



**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Štěpán Jílek

Vibrační optická aktivita nukleotidů a kratších segmentů nukleových kyselin

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Profant, Ph.D.

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2021

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V dne.....

podpis

Zde bych velmi rád poděkoval mému vedoucímu dr. Profantovi za pomoc při interpretaci výsledků, věcné připomínky a zejména za čas věnovaný finalizaci této práce. Dále bych chtěl poděkovat konzultantovi, dr. Mojzešovi za poznatky pro přípravu a měření G-tetrád a dr. Kapitánovi za umožnění změření kvalitních ROA spekter vzorků. Obrovský dík patří mé přítelkyni Nikole a celé mé rodině, kteří mi byli velkou psychickou oporou v nelehké době, kdy tato práce vznikala a bez kterých si nedokážu představit vznik této diplomové práci. Moc děkuji.

Název práce: Vibrační optická aktivita nukleotidů a kratších segmentů nukleových kyselin

Autor: Bc. Štěpán Jílek

Katedra: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Václav Profant, Ph.D., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Nukleotidy jsou organické molekuly, které mají široké spektrum funkcí v živých organismech. Účastní se biologické signalizace, slouží jako kofaktory enzymatických reakcí, hrají ústřední roli v buněčném metabolismu a jsou základními monomerními jednotkami polymerů nukleových kyselin. Nukleotidy se skládají ze tří podjednotek – dusíkaté nukleobáze, pětiuhlíkatého cukru (ribosy či 2'-deoxyribosy) a fosfátové skupiny obsahující jeden až tři fosfáty. Předmětem této diplomové práce je studium různých nukleotidů a jejich samouspořádání ve vodním roztoku prostřednictvím metod vibrační spektroskopie – Ramanova rozptylu a jeho chirálně citlivé varianty, Ramanovy optické aktivity. Ta má potenciál přinést nové zajímavé informace o strukturním uspořádání, dynamice a interakcích těchto molekul, neboť je oproti Ramanovu rozptylu citlivější k vibračním cukerné části nukleotidů, na které jsou tři až čtyři chirální uhlíky. Studovali jsme spektrální projevy spojené s chemickými modifikacemi (rozdíl mezi ribo- a deoxyribonukleotidy, vliv různé polohy fosfátu) i se změnou fyzikálních podmínek (různé nábojové stavy vyvolané změnou pH, vliv koncentrace, vliv iontů). Značná část práce je věnována studiu samoasociace purinových nukleotidů – adenosin-5'-monofosfátu, který při vyšších koncentracích stohuje, a také guanosen-5'-monofosfátu a 2'-deoxyguanosen-5'-monofosfátu, které vytvářejí při vyšších koncentracích v přítomnosti sodíkových či draselných iontů tzv. guaninové tetrády a jejich asociáty, které jsou základem guaninových kvadruplexů a hrají roli v různých biologických procesech (např. v genové expresi).

Klíčová slova: nukleotidy, samouspořádání, guaninové tetrády, Ramanův rozptyl, Ramanova optická aktivita

Title: Vibrational optical activity of nucleotides and shorter nucleic acid segments

Author: Bc. Štěpán Jílek

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Václav Profant, Ph.D., Institute of Physics of Charles University

Abstract: Nucleotides are organic molecules that have a wide range of functions in living organisms. They participate in cell signaling, serve as cofactors of enzymatic reactions, play a central role in cellular metabolism, and are the basic monomeric units of nucleic acid polymers. Nucleotides consist of three subunit molecules – nitrogen nucleobase, five-carbon sugar (ribose or 2'-deoxyribose), and a phosphate group containing one to three phosphates. The subject of this master thesis is the study of various nucleotides and their self-assemblies in water by means of vibrational spectroscopy – Raman scattering and its chirally sensitive variant Raman optical activity (ROA). ROA has the potential to provide new information about the structural arrangement, dynamics, and interactions of nucleotides, as it supposes to be much more sensitive to vibrations of its sugar part containing three to four chiral carbons, compared to Raman scattering. We study spectral manifestations associated with chemical modifications (difference between ribo- and deoxyribonucleotides, the influence of different phosphate positions) and the change of physical conditions (various charge states according to the set pH, effect of concentration, influence of ions). A substantial amount of work is devoted to studying the self-association of purine nucleotides – adenosine-5'-monophosphate, which stacks at higher concentrations, and guanosine-5'-monophosphate and 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate, which form guanine quartets and their assemblies at higher concentrations in the presence of sodium and potassium ions. Guanine quartets represent the basis of guanine quadruplexes playing an important role in various biological processes (e.g., in gene expression).

Keywords: nucleotides, self-association, guanine quartets, Raman scattering, Raman optical activity

Obsah

Předmluva	4
1. Úvod.....	6
1.1 Metody studia struktury nukleových kyselin	6
1.2 Nukleové kyseliny	8
1.2.1 Dusíkaté báze	8
1.2.2 Pentosa	10
1.2.3 Nukleosidy a nukleotidy	11
1.2.4 Konformace nukleotidů.....	13
1.2.5 Samoskladba nukleotidů	15
1.2.6 G-tetrády a G-kvadruplexy	15
1.2.7 Studium nukleotidů a jejich samouspořádání	18
1.2.8 Oligo- a polynukleotidy	20
1.3 Teoretické základy vibrační spektroskopie	25
1.3.1 Vibrační pohyby a stavy molekul	27
1.3.2 Výběrová pravidla pro vibrační přechody.....	29
1.4 Metody vibrační spektroskopie	31
1.4.1 Ramanova spektroskopie	33
1.4.2 Instrumentace Ramanovy spektroskopie	35
1.4.3 Infračervená spektroskopie a její instrumentace	36
1.5 Vibrační optická aktivita	38
1.5.1 Chiralita a optická aktivita	38
1.5.2 Ramanova optická aktivita – ROA	39
1.5.3 Teorie ROA.....	41
1.5.4 Vibrační cirkulární dichroismus (VCD) a jeho teorie.....	43
1.6 Interpretace vibračních spekter.....	46
2. Cíle.....	48

3.	Metody	49
3.1	Vzorky a laboratorní vybavení	49
3.2	Příprava vzorků	50
3.2.1	pH závislosti.....	50
3.2.2	Koncentrační závislosti	50
3.2.3	ROA měření	52
3.3	Rozptylové metody.....	53
3.3.1	Ramanův spektrometr SPEX.....	53
3.3.2	Měření pH závislosti Ramanových spekter.....	53
3.3.3	Koncentrační měření Ramanových spekter	54
3.3.4	ROA spektrometr	55
3.3.5	Měření spekter Ramanovy optické aktivity	56
3.4	Zpracování dat	57
3.4.1	Zpracování spekter	57
3.4.2	Faktorová analýza	57
3.4.3	Určení pK_A konstant faktorovou analýzou.....	59
4.	Výsledky	61
4.1	Ramanovo a ROA spektrum 5'-rAMP	61
4.2	pH závislosti spekter nukleotidů	66
4.2.1	Adenosin-5'-monofosfát	71
4.2.2	ROA spektra 5'-rAMP při různém pH.....	78
4.2.3	Další purinové nukleotidy	81
4.2.4	Pyrimidinové nukleotidy	83
4.2.5	Výsledky pH závislostí	84
4.3	Vliv polohy fosfátu na Ramanova spektra nukleotidů	85
4.4	Srovnání oxy- a deoxyribonukleotidů	88
4.4.1	5'-AMP	88

4.4.2	5'-GMP a 5'-CMP	91
4.5	Koncentrační závislosti	93
4.5.1	Stohování 5'-rAMP	97
4.5.2	Stohování 5'-dGMP	101
4.5.3	Stohování 5'-rGMP	104
4.5.4	Vliv zvýšené koncentrace Na ⁺ iontů na stohování 5'-rGMP a 5'-dGMP	108
4.5.5	Vliv zvýšené koncentrace K ⁺ iontů na stohování 5'-rGMP a 5'-dGMP..	114
4.5.6	Stohování 5'-rGMP ve formě didraselné soli	120
4.5.7	ROA spektra 5'-rAMP různých koncentrací.....	126
4.5.8	ROA spektra 5'-rGMP se sodnými ionty.....	129
5.	Závěr	136
	Seznam použité literatury.....	139
	Seznam obrázků	146
	Seznam tabulek	152
	Seznam použitých zkratk.....	153
	Přílohy	155
	Seznam příloh.....	156

Předmluva

Nukleotidy patří díky svým funkcím k nejdůležitějším biomolekulám na Zemi. Nejvýznamnější funkcí je, že tvoří základní stavební jednotku nukleových kyselin – lineární polymerní řetězce nukleotidů. Nukleové kyseliny ve své struktuře uchovávají genetickou informaci. Studium jejich struktury sahá až do druhé poloviny 19. století. Velký průlom v této oblasti přinesli Watson s Crickem a často opomíjená Rosalinda Franklinová, kteří přišli s modelem deoxyribonukleové kyseliny (DNA) ve formě dvoušroubovice. Tento model je platný dodnes, jeho objevem však studium struktury a funkcí nukleových kyselin neutichlo a přetrvává do dnešní doby, kdy je stále velmi přitažlivé a důležité. Technik, které se k jejich zkoumání využívají, je velké množství od rentgeno-strukturální analýzy přes nukleární magnetické rezonance až po nejrůznější metody optické spektroskopie. Naší expertízou je Ramanova optická aktivita (ROA), což je chirálně citlivá metoda vibrační spektroskopie odvozená od Ramanovy spektroskopie. Možnost využití ROA pro studium nukleových kyselin byla nastíněna na přelomu tisíciletí, avšak od této doby se objevilo jen velmi málo publikací, kde byla ROA za tímto účelem použita. Hlavní motivací této práce je ukázat, že technický pokrok, kterým instrumentace ROA prošla za posledních dvacet let, otevírá dveře pro širší využití této techniky pro systematické studium struktury a dynamiky nukleových kyselin. V této diplomové práci se zaměříme na první krok, to jest na stavební jednotky nukleových kyselin (mononukleotidy) a jejich vyšší uspořádání, které je dané jejich samoasociací.

Tato diplomová práce je rozdělena do pěti kapitol. První kapitola je věnována popisu struktury mono- i oligonukleotidů a mononukleotidových samsopřádání jakož i metod, které jsou pro studium jejich struktury používány. Důraz je kladen na techniky vibrační spektroskopie a z nich především na Ramanovu spektroskopii a Ramanovu optickou aktivitu (ROA). Nalezneme zde i teoretický popis dynamiky molekul a použitých metod vibrační spektroskopie včetně definice souvisejících základních chemických pojmů. Stručně je zde nastíněna i problematika interpretací vibračních spekter, ať už na empirické či statistické bázi nebo pomocí kvantově mechanických simulací spekter. Druhá kapitola obsahuje seznam cílů, kterých v práci chceme dosáhnout. Třetí kapitola shrnuje použitou metodiku – je zde popsána příprava vzorků, postup měření, popis využívaných přístrojů a způsob dalšího zpracování

získaných dat. Ve čtvrté (předposlední) kapitole jsou shrnuty výsledky experimentů, získané poznatky a jejich diskuze. Poslední pátá kapitola (závěr) je věnována zhodnocení, jak se podařilo naplnit stanovené cíle, shrnutí získaných výsledků a perspektivám pro další výzkum.

