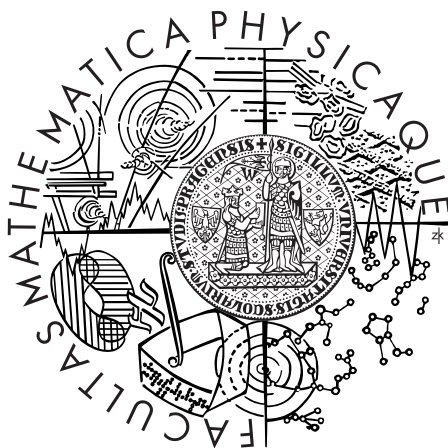


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

Diplomová práce



Pavel Srb

Studium dynamického chování proteinů

Mason-Pfizerova opičího viru

Katedra fyziky nízkých teplot

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Jan Lang, Ph.D.

Studijní program: Biofyzika a chemická fyzika

Děkuji školiteli RNDr. Janu Langovi PhD. za příkladné vedení diplomové práce, kolegům Mgr. Zdeňkovi Tošnerovi a ing. Jiřím Vlachovi za pomoc s programovým vybavením, a ing. Richardu Hrabalovi CSc. a ing. Janu Lipovovi za poskytnutí a přípravu vzorků proteinu.

Děkuji rodičům a svým blízkým za podporu při sepisování této diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem svou diplomovou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 27. dubna 2004

Pavel Srb

Obsah

1	Úvod	1
2	Teoretická část	3
2.1	Teoretický popis NMR spektroskopie	3
2.1.1	Larmorova precese	3
2.1.2	Klasický popis	3
2.1.3	Kvantový popis	3
2.1.4	Spinový hamiltonián	3
2.1.5	Matice hustoty	4
2.1.6	Liouvilleova–von Neumannova rovnice	5
2.2	Externí interakce	6
2.2.1	Pulzy	6
2.3	Interní interakce	6
2.3.1	Chemický posun	6
2.3.2	Přímá dipól-dipólová interakce	7
2.3.3	J-interakce	8
2.3.4	Produktové operátory	8
2.4	Relaxační procesy	8
2.4.1	Relaxační mechanismy	9
2.4.2	Spektrální hustota korelační funkce	9
2.4.3	Solomonovy rovnice	9
2.4.4	Vztahy pro R_1 a R_2	10
2.4.5	Závislost korelačního času na relaxačních dobách	11
2.4.6	Nukleární Overhauserův efekt (NOE)	11
2.4.7	Lipari-Szabó přístup	12
2.5	Pulzní sekvence pro studium dynamiky makromolekul	13
2.5.1	Podélná relaxace	13
2.5.2	Příčná relaxace	15
2.5.3	Měření NOE	17

2.6	Mason-Pfizerův opičí virus	18
2.6.1	Genom retrovirů	18
2.6.2	Morfologie retroviru	18
2.6.3	Životní cyklus retroviru	18
2.7	Matrixový protein	19
2.7.1	Přirozená forma M-PMV MA	20
2.7.2	R55F Mutant M-PMV	20
2.7.3	Srovnání s virem HIV	22
3	Experimentální část	24
3.1	Materiál a metody	24
3.1.1	Vzorky proteinu	24
3.1.2	Parametry sekvencí	25
3.1.3	Zpracování spekter	28
3.1.4	Určení relaxačních dob a parametrů Lipari-Szabóova modelu	28
3.2	Výsledky a Diskuse	31
3.2.1	Vzorek R55F	31
3.2.2	Vzorek WT	39
3.2.3	Srovnání vzorků WT a R55F	42
4	Závěr	45
	Literatura	47
	Přílohy	49
A	Tabulka výsledků pro vzorek R55F.	50
B	Tabulka výsledků pro vzorek R55F (pokračování).	51
C	Tabulka výsledků pro vzorek WT	52

D Tabulka výsledků pro vzorek WT (pokračování)

53

Abstrakt

Název práce: *Studium dynamického chování proteinů Mason-Pfizerova opičího viru.*

Autor: *Pavel Srb*

Katedra (ústav): *Katedra fyziky nízkých teplot*

Vedoucí diplomové práce: *RNDr. Jan Lang, Ph.D.*

e-mail vedoucího: *Jan.Lang@mff.cuni.cz*

Abstrakt: Matrixový protein Mason-Pfizerova opičího viru (M-PMV) tvoří obálku retrovirové kapsidy. Kromě toho hraje také důležitou regulační roli při formování nové virové částice. Přirozená forma M-PMV patří k retrovirovému typu D, protože k formování kapsid dochází uvnitř cytoplasmy. Bodovou mutací argininu 55 za fenylalanin lze docílit změny na typ C, který formuje virové kapsidy na membráně hostitelské buňky (např. HIV). Bylo změřeno relaxační chování spinů ^{15}N (podélná a příčná relaxační doba, $^{15}\text{N}-\{^1\text{H}\}$ stacionární heteronukleární Overhauserův efekt) ve spektrech nukleární magnetické rezonance. Parametry molekulárního pohybu byly získány Lipari-Szabóovým přístupem. V blízkosti mutace ve střední části proteinu byla pozorována tři pohyblivá residua. Je známo, že ve stejné oblasti se pravděpodobně nachází signál pro změnu typu skládání kapsidy. Naproti tomu chování střední části vzorku nemutovaného proteinu bylo uniformní a v rámci chyb měření nebyly pozorovány významější odchylky v pohyblivosti residuů.

Klíčová slova: Nukleární magnetická rezonance, Dynamika, Protein, Mason-Pfizerův opičí virus

Abstract

Title: *Study of dynamic properties of proteins from Mason-Pfizer monkey virus.*

Author: *Pavel Srb*

Department: *Department of low temperature physics*

Supervisor: *RNDr. Jan Lang, Ph.D.*

Supervisor's e-mail address: *Jan.Lang@mff.cuni.cz*

Abstract: Matrix protein of Mason-Pfizer monkey virus (M-PMV) forms a viral outer capsid envelope. It also plays an important role in regulation of assembly of a new viral particle. Wild-type form of M-PMV belongs among the D-type retroviruses, which form their capsids in cytoplasm of the host cell. Substitution of arginin 55 by phenylalanin results in the viral capsid assembly taking place on the cellular membrane, that is typical for C-type retroviruses (e.g. HIV). Relaxation properties of ^{15}N nuclear spins (longitudinal and transverse relaxation times, $^{15}\text{N}\{-^1\text{H}\}$ steady-state heteronuclear Overhauser effect) were determined from nuclear magnetic resonance spectra. Parameters of molecular motion were derived using the Lipari-Szabo approach. Three rather mobile residues were found close to the site of mutation in the region, which is assumed the signal sequence controlling the type of the capsid assembly process. Behaviour of the same part of the wild-type form of the protein was rather uniform and no significant deviations in mobility of residues were observed within the experimental error.

Keywords: Nuclear magnetic resonance, Dynamics, Protein, Mason-Pfizer monkey virus

1 Úvod

Studium struktury a funkce proteinů patří k moderním a rychle se rozvíjejícím odvětvím současné vědy. Z fyzikálních metod studia struktury bílkovin se uplatňují zejména rentgenová krystalografie a spektroskopie nukleární magnetické rezonance. Využití rentgenové krystalografie je mnohem častější, je však omezeno nutností vypěstovat monokrystal studovaného proteinu. Některé slabší interakce působící v roztoku navíc mohou být narušeny silnějšími krystalovými silami. Naproti tomu nukleární magnetická rezonance umožňuje studovat biologické molekuly v přirozeném prostředí, i když ve vyšších než přirozených koncentracích. Omezením je velikost molekul. I největší NMR spektrometry zatím dovolují studovat strukturu proteinů o velikostech maximálně řádově 100 kDa. Nukleární magnetická rezonance však poskytuje unikátní možnost studia dynamiky proteinů pomocí měření relaxačních jevů. Tímto způsobem je možné doplnit obraz molekuly vzniklý vyřešením její struktury o další úhel pohledu.

Studium retrovirů je silně podníceno hlavně zájmem o virus HIV a s ním spojenou celosvětově rozšířenou nemocí AIDS. Životní cyklus viru HIV je však poměrně komplikovaný a je proto vhodné začít s výzkumem na jednodušším modelovém případě. Ideální možnost v tomto ohledu skýtá Mason-Pfizerův opičí virus, který je také retrovirem a jeho účinky u makaků jsou blízké působení viru HIV u lidí. Počátkem 90. let 20. století bylo objeveno, že mutace matrixového proteinu, který tvoří obálku retrovirální kapsidy mohou zásadním způsobem ovlivnit průběh životního cyklu Mason-Pfizerova opičího viru, který se pak v některých případech chová z hlediska životního cyklu velmi podobně jako virus HIV.

Tato diplomová práce má za cíl přispět k výzkumu životního cyklu Mason-Pfizerova opičího viru studiem dynamického chování matrixového proteinu a jeho nejzajímavějšího mutantu. Tato práce je součástí širšího projektu zpracovávaného především na Vysoké škole chemicko-technologické v Praze a

Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, jehož součástí součástí je exprese proteinů Mason-Pfizerova opičího viru a jejich mutantů, studium jejich struktury pomocí NMR spektroskopie a studium jejich vlastností pomocí dalších fyzikálních a biologických metod.

2 Teoretická část

2.1 Teoretický popis NMR spektroskopie

2.1.1 Larmorova precese

Základem jevu nukleární magnetické rezonance (NMR) je Larmorova precese. Pohyb spinu ve vnějším magnetickém poli lze popsat jako pohyb po plášti kužele. Složka magnetizace směřující do osy z se zachovává, složky v osách x a y se mění harmonicky. Frekvence rotačního pohybu kolem osy z se nazývá Larmorova frekvence ω_L .

$$\vec{\omega}_L = -\gamma \vec{B}_0, \quad (1)$$

kde γ je gyromagnetický poměr a B_0 je velikost vnějšího magnetického pole.

2.1.2 Klasický popis

Klasický popis NMR lze provést pomocí Blochových rovnic. Blochovy rovnice jsou soustavou lineárních diferenciálních rovnic prvního řádu a popisují časový vývoj magnetizace pomocí fenomenologických relaxačních dob T_1 , T_2 . Nevýhodou popisu Blochovými rovnicemi je nemožnost zahrnutí všech spin-spinových interakcí na mikroskopické úrovni.

2.1.3 Kvantový popis

Kvantový popis NMR experimentu spočívá v důsledném použití kvantové teorie pro popis spinového systému a přechodů mezi jednotlivými energetickými hladinami, zatímco magnetické pole je popisováno klasicky.

2.1.4 Spinový hamiltonián

Naším zkoumaným systémem je makromolekula v roztoku. Hamiltonův operátor pro takový systém je velmi komplikovaný, protože musí obsahovat informaci

o polohách, hybnostech a spinových stavech všech jader a elektronů. Pro účely popisu NMR experimentů můžeme pohyby elektronů prohlásit za velmi rychlé oproti časové škále pohybů jader. Vliv pohybu elektronů na jádra se tudíž střeďuje. Spinový hamiltonián, který dostatečně dobře popisuje jevy viditelné v NMR experimentu, závisí pouze na orientacích složek jaderného spinu.

2.1.5 Matice hustoty

Vlnová funkce souboru makromolekul nacházejících se v roztoku je také velmi komplikovaná. Pro účely popisu NMR experimentu je možné přejít ke kvantově statistickému popisu. Každá část systému je pak popsána svou vlnovou funkcí Ψ (tzv. vlnová funkce čistého stavu) a jí příslušející hustotou pravděpodobnosti $P(\Psi)$. Hustota pravděpodobnosti popisuje příspěvek daného čistého stavu k celkovému *smíšenému stavu*. Systém pak lze popsat jako superpozici jednotlivých čistých stavů, které jsou popsány vlnovými funkcemi Ψ . Každá z vlnových funkcí Ψ může být rozložena do systému vlastních stavů

$$|\Psi\rangle = \sum_{n=1}^N c_n |n\rangle \quad (2)$$

Střední hodnota libovolné měřitelné veličiny A je pak dána vztahem:

$$\overline{\langle A \rangle} = \sum_{n,m} \overline{c_n c_m^*} \langle m | A | n \rangle \quad (3)$$

Pruh označuje střední hodnotu přes soubor. Koeficienty sumy představují matici:

$$\overline{c_n c_m^*} = \langle n | \rho | m \rangle = \rho_{mn} \quad (4)$$

Matice ρ_{mn} je hermitovská a nazývá se *matice hustoty*.

Diagonální komponenty matice hustoty se nazývají *populace*, protože odpovídají celkovému obsazení dané energetické hladiny. Mimodiagonální komponenty se nazývají *koherence*. Koherence nemají přímou souvislost s pravděpodobnostmi přechodu.

2.1.6 Liouvilleova–von Neumannova rovnice

Pro účely popisu časového vývoje matice hustoty je možné odvodit ze Schrödingerovy rovnice Liouvilleovu–von Neumannovu rovnici.

