

VĚDECKÉ SPISY VYSOKÉHO UČENÍ TECHNICKÉHO V BRNĚ

*Edice Habilitační a inaugurační spisy, sv. 714*

*ISSN 1213-418X*

**Marek Ingr**

**ROVNOVÁŽNÉ A KINETICKÉ PROCESY  
V ROZTOCÍCH BIOLOGICKY  
AKTIVNÍCH MAKROMOLEKUL  
POD VLIVEM VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ**

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

RNDr. Marek Ingr, Ph.D.

**ROVNOVÁŽNÉ A KINETICKÉ PROCESY V ROZTOCÍCH  
BIOLOGICKY AKTIVNÍCH MAKROMOLEKUL  
POD VLIVEM VNĚJŠÍHO PROSTŘEDÍ**

EQUILIBRIUM AND KINETIC PROCESSES IN SOLUTIONS OF  
BIOLOGICALLY ACTIVE MACROMOLECULES INFLUENCED BY EXTERNAL  
ENVIRONMENT

ZKRÁCENÁ VERZE HABILITAČNÍ PRÁCE  
V OBORU FYZIKÁLNÍ CHEMIE



BRNO 2022

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

kyselina hyaluronová, konformace, molekulová dynamika, teoretická chemie, směsné rozpouštědlo, HIV-1 proteinasa, enzymová kinetika, vysoký tlak, kvantová chemie

## **KEYWORDS**

hyaluronic acid, conformation, molecular dynamics, theoretical chemistry, mixed solvent, HIV-1 proteinase, enzyme kinetics, high pressure, quantum chemistry

## **MÍSTO ULOŽENÍ**

Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně

© Marek Ingr, 2022

ISBN 978-80-214-6034-8

ISSN 1213-418X

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| PŘEDSTAVENÍ AUTORA.....  | 4  |
| ÚVOD .....   | 5  |
| KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM ZAHRNUTÝM DO HABILITAČNÍ PRÁCE .....   | 7  |
| 1. Studium molekul kyseliny hyaluronové metodou molekulové dynamiky.....   | 7  |
| 1.1. Simulace makromolekul kyseliny hyaluronové v roztocích elektrolytů .....  | 8  |
| 1.2. Vliv iontů na konformaci a dynamiku oligosacharidů kyseliny hyaluronové .....   | 9  |
| 1.3. Oligosacharidy kyseliny hyaluronové ve směsných rozpouštědlech.....   | 10 |
| 1.4. Další plány a perspektivy.....  | 12 |
| 2. Rovnováhy a kinetika v roztocích oligomerních proteinů za vysokého tlaku .....  | 13 |
| 2.1. Simulace vlivu vysokého tlaku na molekulu HIV-1 proteinasy .....  | 14 |
| 2.2. Rovnovážné a kinetické vlastnosti HIV-1 proteinasy za vysokého tlaku.....   | 16 |
| 2.3. Teoretický popis rovnováh v roztocích oligomerních proteinů za vysokého tlaku.....  | 18 |
| 2.4. Další plány a perspektivy.....  | 19 |
| 3. Kinetika enzymově katalyzovaných reakcí.....  | 19 |
| 3.1. Ovlivnění dimerizace retrovirových proteinas strukturním motivem „fireman’s grip“.....  | 19 |
| 3.2. Mechanismus reakce katalyzované šikimátdehydrogenasou z kořene petržele .....   | 20 |
| 3.3. Fluorescenční substráty pro měření enzymové kinetiky rhomboidových proteinas.....   | 22 |
| 3.4. Enzymologická charakterizace rekombinantní lidské a myši serinové racemasy .....  | 23 |
| 3.5. Další plány a perspektivy.....  | 25 |
| 4. Výpočty elektronového rozptylu na molekulách metodami kvantové chemie .....   | 25 |
| 4.1. Výpočty účinných průřezů elastického rozptylu elektronů na molekulách .....   | 25 |
| 4.2. Výpočty parametrů rezonančního elektronového stavu na molekule F <sub>2</sub> .....   | 26 |
| 5. Aplikace metod polymerasové řetězové reakce (PCR) a jejich teoretický popis .....   | 27 |
| 5.1. Enzymologický popis multitemplátové PCR.....  | 27 |
| 5.2. Metoda přímé exponenciální amplifikace a sekvenování (DEXAS).....   | 28 |
| 5.3. Degradace polyvinylalkoholu za denitrifikujících podmínek.....  | 29 |
| 5.4. Příprava apo-cytochromu b rekombinantní expresí v <i>E. coli</i> .....  | 30 |
| 6. Ostatní publikované práce.....  | 31 |
| 6.1. Inhibice produkce bioplynu produkty degradace biomasy .....   | 31 |
| 6.2. <i>Ab initio</i> výpočty substituentových konstant pro metodu QSAR.....   | 32 |
| 6.3. <i>Ab initio</i> výpočty hyperplochy potenciální energie radikálového kationtu C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> <sup>+</sup> ..... | 33 |
| ZÁVĚR .....  | 34 |
| PŘEHLED LITERATURY.....  | 35 |
| ABSTRAKT.....  | 40 |
| ABSTRACT.....  | 40 |

## PŘEDSTAVENÍ AUTORA

**RNDr. Marek Ingr, Ph.D.**

Narozen: 30. 3. 1973, Kyjov

Bydliště: Náhorní 455, 76001 Zlín

Stav: ženatý, 5 dětí

E-mail: ingr@utb.cz



### Vzdělání

- 1996-2000 PřF UK Praha, doktorské studium fyzikální chemie.
- 1996-1999 PřF UK Praha, magisterské studium biochemie.
- 1991-1996 PřF UK Praha, magisterské studium fyzikální chemie.

### Zaměstnání

- 2011 – *souč.* Fakulta technologická Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, Ústav fyziky a materiálového inženýrství – odborný asistent a vedoucí výzkumného týmu
- 2001 – 2012 Ascoprot Biotech, s.r.o. – jednatel, spolujednatel a vedoucí výzkumu v soukromé biotechnologické společnosti
- 2001 – *souč.* PřF UK, katedra biochemie – odborný asistent (částečný úvazek)
- 1999 – 2000 ÚOCHB AVČR – výzkumný pracovník (částečný úvazek)

### Výzkumná činnost

Počítačové simulace molekul kyseliny hyaluronové (HA) ve vodných i nevodných prostředích a jejich interakce s proteinovými receptory. Studium termodynamických a kinetických vlastností oligomerních proteinů za vysokého tlaku a v podmínkách makromolekulárně zahuštěného prostředí. Enzymová kinetika jedno- a vícesubstrátových reakcí. Konstrukce aparatury pro manipulace mikroobjekty metodou optických a termooptických pastí.

### Odborné stáže

- 2012 – 2019 Univerzita v Montpellieru, Francie – 4 krátkodobé výzk.-pedag. stáže
- 1998 – 1999 Univerzita v Heidelbergu, Německo – desetiměsíční výzkumná stáž
- 1994 Univerzita ve Fribourgu, Švýcarsko – dvouměsíční výzkumná stáž

### Granty

- Simulace molekul hyaluronanu substituovaných alifatickými řetězci a jejich interakce s volnými prekurzory substitute. (Contipro a.s., 2020, hlavní řešitel).
- Struktura a dynamika molekul hyaluronanu ve směsných rozpouštědlech. (Contipro a.s., 2019, hlavní řešitel).
- Řízení struktury a funkce biomolekul na molekulové úrovni: souhra teorie a experimentu (centrum excelence) GAČR – GBP208-12-G016 – člen týmu.

### Publikační aktivita

Autor nebo spoluautor 20 publikací v časopisech s IF (dle WoS) a 1 v časopise bez IF (Scopus), spoluautorství 1 patentu. 276 citací (bez autocitací), H-index 10.

### Pedagogická činnost

Výuka předmětů Fyzikální chemie, Separacioní metody, Molekulové modelování (FT UTB ve Zlíně), Pokročilé praktikum z biochemie a Pohyby biomolekul a vnitrobuněčný transport (PřF UK). Obhájené studentské práce: 5 bakalářských, 4 diplomové.

# ÚVOD

Předkládaná habilitační práce shrnuje veškeré moje dosavadní vědecké aktivity, jejichž výsledky byly publikovány v odborných časopisech. Vzhledem k různorodosti mých odborných zájmů v uplynulých 25 letech není tematicky zcela homogenní, obsahuje práce z různých směrů fyzikální chemie s přesahem do biochemie a biofyziky. Název práce jsem proto zvolil tak, aby odpovídal tématům, jimž se aktuálně věnuji se svojí skupinou spolupracovníků a studentů. Třebaže i zde jde o dva oddělené směry zájmu, jejich společným jmenovatelem je vliv vnějšího prostředí na biologicky aktivní makromolekuly, tedy na jejich strukturu a dynamiku v roztocích. V prvním případě jde o vliv vysokého tlaku na molekuly proteinů, který je využíván jako další nezávislá termodynamická proměnná umožňující rozšířený experimentální pohled na proteinové molekuly. V případě druhého tématu se jedná o vliv složení roztoku na chování molekul kyseliny hyaluronové a jejich derivátů. Toto druhé téma, v současné době celosvětově atraktivní, je hlavním směrem mého současného badatelského zájmu. V jeho rámci se naše skupina věnuje teoretickým simulacím zmíněných molekul v roztocích vodných i nevodných metodou molekulové dynamiky, přičemž ovšem spolupracujeme i s experimentálními skupinami ve společnosti Contipro a.s.

Práce je dále doplněna o další publikace, které s hlavním tématem habilitační práce souvisejí pouze okrajově, případně jsou tematicky odlišné. Tyto práce se týkají témat enzymové kinetiky jedno- i vícesubstrátových reakcí, která má přesah i do oblasti výzkumu proteinů za vysokého tlaku. Dále jde o směry zahrnující vývoj i teoretický popis aplikací metody polymerázové řetězové reakce (PCR), zahrnujících sekvenaci DNA, aplikace kvantitativní PCR i syntézu genů. Všechny tyto biochemicky zaměřené práce v sobě obsahují rovněž metodiky exprese a purifikace rekombinantních proteinů, již jsem se věnoval i v rámci svého komerčního působení v první dekádě tohoto století. Konečně jsou v habilitační práci zařazeny i moje nejstarší odborné publikace z oblasti kvantové chemie, které se zabývají především výpočty rozptylu elektronů na molekulách, ale také výpočty reakčních mechanismů radikálových reakcí a výpočty konstant charakterizujících vliv substituentů pro metodu QSAR.

Téma vlivu vnějšího prostředí na biologicky aktivní makromolekuly jsem zvolil z důvodu mého dlouhodobého zaujetí jevy s ním souvisejícími. Zejména v rámci svého biochemicky zaměřeného působení jsem neustále narážel na problémy vyvolané i poměrně malými změnami vnějších fyzikálních podmínek i složení roztoků. Ty se projevovaly především v oblasti exprese a purifikace rekombinantních proteinů, kde často i malá změna složení roztoku způsobila výraznou změnu v rozpustnosti proteinu, čímž jeho izolaci někdy zjednodušila, jindy naopak zcela znemožnila. Změny pH, iontové síly, polarity roztoku, a v neposlední řadě teploty však ovlivňují

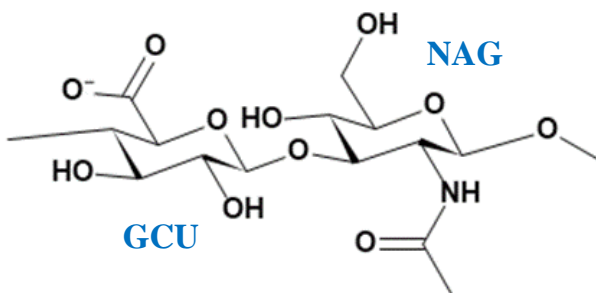
nejen oblast rozpustnosti či srážení proteinů, ale i disociaci podjednotek oligomerních proteinů, unfolding (rozpad terciární struktury) či drobnější konformační změny ovlivňující vazbu ligandů či enzymovou aktivitu.

Ve svých dosavadní pracích jsem se proto zaměřoval na takové systémy, u nichž je buď jednoduše popsateľný externí vliv, nebo obsahují molekuly strukturně jednodušší než molekuly proteinů. K prvnímu případu patří výzkum disociačních rovnováh oligomerních proteinů za vysokého tlaku. Tlak zde vystupuje jako jednoduše popsateľný externí vliv umožňující posun rovnováh do koncentračních oblastí umožňujících lepší experimentální odezvu, čehož jsme využili při studiu dimerizace HIV-1 proteinasy. Do druhé skupiny prací potom patří výzkum chování molekul kyseliny hyaluronové a jejích derivátů v různých vodných a nevodných prostředích metodami výpočetní chemie. Tento biopolymer je molekulou strukturně podstatně jednodušší než proteiny, proto je snazší vlivy prostředí pochopit a vzájemně odlišit. V simulačních metodách lze navíc jednoduše měnit nejen prostředí, ale i studovanou molekulu definovaným připojováním vhodných substituentů, což umožňuje systematický popis externích vlivů. Jelikož je kyselina hyaluronová technologicky významným polymerem, mohou výsledky našeho zkoumání přispět k návrhu pokročilých materiálů typu nosičů léčiv nebo tkáňových náhrad nebo vývoji syntetických metod jejich přípravy. Proto toto téma momentálně tvoří hlavní náplň výzkumného zájmu mne samotného i mojí výzkumné skupiny.

# KOMENTÁŘ K PUBLIKACÍM ZAHRNUTÝM DO HABILITAČNÍ PRÁCE

## 1. STUDIUM MOLEKUL KYSELINY HYALURONOVÉ METODOU MOLEKULOVÉ DYNAMIKY

Kyselina hyaluronová (HA, hyaluronan) je přírodní polysacharid tvořený pravidelně se opakujícími monosacharidovými zbytky kyseliny glukuronové a N-acetylglukosaminu (obr. 1). Vyskytuje se v pojivových tkáních obratlovců, kde tvoří významnou součást mezibuněčné hmoty. Vzhledem k hodnotě pH v těchto prostředích se zde vyskytuje ve formě soli. Jde o silně hydrofilní polymer hojně využívaný v kosmetice a farmacii pro jeho příznivé vlastnosti pro regeneraci pokožky a hojení ran [1]. Pro svoji biokompatibilitu bývá také často využíván ve vývoji nosičů léčiv [2] a tkáňových náhrad [3].



Obr. 1. Strukturální vzorec monomeru kyseliny hyaluronové tvořené monosacharidovými zbytky kyseliny glukuronové (GCU) a N-acetylglukosaminu (NAG).

Vlastnosti molekul kyseliny hyaluronové jsou určovány zejména její značnou hydrofilitou a relativně vysokou rigiditou polymerního řetězce. Hydrofilní povaha molekuly je dána polárními skupinami, které jsou vázány v ekvatoriálních polohách vůči heterocyklům obou zbytků, zatímco v axiálních směrech jsou vázány pouze atomy vodíku. Proto tato oblast „nad“ a „pod“ heterocykly bývá považována za částečně hydrofobní. Polární skupiny jsou schopny vytvářet vodíkové vazby prostřednictvím atomů kyslíku, případně dusíku, s okolními molekulami vody, avšak také v rámci řetězce samotného. Intramolekulární vodíkové vazby přispívají k vyšší konformační rigiditě řetězce HA, protože omezují volné protáčení řetězců kolem vazeb glykosidických spojení.