1. Úvod

1.1 Metody studia struktury nukleových kyselin

Ke studiu struktury nukleových kyselin se zejména v 50. a 70. letech 20. století využívala rentgenová difrakce. Pro některé pravo- a levotočivé helikální struktury DNA (deoxyribonukleová kyselina) a RNA (ribonukleová kyselina) nám poskytla strukturní detaily na atomární úrovni. Získání takovýchto spolehlivých dat z rentgenové difrakce však vyžaduje vykrytalizování nukleových kyselin, které pro složitější struktury, jako je například trojvláknová DNA, není příliš úspěšné a tato metoda tak naráží díky nutnosti vykrytalizování vzorků na své limity. (Taillandier & Liquier, 2006)

Další hojně využívanou technikou je spektroskopie nukleární magnetické rezonance (NMR spektroskopie), která je velmi vhodná pro relativně krátké úseky oligonukleotidů a jejich spektra mohou být podrobně interpretována. Pro delší úseky oligonukleotidů či polynukleotidů naráží tato metoda na svůj limit, neboť dochází k překryvu signálů, které jsou navíc rozšířeny vlivem rychlé relaxace. Velmi často NMR spektroskopie pracuje s vysoce zředěnými roztoky, a tudíž je obtížné pomocí ní pozorovat rozdíly mezi izolovanými molekulami a vysoce koncentrovanými molekulami tvořícími složitější struktury či agregáty v roztoku. (Emwas, 2015)

Výše zmíněné techniky pro studium struktury nukleových kyselin jsou doplňovány metodami optické spektroskopie. Zejména pak absorpční spektroskopii ve viditelné a ultrafialové (UV) oblasti, která je založena na elektronových přechodech a její chirálně citlivou variantu elektronový cirkulární dichroismus (ECD). Tyto metody vyžadují přítomnost chromoforu¹ ve vzorku. V případě oligonukleotidů, polynukleotidů či nukleových kyselin jsou přirozeným chromoforem dusíkaté báze s konjugovanými π -elektrony. Díky tomu jsou na jednu stranu tyto techniky citlivé k bázím a jejím konformacím, ale na druhou stranu málo citlivé k cukr-fosfátové kostře. Opět jsou tyto experimenty obecně omezeny na nízké koncentrace kvůli vysoké absorpenci vzorků. (Kypr et al., 2012)

¹ Typicky část molekuly/látky zodpovědná za absorpci záření

Z hlediska pochopení biologického významu nukleových kyselin je důležité znát strukturu jejich geometrie ve vodných roztocích, což nám samozřejmě rentgenová difrakce neumožňuje. Pro tento účel jsou velmi užitečné a efektivní obě metody vibrační spektroskopie – infračervená spektroskopie (IČ) a Ramanova spektroskopie. Mezi jejich výhody patří například

- a) možnost studia vzorků v různých formách (kapalná – roztok, amorfni – hydratovaná vlákna či film, pevná – krystaly a polykrystaly),
- b) žádné velikostní omezení (od jednotlivých nukleotidů přes polynukleotidy, krátké segmenty DNA až k nativní DNA),
- c) nedestruktivní metody vyžadující malé množství vzorků (typicky 100 μg),
- d) možnost přímého porovnání a charakterizace rozdílů mezi spektry Ramanova rozptylu a IČ absorpce nukleotidů a nukleových kyselin v pevné a kapalně fázi,
- e) snadná změna externích parametrů, jako je iontová síla, pH, teplota apod.

Kombinace rentgenové difrakce spolu s IČ a Ramanovou spektroskopií shodných krystalů DNA a RNA nám umožňuje stanovit markery – charakteristické pásy v IČ a Ramanových spektrech, které odpovídají různým geometriím v pevném stavu a které dále mohou být pozorovány v amorfni i kapalných fázích. Díky tomu pak můžeme snadno pozorovat přechody například mezi konformacemi $B \rightarrow A$, $B \rightarrow Z$, nebo i přechod dvoušroubovice DNA \rightarrow trojvláknová DNA a další. Dále nám vibrační spektroskopie umožňuje určit schéma párování bází (Watsonovo-Crickovo, reverzní Watsonovo-Crickovo, Hoogsteenovo, ...), konformaci cukrů ($C2'$ -endo či $C3'$ -endo), rotaci kolem glykosidické vazby (konformace anti nebo syn) a také dynamické vlastnosti těchto struktur, např. body tání nukleových kyselin. (Taillandier & Liquier, 2006)

Typicky se u nukleotidů a nukleových kyselin měří a interpretuje pouze omezená oblast vibračních přechodů (IČ – 1200 až 1800 cm^{-1} , Raman – 600 až 2000 cm^{-1}) a získaná informace tak není úplná. Nicméně s využitím dokonalejších moderních optických prvků se Ramanova spektroskopie stává vhodnou technikou pro pozorování široké oblasti vibračních přechodů mezi 50 až 4000 cm^{-1} . Obě metody vibrační spektroskopie, IČ a Ramanova spektroskopie, mají i svou chirálně citlivou variantu. V případě IČ je to vibrační cirkulární dichroismus a v případě Ramanovy spektroskopie je to Ramanova optická aktivita (ROA). (Nafie, 2011)

1.2 Nukleové kyseliny

V rámci jednoduchého přiblížení můžeme říct, že se lidské tělo skládá především z vody, proteinů, nukleových kyselin, lipidů a sacharidů. Všechny tyto zmíněné biomolekuly jsou důležité, ale obzvláště důležité jsou pak nukleové kyseliny – DNA a RNA, protože ve své struktuře nesou dědičné informace o složení enzymů a proteinů i informace o jejich struktuře. Každý protein pak díky své struktuře má určitou funkci a účastní se pak různých biochemických procesů. (Taillandier & Liquier, 2006)

Nukleové kyseliny jsou vysokomolekulární lineární polymerní řetězce, které se skládají z nukleotidů. Ty se skládají ze tří rozlišitelných složek: dusíkatá báze, pentosa (D-ribosa nebo 2-deoxy-D-ribosa) a zbytek kyseliny fosforečné, který může být tvořen až třemi fosfáty. V případě, že se molekula skládá pouze z dusíkaté báze a pentosy, tak se nazývá nukleosid.

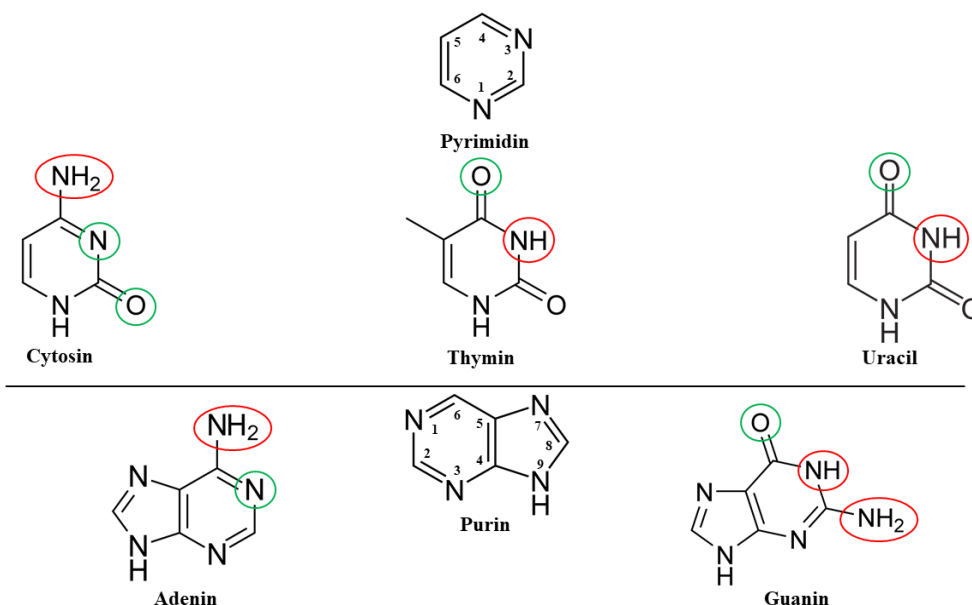
Jednotlivé komponenty nukleotidů si rozebereme ještě podrobněji.

1.2.1 Dusíkaté báze

Dusíkaté báze rozlišujeme podle typu heterocyklu na

- a) purinové – odvozené od purinu: adenin a guanin,
- b) pyrimidinové – odvozené od pyrimidinu: cytosin, thymin a uracil.

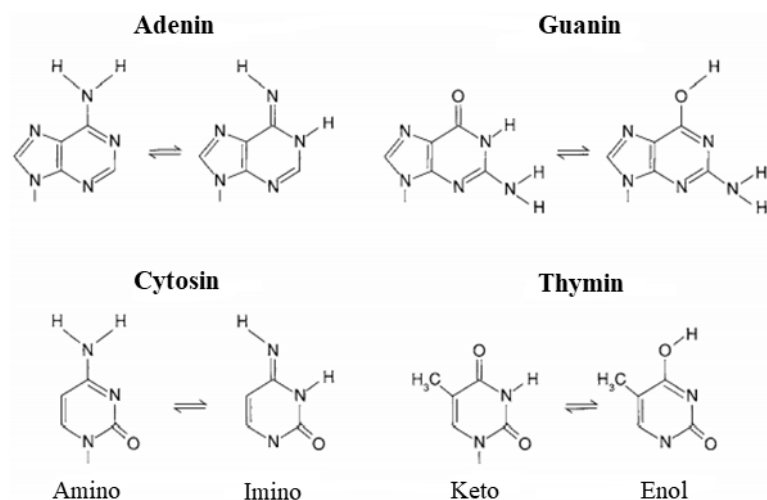
Obě nukleové kyseliny (DNA, RNA) obsahují výše zmíněné purinové báze. V případě pyrimidinových bází DNA obsahuje thymin a cytosin, RNA obsahuje cytosin a uracil (místo thyminu). Všechny báze pak můžeme vidět na **Obrázku 1**. Na všech těchto bázích můžeme rozlišit dva typy funkčních skupin – takové, které jsou potenciálními donory vodíkových vazeb (H-vazeb) a ty, které jsou potenciálními akceptory vodíkových vazeb, viz **Obrázek 1**. Dusíkaté báze mezi sebou mohou vytvářet vodíkové můstky a tzv. se párovat. Základním typem párování je Watsonovo-Crickovo párování bází, kdy se guanin páruje s cytosinem pomocí tří vodíkových vazeb a adenin se páruje s thyminem, resp. uracilem pomocí dvou vodíkových vazeb. Tyto vodíkové vazby jsou pro funkčnost nukleových kyselin podstatné a vycházejí čistě z vlastností dusíkatých bází.



Obrázek 1: Dusíkaté báze – pyrimidinové (nahore), purinové (dole), potenciální donory vodíkových vazeb (červeně) a potenciální akceptory vodíkových vazeb (zeleně);

Další vlastnost, které dusíkaté báze mají, je tautomerie (konstituční izomerie). Jedná se tedy o izomery mající stejný souhrnný vzorec, ale lišící se druhem dvojně vazby a polohou jednoho z vodíkových atomů. V případě dusíkatých bází je to přechod mezi amino a imino tautomerní formou nebo přechod mezi keto a enol tautomerní formou. Rovnováha mezi formami je však výrazně posunuta ve prospěch amino, resp. keto formy. Příklad obou případů můžeme vidět na následujícím **Obrázku 2**. Jednotlivé formy se v tomto případě liší poměry substituentů, které jsou potenciálními donory a akceptory vodíkových vazeb. Díky tomu se báze mohou vázat nestandardním způsobem, což vede k potenciálnímu riziku vzniku mutací například při replikaci DNA.

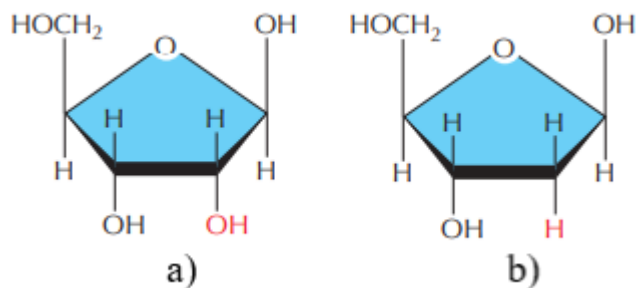
Existují i tzv. minoritní báze, které se vyskytují jen v malém množství v nukleových kyselinách. Například RNA obsahuje různě methylované báze nebo i DNA může obsahovat 5-methylcytosin. (Adams et al., 1992)



Obrázek 2: Tautomerizace bází v DNA, převzato z (Bhagavan, 2002)

1.2.2 Pentosa

Cukernou složkou nukleových kyselin je pentosa (pětiuhlíkatý cukr), který má v obou případech furanosovou formu. Konkrétně je to β -D-ribofuranosa pro RNA a β -D-2-deoxyribofuranosa² pro DNA a jejich konfigurační vzorce jsou na **Obrázku 3**. I tato na první pohled nepatrná změna (absence/přítomnost hydroxylové skupiny) má velký efekt. Kvůli tomu není RNA tak stabilní jako DNA a je náchylnější k enzymatické a chemické degradaci a navíc hydroxylová skupina omezuje možné zaujetí sekundární struktury RNA. (Adams et al., 1992)



Obrázek 3: a) β -D-ribose, b) β -D-2-deoxyribose, převzato a upraveno z (Bruce, 2008)