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = i [\rho(t), H] \quad (5)$$

Pokud H nezávisí na čase, je možné snadno napsat řešení rovnice (5) jako:

$$\rho(t) = \exp(-iHt) \rho(0) \exp(iHt) \quad (6)$$

Pulzní sekvence obecně sestávají z pulzů a prodlev. V dobách mezi pulzy platí, v dobrém přiblížení, že Hamiltonián je časově nezávislý a pro řešení rovnice (5) lze použít vztah (6). Pulzy jsou však tvořeny radiofrekvenčním polem, které se v čase mění. Tento problém je možné řešit nalezením unitární podobnostní transformace, po jejím provedení budou ztransformovaný hamiltonián H_e i matice hustoty ρ^r časově nezávislémi. Z analogie s klasickým popisem NMR plyne, že nalezení unitární transformace odpovídá transformaci do rotující soustavy souřadné. Po ztransformování $H \rightarrow H_e$ a $\rho \rightarrow \rho^r$ lze psát rovnice analogické vztahům (5) a (6).

Faktor $\exp(iHt)$ ze vztahu (6) se nazývá propagátor. V tomto případě se jedná o propagátor rotace soustavy souřadné. Pomocí propagátoru je možné získat explicitní tvar matice hustoty, pokud je znám její tvar na počátku vývoje a pokud jsou známy explicitní tvary propagátorů pro popis pulzních sekvencí. Řešení rovnice(5) lze tedy psát jako:

$$\rho(t) = U^{-1} \rho(0) U, \quad (7)$$

kde U je propagátor a U^{-1} operátor k němu inverzní.

2.2 Externí interakce

Interakce působící na spinový systém jsou dvojího druhu. Interakce externí jsou způsobeny statickým vnějším magnetickým polem B_0 (Larmorova precese) a radiofrekvenčním polem v podobě pulzů.

2.2.1 Pulzy

Magnetizace je makroskopická veličina, která je dána sumou mikroskopických příspěvků jednotlivých spinů. Stav daného spinu během pulzní sekvence se popisuje pomocí složek operátoru jaderného spinu I_x , I_y a I_z . Je-li spinový systém v termální rovnováze je všechna makroskopická magnetizace orientována ve směru osy z . Přesněji, viz. (2.1.1) se složky v transverzální rovině středuji. Popis vývoje složek magnetizace se značně zjednoduší, přejdeme-li do rotující soustavy souřadné. V rotující soustavě souřadné se složky spinu v transverzální rovině nepohybují na frekvenci ω_L , ale pouze na relativní frekvenci $\Omega = \omega_0 - \omega_{ref}$.

Složky spinu směřující do os kartézského souřadného systému jsou reprezentovány *Pauliho maticemi*. Výsledek působení pulzu na spinový systém závisí na délce pulzu, na sklápěcího úhlu a na jeho fázi. V našich sekvencích používáme pulzy se sklápěcími úhly $90^\circ \sim \frac{\pi}{2}$ a $180^\circ \sim \pi$. Fáze používaných pulzů jsou: $x \sim 0^\circ$, $y \sim 90^\circ$, a $-x \sim 180^\circ$ a $-y \sim 270^\circ$. Například $\frac{\pi}{2}$ pulz s fází x sklopí magnetizaci ze směru z do směru $-y$.

2.3 Interní interakce

2.3.1 Chemický posun

Z rovnice (1) plyne, že rezonanční frekvence daného jádra závisí na vnějším poli B_0 . Toto platí bez výhrad pro izolované spiny. V případě molekul je však situace složitější, vnější pole indukuje pohyb nábojů v elektronových obalech a pohyb těchto nábojů indukuje magnetické pole B_j^{ind} . Lokální magnetické pole v místě jádra j B_j^{loc} je pak dáno vektorovým součtem $\vec{B}_j^{loc} = \vec{B}_0 + \vec{B}_j^{ind}$.

Proto jsou rezonanční frekvence jader mírně odlišné v závislosti na lokálních podmínkách. Tento jev lze popsat *tenzorem chemického posunu* δ^j , který lze vyjádřit maticí o rozměrech 3×3 . Tento tenzor je v systému hlavních os diagonální a je reprezentován složkami δ_{xx} , δ_{yy} a δ_{zz} . Pro případ makromolekuly rychle rotující v izotropní kapalině se složky tenzoru střeďují a tenzor chemického stínění může být reprezentován skalární hodnotou, která je dána jeho stopou:

$$\delta = \frac{1}{3} \text{Tr}(\delta^j) \quad (8)$$

Rezonanční frekvence daného jádra bude v závislosti na lokálním poli dána vztahem:

$$\omega = -\gamma(1 + \delta) B_0 \quad (9)$$

Propagátor chemického posunu má tvar:

$$\hat{U}_{chp} = \exp(-i \Omega_0 \tau I_{1z}), \quad (10)$$

kde τ je doba vývoje, Ω_0 rezonanční frekvence.

2.3.2 Přímá dipól-dipólová interakce

Každý pohybující se magnetický moment je zdrojem časově proměnného magnetického pole, které se superponuje k ostatním zdrojům magnetického pole působícího na okolní spiny. Tato interakce se nazývá přímá dipól-dipólová interakce nebo dipól-dipólová interakce přes prostor. Její Hamiltonián má tvar:

$$\hat{H}_{jk}^{DD} = DCC_{jk} \left(3(\hat{I}_j \cdot e_{jk})(\hat{I}_k \cdot e_{jk}) - \hat{I}_j \cdot \hat{I}_k \right), \quad (11)$$

kde e_{jk} jsou báze vektory kartézského systému a b_{jk} je dipól-dipólová konstanta úměrná reciproké třetí mocnině vzdálenosti interagujících spinů (viz.(19)). Vzhledem k tomu, že makromolekula v roztoku rychle rotuje, je vliv této interakce na polohu signálů ve spektru vysokého rozlišení v kapalinách středován na nulu.

2.3.3 J-interakce

Kromě přímé dipól-dipólové interakce existuje nepřímá dipól-dipólová interakce, které je přímým experimentálním dokladem existence chemických vazeb. Tato interakce je zprostředkována spiny vazebných elektronů. Propagátor J-interakce je dán vztahem:

$$\hat{U}_{J-int} = \exp(-i \pi J_{12} \tau 2 I_{1z} I_{2z}) \quad (12)$$

2.3.4 Produktové operátory

Pro popis vývoje spinového systému, ve kterém jsou jednotlivé spiny svázány J-interakcí je výhodné zavést formalismus produktových operátorů. Pro izolovaný spin je báze vlastních stavů operátoru spinu tvořena operátory $\frac{1}{2}\hat{1}$, I_x , I_y a I_z . Řešíme-li pulzní sekvenci včetně vlivu J-interakce musíme provádět transformace (pomocí vztahů (10) a (12)) složitějších operátorů. Tyto operátory se konstruují jako direktní součiny bázových operátorů jednotlivých spinů. Pomocí rovnice (6) a komutačních relací spinových operátorů je možné odvodit sérii pravidel, která pak umožňují snadno počítat vliv pulzů a interakcí na spinový systém během pulzní sekvence.

2.4 Relaxační procesy

V podsekcí 2.1.6 uvádíme, že hamiltonián lze v dobrém přiblížení považovat za časově nezávislý. Takový hamiltonián lze získat pomocí tzv. *sekulární aproximace*, která spočívá v zanedbání mimodiagonálních komponent Hamiltoniánu. *Sekulární aproximace* však vede k zanedbání relaxačních jevů. Pro jejich popis je nutné jít za zjednodušení dané sekulární aproximací. Takový přístup poskytuje Redfieldova teorie, která je však příliš rozsáhlá, proto zde uvedeme pouze její výsledky. Relaxační parametry jednotlivých jader (v našem případě dusíků v kostře proteinu) jsou základním zdrojem informací o jejich pohyblivostech a korelačních časech.

2.4.1 Relaxační mechanismy

Základními mechanismy, které se podílejí na relaxacích v případě spinu o velikosti $\frac{1}{2}$ jsou přímá dipól-dipólová interakce a anizotropie chemického posunu (chemical shift anisotropy, CSA). Principiálně je relaxace způsobena fluktuujícím magnetickým polem $B_f(t)$, které se superponuje se statickým vnějším polem B_0 . Časový průběh pole $B_f(t)$ má následující vlastnosti:

- časová střední hodnota je $\langle B_f(t) \rangle = 0$
- střední kvadratická hodnota je $\langle B_f^2(t) \rangle \neq 0$
- míra rychlosti fluktuací je dána korelační funkcí:

$$G(\tau) = \langle B_f(t) B_f(t + \tau) \rangle \neq 0. \quad (13)$$

2.4.2 Spektrální hustota korelační funkce

Spektrální hustota korelační funkce je zavedena jako Fourierova transformace korelační funkce (13) vztahem:

$$J(\omega) = 2 \int_0^{\infty} G(\tau) \exp(-i\omega t) \quad (14)$$

2.4.3 Solomonovy rovnice

Vztahy popisující časový vývoj populací jednotlivých stavů pro případ dvou-spinového systému se nazývají *Solomonovy rovnice*. Lze je odvodit uvážením pravděpodobností těch přechodů, které přispívají k populaci zkoumané hladiny. Takto získané kinetické rovnice pro populace lze přepsat jako kinetické rovnice pro složku z podélné magnetizace. Další úpravou lze z těchto rovnic získat Solomonovy rovnice ve tvaru:

$$\frac{d}{dt} \begin{pmatrix} \langle \hat{I}_{1z} \rangle \\ \langle \hat{I}_{2z} \rangle \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -R_{auto} & R_{cross} \\ R_{cross} & -R_{auto} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \langle \hat{I}_{1z} \rangle - \langle \hat{I}_{1z} \rangle^{eq} \\ \langle \hat{I}_{2z} \rangle - \langle \hat{I}_{2z} \rangle^{eq} \end{pmatrix}, \quad (15)$$

kde R_{auto} je autorelaxační rychlostní konstanta a R_{cross} je krosrelaxační rychlostní konstanta. Podélná relaxační rychlost R_1 je dána jako:

$$R_1 = R_{auto} \quad (16)$$

Podélná relaxační doba T_1 souvisí s R_1 vztahem $T_1 = 1/R_1$. Vztah pro příčnou relaxační dobu T_2 je možné získat obdobně, je však zapotřebí řešit Solomonovy rovnice pro časový vývoj koherencí I_x a I_y , které odpovídají složkám magnetizace v transverzální rovině.

Explicitní tvar závislostí T_1 a T_2 na spektrálních hustotách korelační funkce je možné získat pomocí *Redfieldovy teorie*.

2.4.4 Vztahy pro R_1 a R_2

V případě studia dynamiky proteinu jsou z hlediska relaxačních mechanismů nejvýznamější dipól-dipólová relaxace dusíku vlivem interakce s přímo vázaným jádrem vodíku a anizotropie chemického posunu daného dusíku. Rovnice v této sekci popisují závislosti relaxačních rychlostí na spektrální hustotě korelační funkce. Tyto vztahy se dále používají při fitování spektrálních hustot korelační funkce pomocí Lipari-Szabóova modelu (viz. 2.4.7). Uvedeme nyní jejich explicitní tvary pro oba relaxační mechanismy:

$$R_1^{DD} = \frac{1}{4} N_H (DCC)^2 [J(\omega_H - \omega_N) + 3J(\omega_N) + 6J(\omega_H + \omega_N)] \quad (17)$$

$$R_2^{DD} = \frac{1}{4} N_H (DCC)^2 [2J(0) + \frac{1}{2}J(\omega_H - \omega_N) + \frac{3}{2}J(\omega_C) + 3J(\omega_H) + 3J(\omega_H + \omega_N)] \quad (18)$$

$$DCC = \frac{\mu_0 \gamma_H \gamma_N h}{8 \pi^2 r_{NH}^3} \quad (19)$$

DCC znamená *dipolar coupling constant*, která závisí na vzdálenosti interagujících jader r_{NH} , a univerzálních konstantách: μ_0 je permeabilita vakua, γ_N, γ_H jsou gyromagnetické poměry jader dusíku ^{15}N a vodíku 1H , h je Planckova konstanta.

$$R_1^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma_C B_0)^2 CSA_{eff}^2 J(\omega_N) \quad (20)$$

$$R_2^{CSA} = \frac{1}{3} (\gamma_C B_0)^2 CSA_{eff}^2 \left[\frac{2}{3} J(0) + \frac{1}{2} J(\omega_N) \right] \quad (21)$$

$$CSA_{eff} = |\Delta\delta| \sqrt{1 + \frac{\eta_{CSA}^2}{3}} \quad (22)$$

$$|\Delta\delta| = \delta_{zz} - \frac{\delta_{xx} + \delta_{yy}}{2} \quad (23)$$

$$\eta_{CSA} = \frac{3}{2} \frac{\delta_{xx} - \delta_{yy}}{\Delta\delta} \quad (24)$$

B_0 je magnetická indukce, $\Delta\delta$ je anizotropie chemického posunu (CSA), η_{CSA} je asymetrie tenzoru chemického posunu. Experimentálně měřené relaxační rychlosti jsou dány jako součet příspěvků obou mechanismů:

$$R_1 = R_1^{DD} + R_1^{CSA} \quad (25)$$

$$R_2 = R_2^{DD} + R_2^{CSA} \quad (26)$$

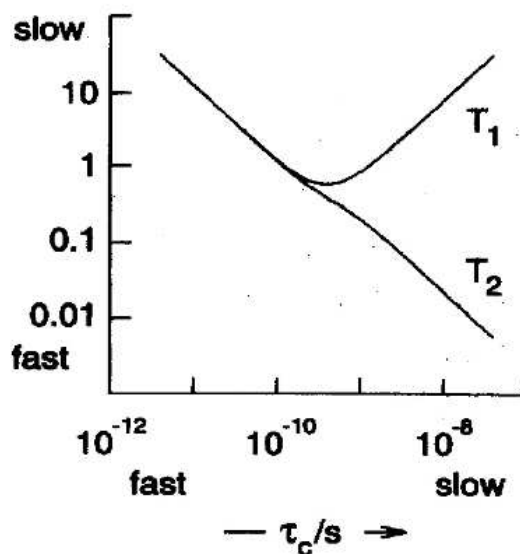
V principu může docházet k interferenci jednotlivých relaxačních mechanismů, každá z rovnic (25),(26) by pak obsahovala ještě interferenční člen. V našich měřeních jsme interferenčním jevům zamezili dostatečně častým invertováním vodíkové magnetizace pomocí 180° pulzů, které slouží jako efektivní decoupling [1].