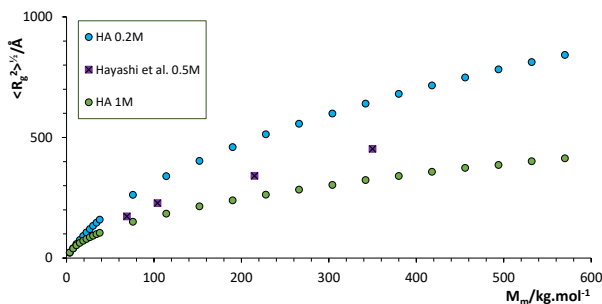
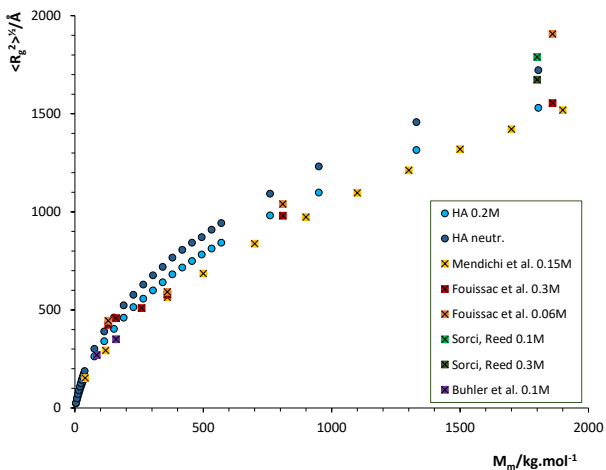
V rámci naší výzkumné skupiny se zaměřujeme na zkoumání vlivu prostředí, v němž se molekula HA nachází, na konformaci a dynamiku polymerního řetězce molekuly HA metodami teoretické a výpočetní chemie. Základem výzkumu jsou simulace metodou molekulové dynamiky (MD), které zachycují chování řetězce HA v časovém intervalu v řádu stovek ns. Simulace probíhají



v systému NpT, tedy za konstantního počtu částic, tlaku a teploty a jsou prováděny programem NAMD, k vizualizacím simulací a vyhodnocením některých parametrů je používán program VMD. Ostatní vyhodnocení jsou prováděna pomocí námi napsaných programů. V průběhu našich výzkumných prací byla simulována různá prostředí počínaje čistou vodou přes vodné roztoky různě koncentrovaných solí až po směsná rozpouštědla tvořená vodou a organickými látkami s ní dokonale mísitelnými, konkrétně 1,4-dioxanem a terc-butanolem (2-methylpropan-2-ol).

### **1.1. Simulace makromolekul kyseliny hyaluronové v roztocích elektrolytů**

V první práci na toto téma (*M. Ingr et al., Carbohydr. Polym. 170 (2017) 289–295*) jsme se zaměřili na simulaci náhodných klubek HA ve vodě a vodných roztocích solí. Simulace obsahující oligosacharid HA o délce 48 monosacharidových zbytků byly prováděny za teploty 310 K pro dvě soli, NaCl a MgCl<sub>2</sub>, ve třech koncentracích. Zároveň byly provedeny obdobné simulace i pro neutrální analog HA obsahující kyseliny glukuronové glukosu. Modely velkých náhodných klubek HA byly konstruovány skládáním náhodně vybraných fragmentů simulovaných řetězců na základě rozdělení dihedrálních úhlů jednotlivých glykosidických spojení odvozeného z výpočtu. Touto metodou byl vytvořen celý statistický soubor náhodných klubek a byly vyhodnoceny střední hodnoty charakteristických veličin, především vzdálenosti konců řetězce a gyračního poloměru. Jejich analýza ukázala, že velikost klubka klesá s rostoucí koncentrací solí v roztoku (obr. 2), což je v souladu s mnohými experimentálními studiemi [4–8]. To potvrzuje relevanci použitého modelu a otevírá možnost simulace náhodných klubek silně botnajících polymerů pomocí metody MD. Trendy u obou použitých solí byly podobné. Navíc nebyly pozorovány výrazné odlišnosti v chování nabitých molekuly HA a jejího neutrálního analogu. To ukazuje, že koncentrace solí neovlivňuje konformaci řetězce pouhým stíněním elektrostatické repulze mezi nabitými karboxylovými skupinami, jejichž vzdálenost cca 10 Å je relativně velká. Podrobněji byly tyto vlivy studovány v následující práci.



Obr. 2. Gyrační poloměr simulovaných náhodných klubek jako funkce molární hmotnosti makromolekuly. Srovnání modelovaných klubek pro tři koncentrace NaCl – 0 M (ozn. „neutr.“), 0,2 M, 1 M s různými publikovanými experimentálními výsledky [4–8]. Kroužky – výsledky vlastních simulací, ostatní symboly – experimentální výsledky z literatury. Převzato a upraveno z M. Ingr et al., *Carbohydr. Polym.* 170 (2017) 289–295.

## 1.2. Vliv iontů na konformaci a dynamiku oligosacharidů kyseliny hyaluronové

Cílem další práce (E. Kutálková et al., *Carbohydr. Polym.* 234 (2020) 115919) bylo zejména objasnit, jakým mechanismem dochází k zmenšení gyračního poloměru molekuly HA v roztocích o zvyšující se iontové síle. Simulace byly prováděny pro molekulu HA s plně disociovanými karboxylovými skupinami v roztocích NaCl o koncentracích 0 M, 0,2 M, 0,6 M, a 1 M za teplot 275 a 310 K. Výpočty ukázaly, že rozložení hodnot dihedrálních úhlů jednotlivých glykosidických spojení je na koncentraci NaCl prakticky nezávislé. S koncentrací NaCl však roste výskyt hodnot dihedrálních úhlů mimo oblast svých rovnovážných hodnot, a proto snáze dochází k přetočení monosacharidového zbytku do jiné polohy. S nejvyšší četností k tomu dochází u dihedrálního úhlu charakterizujícího otočení kolem vazby mezi uhlíkem C4 GCU a glykosidickým kyslíkem (ozn. 14\_2), který je největším zdrojem flexibility molekuly HA. Dihedrální úhel je v přetočeném stavu jednotky až desítky ns, poté se vrací do rovnovážné polohy. Ze simulací dále plyne, že přetočení

v jednom dihedrálním úhlu nevede k bezprostřední kompenzaci protočením jinde v řetězci, naopak všechny ostatní dihedrální úhly v celém řetězci zůstávají, až na náhodné fluktuace, beze změny. Napětí vzniklé protočením tedy disipuje do ostatních stupňů volnosti, což umožňuje protočení jednotlivého dihedrálního úhlu bez nutnosti změny jiného. Kolem vazby odpovídající protočenému dihedrálu však vznikne konformace energeticky nevýhodná, což vede k postupné relaxaci do konformace typu vlásenky, tedy k prudkému zahnutí o téměř  $180^\circ$ , a tedy ke zkrácení vzdálenosti konců řetězce. Jakmile však dojde ke zpětnému protočení uvažovaného dihedrálního úhlu do jeho rovnovážné hodnoty, řetězec se opět „narovná“ do rovnovážné konformace. V některých případech proběhne konformační změna ve značném rozsahu, jindy jen zčásti, pokud ke zpětnému přetočení dojde příliš brzy. Je tedy pravděpodobné, že příčinou změny velikosti klubka se změnou iontové síly roztoku je větší flexibilita řetězce projevující se častějšími konformačními změnami vedoucími k jeho opakovanému zkracování.

Zvýšení četnosti přetočení dihedrálních úhlů za vyšší koncentrace NaCl je dáno jednak celkovým poklesem počtu vodíkových vazeb, což dává molekule HA větší konformační volnost. Vedle toho byla také pozorována pozitivní korelace mezi četností přetočených dihedrálních úhlů 14\_2 a výskytem iontů  $\text{Na}^+$  v blízkosti kyslíku O5 zbytku kyseliny glukuronové. Obě veličiny nabývají maxima při cca 0,6M koncentraci NaCl. Toto maximum také koreluje s minimální hodnotou gyračního poloměru náhodných klubek simulovaných metodou popsanou v předchozí práci.

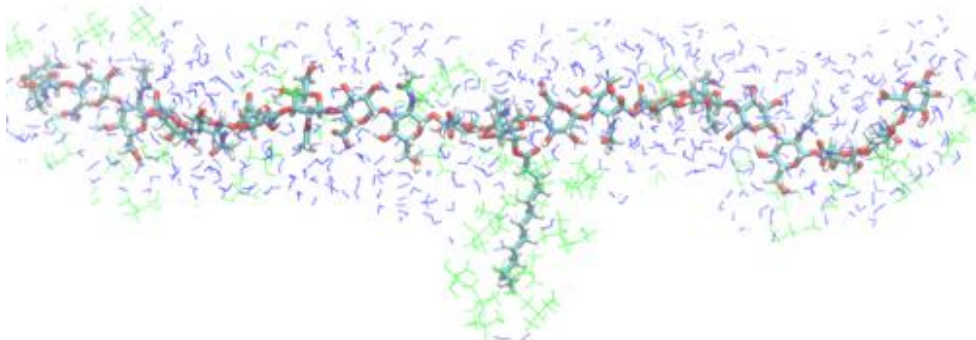
Z uvedených prací vyplývají následující závěry. Metodou molekulové dynamiky lze simulovat oligosacharidy HA, jejichž charakteristické vlastnosti, jakož i vlastnosti velkých náhodných klubek z nich vytvořených, odpovídají experimentálním hodnotám. Simulací získaný gyrační poloměr klesá s rostoucí koncentrací solí v roztoku. Zejména za nízkých teplot však tento pokles nemusí být monotónní, gyrační poloměr nabývá minima při koncentraci NaCl cca 0,6 M. Závislost gyračního poloměru na koncentraci solí souvisí s dynamickým chováním řetězce, především s náhodným protáčením jednotlivých monosacharidových zbytků kolem glykosidických vazeb z rovnovážné polohy, jejichž četnost roste s koncentrací solí. Tato protočení vyvolávají konformační změnu vedoucí k vytvoření ohybu na řetězci HA, což vede k jeho dočasnému zkrácení, a tedy následně ke zmenšení gyračního poloměru.

### **1.3. Oligosacharidy kyseliny hyaluronové ve směsných rozpouštědlech**

V další publikované práci (*E. Kutálková, et al., Int. J. Biol. Macromol. 189 (2021) 826–836*) jsme se věnovali chování oligosacharidů HA ve směsných rozpouštědlech tvořených vodou

a organickými látkami s vodou mísitelnými, 1,4-dioxanem (dále jen dioxan) a terc-butanolem. Výzkum probíhal ve spolupráci se společností Contipro a.s. a jeho primárním cílem bylo vysvětlení různé reaktivity HA v esterifikačních reakcích na jejich hydroxylových skupinách v závislosti na použitém rozpouštědle. Tyto reakce jsou prováděny metodou směsných anhydridů za katalýzy 4-dimethylaminopyridinem (DMAP) [9].

U oligosacharidů HA byla pozorována separace směsných rozpouštědel v bezprostřední blízkosti molekuly HA. Ukázalo se, že molekula HA je solvatována přednostně molekulami vody, zatímco organickou složku odpuzuje. Tento efekt je přitom výraznější ve směsi voda:terc-butanol. Následně byly simulovány molekuly HA substituované jedním dodekanoylovým zbytkem vázaným esterovou vazbou na hydroxylovou skupinu uhlíku C6 NAG. Separace směsného rozpouštědla byla v oblasti řetězce HA stejná jako u nesubstituované molekuly HA, avšak v okolí postranního alifatického řetězce byla přesně opačná – řetězec byl solvatován především organickou složkou. Efekt byl výrazně silnější v případě terc-butanolu, což je pravděpodobně dáno jeho amfifilní povahou, která symetričtější molekule dioxanu chybí. Rozložení molekul směsného rozpouštědla kolem substituované molekuly HA ilustruje obr. 3.



*Obr. 3. Oligosacharid HA substituovaný dodekanoylovým zbytkem ve směsném rozpouštědle tvořeném vodou (modré molekuly) a terc-butanolem (zelené molekuly) v objemovém poměru 1:1. V okolí řetězce HA převládá voda, v blízkosti substituentu jednoznačně dominuje terc-butanol. Převzato a upraveno z E. Kutálková, et al., Int. J. Biol. Macromol. 189 (2021) 826–836.*

Konečně byly simulovány systémy obsahující nesubstituovanou nebo substituovanou molekulu HA a reaktant substituční reakce N-dodekanoyl-4-(dimethylamino)-pyridiniový kationt (dále jen C<sub>12</sub>-DMAP). Bylo prokázáno, že výskyt C<sub>12</sub>-DMAP v blízkosti molekuly HA je podstatně četnější ve směsi voda:dioxan než voda:terc-butanol, přičemž pravděpodobným důvodem tohoto jevu je právě menší separace směsného rozpouštědla u první směsi. Naopak silná separace směsi voda:terc-butanol představuje energetickou bariéru pro přístup C<sub>12</sub>-DMAP k molekule HA. To je v dobrém souladu s experimentálním provedením reakce, která ve směsi voda:dioxan vykazuje

výrazně vyšší stupeň substituce než ve směsi voda:terc-butanol. Reakční prekurzor C<sub>12</sub>-DMAP má navíc v roztoku voda:terc-butanol silnou afinitu k alifatickému řetězci již navázanému na HA a tato interakce mu umožňuje přiblížení k HA, které je v tomto rozpouštědle jinak méně čtené. Naopak ve směsi voda:dioxan se tento efekt prakticky neprojevuje. To vysvětluje experimentální zjištění, že ve směsi voda:terc-butanol bude docházet k častějšímu shlukování substituentů, zatímco ve směsi voda:dioxan bude jejich distribuce po délce řetězce rovnoměrnější. Všechny závěry naší teoretické studie byly navíc nezávisle potvrzeny jinou experimentální prací našich spolupracovníků z Contipro a.s. a dalších, jimž se podařilo prokázat zcela analogické chování i pro jiný alifatický substituent, a to oleoyl [10]. Na základě této shody teorie s experimentem lze předpokládat obecnější platnost získaných závěrů o vlivu směsného rozpouštědla na průběh esterifikačních chemických reakcí na řetězci HA.

#### 1.4. Další plány a perspektivy

Prvním ze směrů dalšího pokračování našeho výzkumu HA jsou simulace interakcí dvou řetězců HA ve vodných roztocích. Některými experimenty provedenými v 90. letech 20. století byla naznačena možnost existence reverzibilních dvojšroubovicových struktur molekul HA ve vodném prostředí [11], což však bylo později vyvráceno jinými experimentálními pracemi [12]. Naše simulace ukazují nemožnost existence stabilních dvojšroubovicových struktur ve vodných roztocích, nicméně četnost vzájemných interakcí obou řetězců rostoucí s koncentrací NaCl může hrát podstatnou roli v chování velkých makromolekulárních klubek nebo koncentrovaných roztoků HA. To lze nepřímo potvrdit experimentálně pozorovaným chováním těchto roztoků metodami viskozimetrie nebo rozptylu světla. Výsledky této studie jsou připravovány k publikaci.