² Často se používají pouze zkrácené názvy D-ribose a D-deoxyribose

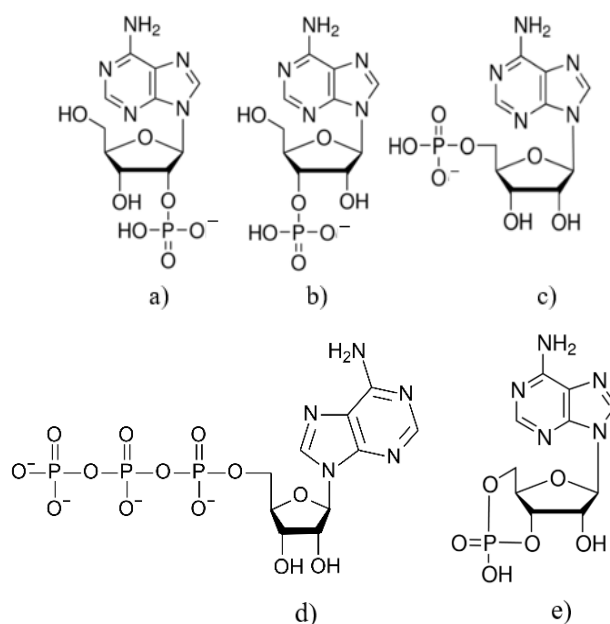
1.2.3 Nukleosidy a nukleotidy

Připojením dusíkaté báze k D-ribose nebo D-deoxyribose vzniká sloučenina, která se označuje jako nukleosid. Jedná se o N-glykosidovou vazbu. Názvy se pak odvozují od konkrétní báze a cukerné složky, tedy např. D-ribosa s adeninem tvoří adenosin, navázáním na guanin získáme guanosin, spojením s cytosinem cytidin, vazbou na uracil uridin a navázáním na thymin thymidin. V případě, že je báze vázaná na D-deoxyribosu, tak se k názvu přidává předpona deoxy-, tedy deoxyadenosin, deoxyguanosin atd. U nukleosidů, resp. nukleotidů i obecně nukleových kyselin je zavedena konvence, že uhlíky ribosy jsou číslovány 1', 2', 3' atd., aby nedocházelo k záměně s číslováním u atomů dusíkatých bází. (Adams et al., 1992)

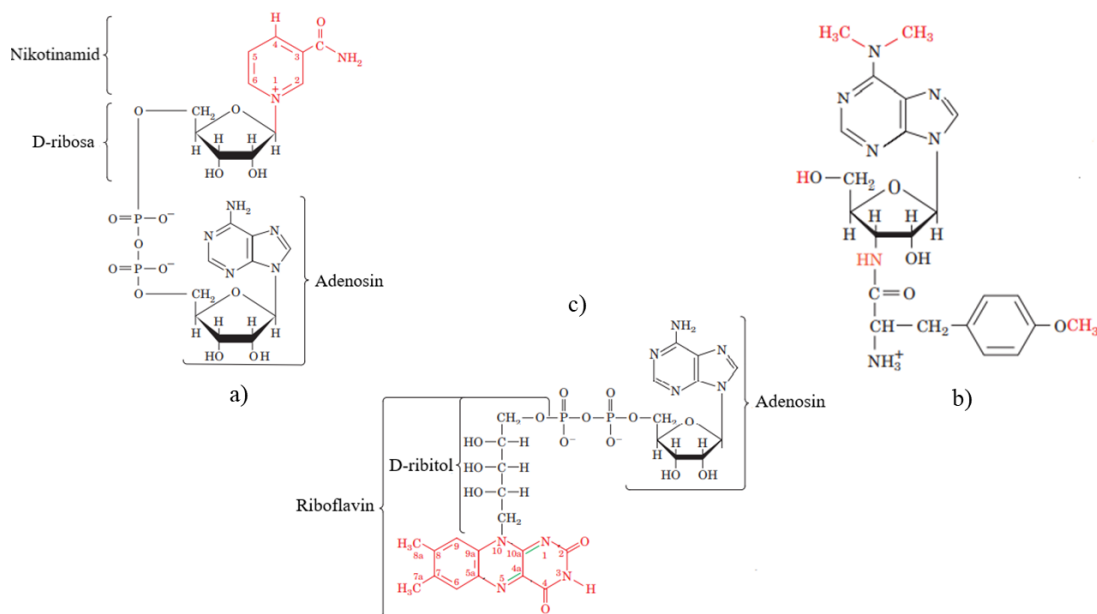
Nukleotidy jsou monomerní jednotky, které jsou základní stavební složkou nukleových kyselin. Jedná se o fosforylované nukleosidy. Zbytek kyseliny fosforečné se může vázat na kteroukoli volnou hydroxylovou skupinu cukerné složky, tedy se může navázat na pozici C(2'), C(3') a C(5'). Tím však variabilita v rámci fosfátů nekončí, protože mohou vytvářet ještě cyklické nukleosid fosfáty – fosfátová skupina se váže dvakrát na jednu molekulu pentosy a vytváří tak můstek mezi hydroxylovými skupinami pentosy. Typicky hydroxylovaná skupina na uhlíku C(5') může být fosforylována jedním až třemi fosfáty. Různé příklady můžeme vidět na následujícím **Obrázku 4**. (Adams et al., 1992)

Nukleotidy mají v živých organismech různorodé funkce, což je způsobeno jejich velkou modifikační variabilitou. Tou nejdůležitější a nejdůležitější funkcí, jak již bylo zmíněno, je jejich strukturní role, kdy slouží jako stavební složka nukleových kyselin. Nicméně například di- a trifosfáty jsou makroergické sloučeniny, které jsou nezbytné pro řadu enzymatických procesů a pro svalovou práci. Nejznámější je adenosintrifosfát (ATP), u něhož hydrolýzou anhydridové vazby dojde k odštěpení jednoho fosfátu a vzniku adenosindifosfátu (ADP). Tato reakce je exergonická a poskytuje tak energii pro řadu biochemických procesů. Cyklické nukleosid fosfáty, které mohou vznikat např. při štěpení vlákna RNA, mají často funkce jako signální molekuly. Příkladem může být adenosin-3',5'-cyklickýmonofostát (cAMP) mající funkci druhého posla (v angl. literatuře *second messenger*) v mnoha drahách přenosů signálu. Účinky signální dráhy tohoto nukleotidu a možnost využití při vývoji nových léků můžeme nalézt např. v (Yan et al., 2016). Nukleotidy jsou často součástí různých kofaktorů jako je nikotinamidadenin nukleotid (NAD), flavinadenin nukleotid (FAD) nebo

koenzym A a jsou důležité pro jejich správné fungování. Taktéž dokáží hrát roli i při biosyntéze bílkovin, kde adenosin ve formě puromycinu působí jako její silný inhibitor nebo mohou vykazovat antibiotickou aktivitu, například adenosin ve formě arabino-či 8-azaderivátů. Příklady biologicky významných látek obsahujících ve své struktuře nukleotidy můžeme vidět na **Obrázku 5**. (Saenger, 1984)



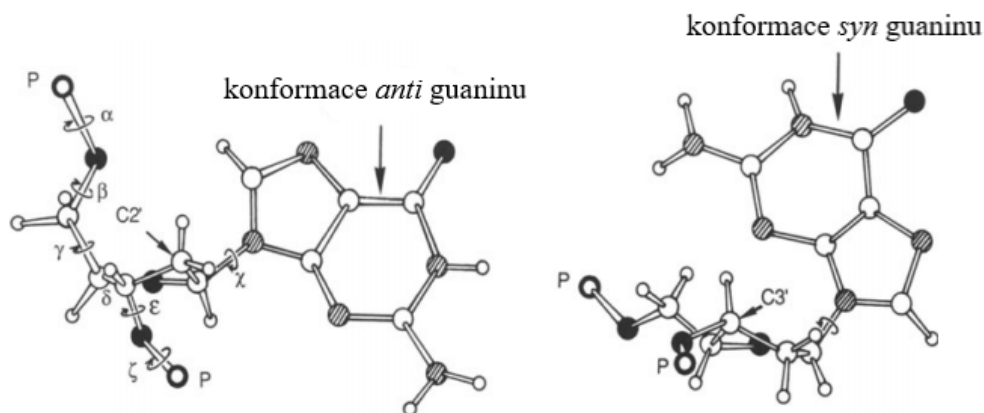
Obrázek 4: Příklady různě fosforylovaných adenosinů:
 a) Adenosin-2'-monofosfát, b) Adenosin-3'-monofosfát,
 c) Adenosin-5'-monofosfát, d) Adenosintrifosfát (ATP),
 e) Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)



Obrázek 5: Příklady biologicky významných látek obsahujících ve své struktuře nukleotidy: a) NAD v oxidované formě (NAD⁺), b) puromycin , c) FAD v oxidované formě (FAD); upraveno z (Voet & Voet, 2010)

1.2.4 Konformace nukleotidů

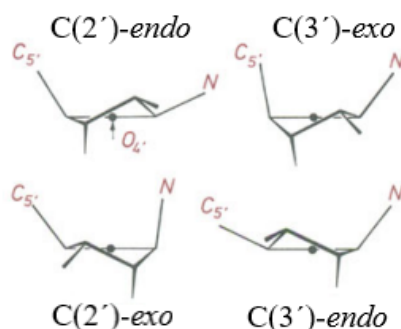
V rámci konformace nukleotidů máme na jedné straně rigidní planární dusíkatou bázi a na straně druhé poměrně flexibilní ribosu a její okolí. Konformační flexibilita izolovaných nukleotidů je dána především rotací kolem N-glykosidové vazby a puckerem³ ribosy. Rotace kolem N-glykosidové vazby umožňuje dusíkaté bázi zaujmout konformaci *syn* – báze je orientována nad plochu ribosy či *anti* – báze je orientována mimo plochu ribosy, viz **Obrázek 6**.



Obrázek 6: Konformace *syn* a *anti* guaninu; upraveno z (Adams et al., 1992)

³ Puckering = zvrásnění či zkrabacení; v české literatuře se ve většině případů používá anglický termín

V případě puckeringu cukru je možno postupovat více způsoby. Ten nejjednodušší je takový, že pokud čtyři uhlíky ribosy jsou v jedné rovině a jeden uhlík vybočuje, pak mluvíme o tzv. obálkové konformaci (angl. Envelope, E). Speciálně pokud C(2') nebo C(3') se nacházejí na stejném poloprostoru jako uhlík C(5'), pak se taková konformace označuje jako *endo* – C(2')-endo, C(3')-endo, viz **Obrázek 7**. V opačném případě, pokud se C(2') a C(3') nacházejí na opačném poloprostoru než C(5'), pak se taková konformace označuje jako *exo* (**Obrázek 7**).



Obrázek 7: Čtyři hlavní konformace cukru; upraveno z (Saenger, 1984)

V uspořádání *twist* pak mimo rovinu vybočují dva uhlíky. Přesnější popis puckeringu ribosy je pomocí pseudorotačního konceptu (viz (Altona & Sundaralingam, 1972)) využívajícího pseudorotační fázový úhel P , díky němuž dokážeme jednoznačně určit jednotlivé konformace ribosy. Definice P dle (Saenger, 1984)

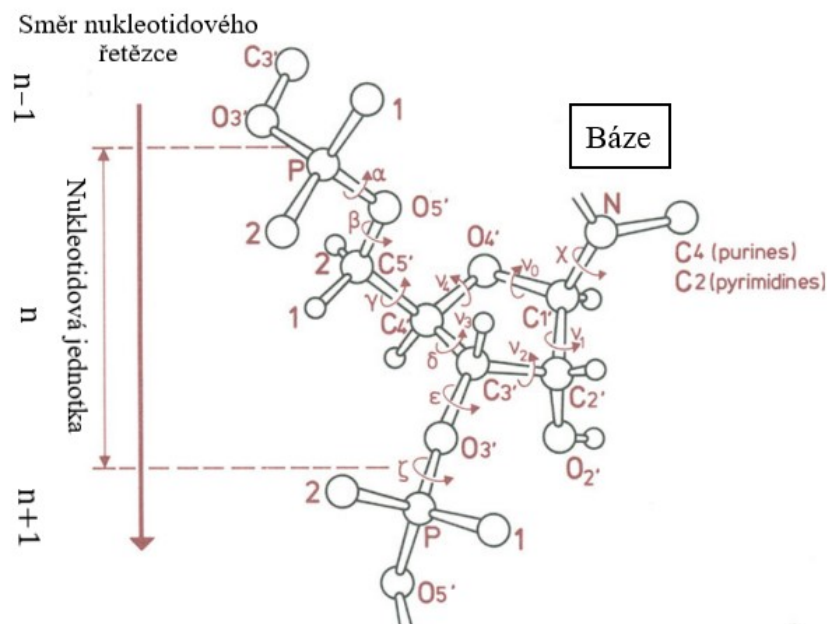
$$\tan P = \frac{(\nu_1 + \nu_4) - (\nu_3 + \nu_0)}{2\nu_2(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)}, \quad (1.1)$$

kde ν_i jsou vzájemně závislé torzní úhly, viz **Obrázek 8**.

V nukleových kyselinách jsou nejdůležitější a nejběžnější konformace C(2') *endo* a C(3') *endo*, kterým odpovídá dle (Saenger, 1984)

- C(2')-endo: $144^\circ \leq P \leq 190^\circ$,
- C(3')-endo: $0^\circ \leq P \leq 36^\circ$.

Další konformační flexibilita volných nukleotidů je v orientaci dihedrálních úhlů α , β a γ (viz **Obrázek 8**), pomocí kterých lze popsat vzájemnou orientaci cyklické ribosy a fosfátové skupiny.



