organické chemie a biochemie, Akademie věd České republiky a Centrum pro biomolekuly a komplexní molekulární systémy, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>d</sup> Gilead Sciences Research Center & IOCB, Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, <sup>e</sup> Department of Chemistry, Single Molecule Analysis Group, University of Michigan, 930 N. University Avenue, Ann Arbor, MI 48109-1055, USA  
ribicka.neonka@email.cz

Ribozym Hepatitidy D (HDV ribozym) je RNA motiv nacházející se v cirkulární RNA lidského viru Hepatitidy D, který je zodpovědný za autokatalytické samoštěpení multimerního RNA vlákna vznikajícího při replikaci viru prostřednictvím „double-rolling“ mechanismu. Předchozí experimentální studie ukázaly, že nukleotid C75 nacházející se v aktivním místě ribozymu je esenciální pro katalýzu, nicméně jeho konkrétní role v mechanismu reakce nebyla dosud identifikována.

Dva alternativní katalytické mechanismy, v nichž C75 hraje roli acido-bazického katalyzátoru, byly navrženy. Zatímco krystalové struktury jsou v souladu s modelem, v němž C75 vystupuje jako obecná báze deprotonující U-1(2'-OH) nukleofilní skupinu, která atakuje štěpený fosfát, biochemické studie jsou spíše konzistentní s modelem, v němž C75 je protonovaný a funguje jako obecná kyselina poskytující proton odstupující alkoholové 5'-O skupině.

V této práci byl studován reakční mechanismus genomické formy HDV ribozymu pomocí hybridní QM/MM metodologie. Bylo nalezeno, že nukleotid C75 je schopen působit v kontextu celkové struktury HDV ribozymu jako obecná báze s reakční bariérou  $\sim 20 \text{ kcal mol}^{-1}$ , která je srovnatelná s experimentální hodnotou. Naprotitomu, na základě dostupných strukturních dat nebylo dosud možno nalézt reakční cestu, v níž by nukleotid C75 vystupoval jako obecná kyselina.

*Tato studie byla podporována granty LC512, LC06030, MSM0021622413 a MSM6198959216 Ministerstva Školství ČR, a granty IAA400040802 a IQS500040581 Grantové Agentury AV ČR, dále AV ČR, grant no. AV0Z50040507 a AV0Z50040702.*