Vedle toho pokračujeme ve zkoumání chování molekul HA ve směsných rozpouštědlech, zejména s ohledem na interakci HA s ionty, která je v méně polárním prostředí silnější než ve vodě. To má za následek rovněž pevnější interakci mezi řetězci, která v určitých poměrech koncentrací směsného rozpouštědla může vést až ke vzniku stabilních duplexových struktur.

Relativně nemnoho výzkumných prací se dosud zabývalo simulacemi substituovaných řetězců HA, třebaže právě chemicky modifikované molekuly HA jsou díky své nižší hydrofilitě často technologicky využívány. Vliv substitucí na strukturu oligosacharidů HA ve vodném prostředí byl studován experimentálně i teoreticky ve skupině A. Mohse [13], přičemž byl prokázán vliv hydrofobních substituentů na tvorbu kompaktnějších makromolekulárních klubek. V rámci probíhajícího pokračování našeho výzkumu proto plánujeme navázat na studie uvedeného typu a zahrnout do nich i vliv směsných rozpouštědel, protože právě v nich často probíhají substituční

reakce vedoucí k navázání hydrofobních zbytků na molekulu. Rovněž plánujeme podrobnější výzkum vlivu koncentrace solí na substituované řetězce HA.

## 2. ROVNOVÁHY A KINETIKA V ROZTOCÍCH OLIGOMERNÍCH PROTEINŮ ZA VYSOKÉHO TLAKU

Chemické rovnováhy v roztocích jsou ovlivnitelné řadou externích faktorů, mezi něž zpravidla počítáme především teplotu a složení rozpouštědla, v němž reakce probíhá. V případě biochemických reakcí probíhajících ve vodném prostředí jsou nejvýznamnějšími faktory iontová síla a pH. Obvykle však mezi ovlivňující faktory nepočítáme tlak, jehož vliv na reakce v kondenzované fázi je vpravdě minimální. To je důsledkem nízké stlačitelnosti kondenzovaných látek, která neumožňuje velké změny objemů reakčních směsí v důsledku probíhajících chemických reakcí.

Změnu rovnovážné konstanty chemické reakce, resp. jejího logaritmického vyjádření  $pK_a = -\log K_a$ , s měnícím se tlakem lze vyjádřit vztahem

$$\left(\frac{\partial pK_a}{\partial p}\right)_T = -\log e \left(\frac{\partial \ln K_a}{\partial p}\right)_T = \frac{\log e}{RT} \left(\frac{\partial \Delta G_r^0}{\partial p}\right)_T = \frac{\log e}{RT} \Delta V_r^0, \quad (1)$$

kde  $p$  je tlak,  $T$  je termodynamická teplota,  $R$  je molární plynová konstanta,  $\Delta G_r^0$  je standardní molární reakční změna Gibbsovy energie a  $\Delta V_r^0$  je standardní molární reakční změna objemu. Ze vztahu je patrné, že pokud molární objem reakční směsi při určitém fyzikálněchemickém ději narůstá, zvyšuje se i  $pK_a$ , tedy klesá rovnovážná konstanta, a tudíž se rovnováha posune na stranu reaktantů, a naopak. Protože u disociačních podjednotek oligomerních proteinů bývají objemové změny v řádu desítek až stovek  $ml\ mol^{-1}$ , je k posunu rovnovážné konstanty o řád zapotřebí tlaku v řádu stovek MPa. Takové tlaky, s výjimkou dolní meze tohoto intervalu, se v biosféře Země vůbec nevyskytují, jelikož odpovídají hloubkám v řádu desítek  $km$  pod vodní hladinou. Přesto byly některé výzkumy v této oblasti zaměřeny právě na vliv tlaku na proteiny hlubokomořských mikroorganismů [14]. Výzkum proteinů za vysokého tlaku však zpravidla nemá primárně význam pro popis jevů probíhajících v přírodě, lze ho však využít k měření rovnovážných konstant procesů, jejichž rovnováha je výrazně posunuta na jednu stranu, takže není jednoduché pozorovat rovnovážné zastoupení obou stavů reagujících látek [15].

Typickým příkladem je měření disociační konstanty oligomerního proteinu složeného z několika podjednotek – pro jednoduchost předpokládejme homodimer. Jestliže je rovnováha silně posunuta na stranu dimeru, je možné pozorovat rovnovážné zastoupení monomeru a dimeru jen za velmi nízkých koncentrací, což znemožňuje dobrou detekci většinou použitelných experimentálních

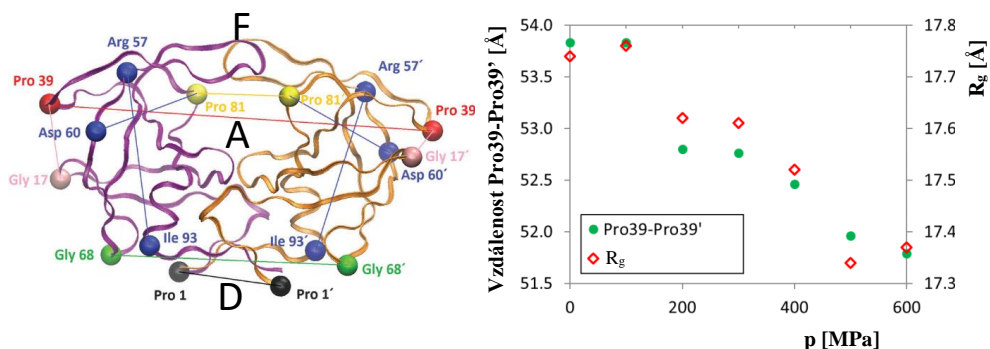
metod. Pokud ovšem disociace dimeru vede ke snížení celkového objemu systému, což je typický případ, lze aplikací vysokého tlaku rovnovážnou konstantu posunout tak, že rovnovážný poměr obou forem umožňuje lepší experimentální odezvu. Proto můžeme rovnovážnou konstantu stanovit za zvýšeného tlaku a následně její hodnotu přepočítat na tlak atmosférický. Vysokotlakých metod bylo v minulosti použito k výzkumu proteinů dimerních [16], tetramerních [17], hexamerních [18], vyšších oligomerů [19] či virových kapsid [20], prionů [21], nebo dokonce polymerních proteinových struktur jako mikrotubuly nebo mikrofilamenta [22]. Procesy, u nichž naopak vysoký tlak podporuje asociaci proteinových molekul do vyšších útvarů, jsou méně obvyklé, jde zpravidla o agregace nespécifikovaného počtu podjednotek [23]. Použití vysokotlakých metod se neomezuje pouze na asociční rovnováhy podjednotkových proteinů, využívá se rovněž ke studiu unfoldingu proteinů [24] a dalších procesů. Vysokotlaké experimenty se navíc neomezují jen na studium rovnováh, ale také na kinetiku zkoumaných procesů [25].

Studium proteinů za vysokého tlaku je z technického hlediska náročnější oproti experimentům za tlaku atmosférického, neboť zkoumaný vzorek musí být umístěn v prostředí, kde je vysoký tlak udržován. Nejběžnějšími metodami používanými v kombinaci s vysokým tlakem jsou spektrofotometrie a fluorimetrie, vysoký tlak však byl aplikován i v kombinaci s rozptylem světla [26] nebo neutronů [14] či gelovou elektroforézou [27]. Pro studium nativních konformací jednotlivých podjednotek oligomerních proteinů jsou pak obzvláště vhodné metody vysokotlaké rentgenové krystalografie a vysokotlaké NMR [28].

V naší skupině jsme se věnovali zejména výzkumu rovnovážných a kinetických vlastností homodimerní aspartátové proteinasy z viru HIV 1 (HIV-1 PR), a to jak experimentálně, tak teoreticky.

## 2.1. Simulace vlivu vysokého tlaku na molekulu HIV-1 proteinasy

V první práci na toto téma (*E. Kutálková et al., Phys. Chem. Chem. Phys. 16 (2014) 25906–25915*) jsme simulovali molekulu HIV-1 PR za různých tlaků od 1 do 600 MPa metodou molekulové dynamiky. Tento přístup byl dříve několikrát použit na různé proteiny, jeho aplikace shrnuje přehledový článek [29]. Cílem studie bylo popsat konformační změny molekuly a určit objemovou změnu provázející disociaci dimeru. Bylo pozorováno mírné zmenšení rozměrů dimeru HIV-1 PR reprezentovaných jednak vzdáleností  $\alpha$ -uhlíků aminokyselin Pro39 a Pro39' ležících na nejbližších místech molekuly (obr. 4), jednak gyračním poloměrem dimeru.



Obr. 4. Vlevo: struktura molekuly HIV-1 PR s vyznačením významných domén: A – aktivní místo obklopené dutinou pro vazbu substrátu, F – chlopně (flaps), D – dimerizační doména. Barevnými kuličkami a čarami jsou vyznačeny vzdálenosti, jejichž změna byla sledována v závislosti na tlaku v systému. Vpravo: Závislost vzdálenosti Pro39-Pro39' (která vykazovala nejvýraznější změnu) a gyračního poloměru  $R_g$  molekuly na tlaku. Převzato a upraveno z E. Kutálková et al., *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (2014) 25906–25915.

Aby bylo možno posoudit a termodynamicky kvantifikovat vliv vysokého tlaku na rovnováhu monomer-dimer, byla vypočtena změna objemu související s disociací dimeru na dva monomery. K tomu byla použita aproximativní metoda zjištění objemového rozdílu založená na stanovení počtu molekul vody v dutině aktivního místa. Vycházíme z předpokladu, že její hydrofobní vnitřní povrch odpuzuje molekuly vody, takže celková hustota těchto molekul je uvnitř dutiny za atmosférického tlaku nižší než ve volné vodě. Zvyšováním tlaku je však tato odpudivá tendence překonávána a do dutiny se dostává více molekul vody z okolí, čímž klesá celkový objem systému. Obdobný výpočet byl proveden také pro monomer, kde je efekt zřejmě menší, protože monomer obsahuje pouze polovinu dutiny aktivního místa.

Vypočtená objemová změna nebyla konstantní, ale závisela výrazně na tlaku. Za nízkého tlaku byla dokonce kladná, poté ale klesala do záporných hodnot, kde nabyla minima (tj. maximální záporné změny) při cca 300 MPa, poté se vrací zpět k nule. Aby bylo možno provést srovnání s experimentálními daty, byla vypočtena hodnota průměrné objemové změny pro interval od nuly do daného tlaku. Takto vypočtené hodnoty odpovídají objemovým změnám ovlivňující experimentální chování při daném tlaku. Průměrné hodnoty začínají opět v kladných oblastech, do záporných hodnot přecházejí u cca 160 MPa a nakonec se stabilizují kolem hodnoty  $-50 \text{ ml/mol}$ . Tomu potom odpovídá i průběh změny hodnoty disociační konstanty dimeru. Tato změna je v oblasti do 160 MPa nepatrně kladná, poté však klesá do záporných hodnot a pro tlaky nad 300 MPa se stabilizuje kolem hodnoty  $\Delta pK_d = -4$ , tedy rovnovážná konstanta disociace dimeru vzroste asi o 4 řády. To svědčí o výrazné tlakové destabilizaci dimeru. Vypočtené hodnoty změny objemu i



disociační konstanty jsou, i přes vysokou míru aproximace, v dobrém souladu s naší následnou experimentální prací na stejném enzymu.

Naše teoretická studie tedy ukazuje potenciál simulací metodou molekulové dynamiky pro výpočty objemových změn molekul proteinů za vysokého tlaku. Dále ukazuje, že objemová změna nemusí být konstantní v celém intervalu aplikovaných tlaků, což je v experimentálních pracích obvykle předpokládáno.

## 2.2. Rovnovážné a kinetické vlastnosti HIV-1 proteiny za vysokého tlaku

Zároveň se simulacemi jsme ve spolupráci se skupinami Dr. Reinharda Langeho a prof. Eliane Dumay z Univerzity v Montpellieru provedli analogickou experimentální studii (*M. Ingr, et al., Plos One. 10 (2015) e0119099*). V této studii jsme vystavili roztok HIV-1 PR postupně se zvyšujícím tlaku a pozorovali fluorescenční odezvu v oblasti fluorescence aromatických aminokyselin, zejména tryptofanu. Pozorované změny v intenzitě a poloze těžiště emisního spektra svědčí o strukturních změnách v molekule proteinu.

Jako první byl ověřen předpoklad, že kompetitivní inhibitory HIV-1 PR stabilizují její dimerní strukturu. Takto stabilizovaný dimer navíc nepodléhá rozpadu terciární struktury (unfoldingu), a to ani za vysokého tlaku. Dále bylo prokázáno, že agregace proteinu nastává až za tlaků vyšších než 350 MPa, což je hodnota umožňující provedení měření parametrů dimerizace i unfoldingu.

Abychom odlišili procesy disociace dimeru a následného unfoldingu monomerů, sledovali jsme rovněž závislost tlakově podmíněných spektrálních změn na koncentraci. V případě unfoldingu, který je v obou směrech procesem prvního řádu, jsou tyto změny koncentračně nezávislé, naopak v případě přechodu mezi dimerem a monomerem vyšší koncentrace stabilizuje dimerní stav. Proto za nízkých koncentrací dojde k disociaci dimeru za nižšího tlaku než v případě koncentrace vyšší. V případě HIV-1 PR byla pozorována zřejmá koncentrační závislost polohy inflexního bodu tlakové závislosti těžiště emisního spektra (obr. 5, vlevo), naopak inflexní bod závislosti intenzity spektra na tlaku se s koncentrací neměnil. Proto byla první závislost považována za odezvu disociace dimeru, zatímco druhá za odezvu unfoldingu disociovaných monomerů.

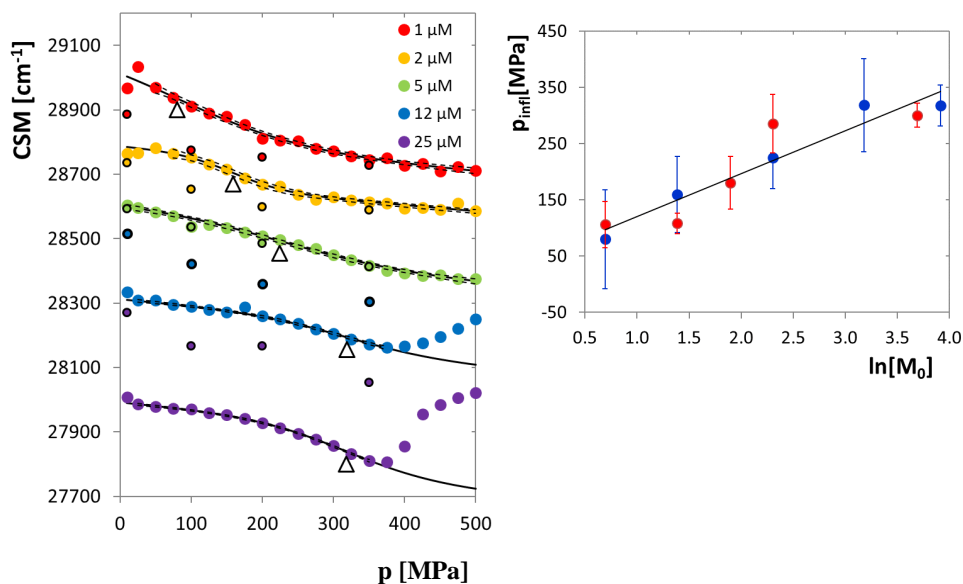
Z první závislosti byla následně vypočtena hodnota disociační konstanty i objemová změna provázející tento proces. Byla použita linearizovaná rovnice závislosti polohy inflexního bodu  $\Delta p_{inf}$  na logaritmu koncentrace proteinu  $[M_0]$  (vyjádřené jako koncentrace formálního monomeru)

$$\Delta p_{inf}([M_0]) = -\frac{RT}{\Delta V_d} \ln[M_0] + \frac{RT}{\Delta V_d} \ln \frac{(1 + \sqrt{2})K_{d,atm}}{4}, \quad (2)$$

kde  $K_{d,atm}$  je disociační konstanta dimeru za atmosférického tlaku a  $\Delta V_d$  je objemová změna disociace (považovaná za konstantu). Z proložení experimentálně získaných hodnot inflexních bodů touto lineární závislostí (obr. 5, vpravo) byly získány hodnoty obou parametrů,  $\Delta V_d = -32,5 \text{ ml/mol}$  a  $K_{d,atm} = 0,92 \mu\text{M}$ . Hodnota disociační konstanty zapadá do oblasti hodnot získaných jinými metodami nezávislými na interakci se substrátem či inhibitorem [30,31]. Naopak kinetické studie na těchto interakcích závislé [32,33], včetně naší starší práce [34], poskytují obecně hodnoty nižší, které mohou být způsobeny vlivem stabilizačního efektu substrátu či inhibitoru.