Obrázek 8: Torzní úhly nukleotidu ν_i ; upraveno z (Saenger, 1984)

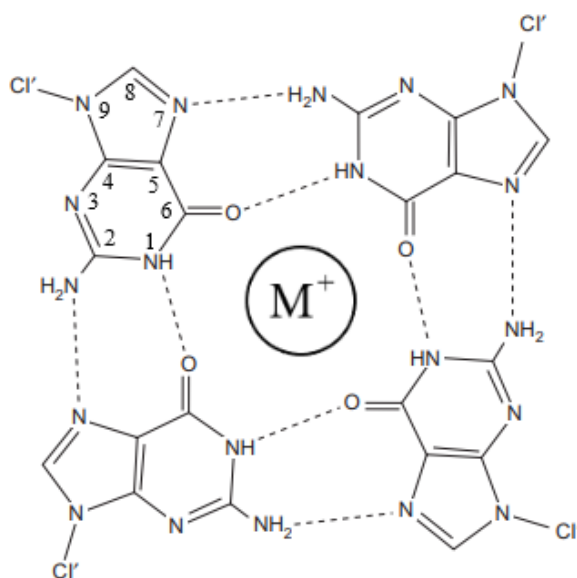
1.2.5 Samoskladba nukleotidů

Studium samoskladby (angl. self-association) mononukleotidů představuje jakýsi „mezistupeň“ před vlastním studiem stability, struktury a funkčních vlastností nukleových kyselin. Je to z toho důvodu, že mezi stabilizační prvky sekundárních struktur nukleových kyselin patří patrové (stacking či stohování) interakce nukleových (dusíkatých) bází a vodíkové vazby mezi bázemi. Oboje můžeme pozorovat již v případě koncentrovaných vzorků mononukleotidů. Samoskladba prostřednictvím stohování nukleových bází probíhá u všech typů mononukleotidů. Nejvíce je však pozorována u purinových bází. Nejsnáze asociuje adenosin-5'-monofosfát (5'-rAMP), následně pak inosin-5'-monofosfát a pak guanosen-5'-monofosfát, viz (Neurohr & Mantsch, 1979).

1.2.6 G-tetrády a G-kvadruplexy

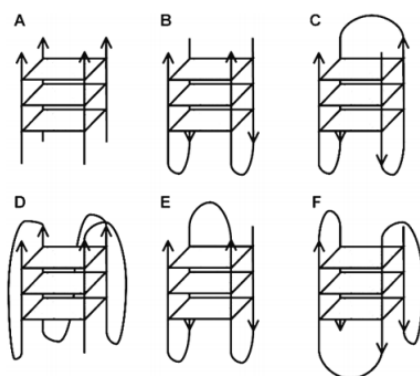
Poměrně výjimečným mononukleotidem při samoskladbě je guanosen. Již na počátku minulého století bylo známo, že guanosen a jeho deriváty vytváří ve vodě při vyšších milimolárních koncentracích viskózní gely. Tento efekt byl vysvětlen až později díky rentgenové difrakci ve článku (Gellert et al., 1962), kde bylo popsáno

tetramerické uspořádání guaninových bází v gelech, které byly vytvořeny rozpuštěním guanosin-5'-monofosfátu (5'-rGMP). Takováto struktura se označuje jako guaninová tetráda (guaninový kvartet, G-tetráda či G-kvartet) a slouží jako molekulární základ pro tvorbu gelu. G-tetráda je planární uspořádání čtyř guaninových bází, kde každá guaninová báze je současně jak donorem, tak akceptorem dvou vodíkových vazeb se svými sousedy. Vzniká tak uzavřené uspořádání, ve kterém je Hoogsteenovské párování mezi jednotlivými guaninovými bázemi. Struktura G-tetrády je uvedena na **Obrázku 9**. V případě G-tetrád se na Hoogsteenovském párování účastní vždy dusíky na pozici N(1), N(2), N(7) a kyslík v pozici O(6) každé guaninové báze, jak je možné vidět opět na **Obrázku 9**. G-tetráda nemusí vznikat pouze z 5'-rGMP, ale například i molekuly guanosin-3'-fosfátu (3'-rGMP) agregují do G-tetrád, viz (Sasisekharan et al., 1975). Experimenty s různými deriváty guaninu, ať už s ribosou či deoxyribosou jako cukernou složkou, potvrdilo původní návrh uspořádání G-tetrád, viz (Guschlbauer et al., 1990). (Simonsson, 2001)



Obrázek 9: Struktura guaninové tetrády (G-tetráda); upraveno z (Neidle, 2011)

Naskládají-li se na sebe dvě a více G-tetrád (např. v DNA), tak mohou vytvářet patrové asociáty, či v případě nukleových kyselin čtyřvláknové struktury s G-tetrádovým jádrem. Takovéto struktury se pak souhrnně označují jako G-kvadruplexy⁴ či DNA tetraplexy. Obecně termín G-kvadruplex označuje jakoukoli čtyřvláknovou strukturu DNA obsahující G-tetrády bez ohledu na propojení vláken. G-kvadruplexy vykazují značný polymorfismus (uspořádání), podrobněji například v (Simonsson, 2001). Na **Obrázku 10** jsou uvedeny různé možnosti uspořádání G-kvadruplexů.

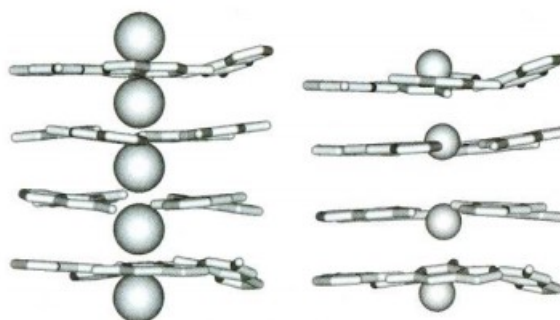


Obrázek 10: Možnosti uspořádání G-kvadruplexů podle uspořádání a počtu vláken nukleových kyselin, (A) – tetramolekulární paralelní, (B) – bimolekulární antiparalelní, (C) – monomolekulární antiparalelní, (D) – monomolekulární paralelní, (E) – jiný typ monomolekulárního antiparalelního a (F) – monomolekulární smíšený G-kvadruplex; převzato z (Hubálková, 2015)

Samotná struktura G-tetrády a G-kvadruplexů silně závisí na vlastnostech prostředí jako je pH a teplota. Zejména pak důležitou roli při stabilizaci a samotnou strukturu G-tetrád a G-kvadruplexů mají kationty viz (Hightower et al., 2009), které se včleňují do centrální dutiny, viz **Obrázek 9** – M^+ , kde kompenzují parciální záporné náboje kyslíků na pozicích O(6) směřujících dovnitř do dutiny. Nicméně stabilizační efekt mezi jednotlivými kationty se výrazně liší, např. viz (Chantot & Guschlbauer, 1969), což naznačuje, že důležitý je iontový poloměr. V případě alkalických kovů největší stabilitu G-kvadruplexů zajišťuje K^+ a dále Rb^+ , Na^+ , Cs^+ a Li^+ . Čím větší má jednomocný kationt iontový poloměr, tím je méně hydrofilní, a proto kationt s větším poloměrem bude mít tendenci se vyskytovat spíše mezi dvěma G-tetrádami, než uprostřed jedné G-tetrády, viz **Obrázek 11**. G-kvartety se mnohem

⁴ G-kvadruplex označuje jakoukoli čtyřvláknovou strukturu DNA

snáze vytvářejí, jak je uvedeno i ve článku (Mudroňová et al., 2016) z 5'-rGMP než z 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfátu (5'-dGMP). (Bryan & Baumann, 2011)



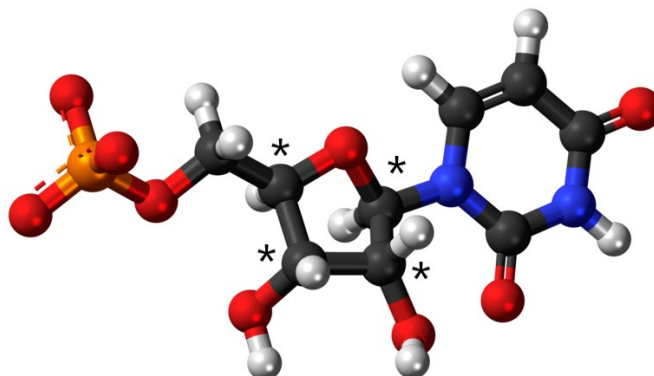
Obrázek 11: Kationt vyskytující se mezi dvěma G-tetrádami (vlevo) a v centrální dutině jedné G-tetrády (vpravo); převzato z (Neidle & Balasubramanian, 2007)

G-kvadruplexy se *in vivo* vyskytují v oblastech s opakující se sekvencí guaninu, tedy např. v promotorových oblastech některých genů (Balasubramanian et al., 2011) a jejich výskyt byl potvrzen i v oblasti lidských telomer, viz (Granotier et al., 2005). Ukazuje se, že mohou mít vliv nejen na genovou expresi (Lam et al., 2013), ale i na replikaci a aktivitu enzymu telomerasy (Lipps & Rhodes, 2009). G-kvadruplexy jsou v posledních letech hojně studovány, protože stabilizaci telomerického G-kvadruplexu určitým malomolekulovým ligandem lze využít k selektivní léčbě zhoubných nádorových onemocnění. Další a podrobnější využití terapeutických účinků G-kvadruplexů lze nalézt například v (Neidle, 2011).

1.2.7 Studium nukleotidů a jejich samouspořádání

Samostatné izolované mononukleotidy byly studovány mnoha nejrůznějšími technikami včetně metod vibrační spektroskopie. Poměrně opomíjená však zůstává Ramanova optická aktivita, která je chirálně citlivou variantou Ramanovy spektroskopie a zvyšuje tak její potenciál. ROA je poměrně univerzální metoda sloužící ke studiu struktur sacharidů, proteinů, nukleových kyselin a dokonce i celých virů, což dokládají například následující publikace (Laurence D. Barron et al., 2004), (Blanch et al., 2003) a (Krupová et al., 2020). Zatímco Ramanova spektroskopie je především citlivá k vibracím dusíkatých (nukleových) bází, tak ROA by měla být více citlivá k lokální konformaci ribosy (kvůli čtyřem chirálním uhlíkům, viz **Obrázek 12**)

a různému charakteru fosforylace a tím i k sekundární struktuře či právě vzniku větších samoskladeb či agregátů.



Obrázek 12: Uridin-5'-monofosfát (5'-rUMP), * značí chirální uhlíky; upraveno z (Uridine-monophosphate)

První studie nukleotidů či nukleových kyselin pomocí ROA byly publikovány v roce 1997, (Bell et al., 1997a) a (Bell et al., 1997b). Dodnes však nebyla provedena detailní interpretace ROA spekter a v ojedinělých studiích z nedávné či současné doby, které ROA využily, jsou spektra interpretována především na základě empirických pozorování. Využití aparátu kvantové chemie a kvantové teorie molekul pro simulace ROA spekter mono- či oligonukleotidů zatím není příliš široké. (Azher, 2018), (Ostovarpour & Blanch, 2012)

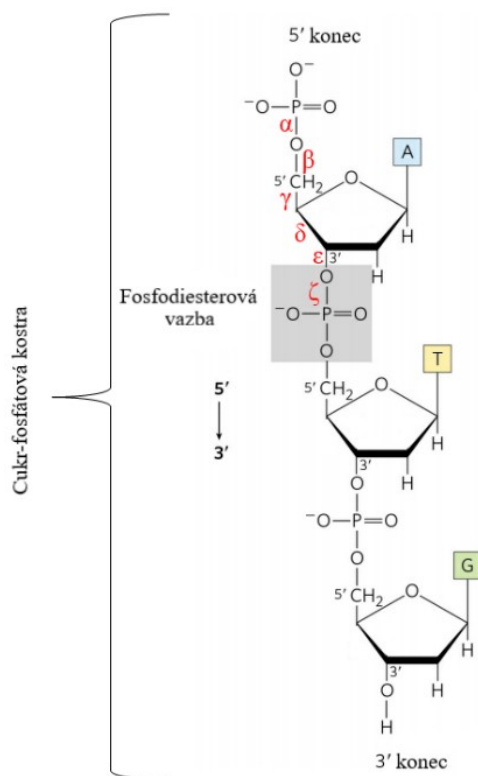
Procesy tvorby samoskladby agregátů z různých nukleotidů byly zkoumány pomocí mnoha technik. Nejvíce zastoupeny jsou však NMR spektroskopie, např. (Neurohr & Mantsch, 1979) či (Hightower et al., 2009), UV absorpce např. (Z. Zhang et al., 2006) a její chirálně citlivá varianta CD spektroskopie (Nakayama et al., 2011). Tvorba G-tetrád byla studována i pomocí technik vibrační spektroskopie – IČ spektroskopie a její chirálně citlivé varianty VCD, viz (Novotná et al., 2012), (Novotná et al., 2014) a (Goncharova et al., 2012), a také Ramanovy spektroskopie (Mudroňová et al., 2016). Ramanova optická aktivita (ROA) zatím nebyla pro studium samoskladby nukleotidů nikdy použita.