2.4.5 Závislost korelačního času na relaxačních dobách

Obecná závislost relaxačních dob na korelačním čase je uvedena v Obr. 1. Pro T_1 není tato funkce prostá a má minimum pro $\tau_C \sim 1 \text{ ns}$. Měříme-li relaxační časy experimentálně, je pro nás důležitá doba T_2 , jejíž závislost na korelačním čase je monotónní. Podle hodnoty T_2 rozhodneme, ve které části křivky se nacházíme. Z Obr. 1 je vidět, že residua s relativně dlouhou T_1 a dlouhou T_2 mají krátké korelační časy a tudíž jsou pohyblivá.

2.4.6 Nukleární Overhauserův efekt (NOE)

Pro jednoduchost uvažujme dvouspinový IS systém. Aplikujeme-li na jádro I slabé radiofrekvenční pole na Larmorově frekvenci po dostatečně dlouhou



Obr. 1: Obecná závislost relaxačních dob T_1 a T_2 na korelačním čase τ_C . Obrázek z publikace: P. J. Hore: *Nuclear Magnetic Resonance*, Oxford University Press, Oxford 1995.

dobu, je možné dosáhnout značného navýšení podélné magnetizace spinu S. Pro intenzitu signálu za přítomnosti NOE platí vztah:

$$NOE = 1 + \left(\frac{\gamma_H}{\gamma_N} \right) \frac{N_H \sigma^{DD}}{R_1^{DD} + R_1^{CSA}} \quad (27)$$

Z teorie plyne, že výsledná NOE pro jádra dusíku by měla ležet v intervalu $\langle -3, 93; 0, 783 \rangle$ [3].

2.4.7 Lipari-Szabó přístup

Druhým nejjednodušším způsobem (po izotropní rotaci), jak najít předpis pro spektrální hustotu korelační funkce, je metoda pánů Lipariho a Szabóa. Vycházejí z předpokladu, že molekula izotropně rotuje jako celek s korelačním časem τ_M jako globálním parametrem. Každý N-H vektor se pak může pohybovat anizotropně s korelačním časem τ_e . Tento lokální pohyb je superponován na globální pohyb a oba pohyby jsou navzájem statisticky nekorelovány. Lokální

pohyblivost je popsána zobecněným parametrem uspořádání S , který nabývá hodnot $0 < S^2 < 1$, [2].

Spektrální hustota korelační funkce je dána jako součet dvou Lorentzových křivek:

$$J(\omega) = \frac{2}{5} \left[\frac{S^2 \tau_M}{1 + \omega^2 \tau_M^2} + \frac{(1 - S^2) \tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right] \quad (28)$$

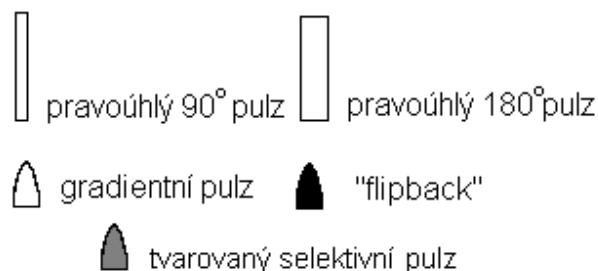
$$\tau^{-1} = \tau_M^{-1} + \tau_e^{-1} \quad (29)$$

2.5 Pulzní sekvence pro studium dynamiky makromolekul

Při měření heteronukleárně korelovaných spekter proteinů je častým problémem nízká citlivost jader dusíku (gyromagnetický poměr γ_N jádra dusíku je $-4,33886 \text{ MHz T}^{-1}$, vodíku $\gamma_H = 42,57748 \text{ MHz T}^{-1}$) Řešením tohoto problému je použití sekvencí s přenosem magnetizace. Pro studium velkých makromolekul, jejichž magnetizace rychle relaxuje je vhodné přenášet přenos přes jednokvantové koherence, využíváme tedy sekvenci *HSQC* (Heteronuclear single quantum coherence), která v podstatě sestává ze dvou *INEPT* (Insensitive Nuclei Enhanced by Polarization Transfer) sekvencí. Protože naším cílem je studovat relaxační chování jader dusíku, je ideální použít dvojnásobného přenosu magnetizace tam a zpět. Excitujeme nejprve jádra vodíku, poté přeneseme magnetizaci na jádra dusíku, změříme relaxační experiment a poté přeneseme magnetizaci zpět na jádra vodíku, kde ji také detekujeme. Tato metoda se nazývá inverzní detekce. Teoretické navýšení citlivosti experimentu odpovídá poměru gama faktorů (~ 10). Schéma sekvence je uvedeno v Obr. 2. Legenda ke schématu – viz. Obr. 3. Pulzní sekvence pro studium relaxačních dob T_1 a T_2 se liší pouze relaxačními bloky (viz. Obr. 4 a 5).

2.5.1 Podélná relaxace

Relaxační doba T_1 se standardně měří metodou "inversion recovery", při které se nejprve rovnovážná magnetizace směřující do osy z sklopí 180° pulzem do směru $-z$ a poté jedním měřícím 90° pulzem do transverzální roviny,

Obr. 3: *Legenda*

kde je detekována. V našich měřeních používáme modifikovanou sekvenci ve které používáme dvou průchodů sekvencí. Při prvním průchodu začíná magnetizace na plné intenzitě ve směru $-z$, při druhém pak ve směru $+z$. Po odečtení (druhý - první) pozorujeme exponenciální pokles intenzity signálů, který začíná z dvojnásobné maximální intenzity. Změříme-li sadu spekter s různými směšovacími časy můžeme pak určit relaxační dobu T_1 fitem vztahu:

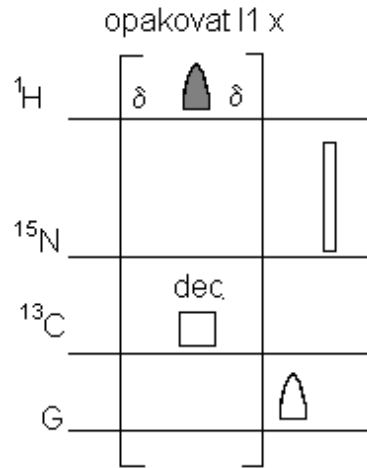
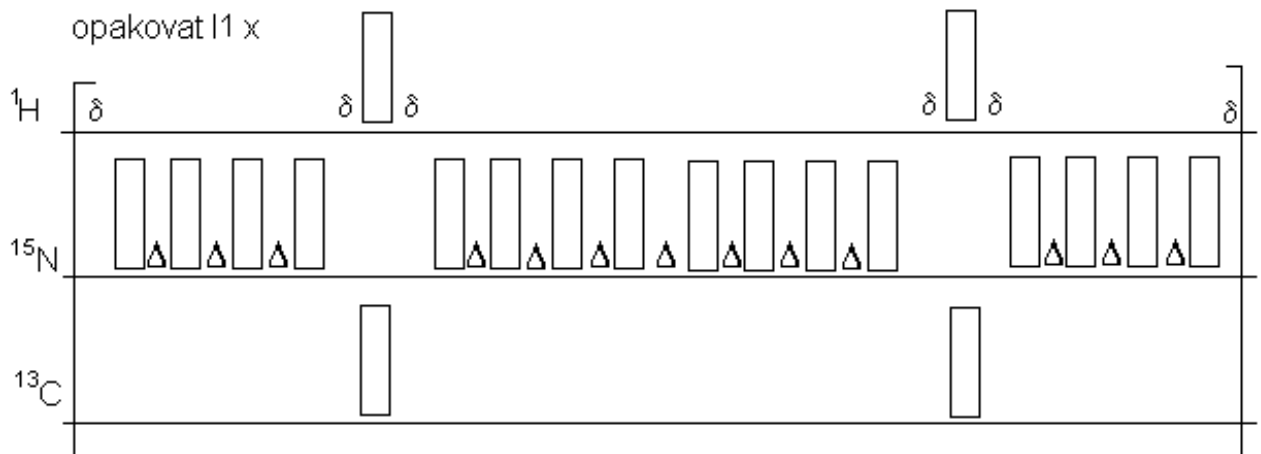
$$I(t) = 2 I(0) \exp\left(-\frac{t}{T_1}\right), \quad (30)$$

kde $I(t)$ je intenzita signálu v čase t a $I(0)$ je intenzita signálu v prvním spektru. Schéma použité sekvence je uvedeno na Obr. 4

Na začátku probíhá přenos magnetizace pomocí sekvence *INEPT* (viz Obr. 2). Následuje vlastní měření relaxace, směšovací čas (celková doba trvání relaxačního bloku) se prodlužuje pomocí počtu opakování smyčky (parametr $l1$).

2.5.2 Příčná relaxace

Příčná relaxační doba T_2 se měří pomocí *spinového echa*. Mějme v čase $t = 0$ magnetizaci ve směru osy x . Necháme-li magnetizaci volně precedovat, dojde k jejímu rozfázování a tudíž k poklesu měřitelné magnetizace. Necháme-li však magnetizaci volně precedovat pouze po dobu Δ a aplikujeme-li poté 180° pulz, dojde po opětovném uplynutí doby Δ ke sfázování magnetizace a nárůstu intenzity signálu. Intenzita tohoto signálu závisí na době Δ . Změřením série spekter

Obr. 4: Relaxační blok pro T_1 . $\delta = 2 \text{ ms}$ Obr. 5: Relaxační blok pro T_2 . $\delta = 0.45 \text{ ms}$, $\Delta = 2 * \delta$. Převzato podle [1].

2.6 Mason-Pfizerův opičí virus

Mason-Pfizerův opičí virus (M-PMV) je retrovirus patřící do skupiny lentivirů. Retroviry se vyznačují tím, že nesou v kapsidě jednořetězcovou RNA, která je zdrojem jejich genetické informace. Mason-Pfizerův virus byl poprvé izolován z nádoru samice makaka, nejeví však překvapivě známky onkogenity, infikování makakové trpí silným selháním imunitního systému [4].

2.6.1 Genom retrovirů

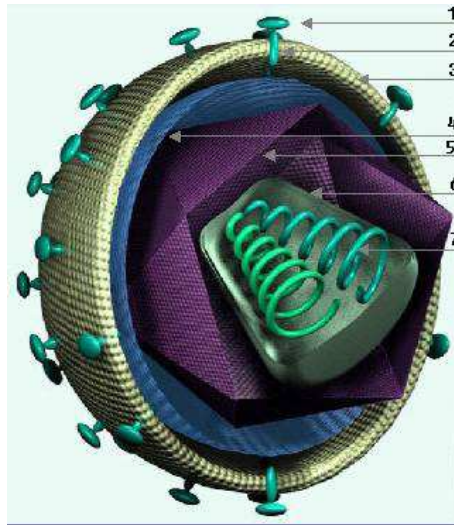
Genom retrovirů se obecně skládá ze tří částí nazývaných *Gag*, *Env* a *Pol*. Část *Gag* kóduje polyprotein o velikosti 78 kDa, který je pak štěpen virovou proteázou za vzniku šesti proteinů (p10, pp16–18, p12, p27 a p4). Protein p10 je podle analogické pozice v ostatních retrovirových genomech a podle toho, že je myristoylován, nazván matrixový protein [5].

2.6.2 Morfologie retroviru

Obal retroviru je tvořen fosfolipidovou membránou, která pochází z hostitelské buňky. Jsou v ní zakotveny dva druhy transmembránových proteinů (povrchový a transmembránový glykoprotein). Uvnitř virové částice se dále vyskytuje matrixový protein, který chrání obsah jádra, a kapsidový protein, který tvoří jádro virální kapsidy. Uvnitř kapsidy se nachází nukleokapsidový protein v komplexu s RNA a virálními enzymy (např. reverzní transkriptázou a virovou integrázou), viz. Obr. 7, [6].

2.6.3 Životní cyklus retroviru

Transmembránové proteiny na povrchu viru jsou schopny specificky interagovat s receptory na povrchu hostitelské buňky. Obsah kapsidy je pomocí dosud přesně neznámých mechanismů transportován do cytoplazmy. RNA genom je pak pomocí *reverzní transkriptázy* přepsán do formy DNA a integrován sledem několika reakcí katalyzovaných *virovou integrázou* do genomu hostitelské



Obr. 7: *Morfologie retrovirové částice. 1 – povrchový glykoprotein, 2 – transmembránový glykoprotein, 3 – obálka viru, 4 – matrixový protein, 5 – kapsidový protein, 6 – nukleokapsidový protein, 7 – genom a enzymy uvnitř kapsidy.*

buňky. Genom viru se tak stává plnohodnotnou součástí genetické informace hostitelské buňky. K transkripci dochází pomocí standardních buněčných mechanismů. Translace polyproteinu kódovaného částí *Gag* probíhá na ribozomech volně umístěných v cytoplazmě. Nasyntetizované části virové kapsidy se pak skládají podle typu retroviru buď na membráně hostitelské buňky (typ C), nebo již v cytoplazmě (typ D). M-PMV ve své přirozené formě patří k typu D.