Z denaturační křivky dané odezvou celkové intenzity fluorescence byly stanoveny hodnoty objemové změny provázející unfolding i jeho rovnovážné konstanty:  $\Delta V_u = -104 \text{ ml/mol}$  a  $K_{u,atm} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ . To znamená, že za teploty  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , za níž měření probíhalo, je monomer za atmosférického tlaku velmi stabilní, jeho unfolding nastává až za vyšších tlaků. To je v souladu i s experimentální studií metodou NMR, v níž byly pozorovány monomery mutantních dimerizačně defektních forem HIV-1 PR [35].

Nakonec byla měřena i závislost kinetických parametrů enzymového štěpení umělého peptidového substrátu srovnáním hodnot reakční rychlosti pro různé tlaky za dané koncentrace obou složek s teoreticky odvozenou křivkou popisující vliv disociace dimeru na kinetiku při konstantnosti Michaelisovy konstanty  $K_m$  a čísla přeměny  $k_{cat}$ . Dobrá shoda experimentální a teoretické křivky ukazuje, že disociace dimeru je velmi podstatným faktorem ovlivňujícím rychlost štěpení substrátu. Drobné odchylky však svědčí o tlakové závislosti kinetických konstant  $K_m$  a  $k_{cat}$ , k jejichž stanovení by však bylo zapotřebí dalších experimentů, které v současné době probíhají.



Obr. 5. Závislost inflexního bodu křivek disociace dimer-monomer na koncentraci HIV-1 PR. Vlevo: experimentálně naměřené body pro jednotlivé koncentrace proložené teoretickou závislostí (plná čára). Přerušované čáry vymezují pásy 95% spolehlivosti regresních křivek. Černě ohraničené tečky reprezentují hodnoty naměřené při zpětném snižování tlaku – tyto jsou ovlivněny předchozím působením velmi vysokého tlaku vyvolávajícího jak unfolding, tak i agregaci proteinu. Trojúhelníčky označují polohu inflexního bodu. Křivky jsou pro přehlednost vzájemně vertikálně posunuty. Vpravo: tlak v inflexním bodě jako funkce koncentrace. Body různých barev označují opakovaná měření, chybové úsečky vyznačují směrodatnou odchylku vypočtenou z chyb nelineární regrese. Plná čára vyznačuje regresní přímku proloženou všemi body dle rovnice (4). Převzato a upraveno z M. Ingr, et al., *Plos One*. 10 (2015) e0119099.

### 2.3. Teoretický popis rovnováh v roztocích oligomerních proteinů za vysokého tlaku

V následující publikované práci (M. Ingr et al., *J. Theor. Biol.* 411 (2016) 16–26) jsme se zaměřili na teoretický popis oligomerizačních rovnováh za vysokého tlaku. Cílem práce bylo vytvořit univerzální popis těchto dějů pro různé počty podjednotek ve variantách homo- i heterooligomerů. Popis byl založen především na změnách poloh inflexních bodů tlakových závislostí stupňů konverze jednotlivých oligomerizačních stavů. Popis byl doplněn matematickými vzorci pro jednotlivé rovnováhy, které lze použít pro počítačové zpracování problému.

Teoretický popis byl vypracován pro několik typů rovnováh. Nejjednodušším typem je uzavřená rovnováha homooligomerního systému, tj. rovnováha mezi oligomerem o daném počtu podjednotek a volnými podjednotkami (monomery) bez předpokladu vzniku jakýchkoli mezistupňů. Křivka přechodu má v tomto případě jen jeden inflexní bod a je popsitelná podobnou rovnicí jako v případě homodimeru. Dále bylo zpracováno několik základních uzavřených rovnováh pro

heterooligomery, konkrétně heterodimer a heterotrimery typů  $A_2B$  nebo  $ABC$ . Teoretický model byl vytvořen i pro rovnováhy postupné (konsekutivní), kdy mezi monomery a výsledným oligomerem stojí ještě několik mezistavů daných postupnou tvorbou výsledného komplexu. Popis těchto rovnováh už je relativně složitý, proto byl vytvořen jen pro homotrimer a oba typy heterotrimerů.

Tato teoretická práce tedy přináší přehledné zpracování popisu rovnováh v různých typech oligomerních proteinových komplexů podléhajících disociaci vlivem vysokého tlaku. Jejím cílem je usnadnit vyhodnocení dalších experimentů s oligomerními proteiny různé komplexnosti.

## **2.4. Další plány a perspektivy**

V současné době plánujeme zejména srovnání přírodní varianty HIV-1 PR s jeho některými mutantními variantami, jakož i s kovalentně spojeným dimerem, který nepodléhá disociaci. Dalším možným směrem výzkumu je chování HIV-1 PR v makromolekulárně zahuštěném prostředí (macromolecular crowding) simulujícím reálné prostředí, v němž se molekuly proteinů nacházejí.

## **3. KINETIKA ENZYMOVĚ KATALYZOVANÝCH REAKCÍ**

Téma enzymové kinetiky částečně souvisí s tématem studia proteinů za vysokého tlaku, věnoval jsem se mu však již dříve a také v rámci jiných projektů. Jednalo se nejdříve o výzkum enzymové kinetiky a disociační rovnováhy dimerních retrovirových proteinas, později jsem se však podílel i na výzkumu aktivity serinové racemasy. Velmi zajímavým tématem byl také výzkum rhomboidových proteinas, což jsou enzymy membránové, takže popis jejich enzymové aktivity musí brát v potaz jejich rozmístění ve dvojrozměrném prostoru biomembrán. Konečně v rámci poslední práce na toto téma jsem se podílel na identifikaci mechanismu dvojsubstrátové zvratné reakce katalyzované šikimátdehydrogenasou, rostlinným enzymem připraveným z kořene petržele.

### **3.1. Ovlivnění dimerizace retrovirových proteinas strukturním motivem „fireman’s grip“.**

Moje první práce z této oblasti (*M. Ingr et al., Protein Sci. 12 (2003) 2173–2182*) souvisí se studiem kinetiky a dimerizační rovnováhy retrovirových proteinas. Retrovirové proteinasy jsou dimerní proteiny, přičemž právě dimerizace je nezbytná pro jejich enzymovou aktivitu [36]. Stanovení disociační konstanty dimeru bylo v minulosti prováděno mnoha výzkumnými skupinami s relativně nejednotnými výsledky závislými na použité metodice a konkrétních podmínkách experimentu. Kromě toho bylo také zjištěno, že enzymová aktivita retrovirových proteinas závisí na tom, jestli se vedle kyseliny asparagové v aktivním místě enzymu nachází aminokyselina threonin nebo serin, což jsou jediné dvě varianty v retrovirech nalezené. Tato aminokyselina tvoří spolu

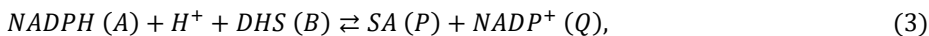
s leucinem předcházejícím aspartát aktivního místa a analogickými aminokyselinami druhého monomeru strukturní motiv zvaný „fireman’s grip“ (hasičský chvat – název je vychází z podobnosti se stoličkou ze čtyř rukou používanou k záchraně raněného), který propojuje oba monomery sítě vodíkových vazeb, čímž přispívá ke stabilizaci dimeru. Mutační studie provedené v obou směrech prokázaly, že varianty s threoninem jsou vždy aktivnější [37,38].

V naší práci jsme si proto kladli za cíl vysvětlit vliv této aminokyseliny na stabilitu dimeru retrovirových proteinas. Vyšli jsme tedy ze dvou přirozeně se vyskytujících (wild-type) proteinas z retrovirů HIV-1 a MAV (myeloblastosis-associated virus), z nichž první obsahuje ve zmíněném motivu threonin a druhý serin, a k oběma připravili metodami rekombinantní exprese a purifikace i opačné varianty. Kromě toho jsme ještě použili přirozenou variantu viru MPMV obsahující ve fireman’s gripu rovněž threonin. Pro všechny tyto enzymy jsme stanovili rovnovážnou konstantu disociace dimeru, stejně jako jednotlivé rychlostní konstanty procesů asociace a disociace, na základě měření rychlosti štěpení fluorescenčního substrátu využívajícího Försterova rezonančního přenosu energie (FRET). Všechny enzymové varianty obsahující threonin v motivu fireman’s gripu měly disociační konstantu v průměru o řád nižší než varianty obsahující serin, byly tedy termodynamicky stabilnější. Příčina tohoto jevu není zcela jednoznačně objasněna, ale lze ji anticipovat z okolností, že u termodynamicky stabilnějších T-variant je zjevně vyšší rychlostní konstanta asociace dimeru, zatímco rychlostní konstanty disociace se od S-variant příliš neliší. Je tedy pravděpodobné, že struktura fireman’s gripu má význam pro počáteční stadium asociace monomerů a že methylové skupiny threoninu tuto strukturu stabilizují lépe než postranní řetězce serinu. Naše závěry tedy podporují hypotézu, že volba mezi serinem a threoninem je evolučně podmíněna a souvisí s regulací aktivity příslušné proteinasy ve virové částici [36].

### **3.2. Mechanismus reakce katalyzované šikimátdehydrogenasou z kořene petržele**

V mé dosud poslední práci z oblasti enzymové kinetiky (*V. Hýsková et al., Phytochemistry. 190 (2021) 112881*) jsme se s kolegy z katedry biochemie PřF UK zabývali mechanismem syntézy kyseliny šikimové enzymem šikimátdehydrogenasou. Ta je klíčovým enzymem šikimátové dráhy, která je významnou cestou syntézy aromatických biologicky aktivních sloučenin. Jelikož se však vyskytuje jenom u bakterií, hub, rostlin a parazitů podkmene výtrusovců, ale ne u živočichů, mohou inhibitory této dráhy být používány jako antimikrobiální či herbicidní látky [39].

Cílem této práce bylo popsat mechanismus reakce katalyzované šikimátdehydrogenasou z petržele a identifikovat její přírodní inhibitory. Jedná se o dvojsubstrátovou reakci



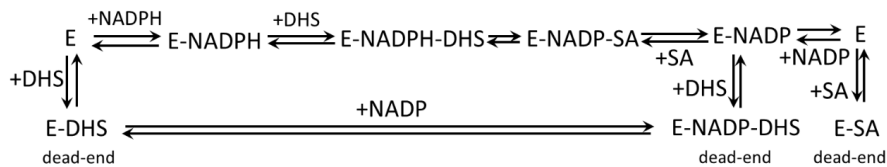
kde  $NADP^+$  je oxidovaná forma koenzymu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu,  $NADPH$  jeho forma redukováná,  $SA$  je kyselina šikimová (šikimát) a  $DHS$  její dehydrogenovaná forma (dehydrošikimát), písmena v závorkách jsou uvedena jako zjednodušující zkratky. Rovnováha reakce není výrazně posunuta ani jedním směrem. Reakce tohoto typu může obecně probíhat různými mechanismy, např. mechanismem uspořádaným (sekvenčním) nebo mechanismem typu ping-pong, ale i mnohými dalšími [40].

K identifikaci mechanismu jsme využili stanovení typu inhibicí jednotlivými reakčními produkty, a to v obou směrech. Přídavek produktu plní roli inhibitoru, je však třeba stanovit, zda se jedná o inhibici kompetitivní či nekompetitivní, případně akompetitivní. V případě inhibice kompetitivní se produkt navazuje na stejnou chemickou entitu (molekulu enzymu nebo jeho komplex s druhým substrátem) jako sledovaný substrát, v opačném případě se váže jiným způsobem. Pro náš enzym šikimátdehydrogenasu jsme získali výsledky shrnuté v tabulce 1,

Tabulka 1. Typy inhibice pro reakce jednotlivých substrátů inhibované jednotlivými produkty. C – kompetitivní inhibice, NC – nekompetitivní inhibice.

| Inhibitor                        | Q (NADP)  |     | P (SA) |     | A (NADPH) |    | B (DHS) |    |
|----------------------------------|-----------|-----|--------|-----|-----------|----|---------|----|
| Substrát s proměnnou koncentrací | NADP<br>H | DHS | NADPH  | DHS | NADP      | SA | NADP    | SA |
| Typ inhibice                     | C         | NC  | C      | NC  | C         | NC | NC      | C  |

kteří nejsou typické pro žádný popsany mechanismus. Analýzou těchto dat s využitím faktu, že reakce zleva doprava je silně inhibována substrátem B, jsme dospěli k návrhu mechanismu naznačeného na obr. 6.



Obr. 6. Reakční mechanismus oxidace kyseliny šikimové šikimátdehydrogenasou. Převzato a upraveno z V. Hýšková et al., *Phytochemistry*. 190 (2021) 112881.

Jde o uspořádaný mechanismus v obou směrech, avšak s tím, že v obou směrech mohou vznikat i komplexy enzymu a substrátů, z nichž reakce nemůže produktivně pokračovat, takže musí dojít k jejich zpětnému rozpadu. Tyto jsou celkem tři a tvoří mrtvé konce reakčního mechanismu.

V rámci práce byla dále měřena inhibice šikimátdehydrogenasy aromatickými látkami, které se mohou vyskytovat v rostlinné tkáni a sloužit jako regulátory její aktivity. Bylo zjištěno, že inhibiční efekt obecně roste s počtem hydroxylových skupin těchto molekul. Ze skupiny měřených látek byly nejlepšími inhibitory kyselina třísllová, kyselina kávová a kyselina chlorogenová.

Naše práce tedy přispívá k poznání mechanismu reakce katalyzované enzymem, který může být potenciálním cílem fungicidních a antimikrobiálních přípravků, uvedené výsledky proto mohou mít i nemalý technologický potenciál.