1.2.8 Oligo- a polynukleotidy

Mononukleotidy se mohou spojovat prostřednictvím fosfodiesterových vazeb a vytvářet lineární řetězce. Nejčastěji se jedná o vazbu jedné fosfátové skupiny na hydroxylovou skupinu na uhlíku C(5') jedné pentosy a zároveň hydroxylovou skupinu na uhlíku C(3') druhé pentosy. Fosfodiesterová vazba mezi hydroxylovými skupinami na uhlících C(2') a C(5') je také možná, ale v přírodě se běžně nevyskytuje, (Saenger, 1984). Příklad nukleotidového řetězce DNA můžeme vidět na následujícím **Obrázku 13**. Sekvence (pořadí) nukleotidů v řetězci nám pak určuje primární strukturu nukleových kyselin. V závislosti na počtu nukleotidových jednotek rozlišujeme

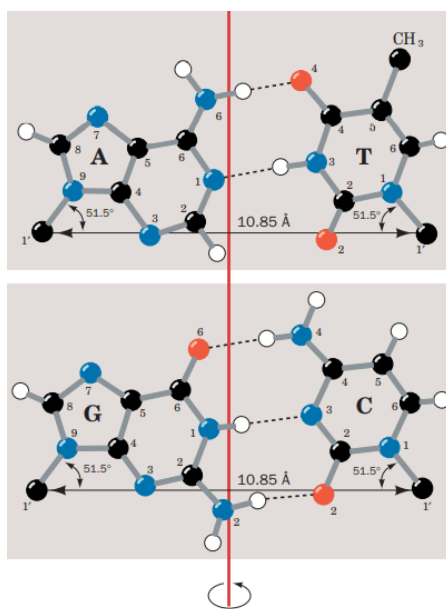
- oligonukleotidy – krátké až středně dlouhé řetězce (cca do 20 bází),
- polynukleotidy – dlouhé řetězce.

Spojení nukleotidů vytváří tzv. cukr-fosfátovou kostru (**Obrázek 13**), na které rozlišujeme až šest dihedrálních úhlů, které nám následně dohromady charakterizují konformaci polynukleotidového řetězce a tím i prostorovou strukturu nukleové kyseliny. (Saenger, 1984)



Obrázek 13: Nukleotidový řetězec DNA se sekvencí A – adenin, T – thymin a G – guanin, dihedrální úhly označeny řeckými písmeny; upraveno z (Nelson et al., 2017)

První model molekuly DNA představili v roce 1953 Watson s Crickem. Jednalo se o model pravotočivé šroubovice tvořené dvěma polynukleotidovými řetězci, které jsou vůči sobě antiparalelně orientovány, tzn. kde má jedno vlákno 3'-konec, má druhé vlákno 5'-konec. Základ helikální struktury tvoří cukr-fosfátová kostra, která je orientována směrem ven z molekuly. Vlákna jsou mezi sebou spojena pomocí nekovalentních interakcí – vodíkových vazeb (H-vazeb), které se vytvářejí mezi dusíkatými bázemi směřujícími dovnitř molekuly. Vznik H-vazeb mezi jednotlivými bázemi se označuje jako párování bází. V molekule DNA se páruje adenin s thyminem (A=T) pomocí dvou vodíkových vazeb a guanin s cytosinem (G≡C) pomocí tří vodíkových vazeb. Příklad tohoto Watsonova-Crickova párování bází můžeme vidět na **Obrázku 14**. (Adams et al., 1992)

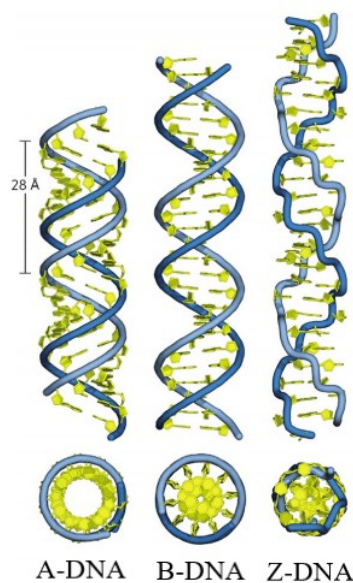


Obrázek 14: Watsonovo-Crickovo párování bází;
upraveno z (Voet & Voet, 2010)

Jak už jsme poznamenali v minulé podkapitole, Watsonovské-Crickovské párování bází není jediným možným způsobem, jak párovat báze. Další možností je tzv. Hoogsteenovo párování, se kterým jsme se již setkali u G-tetrád (podkapitola 1.2.6, **Obrázek 9**). Hoogsteenovo párování bází je důsledkem vzniku různých nekanonických struktur, jako je např. trojvláknová DNA či G-kvadruplexy. Další méně časté způsoby párování bází jsou uvedeny např. v (Saenger, 1984).

Na stabilitě dvoušroubovice DNA se podílí několik prvků. Prvním z nich jsou již zmíněné nekovalentní interakce – H-vazby, které drží pohromadě obě vlákna. I když jsou tyto interakce slabé, tak mají poměrně velký vliv, protože je jich v molekule DNA obrovské množství. Dále je to polarita fosfátových skupin, neboť ve vodném roztoku za fyziologických podmínek jsou plně ionizovány a cukr-fosfátová páteř tak má velký záporný náboj znemožňující ohnutí DNA. Třetím stabilizačním prvkem je hydrofobní interakce – dusíkaté báze směřují dovnitř, kde vytvářejí nepolární prostředí, a naopak směrem ven jsou orientovány polární skupiny dobře rozpustné ve vodě. Posledním a zároveň nejsilnějším stabilizačním prvkem jsou patrové interakce (angl. stacking, stohování). Jednotlivé páry dusíkatých bází jsou poměrně v těsném kontaktu nad sebou a mohou tak splývat oblasti výskytu delokalizovaných π -elektronů sousedních aromatických kruhů nad sebou, což má za následek sdílení elektronů. U nukleových kyselin je však problematické studovat vliv těchto interakcí izolovaně, např. na Ramanova spektra. Proto je vhodné nejprve detailně studovat stavební prvky těchto polymerů, o což jsme se pokusili v rámci této práce.

Jen krátce se zmíníme o vyšší sekundární struktuře nukleových kyselin. Nukleové kyseliny jsou konformačně velmi variabilní molekuly. Dvouvláknová DNA může zaujmout několik odlišných struktur, záviselých na mnoha faktorech, jako je například vlhkost, přítomnost iontů, pH nebo sekvence bází, (Voet & Voet, 2010). Rozlišujeme tři základní typy dvoušroubovice, které jsou označovány jako A-, B- a Z-DNA. Jak takovéto formy DNA vypadají, můžeme vidět na **Obrázku 15**. B-DNA představuje primární konformaci *in vivo*, vyskytující se v dostatečně hydratovaném prostředí (model Watsona a Cricka). V případě, že je B-DNA částečně dehydratovaná, přechází do konformace A-DNA, přičemž tento přechod je reverzibilní. V této konformaci se může vyskytovat i dvouvláknová RNA nebo hybridní molekula DNA–RNA (jedno vlákno DNA a druhé vlákno RNA). A-forma byly pozorována například u některých grampozitivních bakterií nebo v aktivním místě DNA polymerasy, dle (Voet & Voet, 2010). Poslední, již mnohem méně častá forma Z-DNA, vzniká za specifických podmínek jako je vysoká iontová síla či vysoký obsah G=C párů. Rozdíly mezi jednotlivými formami jsou shrnuty v **Tabulce 1** (upravena dle (Voet & Voet, 2010)).



Obrázek 15: Srovnání A-, B- a Z-formy DNA;
upraveno z (Nelson et al., 2017)

Tabulka 1: Strukturální prvky ideálních konformací A-, B-, a Z-DNA

	A-DNA	B-DNA	Z-DNA
Orientace dvoušroubovice	Pravotočivá	Pravotočivá	Levotočivá
Průměr	≈ 26 Å	≈ 20 Å	≈ 18 Å
Počet párů bází na závit	11.6	10	12 (6 dimerů)
Rotace dvoušroubovice na jeden bázevý pár	31°	36°	9°...pyr-pur 51°...pur-pyr
Stoupání dvoušroubovice na jednu otočku	34 Å	34 Å	44 Å
Stoupání dvoušroubovice na jeden bázevý pár	2.9 Å	3.4 Å	7.4 Å (na dimer)
Sklon bází vůči ose dvoušroubovice	20°	6°	7°
Velký žlábek	Úzký, hluboký	Široký, hluboký	Plochý
Malý žlábek	Široký, mělký	Úzký, hluboký	Úzký, hluboký
Konformace pentosy	C(3')-endo	C(2')-endo	C(2')-endo...pyr C(3')-endo...pur
Konformace glykosidové vazby	Anti	Anti	Anti...pyr Syn...pur

Pozn.: pyr značí pyrimidinové báze, pur značí purinové báze

RNA na rozdíl od DNA se povětšinou vyskytuje v jednovláknové podobě. Chybějící hydroxylová skupina na uhlíku C(2') ribosy neumožňuje zaujetí B-formy, a proto je pro ni typická A-forma. Nejčastějším strukturním motivem RNA je tzv. vlásenka (angl. hairpin), vznikající náhodným párováním komplementárních nukleotidových sekvencí a vytvářející tak dvouvláknové úseky. (Bruce, 2008). Kromě toho můžeme pozorovat i množství dalších strukturních motivů jako smyčky, pseudouzly, kissing komplexy, výdutě aj. (M. Zhang et al., 2011).

1.3 Teoretické základy vibrační spektroskopie

Molekuly jsou dynamické útvary, které mohou vykonávat translační, rotační a vibrační pohyby. Molekula složená z N atomů má celkem $3N$ stupňů volnosti (tři kartézské směry x , y a z pro každý atom). Z toho však tři stupně volnosti odpovídají translačnímu pohybu molekuly jako celku a tři odpovídají rotační volnosti molekuly (pokud se nejedná o lineární molekulu). Celkem má tedy molekula $3N - 6$ stupňů volnosti pro vnitřní pohyby – vibrace (v případě lineární molekuly $3N - 5$). (Nafie, 2011)

Pro objasnění základů vibrační spektroskopie musíme použít kvantový popis vibračních pohybů a stavů molekul.

Uvažujeme-li pouze elektrostatické interakce mezi jádry a elektrony včetně jejich kinetických energií, pak lze obecně hamiltonián molekuly \hat{H} tvořené N atomovými jádry a n elektrony zapsat jako

$$\hat{H} = \hat{T}_n + \hat{T}_e + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{en}, \quad (1.2)$$

kde

$$\begin{aligned} \hat{T}_n &= -\frac{\hbar^2}{2} \sum_{I=1}^N \frac{1}{M_I} \Delta_I, \\ \hat{T}_e &= -\frac{\hbar^2}{2m} \sum_{i=1}^n \Delta_i, \\ \hat{V}_{nn} &= \sum_{I < J}^N \frac{Z_I Z_J e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{R}_I - \vec{R}_J|}, \\ \hat{V}_{ee} &= \sum_{i < j}^n \frac{e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{r}_j|}, \\ \hat{V}_{en} &= -\sum_{i=1}^n \sum_{I=1}^N \frac{Z_I e^2}{4\pi\epsilon_0 |\vec{r}_i - \vec{R}_I|}. \end{aligned} \quad (1.3)$$

Význam jednotlivých členů je následující: \hat{T}_n je kinetická energie jader, \hat{T}_e je kinetická energie elektronů, \hat{V}_{nn} je potenciální energie vzájemného působení jader (Coulombovské odpuzování jádro-jádro), \hat{V}_{ee} je potenciální energie vzájemného působení elektronů (Coulombovské odpuzování elektron-elektron) a \hat{V}_{en} je potenciální energie vzájemného působení jader a elektronů (Coulombovské přitahování elektron-jádro). Jednotlivé proměnné v (1.3) jsou M_I – hmotnost jádra, m – hmotnost elektronu,

Z_I – atomové číslo, e – elementární náboj, \vec{R}_I – polohový vektor jádra a \vec{r}_i – polohový vektor elektronu. Při řešení Schrödingerovy rovnice s hamiltoniánem \hat{H}

$$\hat{H} \Psi = W\Psi, \quad (1.4)$$

kde W je celková energie systému v atomových jednotkách, se využívá Bornova-Oppenheimerova aproximace. V této aproximaci dochází k rozseparování elektronového a vibračního pohybu a řešíme tedy dvě rovnice pro dvě vlnové funkce – elektronovou vlnou funkci $\phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i)$, která je parametricky závislá na poloze jader a jadernou vlnovou funkci $\varphi(\vec{R}_J)$. Pro elektronovou vlnovou funkci $\phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i)$ řešíme Schrödingerovu rovnici s pevnými jádry

$$(\hat{T}_e + \hat{V}_{nn} + \hat{V}_{ee} + \hat{V}_{en})\phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i) = E(\vec{R}_J)\phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i), \quad (1.5)$$

kde spodní index \vec{R}_J značí parametrickou závislost na poloze jader a $E(\vec{R}_J)$ je vlastní energie závislejší také na poloze jader. S využitím (1.4) a předpokladem, že elektronová vlnová funkce se mění jen velmi málo se změnou polohy jader (tj. $\Delta_J \phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i) = 0$ a $\nabla_J \phi_{\vec{R}_J}(\vec{r}_i) = 0$) tak pro jadernou vlnovou funkci $\varphi(\vec{R}_J)$ řešíme následující rovnici

$$\left(- \sum_J \frac{\hbar^2}{2M_J} \Delta_J + V(\vec{R}_J) + E(\vec{R}_J) \right) \varphi(\vec{R}_J) = W(\vec{R}_J)\varphi(\vec{R}_J), \quad (1.6)$$

kde první člen odpovídá kinetické energii jader, $V(\vec{R}_J)$ odpovídá elektrostatické interakci jader, $E(\vec{R}_J)$ je efektivní potenciál vytvářený elektrony, $\varphi(\vec{R}_J)$ je vlnová funkce jader a $W(\vec{R}_J)$ je celková energie zahrnující translační, rotační a vibrační energii spolu s energií elektronů v poli pevných jader. Rovnice (1.6) se označuje jako Schrödingerova rovnice pro jádra v Bornově-Oppenheimerově aproximaci.