2.7 Matrixový protein

Matrixový protein (MA) se nachází těsně pod virovou obálkou, k níž se může pevně vázat (viz. dále). Role matrixového proteinu při formování virové kapsidy je trojí (viz. [5]):

- správné sbalení proteinů kódovaných genem *Gag*
- transport zformované kapsidy k plazmatické membráně

- asociace kapsidy s membránou a protržení plazmatické membrány během pučení nové virové částice

MA je posttranslačně upravován přidáním kyseliny myristové k N-konci. Právě myristoylace je jeden z klíčových parametrů ovlivňujících průběh životního cyklu. Odstranění myristoylové skupiny z N konce má u M-PMV velmi závažný důsledek: dochází sice ke správnému sbalení virových kapsid v cytoplazmě, tyto jsou však neschopny správného transportu k buněčné membráně. Kapsidy se kumulují v cytoplazmě a nebyly pozorovány žádné viriony, které by opustily hostitelskou buňku.

2.7.1 Přírozená forma M-PMV MA

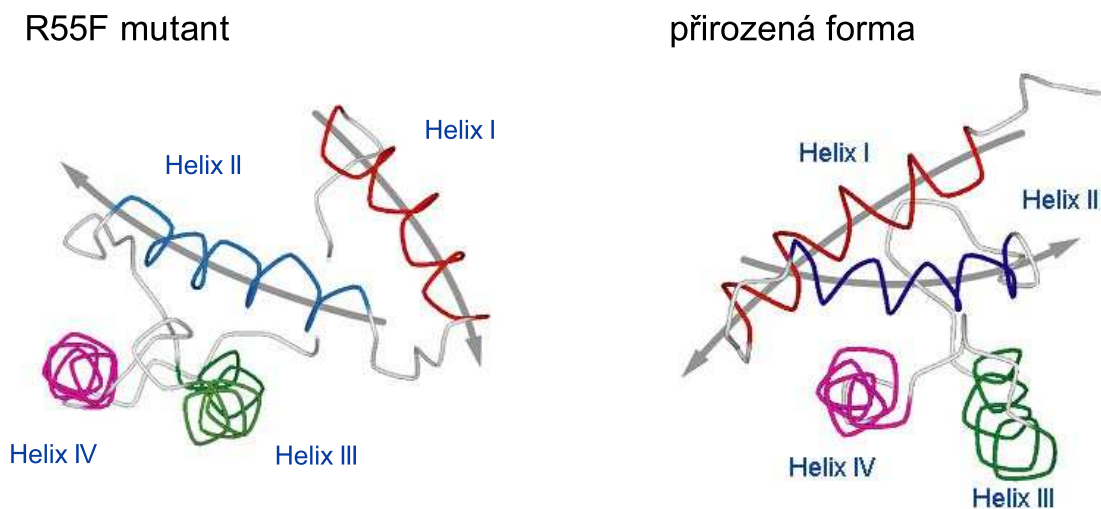
Struktura přírozené formy M-PMV MA (wild type, WT) je helikální, jak bylo určeno pomocí NMR spektroskopie. První helix sahá od residua 6 ke 23, druhý 29–42, třetí od 53–69 a čtvrtý od 77–94. V oblasti 47–51 se vyskytuje částečně uspořádaná smyčka [7]. Bohužel struktura publikovaná v PDB datábázi autory článku [7] neumožňuje podrobné srovnání struktur přírozeného a mutovaného proteinu. V databázi uložený soubor není standartní strukturou proteinu neboť obsahuje pouze informace o polohách atomů C_{α} . Jako součást širšího projektu bude proto vyřešena i struktura WT. Do odevzdání této diplomové práce nebude však tato struktura k dispozici. Všechna srovnání se tedy odkazují k jediné doposud publikované neúplné struktuře M-PMV MA [7].

Nepodařilo se nám nalézt publikaci pojednávající o dynamice retrovirového matrixového proteinu. Tato diplomová práce je zřejmě prvním počinem v této oblasti.

2.7.2 R55F Mutant M-PMV

Bylo prokázáno, že jediná substituce, na pozici 55 matrixového proteinu, v podobě výměny argininu za fenylalanin vede ke změně typu skládání kapsidy z typu C na typ D, Stejného efektu lze dosáhnout i výměnou za tryptofan [9].

Struktura R55F mutantu nebyla dosud publikována, byla však vyřešena ing. V. Veverkou, PhD [8]. v rámci projektu jehož součástí je i tato diplomová práce. Na první pohled lze z Obr. 8 usoudit na dramatické změny ve struktuře mutantu R55F. Vzájemná orientace helixů I a II vůči zbytku molekuly je opačná. Prostorově lépe rozlišený je Obr. 17.



Obr. 8: Porovnání struktur WT [7] a R55F

Rhee a Hunter provedli další studie, které podrobněji mapovaly vliv bodových mutací na funkci matrixového proteinu [5]. Dalšími zajímavými mutacemi jsou: valin 18 za alanin (vznikají kapsidy neschopné transportu k membráně) a náhrada threoninů 41 a 78 za isoleuciny (tvorba virionů neschopných pučení).

V souvislosti s lokalizací mutace R55F existuje představa, že v úseku mezi residuy 43–60 se nachází signální sekvence pro transport předběžně složených proteinů do cytoplasmy (cytoplasmic target-retention signal, CTRS). Změna morfologického typu z D na C by tedy mohla být způsobena mutací v části proteinu, která je rozpoznávána buněčným transportním mechanismem. Vysoce homologní sekvence byla nalezena i u viru způsobujícího u myši nádor

prsu (mouse mammary tumor virus, MMTV), jehož kapsidy se podobně jako M-PMV formují v cytoplazmě hostitelské buňky [10].

2.7.3 Srovnání s virem HIV

Podstatným rozdílem mezi morfologickými typy C a D je místo formování virové kapsidy a následně místo, ve kterém dojde k pučení nového virionu. Virus HIV patří k morfologickému typu C, protože u něj nelze navzájem rozlišit fáze formování kapsidy a pučení, k oběma fázím dochází na membráně hostitelské buňky. Tento fakt znesnadňuje pochopení celého procesu.

Naproti tomu M-PMV patří k typu D, formování kapsidy se odehrává odděleně v cytoplazmě hostitelské buňky. Kapsidy jsou pak transportovány k membráně, kde dochází k asociaci s membránou a pučení nové částice. Separace těchto fází u typu D z něj činí vhodný model pro studium a pochopení procesů odehrávajících se v pozdní fázi retrovirového životního cyklu.

Struktura matrixového proteinu (HIV-1 MA) byla vyřešena pomocí NMR spektroskopie [11, 12] i rentgenové krystalografie [13]. V krystalu existuje HIV-1 MA jako trimer. Přírozená forma HIV-1 MA je myristoylována, myristoylová skupina může být buď ukryta v kavitě, nebo exponována do okolního prostředí. Některé výsledky ukazují, že v roztoku existují v rovnováze monomer a trimer, přičemž v případě monomeru je myristoylová skupina ukryta a v trimerní exponovaná [14]. Tento výsledek podporuje představu, že trimer HIV-1 MA je základní stavební jednotkou obálky retrovirové kapsidy a že myristoylová skupina exponovaná do okolního prostředí umožňuje pevnou asociaci matrixového proteinu s membránou hostitelské buňky. Poté, co je polyprotein *Gag* rozštěpen retrovirovou proteázou dojde u ukrytí myristoylové skupiny do kavity matrixového proteinu. Je známo, že proces zanoření nevyžaduje konformační změny HIV-1 MA [7, 14].

Myristoylace hraje i u viru HIV a ostatních virech morfologického typu C důležitou roli i z hlediska průběhu životního cyklu. Odstranění myristoylové

skupiny z N konce proteinu má za následek produkci špatně sbalených kapsid s poškozenou schopností vázat se k membráně.

3 Experimentální část

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Vzorky proteinu

Vzhledem k zajímavému výsledku pánů Sunga a Rhee [9] byl připraven jednou mutovaný vzorek matrixového proteinu M-PMV, ve kterém byla aminokyselina arginin 55 nahrazena fenylalaninem (dále jen R55F). Arginin je záporně nabitá aminokyselina, její molekulární hmotnost je $177,2 \text{ g mol}^{-1}$, Fenylalanin je nenabitý, jeho hmotnost činí $165,2 \text{ g mol}^{-1}$. Přiřazení a struktura R55F byla již hotova z předchozí části projektu, pro studium relaxací byl tedy připraven vzorek značený pouze dusíkem ^{15}N .

Pro srovnání a z důvodů uvedených v sekci 2.7 byl připraven vzorek přirozené formy matrixového proteinu M-PMV (WT). Protože relaxační experimenty byly z časových důvodů provedeny před přiřazením rezonancí a určením struktury, měřili jsme relaxace na vzorku značeném ^{15}N i ^{13}C . Dvojitě značený vzorek je nutný pro přiřazovací experimenty, pro studium relaxací amidických dusíků v kostře proteinu je však komplikací, bylo proto nutné mírně modifikovat použité pulzní sekvence přidáním dekaplovacích uhlíkových pulzů. Schémata těchto sekvencí jsou uvedeny v Sekci 2.5

Oba vzorky postrádaly myristoylovou skupinu na N konci. Role post-translační myristoylace byla podrobněji popsána v sekci 2.7. Důležité je, že odstranění myristoylové skupiny neovlivňuje strukturu ani funkci matrixového proteinu při formování kapsidy.

Oba vzorky byly připraveny metodami běžnými v molekulární biologii. Genom polyproteinu *Gag* byl vnesen do komerčně dostupného vektoru pGEMEX a následně exprimován v buňkách *E.coli*. K vlastnímu genomu byl přidán úsek kódující šest histidinů (tzv. histidinová kotva), který je pak použit při metaloafinitní chromatografii při čištění fúzního proteinu. Vlastní MA byl pak získán z fúzního proteinu specifickým štěpením M-PMV proteázou. Pro-

tein byl dále čištěn a zakoncentrován na výslednou koncentraci asi 1 mM, která je dostatečná pro NMR měření. Příprava vzorku byla provedena J. Lipovem na oddělení Biochemie a mikrobiologie Vysoké školy chemicko-technologické v Praze ve spolupráci s Ústavem organické chemie a biochemie Akademie věd v Praze.

Oba proteiny mají shodnou hmotnost 10 kDa.

Pro měření byly použity speciální kyvety firmy *Shigemi*, průměr 5 mm, objem vzorku 300 μ l.

3.1.2 Parametry sekvencí

Spektra byla snímána na spektrometru Avance 500 firmy Bruker se třemi radiofrekvenčními kanály. Pro měření proteinových vzorků byla použita sonda TBI, s možností ozařovat ^1H , ^{15}N a ^{13}C optimalizovaná pro detekci ^1H . Pracovní frekvence spektrometru byla 500,132 MHz pro jádra ^1H , 125,765 MHz pro ^{13}C a 50,684 MHz pro ^{15}N . Experimenty byly měřeny při teplotě 298 K. Relaxační prodleva mezi jednotlivými průchody byla 0,8 s pro vzorek R55f a 1.5 s pro WT.