### **3.3. Fluorescenční substráty pro měření enzymové kinetiky rhomboidových proteinas**

Rhomboidové proteinasy (z angl. rhomboid proteinases), zkráceně též rhomboidy, jsou početnou skupinou serinových transmembránových proteinas vyskytujících se u téměř všech organismů. Od většiny ostatních proteolytických enzymů se liší tím, že jejich aktivní místo je lokalizováno v transmembránové doméně, nachází se tedy uvnitř biomembrány, na níž je enzym ukotven. Rhomboidy hrají roli především v různých signálních drahách, proto jsou často využívány jako cíle terapeutického zásahu [41]. Jelikož byly objeveny až v roce 2001, poznatky o nich nejsou dosud tak rozsáhlé jako v případě jiných skupin enzymů. Jejich výzkumem se zabývá mj. skupina Dr. Kvida Stříšovského na ÚOCHB AVČR, kde vznikla také publikace, na níž jsem měl možnost se podílet (*A. Tichá et al., J. Biol. Chem. 292 (2017) 2703–2713*).

Na rozdíl od jiných proteinas nebyly dosud pro výzkum rhomboidů navrženy vhodné nízkomolekulární peptidové substráty poskytující odezvu měřitelnou jednoduchými spektrálními metodami, tj. spektrofotometricky nebo fluorimetricky. Návrh takových substrátů je obsahem naší práce. Byl proveden na základě transmembránové sekvence běžně používaného substrátu LacYTM2. Z něj byla převzata sekvence 36 aminokyselin, přičemž štěpicí místo bylo za 11. aminokyselinou od N-konce peptidu. Na tento peptid byly potom umístěny zbytky molekul poskytujících Försterův rezonanční přenos energie (FRET), a sice fluorescenční donor EDANS a zhášeč fluorescence DABCYL. Obdobně byl navržen i substrát využívající fluorofor TAMRA (tetramethylrhodamin) a zhášeč QXL610, jejichž spektra jsou oproti původní dvojici posunuta tak, aby nedocházelo k rušení fluorescence látkami přítomnými v reakční směsi. Byly změřeny kinetické parametry štěpení těchto substrátů vybranými rhomboidy. Tato měření prokázala použitelnost obou

substrátů pro kinetická měření enzymové aktivity rhomboidů. Na základě mutačních studií štěpicího místa byl tento substrát dále upraven změnou sekvence aminokyselin v blízkosti aktivního místa. Vůči takto upravenému substrátu vykazovaly testované rhomboidy více než 50-krát vyšší aktivitu.

V rámci této práce byla studována i závislost reakční rychlosti na koncentraci amfifilní látky tvořící membránové částice (lipozomy), na nichž reakce probíhají (zde DDM, n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid). Bylo totiž pozorováno, že s rostoucí koncentrací této látky v oblasti nad kritickou micelární koncentrací (CMC) enzymová aktivita klesá. Toto se ukázalo být důsledkem rozdělení molekul enzymu a substrátu na různé lipozomy, k čemuž může dojít zejména v případě nízkých koncentrací obou látek. Tyto látky jsou navíc připraveny v zásobních roztocích rovněž na lipozomech, proto po jejich smíchání v reakční směsi musí nejdříve dojít k přechodu jejich molekul mezi lipozomy, aby byly molekuly enzymu i substrátu přítomny na společných lipozomech. Pokud je koncentrace lipozomů větší než koncentrace enzymu i substrátu, je počet lipozomů obsazených oběma partnery dán vztahem

$$n_{ESM} = \frac{n_E \cdot n_S}{n_L}, \quad (4)$$

kde  $n_E$ ,  $n_S$  a  $n_L$  jsou po řadě počty molekul enzymu, molekul substrátu a lipozomů v reakční směsi. Odtud plyne, že rychlost reakce by měla být nepřímo úměrná koncentraci lipozomů, tedy i koncentraci detergentu DDM v reakční směsi, tj.  $v \sim [DDM]^{-1}$ . Toto bylo skutečně pozorováno v oblasti vyšších koncentrací DDM (kolem 100 mM), zatímco se snižováním koncentrace se snižuje i absolutní hodnota exponentu závislosti – za koncentrace v řádu jednotek mM platilo  $v \sim [DDM]^{-0.4}$ . V této oblasti totiž už přestává platit předpoklad o nadbytku lipozomů nad biomolekulami, což vede ke zmírnění uvažované závislosti.

Získané výsledky ještě zvyrazňují vhodnost navržených substrátů pro výzkum rhomboidů, jelikož ukazují, že nejvhodnější substráty pro kinetická měření jsou takové, které lze skladovat v zásobních roztocích bez detergentů nebo s jejich velmi nízkým obsahem. Toto kritérium nové substráty splňují, neboť je lze skladovat v bezvodém dimethylsulfoxidu bez přítomnosti jakýchkoli amfifilních látek.

### **3.4. Enzymologická charakterizace rekombinantní lidské a myší serinové racemasy**

Serinová racemasa (SR) je enzym katalyzující přeměnu aminokyseliny L-serinu na D-serin [42]. Vzhledem k identické termodynamické stabilitě obou izomerů v achirálním prostředí může



reakce snadno běžet oběma směry. Zajímavý je však především směr od L-serinu k D-serinu, protože představuje biosyntézu této neproteinogenní D-aminokyseliny, která hraje roli v řadě fyziologicky významných procesů. Kromě katalýzy racemizace optických izomerů serinu katalyzuje SR také  $\beta$ -eliminaci každého z nich za vzniku opticky neaktivního pyruvátu [43]. Vzhledem k tomu, že D-serin je významným neurotransmiterem [44], je SR dlouhodobě zkoumána jako potenciální terapeutický cíl v léčbě nemocí jako mozková mrtvice nebo Alzheimerova choroba.

V práci, která vznikala ve skupině prof. Jana Konvalinky na ÚOCHB AVČR (*H.E. Hoffman et al., Protein Expr. Purif. 63 (2009) 62–67*), bylo naším cílem srovnání kinetických vlastností lidské SR (hSR) a jejího myšího ortologu (mSR), který s ní vykazuje 89 %-ní sekvenční shodu. Kromě toho byl cílem rovněž vývoj postupu exprese a purifikace rekombinantní hSR exprimované v kultuře bakterie *Escherichia coli* (*E. coli*). Expresce proteinu byla prováděna z genu optimalizovaného podle četnosti využití kodonů (codon usage) v daném organismu. Takto upravený gen nebyl v době provádění studie k dispozici, proto byl syntetizován složením ze synteticky připravených oligonukleotidů metodou polymerázového cyklického skládání (polymerase cycling assembly - PCA) [45] založené na použití metody PCR. Gen byl syntetizován ve dvou částech, tzv. syntonech, každé o délce cca 500 bp. Syntetizovaný gen byl poté vložen do plasmidu pUC19 a následně do expresního plasmidu pMPM-A4-2 s arabinosou indukovatelným promotorem *araBAD*. Samotná exprese a purifikace byla prováděna metodami převzatými z literatury.

Následně byly stanoveny kinetické konstanty  $K_m$  a  $k_{cat}$ , definované v modelu jednosubstrátové enzymové kinetiky dle Michaelise a Mentenové, pro nově připravený enzym a jejich hodnoty byly porovnány s myším ortologem SR (mSR), připraveným již dříve. Byly sledovány čtyři reakce, a to racemizace v obou směrech a  $\beta$ -eliminace obou optických izomerů serinu. Oba enzymy se shodovaly prakticky ve všech kinetických parametrech, jedinou výjimkou byla  $\beta$ -eliminace D-serinu, u níž byla myší varianta více než třikrát aktivnější. Vysvětlení tohoto rozdílu na strukturní bázi však nebylo možno provést, jelikož v té době nebyla známa krystalová struktura ani jednoho z enzymů. Vedle konstant  $K_m$  a  $k_{cat}$  byly pro oba enzymy stanoveny také konstanty inhibice  $K_i$  pro racemizaci L-serinu třemi kompetitivními inhibitory, malonátem, L-erythro-3-hydroxyaspartátem a glycinem. Bylo zjištěno, že všechny inhibitory inhibují oba enzymy a že jejich inhibiční konstanty jsou pro oba enzymy řádově srovnatelné. Pro hSR však jejich hodnoty byly vždy 2-4-krát nižší než pro mSR, vysvětlení tohoto rozdílu na strukturní úrovni však rovněž nebylo možné.

### 3.5. Další plány a perspektivy

Oblast enzymové kinetiky a chemické kinetiky obecně propojuje řadu témat v této práci uvedených. Proto je pravděpodobné, že se jí přímo či nepřímo budu věnovat i nadále. Některé z připravovaných nebo čerstvě zahájených projektů, jak už bylo zmíněno, se věnují výzkumu vlastností proteinů v makromolekulárně zahuštěném prostředí (macromolecular crowding). Této oblasti se chceme věnovat jak metodami vysokotlakými, tak také konvenčními metodami výzkumu proteinů. Rovněž předpokládáme, že v některých experimentech nám bude velmi ku prospěchu nově budovaná aparatura pro manipulaci mikroskopickými objekty metodou optických pastí, kterou plánujeme využít k řadě experimentů s proteinovými i neproteinovými makromolekulami.

## 4. VÝPOČTY ELEKTRONOVÉHO ROZPTYLU NA MOLEKULÁCH METODAMI KVANTOVÉ CHEMIE

Rozptyl elektronů na molekulách, površích pevných látek a krystalech je jednou z metod studia struktury molekul. Třebaže není využíván tak často jako rentgenová difrakce nebo NMR, patří mezi metody vhodné zejména pro studium struktury molekul absorbovaných na površích pevných látek [46], v současnosti však nabývá na významu i jako metoda studia struktury krystalů [47].

### 4.1. Výpočty účinných průřezů elastického rozptylu elektronů na molekulách

V našich dvou pracích (*M. Polášek et al., Phys. Rev. A. 61 (2000) 032701*; *M. Ingr et al., Phys. Rev. A. 62 (2000) 032703*) jsme se ve skupině prof. Petra Čárského na ÚFCH JH AVČR zabývali vývojem kvantověchemické metody pro výpočet účinných průřezů elastického elektronového rozptylu, tj. pravděpodobností rozptylu elektronu do různých směrů v závislosti na energii rozptylovaného elektronu. Výpočet byl založen na řešení Lipmannovy-Schwingerovy rovnice v bázi rovinných vln, které jsou vhodné pro popis stavu nevázaného elektronu. Jelikož jsme se zabývali rozptylem na molekulách v plynné fázi, byla výsledná hodnota účinného průřezu zprůměrována přes všechny orientace molekuly. Výpočty byly prováděny ve statické výměnné aproximaci (static exchange approximation), která vychází z modelu nezávislých elektronů, a je tedy obdobou Hartreeho-Fockovy metody pro nevázané stavy.

V první práci byl počítán elastický rozptyl na empirickém Yukawově potenciálu a na nepolárních molekulách vodíku a methanu. Tato práce potvrdila dobrou shodu s analytickým

řešením pro Yukawův potenciál a s experimentálními hodnotami účinných průřezů pro obě molekuly a tedy i její dobrou aplikovatelnost na další systémy.

Na tuto práci potom navazoval analogický výpočet na molekule vody (P12), která je polární, což způsobuje singularitu ve výpočtu elementů matice interakčního potenciálu pro rozptyl v dopředném směru. Bylo však prokázáno, že vzhledem k povaze této singularity a rozmístění mřížkových bodů v impulsovém prostoru stačí nahradit integrál dopředného rozptylu nulou a dále výpočet probíhá analogicky případu nepolární molekuly. Výpočet pak prokázal dobrou shodu mezi vypočtenými a experimentálními hodnotami účinných průřezů.

## 4.2. Výpočty parametrů rezonančního elektronového stavu na molekule $F_2$

V další práci (*M. Ingr et al., J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys. 32 (1999) L547–L556*) jsem se věnoval výpočtům rezonančního elektronového rozptylu na molekule  $F_2$ . Tento výzkum probíhal ve spolupráci s Dr. Hans-Dieterem Meyerem ze skupiny Prof. Lorenze S. Cederbauma z Univerzity v Heidelbergu. Rezonancemi nazýváme kvazivázané stavy, v nichž je dopadající elektron zachycen na dobu řádově delší, než je délka kolize elektronu s molekulou v běžném nerezonančním rozptylu. Tím vzniká útvar podobný aniontu dané molekuly, který ovšem není v čase stabilní a následně se rozpadá uvolněním elektronu. Proto pro každý rezonanční stav můžeme definovat střední dobu života, jejíž určení je cílem prováděného výpočtu společně s určením energie, za níž ke vzniku rezonančního stavu dochází. Je zjevné, že účinný průřez je pro rezonanční stav výrazně větší než pro rozptyl nerezonanční. Výpočet energie a střední doby života je možné převést na problém nalezení vlastních hodnot a vlastních funkcí Hamiltoniánu systému, jako je tomu v případě stacionárních stavů. Energie tohoto stavu je však třeba vyjádřit jako komplexní číslo, jehož imaginární část udává právě střední dobu života rezonance. K jejímu výpočtu je třeba použít speciálních metod [48,49].

V naší studii jsme použili metodu komplexních absorbujících potenciálů (CAP), což jsou ryze imaginární potenciálové funkce umožňující nám zbavit vlnovou funkci rezonančního stavu její divergující části. Výpočet byl prováděn metodou multireferenční konfigurační energie (MRCI) – tato metoda jako celek byla označena CAP/CI. Byly získány komplexní energie aniontu  $F_2^-$  v základním stavu ( $X \Sigma_u^+$ ) pro řadu mezijaderných vzdáleností v oblasti, kde se energie tohoto iontu nachází nad energií základního stavu neutrální molekuly (v opačné oblasti je klasickým vázaným stavem aniontu). Vypočítané hodnoty šířky rezonance jako funkce mezijaderné vzdálenosti byly extrapolovány k nule, čímž byl nalezen bod křížení křivek potenciální energie základních stavů aniontu a neutrální molekuly. To umožnilo správné vertikální nastavení obou křivek, které bylo

možno zkontrolovat porovnaním se známou experimentálně zjištěnou hodnotou elektronové afinity atomu fluoru. Toto srovnání poskytlo velmi dobrou shodu, která prokázala správnost použitého přístupu. Dále byly získány hodnoty energií a šířek rezonančního stavu  $X \Sigma_u^+$  aniontu  $F_2^-$  pro řadu mezijaderných vzdáleností, které jsou potřebné pro výpočet kvantové dynamiky rezonančního stavu, a tedy i simulace procesu disociativního elektronového záchytu nebo výpočty spekter vibračně excitovaného elektronového rozptylu na molekule  $F_2$ .