1.3.1 Vibrační pohyby a stavy molekul

Abychom se od rovnice (1.6) dostali k vlastním vnitřním pohybům (vibracím), musíme ještě odseparovat vnější translační a rotační stupně volnosti. Nejprve se přechodem do těžišťové soustavy odseparuje pohyb těžiště (odpovídá řešení pro volnou částici – rovinná vlna) a posléze se přechodem do soustavy spojené s hlavními osami momentu setrvačnosti oddělí i rotační a vibrační pohyb (podrobněji např. v (Skála, 1995)). Pak nám rovnice (1.6) přejde na tvar

$$\left[-\frac{\hbar^2}{2\mu} \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{\hbar^2 l(l+1)}{2\mu r^2} + V(r) \right] \Psi_v(r) = E_{vr} \Psi_v(r), \quad (1.7)$$

kde μ je redukovaná hmotnost, r je vzájemná vzdálenost atomů, l je vedlejší kvantové číslo, E_{vr} je energie zahrnující vibrační a rotační energii a $\Psi_v(r)$ je vibrační (radiální) vlnová funkce. Rovnice (1.7) bohužel není exaktně řešitelná kvůli obecně komplikovanému tvaru potenciálu $V(r)$ a navíc závisí i na rotačním stavu molekuly prostřednictvím vedlejšího kvantového čísla l . To znamená, že rotační a vibrační pohyb nejsou plně separovatelné. Využívá se zde proto dvou aproximací.

Problém se separací rotačních a vibračních pohybů se řeší rozvojem druhého členu v rovnici (1.7) do Taylorovy řady a omezením se na první člen rozvoje. Tento přístup se nazývá aproximace malých výchylek z rovnovážné polohy, popř. aproximace tuhého rotátoru. Komplikovaný tvar potenciálu $V(r)$ se řeší analogicky, tj. rozvojem do Taylorovy řady v okolí minima ($r = r_0$) a omezením se na první netriviální (kvadratický, harmonický) člen, tj.

$$V(r) = V(r_0) + \frac{1}{2} \frac{\partial^2 V(r)}{\partial r^2} (r - r_0)^2, \quad (1.8)$$

Tento postup se nazývá harmonická aproximace a jde vlastně o nahrazení komplikovaného tvaru potenciálu $V(r)$ parabolou v minimu. Řešení rovnice (1.7) s využitím obou výše uvedených aproximací vede k předpisu pro energii dvouatomové molekuly ve tvaru

$$\begin{aligned} E_{vr} &= E_v + E_r + V(r_0), \\ E_v &= \hbar\omega \left(n + \frac{1}{2} \right), \\ E_r &= \frac{\hbar^2 l(l+1)}{2\mu r_0^2} = \frac{\hbar^2 l(l+1)}{2I_0}, \end{aligned} \quad (1.9)$$

kde E_v je vibrační energie, E_r je rotační energie, n značí stupeň vibrační excitace, l je vedlejší kvantové číslo (stupeň rotační excitace), ω je frekvence vibrace ($\omega\sqrt{k/\mu}$, kde k představuje silovou konstantu) a I_0 je moment setrvačnosti. Obě použité aproximace jsou ve své podstatě poměrně hrubé, a ačkoli umožňují rychlé výpočty vibračních spekter i středně velkých molekul, nesou s sebou řadu systematických nepřesností. Skutečný potenciál $V(r)$ nemá ekvidistantní hladiny ani nekonečnou hloubku jako harmonický potenciál. Špatně vycházejí i limity pro jadernou repulzi a disociaci. Velká snaha je proto věnována vývoji nových výpočetních metod, které by umožnily lépe aproximovat tvar potenciálu $V(r)$ bez razantního navýšení výpočetní náročnosti.

V případě vibrací víceatomových molekul je popis o něco složitější, protože potenciální energie závisí na výchylkách z rovnovážných poloh všech atomů. Pro podrobnější popis odkazují na knihu (Atkins & Friedman, 2005). Potenciální energie v harmonické aproximaci má tvar

$$V = \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right)_0 q_i q_j, \quad (1.10)$$

$$q_i = \frac{\sqrt{m_i}}{x_i},$$

kde q_i je zobecněná souřadnice, m_i je hmotnost atomu vychýleného do polohy x_i a druhá derivace je vyčíslena v bodě 0. Celkovou energii molekuly pak můžeme napsat jako

$$E = \frac{1}{2} \sum_i \dot{q}_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \left(\frac{\partial^2 V}{\partial q_i \partial q_j} \right) q_i q_j, \quad (1.11)$$

kde první člen představuje kinetickou energii jader a druhý člen představuje jejich potenciální energii. Obtížnými členy ve vztahu (1.11) jsou křížové členy ($i \neq j$) v potenciální energii. Z tohoto důvodu se hledá lineární kombinace Q_i ze zobecněných souřadnic q_i , tak aby celková energie přešla do tvaru

$$E = \frac{1}{2} \sum_i \dot{Q}_i^2 + \frac{1}{2} \sum_{i,j} \lambda_{ij} Q_i Q_j, \quad (1.12)$$

kde λ_i má smysl frekvence a křížové členy se nám již nevyskytují. Jelikož některé kombinace Q_i odpovídají translačním a rotačním pohybům, tak pro ně můžeme očekávat $\lambda_i = 0$. Lineární kombinace Q_i umožňující separovat vibrační módy nazýváme normální souřadnice. Vibrace, které odpovídají výchylkám z rovnovážných poloh atomů podél těchto normálních souřadnic, označujeme jako normální vibrační

módy. Hamiltonián v normálních souřadnicích pak má tvar součtu $3N - 6$ hamiltoniánů lineárních harmonických oscilátorů, které odpovídají nezávislým vibračním pohybům molekuly

$$\hat{H} = \sum_i^{3N-6} \left(-\frac{\hbar^2}{2} \left(\frac{\partial^2}{\partial Q_i^2} \right) + \frac{1}{2} \lambda_i Q_i^2 \right). \quad (1.13)$$

Celková vibrační vlnová funkce molekuly Ψ je tedy součinem vlnových funkcí jednotlivých módů a celková vibrační energie E je pak součtem jejich energií

$$\begin{aligned} \Psi &= \prod_i^{3N-6} \psi_{v_i}(Q_i), \\ E &= \sum_i^{3N-6} \hbar \omega_i \left(v_i + \frac{1}{2} \right), \end{aligned} \quad (1.14)$$

kde v_i představuje nezávislý vibrační mód a ω_i je jeho frekvence.

1.3.2 Výběrová pravidla pro vibrační přechody

Zaměříme se nyní na to, jak je to s výběrovými pravidly pro vibrační přechody v případě, kdy se nemění elektronový stav molekuly. Dipólový moment molekuly $\vec{\mu}$, závislé na výchylce atomů z rovnovážných poloh, si můžeme vyjádřit pomocí Taylorova rozvoje vztahem

$$\vec{\mu} = \vec{\mu}_0 + \sum_i \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_i} \right)_0 Q_i + \dots, \quad (1.15)$$

kde $\vec{\mu}_0$ značí dipólový moment molekuly, kdy je nulová výchylka. K přechodu mezi vibračními stavy v_i a u_i jednoho vibračního módu ve víceatomové molekule bude docházet, jestliže tranzitní dipólový moment přechodu $\vec{\mu}_{v_i u_i}$ bude nenulový tzn.

$$\vec{\mu}_{v_i u_i} = \langle v_i | \vec{\mu} | u_i \rangle \neq 0. \quad (1.16)$$

Dosadíme-li vztah (1.15) do (1.16) a současně se omezíme na první dva členy rozvoje (lineární aproximace), tak dostaneme

$$\vec{\mu}_{v_i u_i} = \vec{\mu}_0 \langle v_i | u_i \rangle + \left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_i} \right)_0 \langle v_i | Q_i | u_i \rangle. \quad (1.17)$$

První člen v (1.17) vymizí díky ortogonalitě vlastních stavů. Důležitá je tedy změna tranzitního dipólového momentu přechodu nikoliv jeho velikost. Druhý člen bude nenulový (v rámci harmonické aproximace) pouze v případě kdy $v_i = u_i \pm 1$.

Fundamentálními přechody jsou pak nazývány přechody jednoho vibračního módu z $v_i = 0$ do $u_i = 1$. (Atkins & Friedman, 2005)

Dochází-li při vibraci současně k excitaci normálního vibračního módu a změně dipólového momentu molekuly $\left(\frac{\partial \vec{\mu}}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$, označuje se tato vibrace jako infračerveně aktivní (aktivní v IČ). V případě aktivní vibrace v Ramanově spektroskopii musí docházet při excitaci normálního vibračního módu současně také ke změně polarizovatelnosti molekuly α , tedy $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q_i}\right)_0 \neq 0$. V případě molekul, které jsou symetrické tak často pozorujeme, že některé z vibrací jsou aktivní pouze v jedné z vibračních technik. (Atkins & Friedman, 2005)

1.4 Metody vibrační spektroskopie

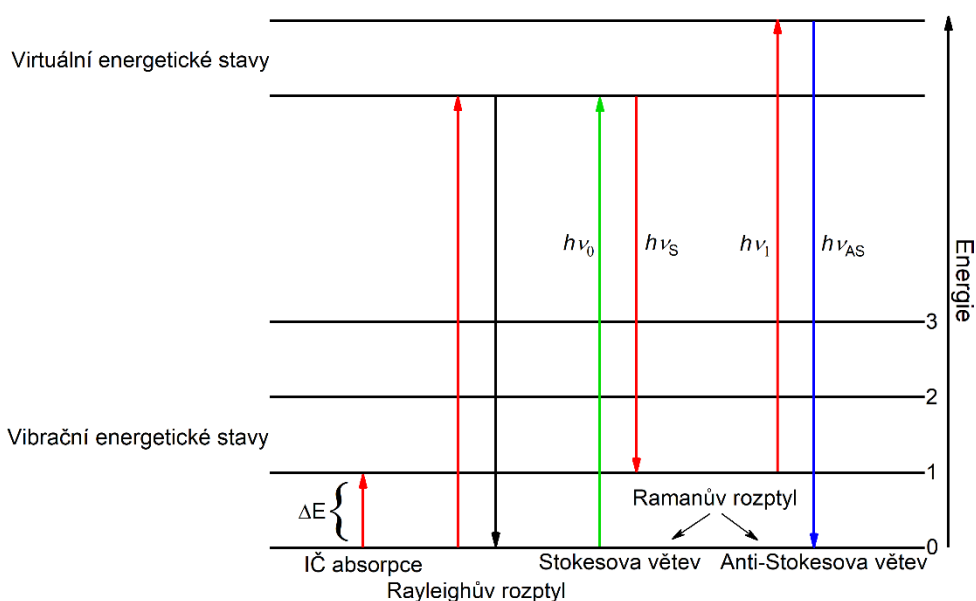
Vibrační spektroskopie je podoborem optické spektroskopie, která zahrnuje dvě základní techniky – infračervenou spektroskopii (IČ) a Ramanovu spektroskopii. IČ spektroskopie se dále ještě rozlišuje podle použité vlnové délky infračerveného záření na blízkou, střední a vzdálenou infračervenou spektroskopii. Metody vibrační spektroskopie jsou založeny na přechodech mezi stacionárními vibračními hladinami. Používají se ke studiu široké škály vzorků, například čistě pro identifikaci látky, pro kvalitativní a kvantitativní analýzu až po objasnění molekulární struktury. Výhodou těchto metod také je, že umožňují studium vzorků za nejrůznějších podmínek – např. měření z různého množství vzorku, rozličné teploty či různé fyzikální fáze (pevné látky, kapaliny, gely apod.). Další výhodou je, že ve většině případů se jedná o nedestructivní metody. Ramanova a IČ spektroskopie jsou techniky, které jsou navzájem komplementární. Z tohoto důvodu se velmi často používají v kombinaci ke studiu všech vibrací dané molekuly, neboť určitá vibrace může být např. v IČ aktivní a v Ramanově spektroskopie naopak neaktivní a vice versa. To nám umožňuje se na stejnou oblast vibrací dívat různými pohledy. (Larkin, 2011)