T₁ R55F

- vodíkový 90° pulz 9,8 μ s; útlum 6 dB
- dusíkový 90° pulz 17,6 μ s; útlum -2 dB
- tvarovaný selektivní vodíkový pulz 1,5 ms, útlum 28 dB, gaussovský tvar
- “flipback” na magnetizaci vody 5,4 ms, útlum 42 dB, tvar iburp
- gradientní pulz 0,8 ms, útlum 18 dB
- spektrální šířka 7002,801 Hz (F2), 1520 Hz (F1)
- délka akvizice 0,1462772 s
- počet scanů 64
- digitalizace 2048 bodů (F2), 200 bodů (F1)
- doba d 2,74725 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91$ Hz

- doba delta 1,108 ms
- doba δ 2 ms
- byly použity tyto směšovací časy: 0.0121 s, 0.0231 s, 0.0451 s, 0.0891 s, 0.1771 s, 0.3531 s, 0.7051 s a 1.4091 s.
- délka měření série 8 spekter s proměnným l_1 byla asi 2 dny 16 hodin

T₂ R55F

- vodíkový 90° pulz 9,8 μ s; útlum 6 dB
- dusíkový 90° pulz 17,6 μ s; útlum -2 dB
- “flipback” na magnetizaci vody 5,4 ms, útlum 42 dB, tvar iburp
- gradientní pulz 0,8 ms, útlum 18 dB
- spektrální šířka 7002,801 Hz (F2), 1520 Hz (F1)
- délka akvizice 0,1462772 s
- počet scanů 64
- digitalizace 2048 bodů (F2), 200 bodů (F1)
- doba d 2,74725 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91$ Hz
- doba delta 1,108 ms
- doba δ 450 μ s, $\Delta = 2 * \delta$
- byly použity tyto směšovací časy: 0.0144 s, 0.0288 s, 0.0577 s, 0.1152 s, 0.2304 s, 0.4608 s, 0.9216 s.
- délka měření série 7 spekter s proměnným l_1 byla asi 2 dny 5 hodin

NOE R55F

- vodíkový 90° pulz 9,8 μ s; útlum 6 dB
- dusíkový 90° pulz 17,6 μ s; útlum -2 dB
- tvarovaný selektivní vodíkový pulz 1,5 ms, útlum 28 dB, gaussovský tvar
- “flipback” na magnetizaci vody 5,4 ms, útlum 42 dB, tvar iburp
- gradientní pulz 0,8 ms, útlum 18 dB
- spektrální šířka 7002,801 Hz (F2), 1520 Hz (F1)

- délka akvizice 0,1462772 s
- počet scanů 80
- digitalizace 2048 bodů (F2), 200 bodů (F1)
- doba d 2,74725 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91$ Hz
- délka ozařovací periody cpd 8 s
- délka měření dvou spekter s NOE a bez NOE byla asi 2 dny

T₁ WT

- vodíkový 90° pulz 9 μ s; útlum 6 dB
- dusíkový 90° pulz 17 μ s; útlum -2 dB
- tvarovaný selektivní vodíkový pulz 0,6 ms, útlum 15,6 dB, gaussovský tvar
- “flipback” na magnetizaci vody 5,4 ms, útlum 42 dB, tvar iburp
- gradientní pulz 0,8 ms, útlum 16 dB
- 90° tvrdý uhlíkový pulz 46 μ s, útlum 0 dB
- spektrální šířka 7002,801 Hz (F2), 1520 Hz (F1)
- délka akvizice 0,0731636 s
- počet scanů 64
- digitalizace 1024 bodů (F2), 256 bodů (F1)
- doba d 2,74725 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91$ Hz
- doba delta 1,108 ms
- doba δ 2 ms
- byly použity tyto směšovací časy: 0.0121 s, 0.0231 s, 0.0451 s, 0.0891 s, 0.1771 s, 0.3531 s, 0.7051 s a 1.4091 s.
- délka měření série 8 spekter s proměnným l_1 byla asi 2 dny

T₂ WT

- vodíkový 90° pulz 9 μ s; útlum 6 dB
- dusíkový 90° pulz 17 μ s; útlum -2 dB

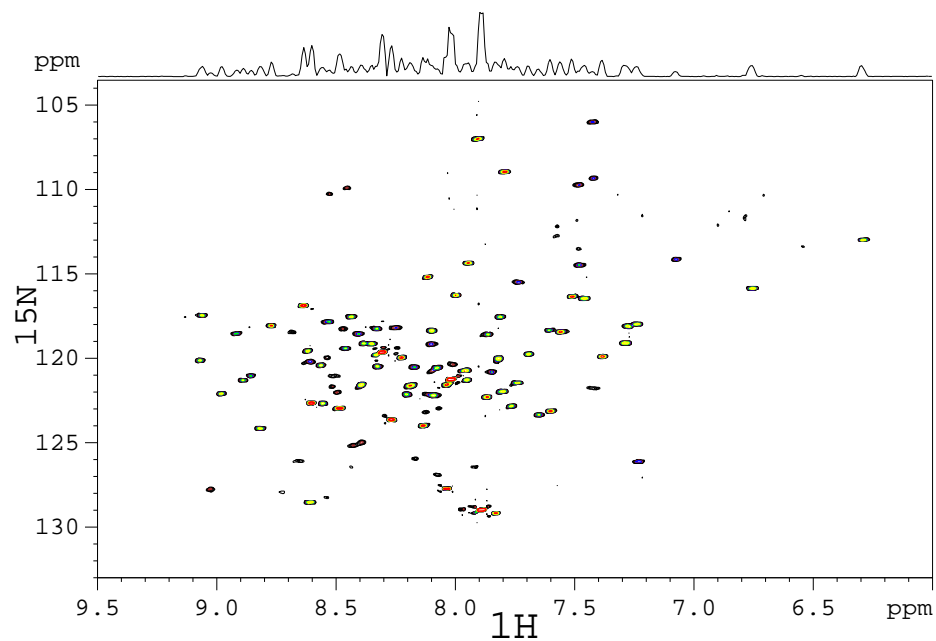
- tvarovaný selektivní vodíkový pulz 0,6 ms, útlum 15,6 dB, gaussovský tvar
- “flipback” na magnetizaci vody 2,7 ms, útlum 36 dB, tvar iburp
- gradientní pulz 0,8 ms, útlum 16 dB
- 90° tvrdý uhlíkový pulz 23 μ s, útlum 0 dB
- spektrální šířka 7002,801 Hz (F2), 1520 Hz (F1)
- délka akvizice 0,0731636 s
- počet scanů 64
- digitalizace 2048 bodů (F2), 200 bodů (F1)
- doba d 2,74725 ms, velikost odpovídající interakční konstanty $J_{NH} = 91$ Hz
- doba delta 1,108 ms
- doba δ 450 μ s, $\Delta = 2 * \delta$
- byly použity tyto směšovací časy: 0.014442 s, 0.028885 s, 0.043327 s, 0.086654 s, 0.115569 s, 0.173309 s, 0.288848 s, 0.462157 s.
- délka měření série série 8 spekter s proměnným t_1 byla asi 1 den 21 hodin

3.1.3 Zpracování spekter

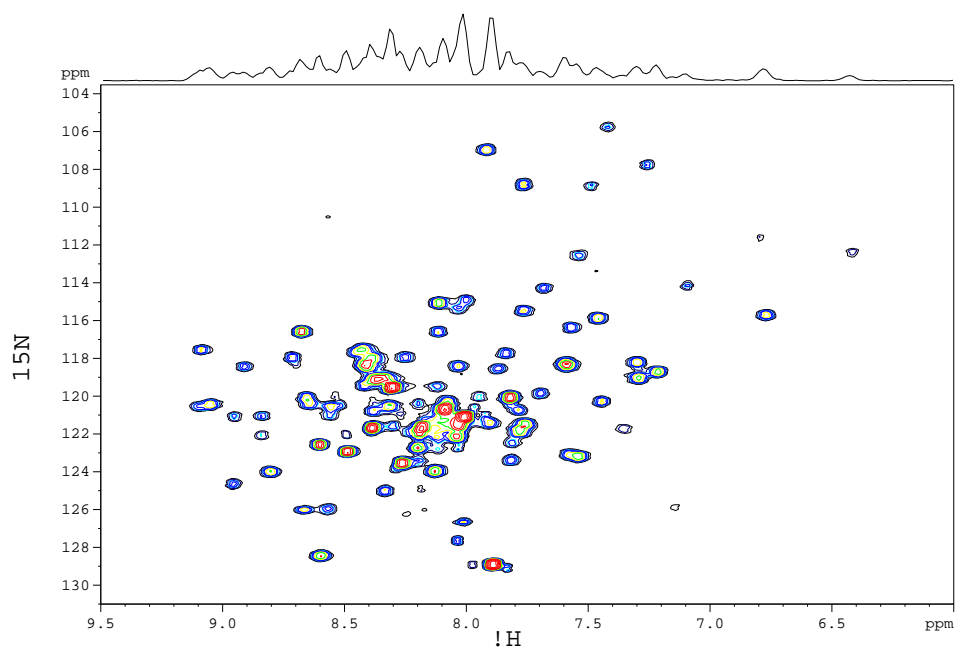
Spektra byla ztransformována Fourierovou transformací v obou doménách programem NMRPipe [15]. Apodizace: cosine-bell, doplnění nulami: počet bodů byl doplněn na dvojnásobek, poté oříznut na mocninu 2. Korekce baseline: polynom 4 řádu, byla použita lineární predikce v obou doménách. Spektra byla manuálně zřazována. Pro integraci spekter byl použit program NMRview [16], který umožňuje volbu integrační oblasti ve tvaru elipsy.

3.1.4 Určení relaxačních dob a parametrů Lipari-Szabóova modelu

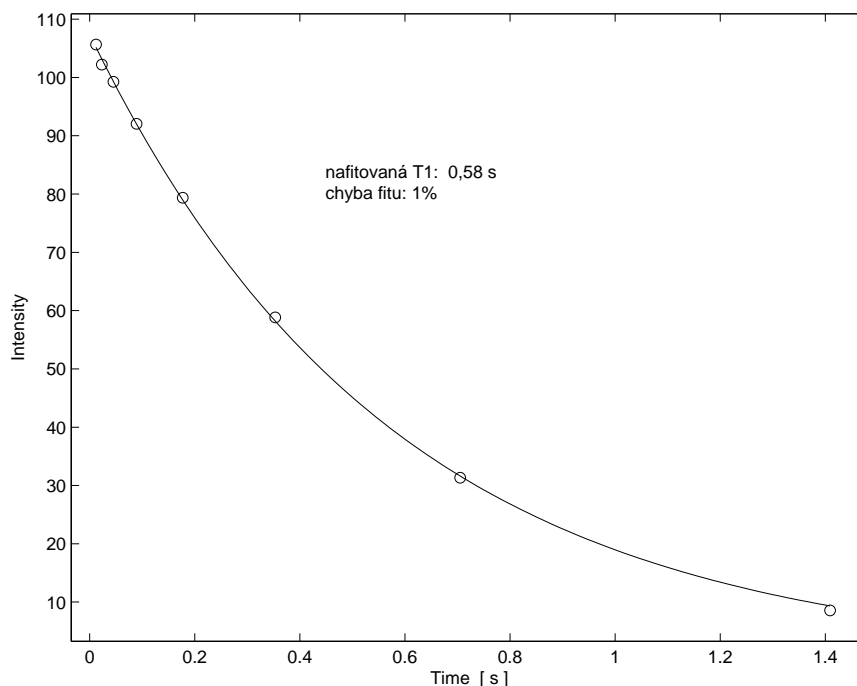
Relaxační doby byly určeny pomocí fitovací rutiny v prostředí MATLAB (autor Jan Lang) fitem vztahu (30). Chyby relaxačních dob byly určeny Monte-Carlo simulacemi. Ke každé exponenciále byla vygenerováno 20 nových sad dat jejichž body jsou od experimentálních vzdáleny nejvýše o směrodatnou odchylku. Z nich byl pak spočten průměr a jeho odchylka. Ukázka fitu relaxační doby T_1



Obr. 9: Ukázka H-N korelace, spektrum vzorku R55F, měření T_1 , nejkratší směšovací čas.



Obr. 10: Ukázka H-N korelace, spektrum vzorku WT, měření T_1 , nejkratší směšovací čas.



Obr. 11: Ukázka fitu relaxační doby T_1 , vzorek R55F, residuum 23.

je uvedena v Obr.(11). Chyby fitů vycházejí mírně lepší než skutečné chyby určení relaxačních dob dané systematickými chybami.

Parametry Lipari-Szabóova modelu byly určeny programem (autor Zdeněk Tošner) v prostředí MATLAB. Vstupem programu jsou relaxační doby T_1 , T_2 , NOE navýšení. Pro každé residuum máme tedy 3 experimentální parametry. Dále zadáváme počet a velikost magnetických polí, ve kterých byla provedena měření a počet vodíků vázaných k danému dusíku. Program minimalizuje funkci danou vztahem (28), přičemž hodnotu spektrální hustoty korelační funkce spočte pomocí rovnic (25,26).

Vzorek WT je dvojitě značený. Pro jeho fitování bylo proto nutné doplnit rovnice pro relaxační časy (25),(26) o člen popisující relaxaci dusíku způsobenou dipól–dipólovou interakcí se dvěma sousedícími uhlíky. Velikost tohoto příspěvku činí přibližně 20 % velikosti příspěvku dipól–dipólové interakce N–H.

Pro výpočet byly použity tyto parametry:

- délka vazby N-H: 0,102 nm [17]
- velikost anizotropie chemického posuvu: 165 ppm [18]
- délka vazby C-N: 0,150 nm. [18]

Výstupem programu po úspěšném doběhnutí minimalizační procedury je:

- $2N+1$ parametrů: globální korelační čas τ_M , a pro každé residuum lokální korelační čas τ_e a zobecněný parametr uspořádanosti S^2
- pomocí nafitovaných parametrů zpětně spočtené hodnoty relaxačních rychlostí R_1 a R_2 a jejich porovnání s experimentálními hodnotami
- metodou Monte-Carlo spočtené chyby parametrů τ_M, τ_e a S^2 .

Kompletní výpočet parametrů vzorku R55F (jako počáteční nástřely byly zadány přednafitované hodnoty) trval i s výpočtem chyb (20 iterací) 16 hodin.