## 5. APLIKACE METOD POLYMERASOVÉ ŘETĚZOVÉ REAKCE (PCR) A JEJICH TEORETICKÝ POPIS

Polymerasová řetězová reakce (PCR) byla objevena v roce 1983 Kary Mullisem jako metoda mnohonásobné amplifikace vybraného úseku molekuly DNA. Její mimořádný vědecký přínos nejen že vynesl jejímu objeviteli Nobelovu cenu, ale vedl k rozšíření metody do mnoha příbuzných vědních oborů od samotného základního výzkumu v oblasti molekulární biologie, genetiky a biochemie přes metody klinické diagnostiky až po forenzní analýzy typu určování otcovství či pachatelů trestných činů [50]. Třebaže princip metody je velmi jednoduchý, vyvinula se pestrá škála jejích různých variant používaných k účelům preparativním i ke kvalitativní a kvantitativní analýze. Typické provedení metody PCR obsahuje v reakční směsi pufr umožňující aktivitu DNA polymerasy, templátovou DNA, směs čtyř deoxynukleosidtrifosfátů (dNTP), dva primery vymezující konce amplifikovaného úseku a termostabilní DNA polymerasu. Reakce probíhá ve třech cyklicky se opakujících krocích, z nichž první probíhá za vysoké teploty (94-98 °C) a dochází při něm k disociaci (nazývané též „tání“) řetězců tvořících dvojšroubovicovou molekulu DNA, druhý za teploty v rozmezí cca 50-68 °C, při němž dochází k nasedání (anealingu) primerů na komplementární sekvence templátu, a třetí za teplotního optima funkce zvolené DNA polymerasy (typicky 72 °C), při němž dochází k samotné polymerizaci nových vláken DNA enzymovou replikací vláken templátu přítomného ve směsi.

### 5.1. Enzymologický popis multitemplátové PCR

V klasickém provedení PCR je amplifikován jeden úsek DNA pomocí dvou primerů za vzniku jednoho PCR produktu. Existují však metody, kdy je v jedné reakční směsi amplifikováno více PCR produktů. Tyto mohou vznikat přepisem několika templátů pomocí stejné dvojice primerů – tato metoda se nazývá multitemplátová PCR, nebo pomocí více dvojic templátů – potom jde o multiplexovou PCR [51]. Tyto metody slouží k detekci a kvantifikaci více sekvencí DNA ve směsi,

a to včetně sekvencí málo zastoupených. Cílem naší práce bylo teoreticky popsat průběh souběžné amplifikace více templátů s ohledem na příčiny jevů narušujících správnost stanovení.

V rámci naší práce (*M. Ingr, et al., J. Theor. Biol. 382 (2015) 178–186*) jsme odvodili teoretický model amplifikace v multitemplátové PCR s platností také pro PCR multiplexovou. Popis je založen na modelu enzymové kinetiky jednosubstrátové reakce dle Michaelise a Mentenové, kde substrátem je komplex enzym primer, či přesněji replikované vlákno DNA [52]. Významným vstupním parametrem je procesivita enzymu vyjádřená formou rovnovážné konstanty mezi enzymem asociovaným se substrátem a enzymem volným. Na základě této teorie byl proveden nejen deterministický výpočet amplifikačních křivek, ale i simulace amplifikace jako náhodného procesu na jednotlivých molekulách. S jeho pomocí bylo stanoveno, jak procesivita enzymu ovlivňuje možnost přesné detekce minoritních templátů a v jakém nejmenším poměru k templátu majoritnímu lze při dané procesivitě enzymu minoritní templát detekovat. Výsledky byly následně diskutovány v kontextu různých aplikací klasické i kvantitativní PCR.

## 5.2. Metoda přímé exponenciální amplifikace a sekvenování (DEXAS)

Metoda DEXAS byla navržena koncem 90. let 20. století Kilgerem a Pääbem [53] jako vylepšení klasické Sangerovy metody sekvenace DNA [54]. Její podstata spočívá v oboustranné amplifikaci sekvenovaného úseku DNA metodou PCR se simultánní produkcí sekvenačních fragmentů. V reakční směsi tedy musí být přítomny dva primery, z nichž každý je značen odlišnou fluorescenční značkou. Reakční směs dále obsahuje složky obvyklé pro sekvenaci DNA, tj. vhodný reakční pufr, analyzovaný vzorek DNA, termostabilní DNA polymerasu, směs čtyř deoxinukleosidtrifosfátů (dNTP) a jeden zvolený dideoxinukleosidtrifosfát (ddNTP). Reakce je provedena paralelně čtyřikrát, vždy s jedním konkrétním ddNTP (tj. ddATP, ddCTP, ddGTP, nebo ddTTP). Výhodou metody oproti klasickému provedení je jednak amplifikace templátu a jednak možnost souběžné analýzy sekvence z obou stran daného úseku DNA.

Cílem naší práce (*M. Ingr, J. Konvalinka, Biol. Chem. 381 (2000) 439–445*) bylo vytvoření teoretického popisu metody DEXAS, který by umožňoval snadné nalezení některých parametrů klíčových pro optimální průběh reakce. Proto byl odvozen teoretický model, který při znalosti poměru afinit enzymu k nukleotidům a počtu cyklů umožňuje určit optimální poměr dNTP a ddNTP. Výpočet byl dále rozšířen i na variantu se dvěma různými enzymy lišícími se schopností začleňovat ddNTP do řetězce. Vedle toho byl posouzen také vliv účinnosti enzymové amplifikace na rovnoměrnost množství fragmentů jednotlivých délek a vliv chybové frekvence dané DNA polymerasy na možné znečištění signálu fragmenty vzniklými v důsledku vnesených mutací.

Nakonec byl navržen algoritmický postup, jak správně určit parametry PCR amplifikace v metodě DEXAS, tj. zejména poměr dNTP a ddNTP, poměr použitých DNA polymeras a počet cyklů reakce, aby bylo dosaženo optimálního výtěžku sekvenačních fragmentů.

V následujících letech však došlo k velmi bouřlivému rozvoji sekvenačních metod a zejména k rozšíření kapilárních sekvenátorů využívajících čtyřbarevnou fluorescenční detekci fragmentů značených nikoli na primerech, ale reakčních terminátorech [55], jakož i k prudkému rozvoji sekvenačních metod „nové generace“ (Next-Generation sequencing, NGS). Výhody přinášené metodou DEXAS se tím bohužel staly nevýznamnými. Přesto byl DEXAS ve své době zajímavou myšlenkou a teoretické zpracování jeho popisu se jevílo jako smysluplný příspěvek k rozvoji sekvenačních metod.

### **5.3. Degradace polyvinylalkoholu za denitrifikujících podmínek**

Polyvinylalkohol (PVA) je ve vodě rozpustný polymer s širokým využitím ve výrobcích běžné denní potřeby, v nichž je využíván jako zahušťovadlo, emulgátor, látka tvořící filmy či adhezivum [56]. Vzhledem k jeho roční produkci přesahující 1 Mt dochází k úniku nemalého množství tohoto polymeru do životního prostředí, zejména v odpadních vodách. Naopak příznivou skutečností je, že PVA je biodegradabilní prostřednictvím některých druhů bakterií a hub [57]. Biodegradací procesy jsou vždy založeny na enzymatické oxidaci PVA, v níž je zpravidla konečným příjemcem elektronů molekula kyslíku. V půdách, kde je kyslíku nedostatek, je však možnost degradace PVA těmito mikroorganismy značně omezená [58]. Některé předchozí práce však ukazovaly na možnost anaerobní degradace PVA, v nichž by konečným oxidačním činidlem byly dusičnanové anionty (denitrifikační podmínky) [59].

Naše práce vznikající v laboratoři prof. Marka Koutného na FT UTB ve Zlíně (*H. Marušincová et al., International Biodeterior. Biodegrad. 84 (2013) 21–28*) byla proto zaměřena na prokázání možnosti této degradace v denitrifikačních podmínkách prostřednictvím bakteriálního společenstva z čistírny odpadních vod (ČOV – vzorky byly odebrány v ČOV ve Zlíně-Malenovicích) a identifikaci nalezeného bakteriálního druhu, který tuto degradaci způsobuje.

Bakteriální kulturou odebranou z ČOV bylo zaočkováno minerální médium, v němž jedinou látkou obsahující uhlík byl právě PVA, a tato kultura byla kultivována za aerobních i anaerobních podmínek v přítomnosti i bez přítomnosti dusičnanů. Experimenty prokázaly, že v anaerobních podmínkách je PVA oxidován právě na úkor redukce dusičnanových aniontů. Následně jsme provedli sérii experimentů s cílem najít bakteriální druh, který degradaci PVA v denitrifikačních podmínkách způsobuje. Nejdříve byla provedena analýza genu 16S rRNA metodou TGGE

(temperature-gradient gel electrophoresis) [60]. Z pokusu vyplynulo, že během kultivace v kultuře výrazně roste zastoupení bakterie rodu *Steroidobacter*, která proto byla označena za pravděpodobného původce degradace. Její přítomnost v kultuře byla následně prokázána sekvenací genu 16S rRNA amplifikovaného PCR z narostlé bakteriální kultury. Přímý vztah této bakterie k degradaci PVA v denitrifikačních podmínkách byl dále prokázán stanovením jejího zastoupení v bakteriální kultuře v různých dnech od začátku kultivace metodou kvantitativní PCR (qPCR), která byla provedena paralelně se dvěma dvojicemi primerů. První dvojice nasedala na konzervativní sekvence genu 16S rRNA, které jsou společné všem bakteriím, zatímco druhá nasedala do hypervariabilní sekvence specifické pro hledanou bakterii. Standardem byl v obou případech plazmid pUC19 nesoucí dříve zaklonovaný gen 16S rRNA bakterie *Steroidobacter* ZUMI 37, templátem byla DNA izolovaná z bakteriální kultury v různých dnech kultivace. Touto metodou bylo zjištěno, že zastoupení sledované bakterie rostlo v průběhu kultivace z cca 0,02 % na začátku až k cca 16 % na konci kultivace. Výsledek tedy jasně prokázal souvislost bakterie *Steroidobacter* ZUMI 37 s degradací PVA v denitrifikačních podmínkách, proto ji lze prohlásit za hledaný degradující mikroorganismus. Třebaže se bakteriální kmen nepodařilo vypěstovat v čisté kultuře, což může být důsledkem nutné symbiózy s jinými bakteriemi, má výsledek potenciální význam pro využití v technologiích cílících na odstraňování PVA z životního prostředí, zejména v čištění odpadních vod.

#### **5.4. Příprava apo-cytochromu b rekombinantní expresí v *E. coli***

Cytochrom b<sub>5</sub> (dále jen b<sub>5</sub>) je malý hemoprotein o relativní molekulové hmotnosti cca 17 kDa, který je schopen přenášet jednotlivé elektrony v enzymově katalyzovaných biochemických reakcích [61]. V buňkách savců je b<sub>5</sub> přítomen ve třech isoformách vyskytujících se v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a cytoplazmě erytrocytů [62]. Retikulární forma je složena z N-terminální domény obsahující místo pro vazbu hemu a menší hydrofobní C-terminální domény odpovědné za fixaci b<sub>5</sub> na membráně [63]. Tato doména je klíčová pro interakci b<sub>5</sub> s dalšími membránovými proteiny, zejména cytochromem P450 (CYP). Aby mohl být b<sub>5</sub> aktivním přenašečem elektronů v redoxních reakcích, musí obsahovat hem jako redoxní kofaktor. Takový protein se potom označuje jako holo-protein, v tomto případě holo-b<sub>5</sub>. Funkce holo-b<sub>5</sub> spočívá ve stimulaci aktivity CYP, třebaže některé experimenty ukázaly i opačný efekt [64]. Jiné ukazují, že b<sub>5</sub> je schopen stimulovat aktivitu CYP i jako apo-protein (apo-b<sub>5</sub>), tj. bez přítomnosti hemového kofaktoru [65]. Pro výzkum těchto reakcí je proto nezbytné mít k dispozici i apo-b<sub>5</sub> ve formě čistého proteinu, na jehož přípravu heterologní expresí v bakteriích *Escherichia coli* jsme se zaměřili v naší

studii (V. Kotrbová *et al.*, *Protein Expr. Purif.* 66 (2009) 203–209). Práce probíhala na katedře biochemie PřF UK ve skupině prof. Marie Stiborové.

Gen proteinu byl připraven syntézou z chemicky syntetizovaných oligonukleotidů metodou polymerase cycling assembly (PCA) [45]. Syntetizovaný gen byl dále vložen do expresního plazmidu pET22b a byl exprimován v buňkách *E. coli* BL21(DE3) Gold. Protože po ultrazvukové destrukci buněk se protein apo-b5 nacházel na fragmentech biologických membrán, byl buněčný lyzátní odštěněn na preparativní ultracentrifuze a protein byl izolován z rozpuštěného sedimentu dvěma iotoměničovými chromatografiemi. Preparát byl následně zbaven detergentů dialýzou a byl zahuštěn pomocí centrifugační ultrafiltrační cely Amicon.

Izolovaný protein byl dále charakterizován spektrofotometricky a kineticky aby bylo prokázáno, že jde o apo-formu a že po rekonstituci s hemem je protein biologicky aktivní. Nakonec byl zkoumán vliv rekombinantního b5 na aktivaci oxidace barviva Sudan I lidským CYP3A4, a to jak v holo-, tak v apo-formě. Rekombinantní preparát v holo-formě zesiloval oxidační účinek CYP3A4 prakticky stejně jako kontrolní vzorky králíčího a lidského holo-b5, což opět prokazovalo správnou funkci rekombinantně připraveného proteinu. Navíc bylo zjištěno, že i sama apo-forma zvýšila úroveň oxidace, byť významně méně než holo-b5. To potvrzuje správnost teorie předpokládající alosterický vliv apo-b5 na funkci CYP3A4 [65]. Byla tedy prokázána vysoká biologická aktivita rekombinantního preparátu ve všech zkoumaných vlastnostech, což poskytlo možnost využívat tento protein k dalším výzkumům biochemických redoxních reakcí, jichž se účastní.

## **6. OSTATNÍ PUBLIKOVANÉ PRÁCE**

### **6.1. Inhibice produkce bioplynu produkty degradace biomasy**

Produkce bioplynu anaerobní fermentací biomasy je ekonomicky schůdnou alternativou ke spotřebě fosilních paliv, která navíc může jako surovinu využívat odpadní produkty různých průmyslových a zemědělských procesů. Rostlinná biomasa je tvořena především celulosou, hemicelulosou a ligninem, které tvoří komplexní matici odolnou proti biotické i abiotické degradaci [66]. Vzhledem k tomu je biomasa před samotným použitím k produkci bioplynu upravována tak, aby se co nejvíce rozvolnila její struktura. Běžnou metodou těchto úprav je metoda parní exploze [67], kdy je biomasa po stanovený čas zahřívána ve speciálním kanálu za vysokého tlaku externě dodávanou párou, aby po následném prudkém snížení tlaku na konci kanálu došlo k jejímu rozmělnění. Možným problémem tohoto postupu je vznik nízkomolekulárních vedlejších produktů,



kteře mohou následně inhibovat proces samotné produkce methanu, jenž je klíčovou složkou bioplynu.

Naše práce, která vznikala v laboratoři prof. Marka Koutného na FT UTB ve Zlíně (*S. Pekařová et al., BioResources 12 (2017) 2421–2432*), se zabývala studiem vlivu některých takových látek na produkci methanu bakteriálním společenstvem pocházejícím z digestátu biomasy z bioplynového produkčního zařízení z Českých Budějovic. Jako zdroj uhlíku byly použity dva umělé substráty, celulóza a acetát. Jako inhibující látky byly testovány furfural, 5-hydroxymethylfurfural, kyselina gallová a kyselina třísllová.

Z testovaných látek vykazoval významnější inhibiční efekt pouze 5-hydroxymethylfurfural, v koncentracích dosažitelných v bioplynovém reaktoru však ani on nepředstavuje pro proces výrazný problém. Lze proto konstatovat, že žádná ze zkoumaných látek nepředstavuje technologické riziko pro produkci methanu z biomasy po předchozí úpravě metodou parní exploze.