Obě metody vibrační spektroskopie – Ramanova a IČ spektroskopie zahrnují studium interakce elektromagnetického záření s molekulárními vibracemi. Odlišují se však způsobem, jakým je energie fotonu přenesena na změnu vibračního stavu molekuly. IČ spektroskopie studuje přechody mezi stacionárními vibračními stavy molekuly vyvolané absorpcí infračerveného záření (fotonu), jehož energie je shodná s energetickým rozdílem dvou stacionárních vibračních stavů molekuly, (Larkin, 2011). V případě, kdy je energie dopadajícího fotonu mnohem větší, než je energetický rozdíl mezi stacionárními vibračními stavy, tak absorpce takového fotonu vybudí molekulu do nestabilního virtuálního energetického stavu a následně dojde k vyzáření sekundárního fotonu a molekula se tak vrátí do stacionárního stavu. Je-li vlnová délka absorbujícího i vyzářeného fotonu shodná, pak mluvíme o pružném, tzv. Rayleighově rozptylu. V případě, je-li vlnová délka vyzářeného fotonu odlišná, pak mluvíme o neelastickém, tzv. Ramanově rozptylu⁵, (Prosser, 1989). Rozdíl mezi energiemi absorbovaného a vyzářeného fotonu se ze zákona zachování energie využije ke změně stacionárního vibračního stavu. Na **Obrázku 16** pak můžeme vidět jednotlivé

⁵ V ruské literatuře se můžeme setkat s pojmem kombinační rozptyl.

energetické přechody mezi vibračními stavy při infračervené absorpci, Rayleighově a Ramanově rozptylu.

Nejčastěji se vibrační spektra prezentují ve vlnočtové škále $\tilde{\nu}$ (v jednotkách reciprokových centimetrů, cm^{-1}), která je definována jako převrácená hodnota vlnové délky λ odpovídající frekvence vibrací, (Schrader, 1995). Vibrační spektra jsou specifická a jedinečná pro každou molekulu tak jako otisk lidského prstu. Vibrační pásy v Ramanových a IČ spektrech jsou charakterizované obvykle vlnočtem $\tilde{\nu}$, intenzitou a tvarem a závisejí na složení a hmotnosti atomů, geometrickém uspořádání, chemických vazbách apod, (Larkin, 2011).



Obrázek 16: Schéma energetických přechodů mezi vibračními stavy při infračervené absorpci, Rayleighově a Ramanově rozptylu, převzato z (Jílek, 2019)

Metody vibrační spektroskopie můžeme rozšířit zavedením optické aktivity. Tím získáme chirálně citlivé varianty metod vibrační spektroskopie. Souhrnně se pro tyto metody používá termín vibrační optická aktivita (VOA). Jedny z nejdůležitějších metod jsou vibrační cirkulární dichroismus (VCD) – chirálně citlivá varianta IČ spektroskopie a Ramanova optická aktivita (ROA) – chirálně citlivá varianta Ramanovy spektroskopie, které rozebereme později v dalších kapitolách. Taktéž jsou to metody komplementární, které se kombinují pro získání komplementárních informací o studovaných systémech. (Nafie, 2011)

1.4.1 Ramanova spektroskopie

Rozptyl světla lze popsat klasicky pomocí oscilujících dipólů, které jsou indukovány v molekule dopadajícím elektromagnetickým zářením. Světelné fotony se pak mohou rozptýlit pružně – Rayleighův rozptyl, anebo nepružně – Ramanův rozptyl. Nicméně většina fotonů se rozptýlí pružně, ale jen velmi málo nepružně (z jednoho milionu fotonů se přibližně jeden rozptýlí nepružně – velmi slabý jev, dle (Kapitán, 2006). (Larkin, 2011)

Ramanův rozptyl je pojmenován po svém objeviteli C. V. Ramanovi, který po ozáření vzorku monochromatickým světlem pozoroval v rozptýleném záření vyjma budící čáry (Rayleighův rozptyl) ještě další slabší linie, které byly kolem ní symetricky rozmístěné. Zjistilo se, že vzdálenosti těchto linií od centrální čáry (na vlnočtové škále) nezávisí na vlnové délce použitého monochromatického záření a jsou charakteristické pro každou látku. (Prosser, 1989)

Jak Rayleighův, tak Ramanův rozptyl jsou dvoufotonové procesy rozptylu světla. Excitační foton je molekulou absorbován a dojde k jejímu vybuzení ze základního do virtuálního stavu. Tento stav molekuly je nestabilní a dojde tak k vyzáření sekundárního fotonu. V případě Rayleighova rozptylu je vlnová délka sekundárního fotonu shodná s vlnovou délkou dopadajícího fotonu a molekula tak přejde zpět do základního stavu. Pro Ramanův rozptyl se vlnové délky primárního a sekundárního fotonu neshodují a molekula nám z virtuálního stavu přejde do prvního excitačního vibračního stavu. Foton tedy předá část své energie molekule, která ji využije na změnu svého vibračního stavu. Jak ukazuje **Obrázek 16**, existují dva typy Ramanova rozptylu – Stokesův a anti-Stokesův Ramanův rozptyl. Stokesův odpovídá situaci, kdy molekula byla původně v základním vibračním stavu, zatímco anti-Stokesův odpovídá případu, kdy molekula byla původně v excitovaném vibračním stavu. Na základě zákona zachování energie, pak můžeme psát (viz **Obrázek 16**)

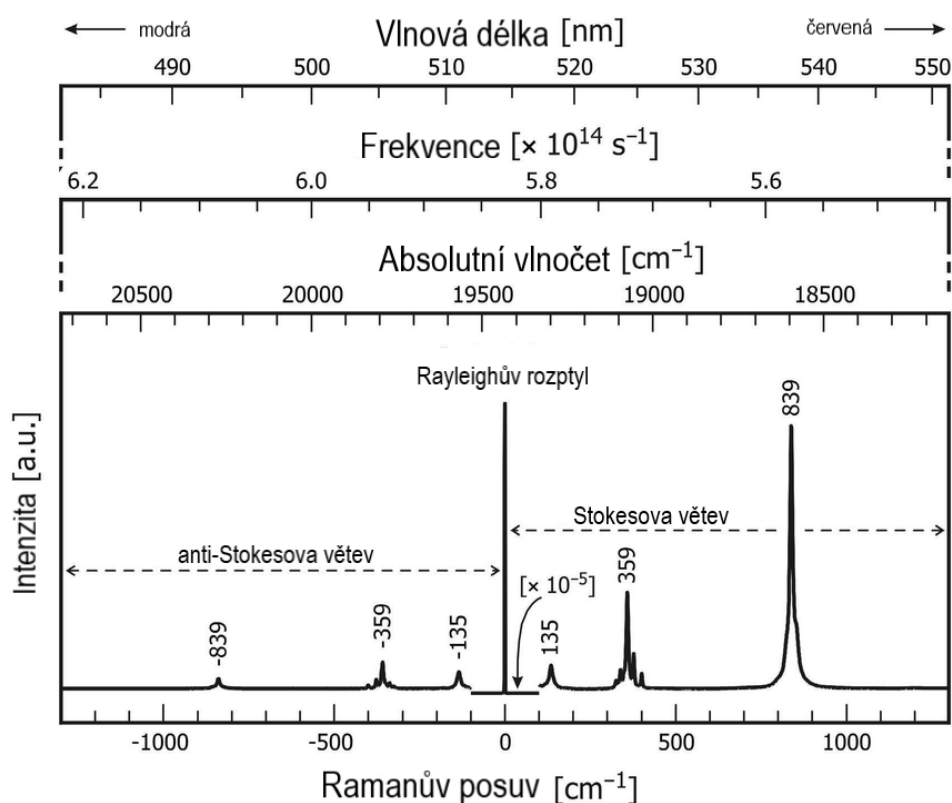
$$h\nu_{S,AS} = h\nu_{0,1} \mp (E_1 - E_0), \quad (1.18)$$

kde $\nu_{S,AS}$ je frekvence sekundárního fotonu (index S , resp. AS značí Stokesův, resp. anti-Stokesův Ramanův rozptyl), $\nu_{0,1}$ je frekvence dopadajícího (primárního) fotonu, E_0 , resp. E_1 je energie základního, resp. prvního excitačního vibračního stavu (platí $E_1 > E_0$), h je Planckova konstanta a pořadí indexů si odpovídá (index S odpovídá indexu 0 a znaménku mínus). Naměřené spektrum tak tedy obsahuje Stokesovu a anti-Stokesovu větev Ramanova rozptylu a centrální budící linii odpovídající Rayleighově

rozptylu, kterou je nutno potlačovat podle Ramanova (vlnočtového) posuvu, viz **Obrázek 17**. V praxi se však výhradně měří Stokesova větev, protože má větší intenzitu. Za běžných teplot je podle Maxwellova-Boltzmanova zákona většina molekul v základním vibračním stavu. Pro intenzitu Ramanova rozptylu I_R přibližně platí

$$I_R \propto \nu^4 I_0 N \left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2, \quad (1.19)$$

kde ν je frekvence excitačního záření, I_0 je intenzita excitačního záření, N je počet molekul, α je polarizovatelnost molekuly a Q má význam souřadnice. Díky závislosti na koncentraci molekul ve vztahu (1.19) může být Ramanova spektroskopie využita ke kvantitativní analýze. Člen $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right)^2$ nám určuje podmínku na pozorovatelnost určité vibrace. Aktivní vibrace v Ramanově spektroskopii jsou pouze ty, při kterých se mění polarizovatelnost molekuly, $\left(\frac{\partial \alpha}{\partial Q} \right) \neq 0$. (Larkin, 2011)

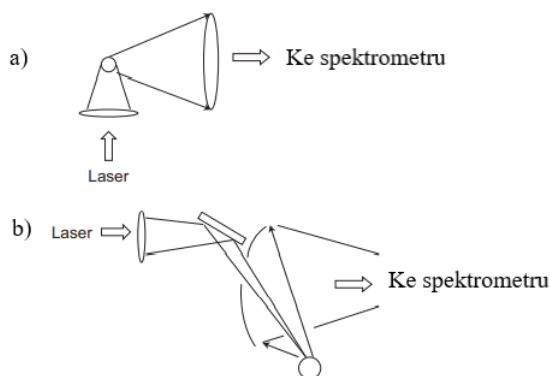


Obrázek 17: Příklad Ramanova spektra s oběma částmi – Stokesova a anti-Stokesova; upraveno z (Nasdala et al., 2004)

1.4.2 Instrumentace Ramanovy spektroskopie

Ve většině případů jsou Ramanovské spektrometry disperzní a jsou konstruovány tak, aby potlačily rozptýlené Rayleighovo záření při detekci Ramanova rozptylu. Spektrometr se skládá ze zdroje záření, kterým je laser s vlnovou délkou z viditelné, UV či blízké infračervené oblasti, dále jsou v něm sběrné optické prvky, spektrální analyzátor (monochromátor či interferometr) a detektor. V závislosti na excitačním záření se musí volit materiál optických prvků spolu s typem detektoru. Konstrukce těchto spektrometrů se musí vyrovnávat se dvěma protichůdnými konflikty – optická propustnost a spektrální rozlišení. Dříve se Ramanova spektra měřila skenovacím přístupem (dvojitý monochromátor). Rozvoj vysoce účinných filtrů potlačujících Rayleighovo rozptýlení umožnil použití jediné mřížky. Nejpoužívanějšími filtry jsou holografické notch filtry nebo edge (hranové) filtry. Jako detektory se dnes výhradně používají CCD či CMOS detektory, které výrazně zlepšily poměr signál/šum a zkrátily čas měření (spektrum je měřeno najednou). Bohužel tyto detektory mají omezený počet pixelů a experimentátor musí volit mezi spektrálním pokrytím a rozlišením. (Larkin, 2011)

Jelikož rozptýlené záření (Rayleighovo i Ramanovo) je všesměrové, tak v závislosti na úhlu rozptylu jsou možná jakákoli experimentální uspořádání. Nejčastěji se používají dvě základní geometrie – geometrie pravoúhlého (90°) a zpětného rozptylu (180°), které můžeme vidět na **Obrázku 18**. Obě geometrie jsou efektivní, ale většina moderních systémů používá geometrii zpětného rozptylu, zejména pak Ramanovské mikroskopy, (Smith & Dent, 2019).