3.2 Výsledky a Diskuse

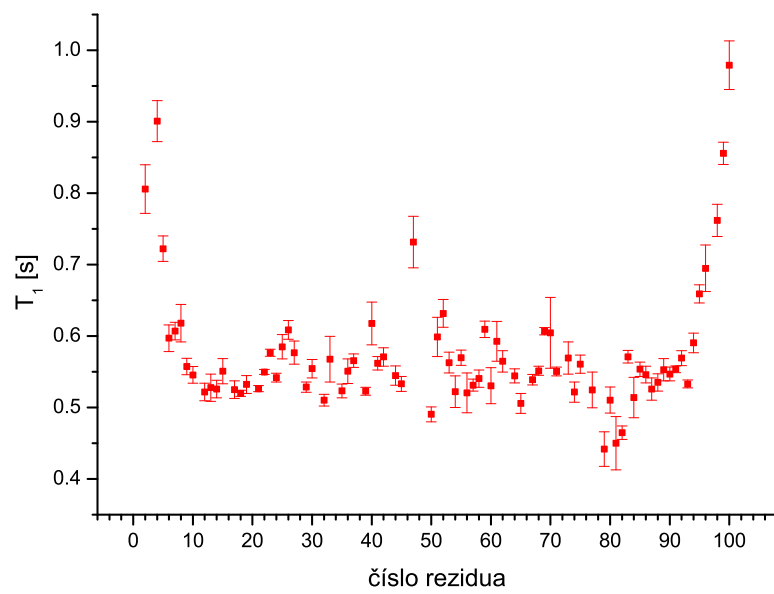
3.2.1 Vzorek R55F

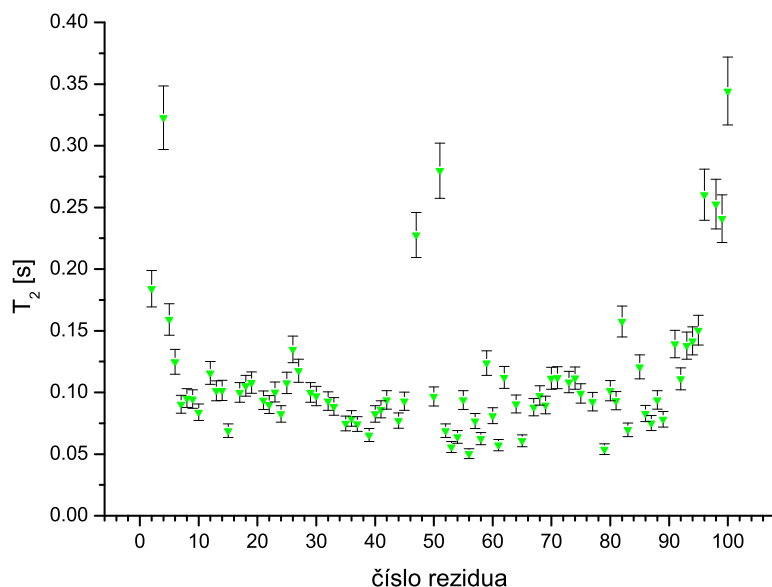
Na vzorku R55F byly změřeny doby T_1 a T_2 i NOE navýšení pro jádra amidických dusíků kostry proteinu. Schémata sekvencí jsou uvedena v sekci 2.5, detailní parametry pro jednotlivá měření pak v sekci 3.1.2. Získané hodnoty jsou spolu s chybami uvedeny v Obr. (12,13 a 15).

Hodnoty T_1 dosahují pro krajní residua hodnot až 0,9s. Střední část proteinu je relativně rigidní. Průměrná T_1 se zde pohybuje okolo 0,5 s. Chyby určení T_1 se pohybují mezi 5 až 10 %

Residuum 47 se vymyká uniformnímu chování zbytku střední části řetězce, jeho nafitovaná T_1 je 0,73 s. Srovnáním se sekundární strukturou bylo zjištěno (viz. Obr 14), že toto residuum se nalézá v oblasti smyčky mezi helixy II a III (viz.2.7.1).

Hodnoty relaxačních dob T_2 (Obr. 13) vykazují podobné chování jako T_1 . Na koncích molekuly dosahují hodnoty T_2 až 0,32 s. Srovnáním s Obr. 1 lze

Obr. 12: Výsledné T_1 pro vzorek R55F.

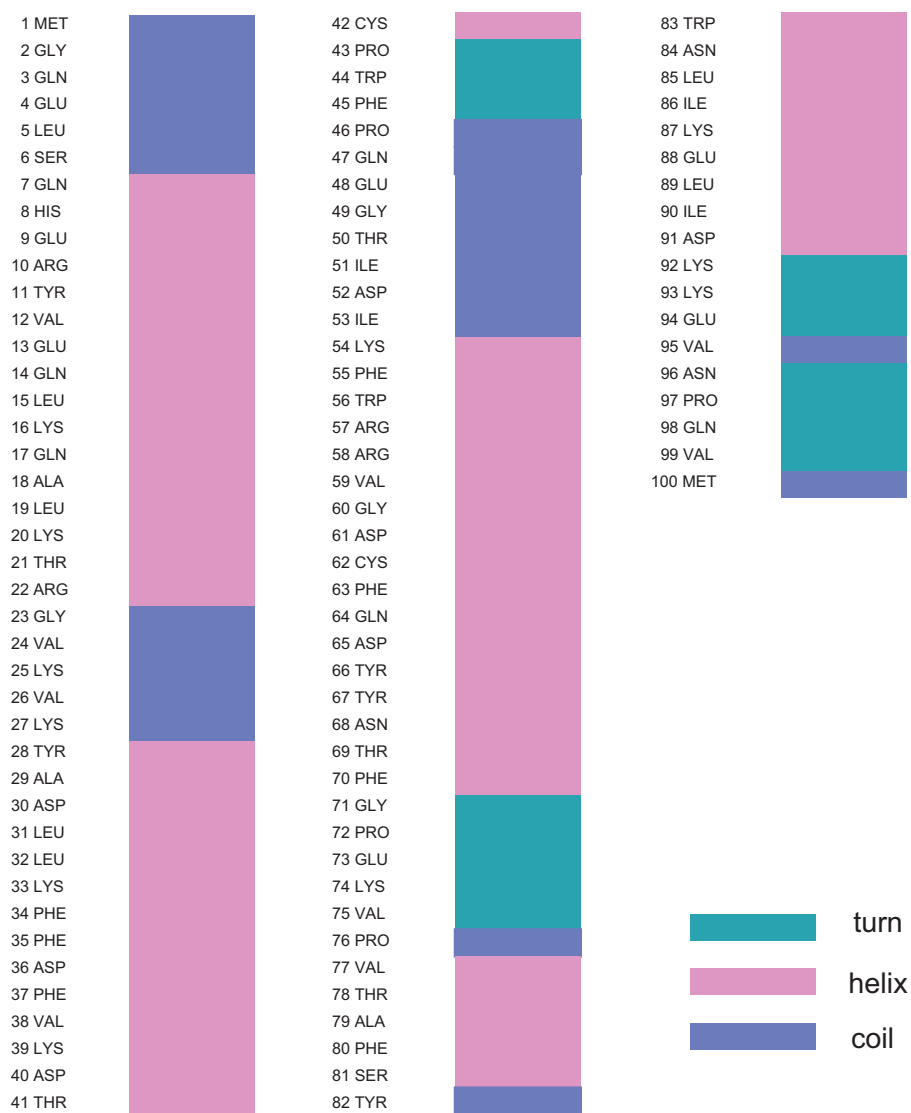


Obr. 13: Výsledné hodnoty příčné relaxační doby pro vzorek R55F.

zjistit, že se nalzáme mimo oblast extrémního zúžení. Střední část molekuly lze charakterizovat hodnotou T_2 0,1 s. Opět, podobně jako u T_1 , se oblasti smyčky mezi druhým a třetím helixem vyskytují dvě rezidua (47 a 51) se zvýšenou pohyblivostí. Jejich T_2 dosahují hodnot 0,23 s a 0,28 s.

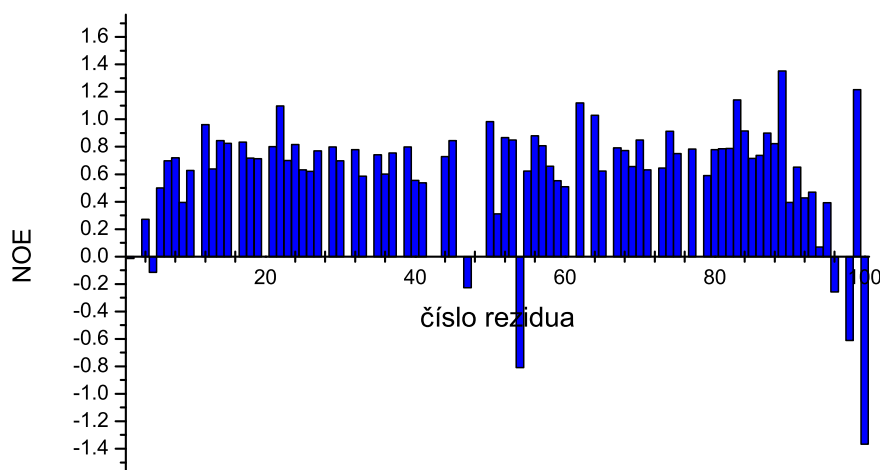
Pro relaxační doby T_1 u reziduí byly naměřeny (31, 36, 66, 78) extrémně nízké hodnoty. Tyto nebyly využity při výpočtech pohybových parametrů, protože se s největší pravděpodobností jedná o experimentální artefakt. Z porovnání se sekundární strukturou plyne, že uvedená rezidua se vyskytují uvnitř helikálních částí proteinu, ve kterých se pohyblivost jednotlivých reziduí nemůže příliš lišit.

Pro nevyžití residua 78 máme ještě jeden důvod, protože jeho T_1 byla extrémně nízká a ve spektrech T_2 se jeho krospektrum vůbec nevyskytuje. Ke konci měření mohlo dojít ke změně konformace vzorku vlivem endopeptidázové aktivity retrovirové proteázy. Celková doba měření vzorku R55F byla asi dva týdny



Obr. 14: Schéma sekundární struktury vzorku R55F [8].

a na konci měření již vzorek zcela změnil konformaci. Data z opakovaných měření prováděných v druhém týdnu tak nemohla být relevantně použita k vyhodnocení relaxačních dob.

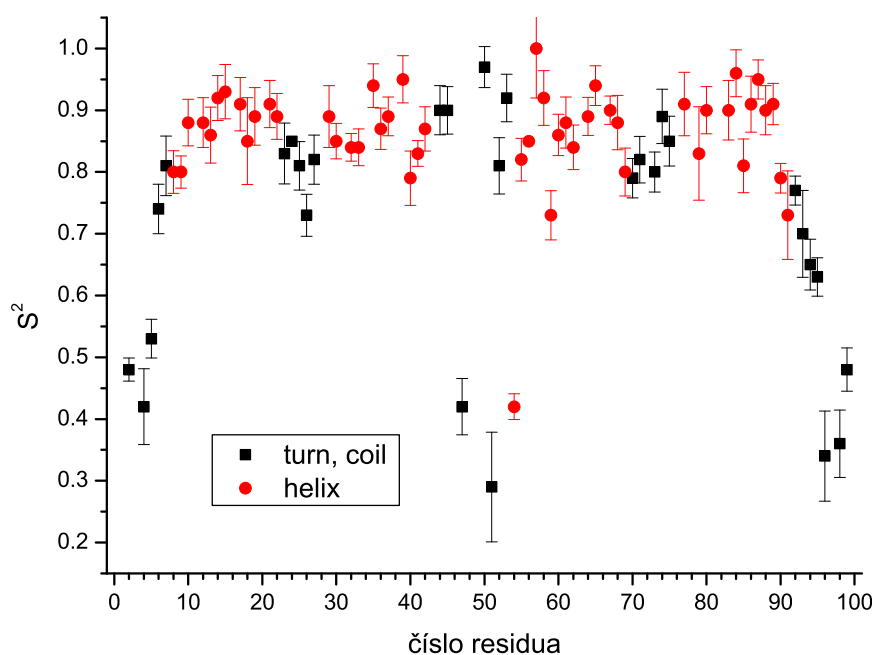


Obr. 15: Výsledné hodnoty NOE navýšení pro vzorek R55F.

Spektra, ze kterých byly získány hodnoty NOE navýšení, mají velmi špatný poměr signál–šum. Je to dáno způsobem měření, při kterém nelze využít metody *INEPT* k přenosu magnetizace z citlivých vodíků na dusíky, neboť nás právě zajímá kolik magnetizace přejde na dusíky vlivem dipól–dipólové interakce po zapnutí ozařování vodíků 1H . Z teorie plyne, že výsledná NOE pro jádra dusíku by měla ležet v intervalu $\langle -3, 93; 0, 783 \rangle$ [3]. Z hodnot uvedených v grafu (15) je patrné, že většina reziduí se se svými hodnotami pohybuje na horní hranici teoretického intervalu. Velikosti překročení teoreticky přípustných hodnot (zejména residua 22 a 89) dávají odhad chyby s jakou jsou NOE navýšení určena. Získané hodnoty mají tedy pouze kvalitativní význam. Pro fit Lipari–Szabóova modelu byly hodnoty NOE použity s čtvrtinovou váhou proti T_1 . Váha T_2 byla poloviční, protože chyby určení T_2 jsou přibližně dvojnásobné proti chybám T_1 .