## 6.2. *Ab initio* výpočty substituentových konstant pro metodu QSAR

Konceptem QSAR (quantitative structure-activity relationship – modely kvantitativní závislosti aktivity na struktuře) se rozumí soubor pravidel a výpočetních postupů sloužících k predikci chemických a biologických vlastností sloučenin, především organických, na základě znalosti jejich struktury a veličin (deskriptorů) z ní přímo odvoditelných [68]. Je znám a rozvíjen po dobu více než 55 let a v dnešní době je tvořen širokou škálou různých výpočetních metod.

Součástí QSAR je také posouzení vlivu konkrétního substituentu na vlastnosti dané molekuly. Tento vliv je do QSAR promítnut skrze odlišné hodnoty vhodně zvolených deskriptorů, v našem případě konstant charakterizujících jednotlivé dílčí vlivy, kterými substituent působí na sloučeninu, na niž je vázán. Pro kvantitativní posouzení těchto vlivů substituentů na zvolenou vlastnost  $y$  uvažované sloučeniny byla navržena rovnice [69]

$$y = y_0 + \rho_F \sigma_F + \rho_R \sigma_R + \rho_\alpha \sigma_\alpha + \rho_\chi \sigma_\chi + \varepsilon. \quad (5)$$

Zde  $y_0$  značí hodnotu dané veličiny pro nesubstituovanou molekulu, parametry  $\rho$  jsou rozvojovými konstantami udávajícími vliv příspěvků dle jednotlivých forem působení substituentu na molekulu a konstanty  $\sigma$  jsou charakteristikami jednotlivých substituentů. Veličina  $\varepsilon$  zahrnuje ostatní nespécifikované vlivy. Index  $F$  označuje vliv indukčního efektu substituentu (field-inductive),  $R$  efektu rezonančního (mezomerního),  $\alpha$  vliv polarizace molekuly v důsledku přítomnosti substituentu a  $\chi$  vliv jeho elektronegativity (tento vliv je nejméně významný a také nejméně rigorózně definovatelný).

Naše publikace (*O. Exner et al., Theochem-J. Mol. Struct. 397 (1997) 231–238*) byla zaměřena na výpočty hodnot jednotlivých konstant *ab initio* metodami kvantové chemie na základě modelů navržených dříve Marriottem a Topsomem [70,71]. Byla realizována ve skupině prof. Petra Čárského na ÚFCH JH AVČR pod vedením prof. Otto Exnera z ÚOCHB AVČR. Cílem práce bylo jednak přepočítání dříve vypočtených konstant ve větších bázích atomových orbitalů, jednak stanovení konstant příslušejících dosud nezkoumaným substituentům. Kromě toho byl posuzován vliv konformace na hodnotu konstanty, pokud u daného substituentu více konformací přichází v úvahu.

Naše výpočty poskytly upřesněné hodnoty všech konstant a ukázaly, že hodnoty vypočtené se od experimentálních neliší v průměru více, než se liší jednotlivé sady experimentálních hodnot mezi sebou navzájem. Srovnání hodnot konstant pro *E* a *Z* konformery jednotlivých substituentů ukázalo významný vliv na hodnoty konstant, zejména na  $\sigma_F$ , v některých případech i  $\sigma_a$ . Proto lze očekávat prokazatelný vliv konformace na vlastnosti molekul. Bohužel však pro tyto výpočty nebylo k dispozici relevantní srovnání s experimentem, uváděné experimentální hodnoty jsou bližší četněji zastoupené konformaci *Z*. I přesto však lze konstatovat, že *ab initio* výpočty představují rozumnou cestu získání hodnot konstant i pro substituenty, pro které experimentální provedení není k dispozici nebo není snadno proveditelné.

### 6.3. *Ab initio* výpočty hyperplochy potenciální energie radikálového kationtu $C_4H_6^+$

Reakce ve zkřížených molekulových paprscích jsou významnou experimentální technikou sloužící ke studiu reakční dynamiky elementárních chemických reakcí, jejíž přínos byl oceněn Nobelovou cenou za chemii roku 1986 (Herschbach, Lee). Je založena na kolizi dvou paprsků tvořených vysoce urychlenými molekulami, které v důsledku srážek reagují za vzniku různých meziproductů a následně konečných produktů. Ty poté letí v různých směrech vzhledem ke směřům vstupujících paprsků, kde také mohou být detekovány a může být měřena jejich energie [72]. Použití těchto metod umožňuje mimo jiné i výzkum reakčních mechanismů reakcí radikálových kationtů, kterému se věnovala laboratoř prof. Zdeňka Hermana na ÚFCH JH AVČR. V návaznosti na to jsme ve skupině prof. Petra Čárského prováděli kvantověchemické výpočty kladoucí si za cíl vysvětlení vzájemných přeměn jednotlivých meziproductů těchto reakcí. Výzkum byl prováděn ve spolupráci se skupinou prof. Thomase Ballyho z Univerzity ve Fribourgu ve Švýcarsku. V rámci tohoto projektu vznikla i naše publikace (*V. Hrouda et al., J. Phys. Chem. A 102 (1998) 9297–9307*).

Radikálový kationt  $C_4H_6^+$  vzniká jako produkt srážky molekul acetyleny a ethylenu, z nichž jedna je v ionizovaném stavu, tedy postrádá jeden elektron. K jeho vzniku dochází v experimentech ve zkřížených molekulových paprscích, vzhledem k jeho nízké stabilitě však dochází k rozkladu na různé fragmenty, které jsou následně detekovány. Mezi reaktanty a konečnými produkty však leží celá řada meziproductů a tranzitních stavů, přes které musí komplex  $C_4H_6^+$  projít a které tvoří složitou hyperplochu potenciální energie (HPE), na níž se systém v průběhu reakce pohybuje. Cílem této práce tedy bylo zmapovat HPE systému  $C_4H_6^+$  na několika úrovních *ab initio* výpočtů a navrhnout reakční koordinátu vedoucí od reaktantů k produktům, které byly pozorovány experimentálně [73]. Struktury ležící v minimech HPE byly navrženy intuitivně a následně optimalizovány na několika úrovních *ab initio* výpočtů. Následně byly nalezeny i struktury tranzitních stavů tato minima propojující. Energie ve stacionárních bodech byla následně ještě přepočítána metodou RCCSD(T) poskytující přesnější hodnoty rozdílů energií jednotlivých stavů.

Výsledek naší kvantověchemické studie se shoduje s experimentálním pozorováním, přičemž navíc propojuje reaktanty a produkty reakční koordinátou vysvětlující mechanismus studované chemické reakce.

## ZÁVĚR

Předkládaná habilitační práce je sestavena z výsledků získaných v období 1997-2021. Obsahuje výsledky různých studií experimentálních i teoretických, které se vždy věnují výzkumu fyzikálních vlastností molekul, byť v rámci několika různých výzkumných směrů. Nejstarší z těchto prací se věnují vesměs molekulám izolovaným, pozdější práce se však týkají molekul v roztoku, a právě zde je vždy možné pozorovat zásadní vliv vnějšího prostředí na jejich chování. Poslední práce se proto věnují právě tomuto fenoménu na příkladu biotechnologicky atraktivní molekuly kyseliny hyaluronové. Vzhledem k značnému rozvoji výpočetní techniky v posledních desetiletích je v současné době možné provádět molekulárně-dynamické simulace relativně velkých systémů, které umožňují zkoumat nejen strukturu a konformaci hlavní studované molekuly, ale i rozložení molekul rozpouštědla, případně dalších látek v prostředí přítomných. Jde vesměs o jevy, které jsou experimentálně těžko měřitelné, proto je pro jejich pochopení přínos výpočetní chemie nezastupitelný. Výsledky zahrnuté do této práce vysvětlují, jak roztoky solí a vybraná směsná rozpouštědla ovlivňují experimentálně pozorovatelné vlastnosti molekul kyseliny hyaluronové. Tím také ukazují, že vysvětlení molekulární podstaty experimentálních pozorování na základě analýzy simulovaných systémů je perspektivní cestou zkoumání vlivu prostředí na biomakromolekuly. Proto

je tento přístup hlavní náplní práce mojí výzkumné skupiny, který se svými kolegy hodlám i nadále rozvíjet.

Zkoumání vlivu externích podmínek bylo obsaženo i v dalších publikovaných pracích včnujících se vlivu vysokého tlaku na molekuly oligomerních proteinů. Vysokotlaká metodika byla úspěšně aplikována na popis rovnováhy dimerizace, unfoldingu i enzymové kinetiky HIV-1 proteinasy a naznačila možnosti aplikace na další typy systémů.

Vliv prostředí hrál zásadní roli i v dalších uvedených pracích z oblasti enzymové kinetiky, byť nebyl přímo předmětem zkoumání. V budoucnu proto plánujeme zaměřit se i experimentálně na vliv prostředí na proteinové molekuly, především na vliv makromolekulárně zahuštěného prostředí simulujícího podmínky v buněčné cytoplazmě.

## PŘEHLED LITERATURY

- [1] D. Jiang, J. Liang, P.W. Noble, Hyaluronan in Tissue Injury and Repair, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23 (2007) 435–461. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123337>.
- [2] K.N. How, W.H. Yap, C.L.H. Lim, B.H. Goh, Z.W. Lai, Hyaluronic Acid-Mediated Drug Delivery System Targeting for Inflammatory Skin Diseases: A Mini Review, *Front. Pharmacol.* 11 (2020) 1105. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01105>.
- [3] D.D. Allison, K.J. Grande-Allen, Review. Hyaluronan: a powerful tissue engineering tool, *Tissue Eng.* 12 (2006) 2131–2140. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2131>.
- [4] R. Mendichi, L. Soltés, A. Giacometti Schieron, Evaluation of radius of gyration and intrinsic viscosity molar mass dependence and stiffness of hyaluronan, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1805–1810. <https://doi.org/10.1021/bm0342178>.
- [5] K. Hayashi, K. Tsutsumi, F. Nakajima, T. Norisuye, A. Teramoto, Chain-stiffness and excluded-volume effects in solutions of sodium hyaluronate at high ionic strength, *Macromolecules.* 28 (1995) 3824–3830. <https://doi.org/10.1021/ma00115a012>.
- [6] E. Fouissac, M. Milas, M. Rinaudo, R. Borsali, Influence of the ionic strength on the dimensions of sodium hyaluronate, *Macromolecules.* 25 (1992) 5613–5617. <https://doi.org/10.1021/ma00047a009>.
- [7] E. Buhler, F. Boué, Chain Persistence Length and Structure in Hyaluronan Solutions: Ionic Strength Dependence for a Model Semirigid Polyelectrolyte, *Macromolecules.* 37 (2004) 1600–1610. <https://doi.org/10.1021/ma0215520>.
- [8] G.A. Sorci, W.F. Reed, Effect of Valence and Chemical Species of Added Electrolyte on Polyelectrolyte Conformations and Interactions, *Macromolecules.* 37 (2004) 554–565. <https://doi.org/10.1021/ma035551z>.
- [9] G. Huerta-Ángeles, M. Brandejsová, K. Kopecká, F. Ondreáš, T. Medek, O. Židek, J. Kulhánek, H. Vagnerová, V. Velebný, Synthesis and Physicochemical Characterization of Undecylenic Acid Grafted to Hyaluronan for Encapsulation of Antioxidants and Chemical Crosslinking, *Polymers.* 12 (2020) 35. <https://doi.org/10.3390/polym12010035>.
- [10] O. Štrympl, J. Vohlídal, M. Hermannová, M. Maldonado-Domínguez, M. Brandejsová, K. Kopecká, V. Velebný, G. Huerta-Ángeles, Oleate-modified hyaluronan: Controlling the number and distribution of side chains by varying the reaction conditions, *Carbohydr. Polym.* 267 (2021) 118197. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.118197>.

- [11] J.E. Scott, F. Heatley, Biological Properties of Hyaluronan in Aqueous Solution Are Controlled and Sequestered by Reversible Tertiary Structures, Defined by NMR Spectroscopy, *Biomacromolecules*. 3 (2002) 547–553. <https://doi.org/10.1021/bm010170j>.
- [12] C.D. Blundell, P.L. DeAngelis, A. Almond, Hyaluronan: the absence of amide–carboxylate hydrogen bonds and the chain conformation in aqueous solution are incompatible with stable secondary and tertiary structure models, *Biochem. J.* 396 (2006) 487–498. <https://doi.org/10.1042/BJ20060085>.
- [13] W.M. Payne, D. Svehkarev, A. Kyrychenko, A.M. Mohs, The role of hydrophobic modification on hyaluronic acid dynamics and self-assembly, *Carbohydr. Polym.* 182 (2018) 132–141. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.10.054>.
- [14] U.R. Shrestha, D. Bhowmik, J.R.D. Copley, M. Tyagi, J.B. Leão, X.-Q. Chu, Effects of pressure on the dynamics of an oligomeric protein from deep-sea hyperthermophile, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112 (2015) 13886–13891. <https://doi.org/10.1073/pnas.1514478112>.
- [15] C.A. Royer, Application of pressure to biochemical equilibria: the other thermodynamic variable, *Meth. Enzymol.* 259 (1995) 357–377. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)59052-8](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)59052-8).
- [16] M.J. Kornblatt, R. Lange, C. Balny, Use of hydrostatic pressure to produce “native” monomers of yeast enolase, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 3897–3904. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04326.x>.
- [17] K. Ruan, G. Weber, Physical heterogeneity of muscle glycogen phosphorylase revealed by hydrostatic pressure dissociation, *Biochemistry*. 32 (1993) 6295–6301. <https://doi.org/10.1021/bi00075a025>.
- [18] D. Foguel, G. Weber, Pressure-induced Dissociation and Denaturation of Allophycocyanin at Subzero Temperatures, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 28759–28766. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.48.28759>.
- [19] J.L. Silva, D. Foguel, A.T. DaPoian, P.E. Prevelige, The use of hydrostatic pressure as a tool to study viruses and other macromolecular assemblages, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6 (1996) 166–175. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(96\)80071-6](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(96)80071-6).
- [20] A.T. Da Poian, A.C. Oliveira, L.P. Gaspar, J.L. Silva, G. Weber, Reversible Pressure Dissociation of R17 Bacteriophage: The Physical Individuality of Virus Particles, *J. Mol. Biol.* 231 (1993) 999–1008. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1347>.
- [21] J. Torrent, R. Lange, H. Rezaei, The Volumetric Diversity of Misfolded Prion Protein Oligomers Revealed by Pressure Dissociation, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 20417–20426. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661710>.
- [22] P. Messier, C. Seguin, Effects of High Hydrostatic-Pressure on Microfilaments and Microtubules, *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 44 (1978) 281–295.
- [23] R. Gebhardt, W. Doster, J. Friedrich, W. Petry, A. Schulte, Pressure-induced critical association of myoglobin, Springer-Verlag Berlin, Berlin, 2003.
- [24] J. Torrent, J.P. Connelly, M.G. Coll, M. Ribó, R. Lange, M. Vilanova, Pressure versus heat-induced unfolding of ribonuclease A: the case of hydrophobic interactions within a chain-folding initiation site, *Biochemistry*. 38 (1999) 15952–15961. <https://doi.org/10.1021/bi991460b>.
- [25] J. Font, A. Benito, R. Lange, M. Ribó, M. Vilanova, The contribution of the residues from the main hydrophobic core of ribonuclease A to its pressure-folding transition state, *Protein Sci.* 15 (2006) 1000–1009. <https://doi.org/10.1110/ps.052050306>.
- [26] G. Meier, H. Kriegs, A high pressure cell for dynamic light scattering up to 2 kbars with conservation of plane of polarization, *Rev. Sci. Instrum.* 79 (2008) 013102. <https://doi.org/10.1063/1.2827137>.