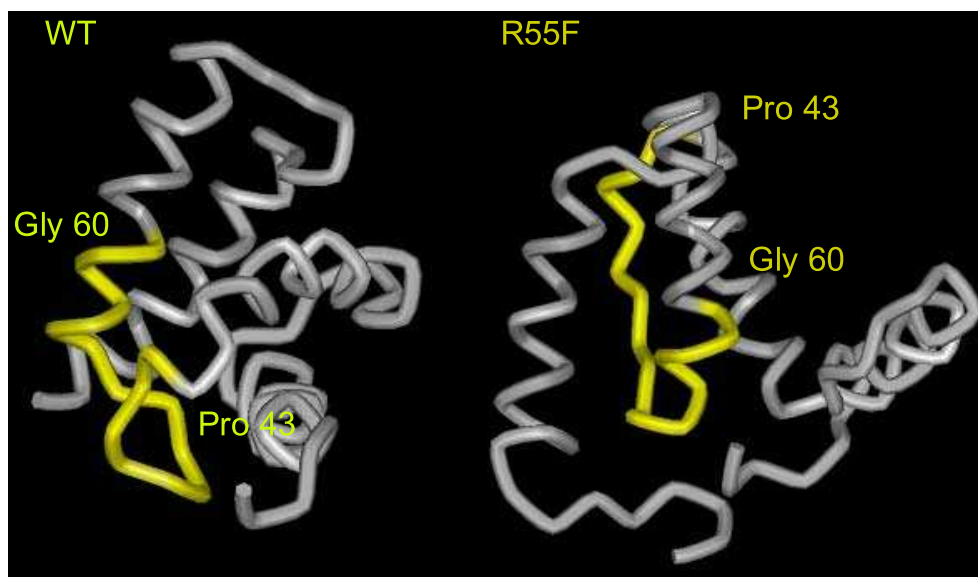
Hodnoty zobecněných parametrů uspořádání jsou uvedeny v Obr. (16). Okraje proteinu jsou poněkud flexibilnější, S^2 dosahují hodnot přibližně 0,4. Střední část molekuly je vysoce rigidní, $S^2 \sim 0,9$. To odpovídá stanovené terciální struktuře skládající se z vysoce uspořádaných α -helixů, které jsou spojeny méně uspořádanými smyčkami, (viz. Obr.8).

Zajímavá jsou tři residua (47, 51 a 54), která se vyskytují v těsné blízkosti mutace (55). V oblasti mezi residuy 43–53 se nalézá méně uspořádaná oblast



Obr. 16: Zobecněný parametr uspořádanosti Lipari-Szabóova modelu pro vzorek R55F

spojující helixy II a III. Změna konformace v této oblasti (viz. Obr. 17) molekuly je pravděpodobně příčinou zásadní odlišnosti struktur WT a R55F. V této oblasti se dále nachází předpokládaná signální sekvence (CTRS) pro změnu lokalizace skládání retrovirové kapsidy. Zvýšená pohyblivost residua 47 je tedy ve shodě s očekávaným chováním mutantu R55F.

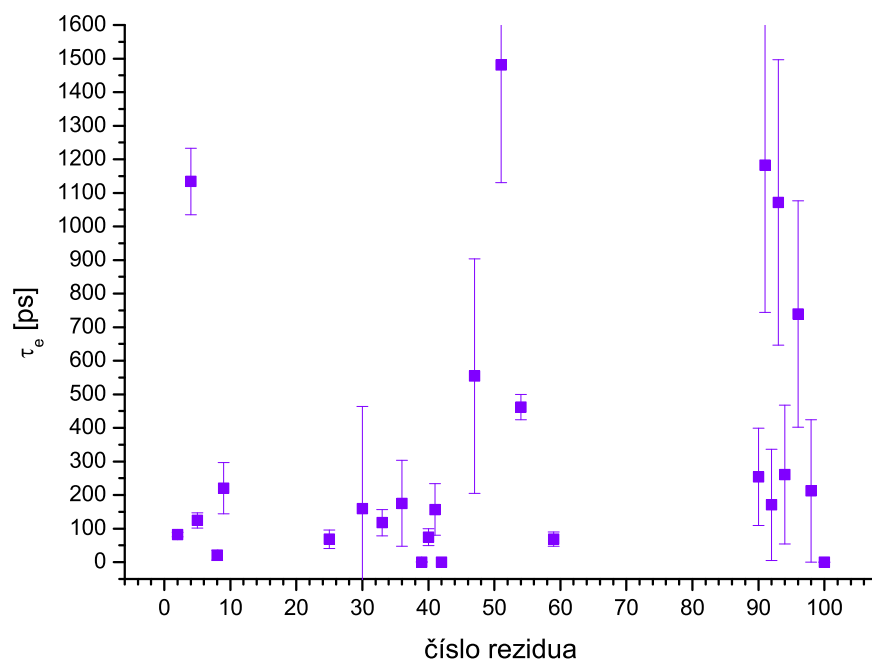


Obr. 17: Srovnání struktur R55F a WT

Značná pohyblivost okrajových residuů naznačuje, že protein se ve vzorku vyskytuje ve formě monomeru. Metodami NMR spektroskopie však nemůže být vyloučeno, že malá část z celkového počtu molekul proteinu se vyskytuje v oligomerní struktuře.

Globální korelační čas celé molekuly je 8,5 ns.

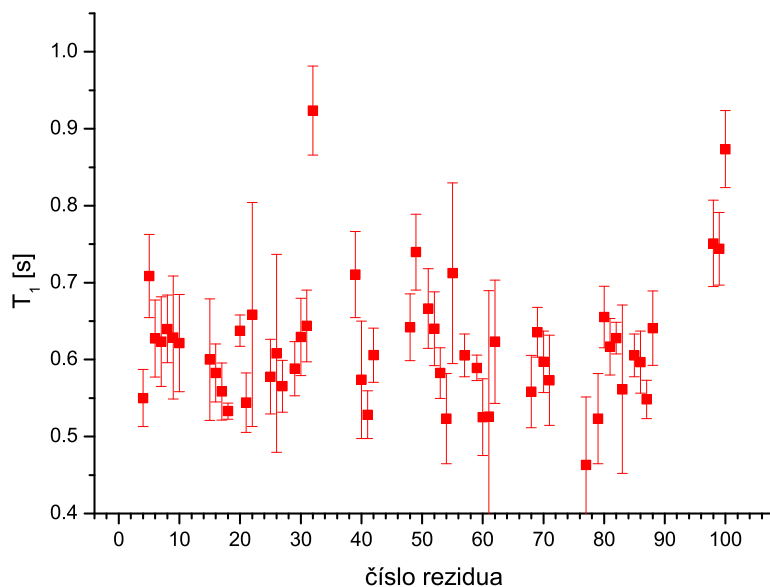
Lokální korelační časy uvedené v Obr.(18) mají velmi omezenou vypovídací hodnotu. Chyby určené z fitu jsou velké protože pro velká S^2 ($S^2 < 0.7$) je druhý člen Lipari-Szabóových spektrálních hustot pro $\tau_e \sim 100$ ps zanedbatelný. Vzhledem k malému počtu experimentálních parametrů používá pak fitovací procedura lokální korelační čas τ_e jako volný parametr k umělému snížení celkové chyby fitu volnou nereálných τ_e . Lipari-Szabóův není modelem ideálním. Lepší by bylo použít modely specifické pro daný typ pohybu (např. „wobbling in a cone“). Tyto modely však obsahují více parametrů a vyžadovaly by větší počet experimentálních údajů. Naměření podrobných relačních dat je však extrémně náročné na experimentální čas, kvalitu a koncentraci vzorku.



Obr. 18: Lokální korelační časy Lipari-Szabóova modelu pro rezidua s $S^2 < 0.7$.

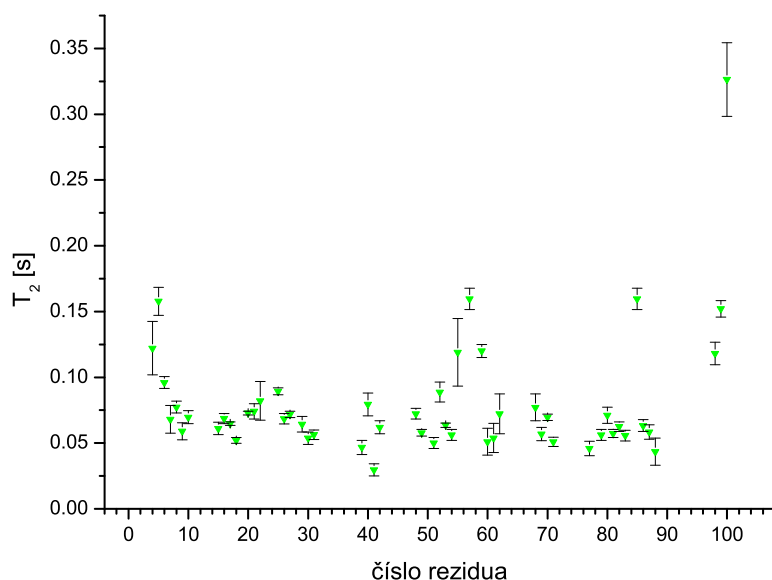
3.2.2 Vzorek WT

Pro vzorek WT byly změřeny pouze série spekter pro určení relaxačních dob T_1 a T_2 . Určení NOE navýšení bylo vynecháno pro obecně špatnou kvalitu naměřených dat a z toho plynoucí malou vypovídací hodnotu. Spektra vzorku WT mají horší kvalitu oproti spektrům R55F. Měření byla komplikována větším množstvím interakcí přítomných ve dvojitě značeném vzorku a také obtížnější optimalizací nastavení sekvence na délku například dusíkových pulzů. Větší šířka signálů znesnadňuje volbu vhodných integračních oblastí a u signálů, jejichž chemické posuny se navzájem jen málo liší nelze často provést odpovídající separaci, která by umožnila přesnější určení objemů a posléze i relaxačních dob. V období sepisování této diskuse nebylo známo přiřazení všech rezonancí, některé úseky nebyly přiřazeny s jistotou. Tato residua byla ze zobrazených dat i z diskuse vyjmuta. Celkem bylo přiřazeno 88 residuí, změřeno bylo 70 residuí a v grafech je vyneseno 54 z nich.



Obr. 19: Výsledné T_1 pro vzorek WT.

Změřené hodnoty relaxační doby T_1 jsou uvedeny v Obr. 19. Na konci molekuly se vyskytují flexibilnější residua, jejich T_1 dosahují hodnot 0.9 s. Ve střední části je průměrná hodnota T_1 asi 0.6 s.



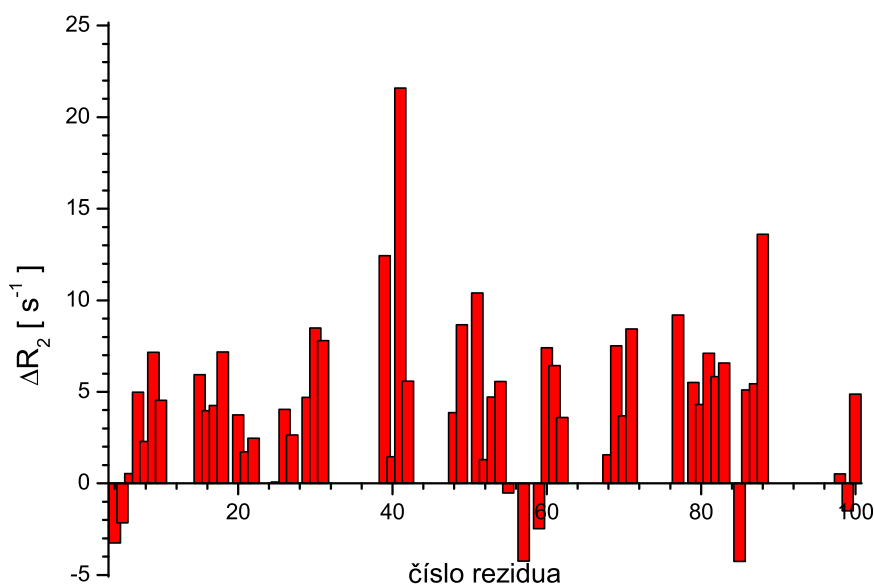
Obr. 20: Výsledné T_2 pro vzorek WT.

Relaxační doby T_2 jsou uvedeny v Obr.20. Na koncích molekuly je možno pozorovat pohyblivá residua s T_2 přibližně 0.3 s. Ve střední části pozorujeme T_2 asi 0.08 s.

Hodnoty pro residua 37 (T_1), 55, 57, 59 (vše T_2) byly porovnány se sekundární strukturou publikovanou v [7]. Residuum 37 je součástí α -helixu II, jeho pohyblivost se nemůže výrazně odlišovat od pohyblivosti okolních residuí. Residua 55, 57 a 59 se nalézají na začátku helixu III, je pravděpodobné, že jejich hodnoty jsou experimentální artefakty.

Při fitování parametrů Lipari-Szabóova modelu u vzorku WT jsme se setkali s několika obtížemi.

Experimentálně změřené časy T_2 jsou systematicky kratší, než doby spočtené zpětně z nafitovaných dat. To poukazuje na možnou přítomnost che-



Obr. 21: Rychlosti chemické výměny pro vzorek WT.

mické výměny, neboť v T_2 je obsažena informace o spektrálních hustotách korelační funkce na nulové frekvenci (viz.18). Byl proto proveden výpočet parametrů Lipari-Szabóova modelu pouze z experimentálně daných dob T_1 . Z nich byly spočteny časy T_2 odpovídající časům T_1 . V převrácených hodnotách relaxačních dob, které odpovídají relaxačním rychlostem lze napsat vztah:

$$R_2 = R_2^{fit} + \Delta R_2, \quad (31)$$

kde R_2 je experimentálně změřená hodnota, R_2^{fit} je hodnota spočtená pomocí experimentální R_1 . V Obr.21 znázorněné ΔR_2 odpovídají rozdílu mezi R_2 a R_2^{fit} . ΔR_2 by mohl být tzv. *výměnný člen* nesoucí informaci a rychlosti chemické výměny, kterou je dané residuum postiženo. Známa tvorba trimerů matrixového proteinu viru HIV podporuje tuto představu. Na druhou stranu příspěvek chemické výměny by měl být výraznější pro residua na koncích molekuly, která zprostředkovávají vazbu mezi jednotkami. Takto uniformní ΔR_2 též

může být způsobeno systematickou chybou způsobenou například nepřesností nebo nehomogenitou 180° pulzů v CPMG sekvenci použité pro měření T_2 .