- [27] A.A. Paladini, J.L. Silva, G. Weber, Slab gel electrophoresis of oligomeric proteins under high hydrostatic pressure, *Anal. Biochem.* 161 (1987) 358–364. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90463-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90463-5).
- [28] M.D. Collins, C.U. Kim, S.M. Gruner, High-Pressure Protein Crystallography and NMR to Explore Protein Conformations, in: D.C. Rees, K.A. Dill, J.R. Williamson (Eds.), *Annual Review of Biophysics*, Vol 40, Ann. Rev. Biophys., Palo Alto, 2011: pp. 81–98.
- [29] E. Paci, High pressure simulations of biomolecules, *Biochim. Biophys. Acta-Protein Struct. Molec. Enzym.* 1595 (2002) 185–200. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(01\)00343-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(01)00343-0).
- [30] D. Xie, S. Gulnik, E. Gustchina, B. Yu, W. Shao, W. Qoronfleh, A. Nathan, J.W. Erickson, Drug resistance mutations can effect dimer stability of HIV-1 protease at neutral pH, *Protein Sci.* 8 (1999) 1702–1707. <https://doi.org/10.1110/ps.8.8.1702>.
- [31] K. Strisovsky, U. Tessmer, J. Langner, J. Konvalinka, H.G. Kräusslich, Systematic mutational analysis of the active-site threonine of HIV-1 proteinase: rethinking the “fireman’s grip” hypothesis, *Protein Sci.* 9 (2000) 1631–1641. <https://doi.org/10.1110/ps.9.9.1631>.
- [32] P.L. Darke, S.P. Jordan, D.L. Hall, J.A. Zugay, J.A. Shafer, L.C. Kuo, Dissociation and association of the HIV-1 protease dimer subunits: equilibria and rates, *Biochemistry.* 33 (1994) 98–105. <https://doi.org/10.1021/bi00167a013>.
- [33] C.A. Pargellis, M.M. Morelock, E.T. Graham, P. Kinkade, S. Pav, K. Lubbe, D. Lamarre, P.C. Anderson, Determination of kinetic rate constants for the binding of inhibitors to HIV-1 protease and for the association and dissociation of active homodimer, *Biochemistry.* 33 (1994) 12527–12534. <https://doi.org/10.1021/bi00207a021>.
- [34] M. Ingr, T. Uhlíková, K. Strisovský, E. Majerová, J. Konvalinka, Kinetics of the dimerization of retroviral proteases: the “fireman’s grip” and dimerization, *Protein Sci.* 12 (2003) 2173–2182. <https://doi.org/10.1110/ps.03171903>.
- [35] R. Ishima, D.A. Torchia, J.M. Louis, Mutational and structural studies aimed at characterizing the monomer of HIV-1 protease and its precursor, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 17190–17199. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701304200>.
- [36] H.G. Kräusslich, Human immunodeficiency virus proteinase dimer as component of the viral polyprotein prevents particle assembly and viral infectivity., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 88 (1991) 3213–3217.
- [37] J. Konvalinka, M.A. Litterst, R. Welker, H. Kottler, F. Rippmann, A.M. Heuser, H.G. Kräusslich, An active-site mutation in the human immunodeficiency virus type 1 proteinase (PR) causes reduced PR activity and loss of PR-mediated cytotoxicity without apparent effect on virus maturation and infectivity, *J Virol.* 69 (1995) 7180–7186. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.7180-7186.1995>.
- [38] G. Arad, M. Chorev, A. Shtorch, A. Goldblum, M. Kotler, Point mutation in avian sarcoma leukaemia virus protease which increases its activity but impairs infectious virus production, *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 8) (1995) 1917–1925. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-8-1917>.
- [39] Y. Carrington, J. Guo, C.H. Le, A. Fillo, J. Kwon, L.T. Tran, J. Ehling, Evolution of a secondary metabolic pathway from primary metabolism: shikimate and quinate biosynthesis in plants, *Plant J.* (2018). <https://doi.org/10.1111/tbj.13990>.
- [40] D.L. Purich, *Enzyme Kinetics: Catalysis and Control: A Reference of Theory and Best-Practice Methods*, 1st edition, Elsevier, Amsterdam, 2010.
- [41] K. Strisovsky, Why cells need intramembrane proteases - a mechanistic perspective, *FEBS J.* 283 (2016) 1837–1845. <https://doi.org/10.1111/febs.13638>.
- [42] H. Wolosker, S. Blackshaw, S.H. Snyder, Serine racemase: a glial enzyme synthesizing D-serine to regulate glutamate-N-methyl-D-aspartate neurotransmission, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 96 (1999) 13409–13414. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.23.13409>.

- [43] K. Stríšovský, J. Jirásková, C. Barinka, P. Majer, C. Rojas, B.S. Slusher, J. Konvalinka, Mouse brain serine racemase catalyzes specific elimination of L-serine to pyruvate, *FEBS Lett.* 535 (2003) 44–48. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(02\)03855-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(02)03855-3).
- [44] H. Wolosker, E. Dumin, L. Balan, V.N. Foltyn, D-amino acids in the brain: D-serine in neurotransmission and neurodegeneration, *FEBS J.* 275 (2008) 3514–3526. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06515.x>.
- [45] H.O. Smith, C.A. Hutchison, C. Pfannkoch, J.C. Venter, Generating a synthetic genome by whole genome assembly:  $\phi$ X174 bacteriophage from synthetic oligonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100 (2003) 15440–15445. <https://doi.org/10.1073/pnas.2237126100>.
- [46] F. Jona, J.A. Strozier, W.S. Yang, Low-energy electron diffraction for surface structure analysis, *Rep. Prog. Phys.* 45 (1982) 527–585. <https://doi.org/10.1088/0034-4885/45/5/002>.
- [47] T. Gruene, E. Mugnaioli, 3D Electron Diffraction for Chemical Analysis: Instrumentation Developments and Innovative Applications, *Chem. Rev.* 121 (2021) 11823–11834. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00207>.
- [48] H. Feshbach, Unified theory of nuclear reactions, *Ann. Phys.* 5 (1958) 357–390. [https://doi.org/10.1016/0003-4916\(58\)90007-1](https://doi.org/10.1016/0003-4916(58)90007-1).
- [49] A.U. Hazi, H.S. Taylor, Stabilization Method of Calculating Resonance Energies: Model Problem, *Phys. Rev. A.* 1 (1970) 1109–1120. <https://doi.org/10.1103/PhysRevA.1.1109>.
- [50] L. Garibyan, N. Avashia, Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR), *J. Invest. Dermatol.* 133 (2013) e6. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- [51] E. Kalle, M. Kubista, C. Rensing, Multi-template polymerase chain reaction, *Biomol. Detect. Quantif.* 2 (2014) 11–29. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2014.11.002>.
- [52] S. Schnell, C. Mendoza, Theoretical description of the polymerase chain reaction, *J. Theor. Biol.* 188 (1997) 313–318. <https://doi.org/10.1006/jtbi.1997.0473>.
- [53] C. Kilger, S. Pääbo, Direct exponential amplification and sequencing (DEXAS) of genomic DNA, *Biol. Chem.* 378 (1997) 99–105. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.2.99>.
- [54] F. Sanger, S. Nicklen, A.R. Coulson, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74 (1977) 5463–5467. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.74.12.5463>.
- [55] M.L. Metzker, Emerging technologies in DNA sequencing, *Genome Res.* 15 (2005) 1767–1776. <https://doi.org/10.1101/gr.3770505>.
- [56] N.B. Halima, Poly(vinyl alcohol): review of its promising applications and insights into biodegradation, *RSC Adv.* 6 (2016) 39823–39832. <https://doi.org/10.1039/C6RA05742J>.
- [57] F. Kawai, X. Hu, Biochemistry of microbial polyvinyl alcohol degradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84 (2009) 227–237. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2113-6>.
- [58] E. Chiellini, A. Corti, S. D’Antone, R. Solaro, Biodegradation of poly (vinyl alcohol) based materials, *Prog. Polym. Sci.* 28 (2003) 963–1014. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(02\)00149-1](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(02)00149-1).
- [59] J. Hrnčířík, J. Pšejka, J. Kupec, S. Bernkopfová, Anaerobic Biodegradation of Polyvinyl Alcohol Modified by Extracellular Polysaccharides, *J. Polym. Environ.* 18 (2010) 98–103. <https://doi.org/10.1007/s10924-010-0180-5>.
- [60] V. Víglašky, Polyacrylamide temperature gradient gel electrophoresis, *Methods Mol. Biol.* 1054 (2013) 159–171. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-565-1\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-565-1_10).
- [61] T.D. Porter, The roles of cytochrome b5 in cytochrome P450 reactions, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 16 (2002) 311–316. <https://doi.org/10.1002/jbt.10052>.
- [62] G. Vergères, L. Waskell, Cytochrome b5, its functions, structure and membrane topology, *Biochimie.* 77 (1995) 604–620. [https://doi.org/10.1016/0300-9084\(96\)88176-4](https://doi.org/10.1016/0300-9084(96)88176-4).
- [63] T.A. Clarke, S.-C. Im, A. Bidwai, L. Waskell, The role of the length and sequence of the linker domain of cytochrome b5 in stimulating cytochrome P450 2B4 catalysis, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36809–36818. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406055200>.

- [64] J.B. Schenkman, I. Jansson, The many roles of cytochrome b5, *Pharmacol. Ther.* 97 (2003) 139–152. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00327-3](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00327-3).
- [65] H. Yamazaki, M. Nakamura, T. Komatsu, K. Ohyama, N. Hatanaka, S. Asahi, N. Shimada, F.P. Guengerich, T. Shimada, M. Nakajima, T. Yokoi, Roles of NADPH-P450 Reductase and Apo- and Holo-Cytochrome b5 on Xenobiotic Oxidations Catalyzed by 12 Recombinant Human Cytochrome P450s Expressed in Membranes of *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.* 24 (2002) 329–337. <https://doi.org/10.1006/prep.2001.1578>.
- [66] W.S. Adney, C.J. Rivard, M. Shiang, M.E. Himmel, Anaerobic digestion of lignocellulosic biomass and wastes - Cellulases and related enzymes, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 30 (1991) 165–183. <https://doi.org/10.1007/BF02921684>.
- [67] F.R. Amin, H. Khalid, H. Zhang, S. u. Rahman, R. Zhang, G. Liu, C. Chen, Pretreatment methods of lignocellulosic biomass for anaerobic digestion, *AMB Express.* 7 (2017) 72. <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0375-4>.
- [68] E.N. Muratov, J. Bajorath, R.P. Sheridan, I.V. Tetko, D. Filimonov, V. Poroikov, T.I. Oprea, I.I. Baskin, A. Varnek, A. Roitberg, O. Isayev, S. Curtalolo, D. Fourches, Y. Cohen, A. Aspuru-Guzik, D.A. Winkler, D. Agrafiotis, A. Cherkasov, A. Tropsha, QSAR without borders, *Chem. Soc. Rev.* 49 (2020) 3525–3564. <https://doi.org/10.1039/D0CS00098A>.
- [69] R.W. Taft, R.D. Topsom, The Nature and Analysis of Substituent Electronic Effects, in: *Progress in Physical Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 1987: pp. 1–83. <https://doi.org/10.1002/9780470171950.ch1>.
- [70] R.D. Topsom, Some Theoretical Studies of Electronic Substituent Effects in Organic Chemistry, in: *Progress in Physical Organic Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 1987: pp. 125–191. <https://doi.org/10.1002/9780470171950.ch3>.
- [71] S. Marriott, W.F. Reynolds, R.W. Taft, R.D. Topsom, Substituent electronegativity parameters, *J. Org. Chem.* 49 (1984) 959–965. <https://doi.org/10.1021/jo00180a002>.
- [72] N. Balucani, G. Capozza, F. Leonori, E. Segoloni, P. Casavecchia, Crossed molecular beam reactive scattering: from simple triatomic to multichannel polyatomic reactions, *Int. Rev. Phys. Chem.* 25 (2006) 109–163. <https://doi.org/10.1080/01442350600641305>.
- [73] Z. Herman, K. Birkinshaw, Reactive Scattering of Ions, *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie.* 77 (1973) 566–575. <https://doi.org/10.1002/bbpc.19730770805>.



## ABSTRAKT

Předkládaná práce je tvořena komentovaným souborem odborných publikací pokrývajících moje dosavadní výzkumné aktivity. Její první dvě části se zabývají vlivem externího prostředí na termodynamické a kinetické vlastnosti biologických makromolekul. První z nich se týká simulací oligosacharidů kyseliny hyaluronové (HA) metodou molekulové dynamiky ve vodných i nevodných prostředích a hledá vztahy mezi prostředím na jedné straně a strukturou a dynamikou molekuly HA, včetně interakcí s dalšími molekulami, na straně druhé. Druhá část obsahuje výzkum vlastností proteinů za vysokého tlaku. Obsahuje teoretickou studii vlivu tlaku na molekulu HIV-1 proteinasy, jakož i experimentální výzkum rovnováhy a kinetiky dimerizace a unfoldingu této molekuly. Zabývá se též obecným teoretickým popisem rovnováh oligomerních proteinů za vysokého tlaku. Práce je dále doplněna o další publikace, tematicky více či méně odlišné. Obsahuje studie z oboru kinetiky enzymově katalyzovaných reakcí, jedno- i dvousubstrátových, jakož i reakcí katalyzovaných membránovými proteinasami. Další část je věnována pracím zaměřeným na výpočty elektronového rozptylu na molekulách *ab initio* metodami. Následuje část věnovaná aplikacím metody polymerázové řetězové reakce (PCR) a část obsahující několik dalších publikací na různá témata.

## ABSTRACT

The presented thesis consists of a commented set of scientific publications covering my hitherto research activities. Its first two sections are concerned with the influence of external environment on the thermodynamic and kinetic properties of biological macromolecules. The first one of them presents the simulations of the oligosaccharides of hyaluronic acid (HA) by the method of molecular dynamics in both aqueous and non-aqueous environments and searches for the relations between the environment on one side and the structure and dynamics of the HA molecule, including interactions with other molecules, on the other side. The second part contains the research of the properties of proteins at high pressure. It contains a theoretical study of the pressure influence on the molecule of HIV-1 proteinase as well as an experimental research of the equilibrium and kinetics of the dimerization and unfolding of this molecule. It also contains a general theoretical description of the equilibria of oligomeric proteins under high pressure. The thesis is further supplemented by other publications on more or less different topics. It contains studies of the kinetics of enzyme-catalyzed reactions, one- and two-substrate, but also of reactions catalyzed by membrane proteinases. The next part is dedicated to the calculations of electron scattering on molecules by the *ab initio* methods. The following part contains applications of the method of polymerase chain reaction (PCR) and the last part consists of some other publications on different topics.