Pozorovaná míra ΔR_2 u residua 42 se zdá být nad úrovní systematické chyby, toto residuum se nachází na počátku neuspořádané oblasti mezi residuy 42–54, která je hlavní příčinou strukturní odlišnosti proteinů R55F WT.

Vzhledem k tomu že pro vzorek WT postrádáme experimentálně určené hodnoty NOE navýšení, bylo hledání minima soustavy rovnic Lipari-Szabóova modelu poněkud problematické. Pro krátké časy přejde druhý člen v (28) na tvar $(1 - S^2)\tau$. Pokud první člen nefituje dostatečně dobře experimentálně změřenou hodnotu R_1 minimalizační procedura zvýší uměle váhu druhého členu použitím nereálné hodnoty τ_e . Celý fit je pak tlačěn k příliš nízkým hodnotám S^2 a vysokému globálnímu korelačnímu času τ_m . Kvůli nedostatku experimentálních dat bylo jedinou možností řešení tohoto problému zafixovat hodnoty τ_e pro některá residua (10–90) a snížit tak počet fitovaných parametrů.

Spočtené parametry jsou uvedeny na Obr. 22.

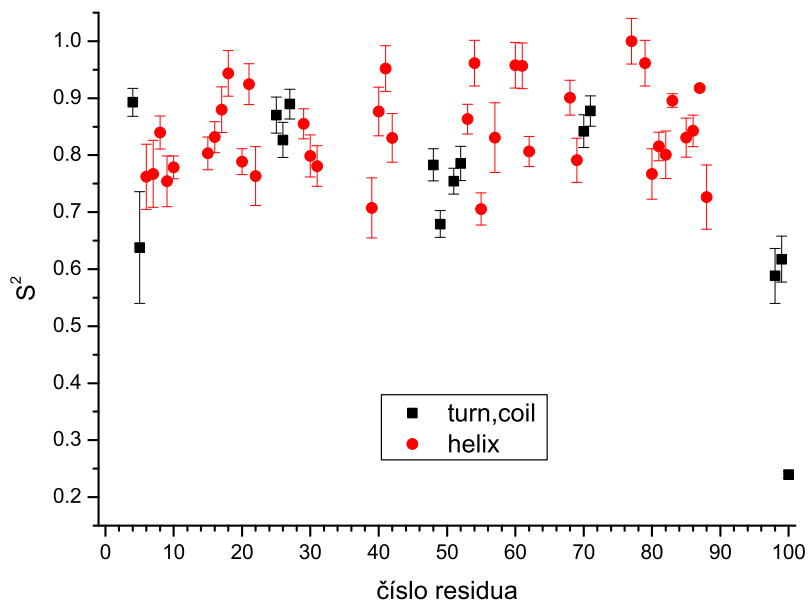
Hodnoty zobecněného parametru uspořádání ve střední části proteinu ukazují, že struktura je vysoce rigidní. Průměrný S^2 v této oblasti je zhruba 0,9. Kvalita dat je však výrazně horší oproti R55F a tak nelze vyvozovat žádné podrobnější závěry o pohyblivostech jednotlivých residuí.

Výsledná nafitovaná hodnota globálního korelačního času τ_m byla 9,0 ns.

Z dat naměřených doposud na vzorku WT nebylo možné provést podrobnější analýzu dynamického chování kostry proteinu. Z relaxačních parametrů byly použitelné v podstatě pouze relaxační doby T_1 . V dalším pokračování projektu budou tato měření opakována za účelem získání spekter s lepším poměrem signál–šum.

3.2.3 Srovnání vzorků WT a R55F

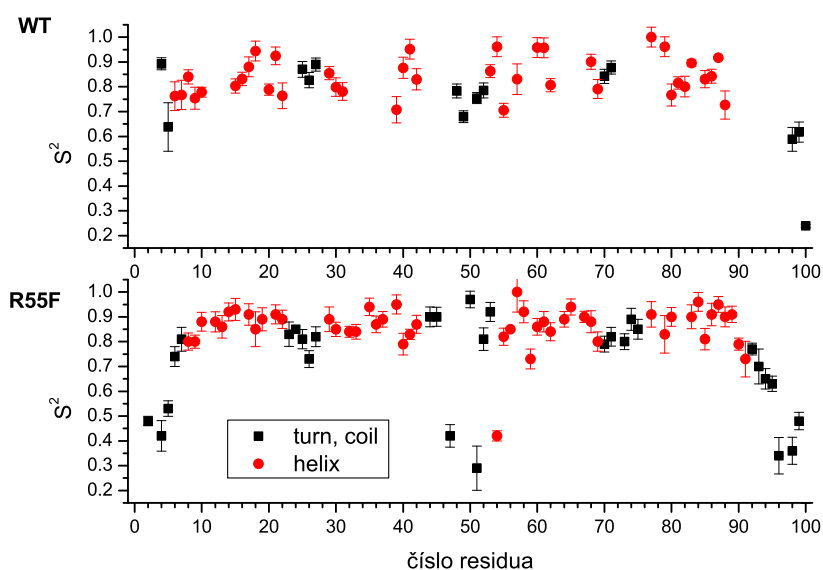
Hlavní relaxační parametry a spočtené zobecněné parametry uspořádání pro vzorky R55F a WT jsou porovnány v Tabulce 1. Zobecněné parametry uspořádání jsou ještě jednou přehledně vyneseny v Obr. (23).



Obr. 22: Zobecněný parametr uspořádání pro vzorek WT.

Tab. 1: Srovnání výsledků pro vzorky R55F a WT

vzorek	T_1 okraje	T_1 střed p.	T_2 okraje	T_2 střed p.	S^2 okraje	S^2 střed p.
R55F	0.9	0.5	0.32	0.1	0.4	0.8-0.9
WT	0.9	0.6	0.3	0.08	0.3	0.7-0.95



Obr. 23: Porovnání spočtených zobrazených parametrů uspořádání pro vzorky R55F a WT

Z uvedených parametrů je možné říci, že dynamické chování obou vzorků je velice podobné. Helikální části proteinů jsou rigidní. U vzorku R55F je zvýšená pohyblivost v oblasti CTRS, kde se zároveň nachází oblast mutace. Tato pohyblivější residua nebyla v nemutovaném WT pozorována.

Globální korelační časy vycházejí 8,5 ns pro R55F a 9,0 ns pro WT. Z Debeyovy teorie plyne, že globální korelační čas je úměrný třetí mocnině charakteristického rozměru molekuly. Z toho plyne, molekuly R55F a WT se ve velikosti prakticky neliší, což odpovídá očekávání.

4 Závěr

- Byly změřeny NMR relaxační parametry (^{15}N : T_1 , T_2 a NOE) dvou vzorků matrixového proteinu Mason-Pfizerova opičího viru: jednou mutovaný vzorek, ve kterém byl arginin na pozici 55 nahrazen fenylalaninem a přirozená nemutovaná forma. Ke stanovení dynamických parametrů byl použit Lipari-Szabóův přístup.
- T_1 vzorku R55F se na koncích molekuly jsou přibližně 0,9 s, střední část molekuly je poměrně uniformní, T_1 dosahují hodnot 0,5 s. T_2 jsou v rozmezí 0,3 s na konci a 0,1 s ve střední části. Zobecněné parametry uspořádání jsou na okrajích molekuly rovny 0,4, což odpovídá pohyblivých residuím, střed molekuly je rigidní S^2 mezi 0,8 a 0,9. Globální korelační čas molekuly je 8,5 ns. V oblasti 42–55 byla pozorována tři pohyblivější residua. jejich výskyt je ve shodě s předpokládanou lokalizací signálu pro změnu způsobu skládání kapsidy. Tento signál je zřejmě nefunkční u mutantu R55F, neboť tento formuje kapsidy na membráně hostitelské buňky na rozdíl od přirozené formy, která tak činí uvnitř cytoplazmy.
- T_1 vzorku WT se na koncích molekuly jsou přibližně 0,8 s, střední část molekuly je poměrně rigidní, T_1 se pohybují okolo 0,6 s. T_2 jsou v rozmezí 0,3 s na konci a 0,08 s ve střední části. Zobecněné parametry uspořádání jsou na okrajích molekuly rovny 0,4, což odpovídá pohyblivých residuím, střed molekuly je rigidní S^2 mezi 0,7 a 0,95. Globální korelační čas molekuly je 9,0 ns. Pozorovaný rozdíl mezi experimentálně změřenými T_2 a T_2 zpětně spočtenými z T_1 ukazuje na možnost chemické výměny. Přítomnost chemické výměny podporuje představu, že matrixový protein tvoří v přirozené formě trimery.
- Z porovnání zobecněných parametrů uspořádání vychází vzorek nemutovaného proteinu WT jako mírně rigidnější. Globální korelační časy obou molekul jsou v podstatě stejné, což odpovídá očekávání, že mutace nemění výrazně velikost molekuly. Výskyt tří pohyblivých residuů v mutovaném

vzorku je ve shodě s předpokládanou lokalizací signálu pro změnu způsobu skládání kapsidy. Tento signál je zřejmě nefunkční u mutantu R55F, neboť tento formuje kapsidy na membráně hostitelské buňky na rozdíl od přirozené formy, která tak činí uvnitř cytoplazmy.

- Lepší hodnocení bude možné po dokončení strukturních studií nemutované formy matrixového proteinu.

Literatura

- [1] Kay, J .E. et al., , *J.Magn. Reson.* 97, **1992**, 359.
- [2] Lipari, G., Szabó, A., *Model free approach to the Interpretation of Nuclear Magnetic Resonance Relaxation in Macromolecules 1. Theory and range of validity*, *J.Am.Chem.Soc.* 104, **1982**, 4546–4559.
- [3] Malcolm H. Levitt, *Spin Dynamics: Basics of Nuclear Magnetic Resonance*, John Wiley and sons, LTD, **2001**, 538–542.
- [4] Jiro Yasuda, and Eric Hunter, *Role of Matrix Protein in The Type D Retrovirus Replication Cycle, Importance of the Arginine Residue at Position 55*, *Virology* 268, **2000**, 533–538.
- [5] , *Amino acid substitutions within the matrix protein of type D retroviruses affect assembly, transport and membrane association of a capsid*, *The EMBO journal vol. 10 no. 3*, **1991**, 535–546.
- [6] Kliková, M., Ruml, T., *Retroviry a jejich životní cyklus*, *Chem. listy* 88, **1994**, 660–668.
- [7] Conte, M. R.,Klikova, M., Hunter, E., Ruml, T. and Matthews, S., *The three-dimensional solution structure of the matrix protein from the type D retrovirus, the Mason-Pfizer monkey virus, and implications for the morphology of retroviral assembly*, *The EMBO journal*, Vol. 16, No.19, **1997**, 5819–5826.
- [8] ing. Václav Veverka, PhD., *nepublikované výsledky*, , **2003**, .
- [9] Rhee, S.S. and Hunter, E., *A single Amino acid Substitution within the Matrix Protein of a type D Retrovirus converts its Morphogenesis to That of type C Retrovirus*, *Cell*, Vol. 63, , **1990**, 77–86.
- [10] Sakalian, M. and Hunter, E., *Separate assembly and Transport domains within the Gag Precursor of Mason-Pfizer monkey virus* , *Journal of virology* Vol. 73, No. 10, **1999**, 8073–8082.

-
- [11] Matthews, S., Barlow, P., Boyd, J., Barton, G., *Structural similarity between the p17 matrix protein of HIV-1 and interferon- γ* , *Nature* 370, **1994**, 666–668.
- [12] Matthews, S., Barlow, P., Clark, N., Kingsman, S., Kingsman, A., and Campbell, I., *The refined structure of the HIV-1 matrix protein, p17*, *Biochem. Soc. Trans.* 23, **1995**, 725–728.
- [13] Hill, C. P., Worthylake, D., Bancroft, D. P., Christensen, A. M. and Sundquist, W. I., *Crystal structures of the trimeric HIV-1 matrix protein: implications for membrane association.*, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93, **1996**, 3099–3104.
- [14] Tang, C. et. al., *Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, **2004**, 517–522.
- [15] Delaglio, F., Grzesiek, S., Vuister, G., Zhu, G., Pfeifer, J., and Bax, A., *NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX Pipes.*, *J. Biomol. NMR* 6, **1995**, 277–293.
- [16] Johnson, B.A. and Blevins, R.A., *NMRView: a computer program for the visualization and analysis of NMR data.*, *J. Biomol. NMR* 4, **1994**, 603–614.
- [17] Cavanah, J. et. al , *Protein NMR spectroscopy: Principles and Practice*, *Academic Press Inc.*, **1996**, 270–280.
- [18] Korzhnev, D. M. et al., *NMR studies of Brownian tumbling and internal motions in proteins*, *Progress in Nuclear magnetic resonance spectroscopy* 38, **2001**, 197–266.

Přílohy

A Tabulka výsledků pro vzorek R55F.

B Tabulka výsledků pro vzorek R55F (pokračování).

C Tabulka výsledků pro vzorek WT

D Tabulka výsledků pro vzorek WT (pokračování)