Obrázek 18: Geometrie Ramanova spektrometru: a) pravoúhlá geometrie, b) geometrie zpětného rozptylu; upraveno z (Larkin, 2011)

1.4.3 Infračervená spektroskopie a její instrumentace

Infračervená spektroskopie (IČ) je založena na absorpci infračerveného záření, kterou nám popisuje Lambertův-Beerův zákon

$$\phi = \phi_0 \cdot 10^{-A} = \phi_0 \cdot 10^{-\varepsilon c l}, \quad (1.20)$$

kde ϕ je výstupní zářivý tok světla, ϕ_0 je vstupní zářivý tok světla, A je (dekadická) absorbance, ε je (dekadický) molární absorpční koeficient, c je molární koncentrace absorbujících molekul a l je tloušťka vzorku. Nejčastěji se infračervená spektra získávají měřením transmitance (propustnosti) vzorku τ , která je rovna

$$\tau = \frac{\phi}{\phi_0}. \quad (1.21)$$

Absorpce či absorpční koeficient α je pak roven

$$\alpha = 1 - \tau, \quad (1.22)$$

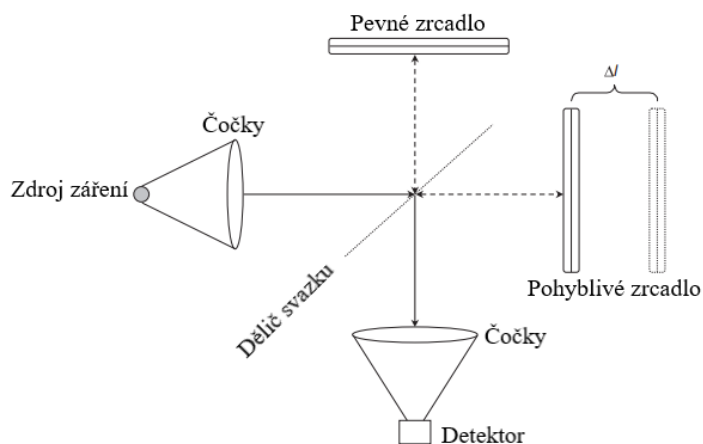
který je potřebný k získání infračerveného spektra. (Schrader, 1995)

K měření infračervených spekter se používají dva experimentální přístupy. Prvním je měření propustnosti pomocí disperzních spektrofotometrů obsahujících monochromátor. Většinou se vzorek umísťuje mezi monochromátor a detektor (u některých přístrojů je vzorek umístěn až za monochromátor). Principem fungování je porovnávání intenzit záření jednotlivých vlnových délek, získaných pomocí monochromátoru bez přítomnosti vzorku ve vzorkové části (případně s přítomností referenčního vzorku), s intenzitami získanými při průchodu zkoumaným vzorkem či látkou, čímž získáme propustnost vzorku τ . (Prosser, 1989)

V dnešní době jsou již téměř všechny komerční infračervené spektrometry založeny na sběru interferometrických dat. Takovéto spektrometry využívají k naměření infračervených spekter Fourierovu transformaci – FTIR⁶ spektroskopie. V těchto přístrojích není přítomen monochromátor ale interferometr (např. Michelsonův, schéma viz **Obrázek 19**). Dělič svazku způsobí rozdělení záření na dva paprsky. Jeden paprsek se odrazí od pevného zrcátka a po průchodu vzorkem dopadá na detektor. Druhý se odráží od pohyblivého zrcátka a také po průchodu vzorkem dopadá na detektor, kde spolu tyto dva paprsky interferují. Poloha pohyblivého zrcátka určuje, jestli bude interference konstruktivní či destruktivní. Výsledkem je interferogram, který se získal měřením intenzity záření vzhledem k poloze

⁶ Z angl. Fourier transform infrared

pohyblivého zrcátka a představuje Fourierův obraz spektra. Pomocí výpočetní techniky je infračervené spektrum získáno zpětnou Fourierovou transformací. Takováto konstrukce spektrometrů skýtá řadu výhod. První z nich je multiplexová (Felgettova) výhoda a s ní i zkrácení měřicího času, lepší poměr signál/šum a velká propustnost pro optické záření (tzv. Jacquinotova výhoda). Podrobnější popis můžeme nalézt např. v (Larkin, 2011) nebo (Diem, 2015).



Obrázek 19: Schéma Michelsonova interferometru, ;
upraveno z (Larkin, 2011)

1.5 Vibrační optická aktivita

Vibrační optická aktivita je souhrnný termín pro chiroptické (chirálně citlivé varianty) infračervené a Ramanovy spektroskopie. V případě infračervené spektroskopie se jedná o vibrační cirkulární dichroismus (VCD) a v případě Ramanovy spektroskopie se jedná o Ramanovu optickou aktivitu (ROA). Jsou to metody komplementární a velmi často se spolu kombinují, neboť každá z nich nám dává trochu jiný pohled na zkoumanou látku. Proč je dobré tyto metody kombinovat můžeme názorně vidět v článku (Tam et al., 1997), kde jsou porovnávána spektra velmi podobných molekul – 1-amino-2-propanol a 2-amino-1-propanol. Ukázalo se, že tyto molekuly měly ROA spektra velmi podobná, ale zcela rozdílná VCD spektra. Teorie i experimentální instrumentace je u VCD značně jednodušší než u ROA, (Nafie et al., 1994).

1.5.1 Chiralita a optická aktivita

Pojmy chiralita a optická aktivita spolu úzce souvisejí. Nejčastěji a nejintuitivněji je chiralita pro molekuly definována tak, že molekula je chirální, pokud ji nelze ztotožnit s jejím zrcadlovým obrazem. Jednoduchou představou mohou být lidské ruce, které taktéž nelze ztotožnit se svými zrcadlovými obrazy. Další možná definice chiralit může být pomocí prvků symetrie tvořící grupu. (Nafie, 2011)

Většina biologicky významných molekul vykazuje chiralitu. Příkladem mohou být proteiny, aminokyseliny, cukry, ale i např. DNA. Zdrojem chiralit v těchto látkách je většinou čtyřvázný uhlík (označení * na **Obrázku 12**), který je vázán ke čtyřem různým skupinám či prvkům a představuje tak chirální centrum molekuly (stereocentrum). Existuje více konvencí, jak specifikovat stereocentrum. První je založena na Fisherově projekci a vede k označení L a D, se kterým se můžeme setkat převážně u aminokyselin, cukrů a peptidů. Jinde se však používá označení R (rectus – pravý) a S (sinister – levý), které je založeno na prioritě navázaných skupin – Cahnův-Ingoldův-Prelogův systém. Další značení se odvíjí od toho, zda daná látka stačí rovinu polarizovaného světla po směru hodinových ručiček (+) nebo proti směru hodinových ručiček (–).

Chirální molekuly mající stejné chemické složení, ale odlišné optické vlastnosti se nazývají enantiomery. Jsou to tedy látky, které mají odlišnou absolutní, ale stejnou

relativní konfiguraci. Dva enantiomery téže látky stáčí roviny polarizovaného světla přesně opačně. Souvislost optické aktivity a chiralidy je dána tím, že optická aktivita je rozdíl odezvy chirální molekuly pro pravotočivé a levotočivé kruhově polarizované světlo. Tuto rozdílnou odezvu můžeme pozorovat pomocí metod vibrační optické aktivity.

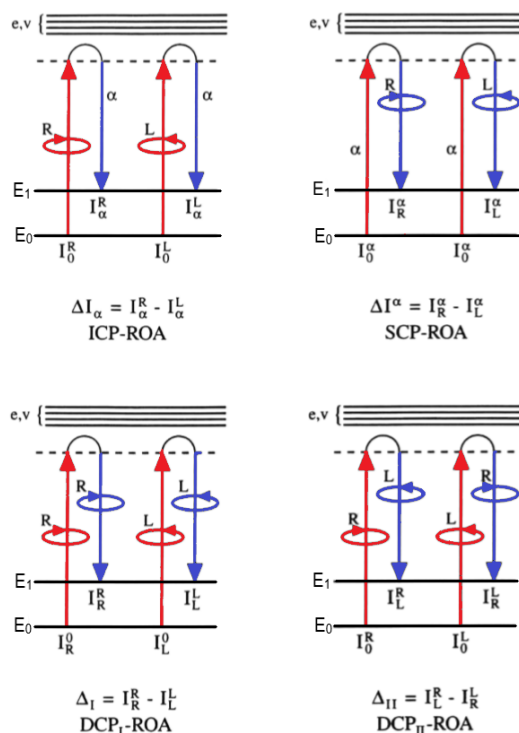
1.5.2 Ramanova optická aktivita – ROA

Ramanova optická aktivita (ROA) je chirálně citlivá varianta Ramanovy spektroskopie. Jedná se o metodu diferenční – měří se rozdílná odezva molekuly vůči pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovanému záření. Je tedy definována jako rozdíl intenzity Ramanova rozptylu mezi pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaným dopadajícím nebo rozptýleným zářením, (Nafie, 2011). Tento rozdíl je oproti původnímu Ramanovskému signálu menší o 3 až 5 řádů, (L.D. Barron & Buckingham, 1971).

Existují čtyři varianty ROA experimentu, tzv. modulační schémata. Ta jsou uvedena na **Obrázku 20**, kde E_0 a E_1 jsou vibrační energetické hladiny. Původní metodou je ICP (incident circular polarization), na které byly založeny první měření, viz (L. D. Barron et al., 1973a), (L. D. Barron et al., 1973b) a (Werner Hug et al., 1975). V ICP se měří rozdíl intenzit nepolarizovaného rozptýleného záření pro dopadající pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované záření ($I^R - I^L$). ICP modulační schéma využívá i ROA spektrometr vybudovaný na Fyzikálním ústavu MFF UK v Praze, jehož podrobná konstrukce je popsána v (Hanzlíková et al., 1999). Další variantou je SCP (scattered circular polarization), při které se měří rozdíl intenzit pravotočivě a levotočivě kruhově polarizované komponenty rozptýleného záření ($I_R - I_L$). V této variantě je budící záření buď lineárně polarizované, nebo nepolarizované. Na této variantě je založen například komerční ROA spektrometr od firmy Biotools, Inc. První konstrukce tohoto modulačního schématu je popsána v (Spencer et al., 1988). Zbylé dvě metody jsou si velmi blízké. U nich je vždy budící záření kruhově polarizované a následně se detekuje rozptýlené záření, které má stejnou či opačnou kruhovou polarizaci, DCP_I: $I_R^R - I_L^L$, DCP_{II}: $I_R^L - I_L^R$ (dual circular polarization). Na závěr uvádíme definice jednotlivých modulačních schémat pro jakýkoli vibrační přechod mezi stavy ev a ev' (e značí elektronový stav a v , v' různé vibrační stavy) zahrnující vibrační mód a

$$\begin{aligned}
\text{ICP ROA } (\Delta I_\alpha)^a_{ev,ev} &= (I_\alpha^R)^a_{ev,ev} - (I_\alpha^L)^a_{ev,ev}, \\
\text{SCP ROA } (\Delta I^\alpha)^a_{ev,ev} &= (I_R^\alpha)^a_{ev,ev} - (I_L^\alpha)^a_{ev,ev}, \\
\text{DCP}_I \text{ ROA } (\Delta I_I)^a_{ev,ev} &= (I_R^R)^a_{ev,ev} - (I_L^L)^a_{ev,ev}, \\
\text{DCP}_{II} \text{ ROA } (\Delta I_{II})^a_{ev,ev} &= (I_L^R)^a_{ev,ev} - (I_R^L)^a_{ev,ev},
\end{aligned}
\tag{1.23}$$

kde dolní indexy mají význam polarizace budícího záření a horní indexy mají význam polarizace rozptýleného záření. Stejně jako u Ramanovy spektroskopie jsou u ROA experimentů možná různá geometrická uspořádání. Nejvýznačnější jsou geometrie zpětného, dopředného a pravouhého rozptylu. V dnešní době převažuje geometrie zpětného rozptylu, která je pro intenzitu ROA signálu nejvhodnější, (Hecht et al., 1989). (Nafie, 2011)



Obrázek 20: Metody měření ROA; upraveno z (Nafie, 2011)

1.5.3 Teorie ROA

Intenzita rozptýleného záření I na molekule s komplexní polarizovatelností $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$ interagující s jednotkovými komplexními polarizačními vektory budícího elektrického pole \tilde{e}_β^i a rozptýleného elektrického pole \tilde{e}_α^d je dána vztahem

$$I(\tilde{e}^d, \tilde{e}^i) = 90K \langle |\tilde{e}_\alpha^{d*} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} \tilde{e}_\beta^i|^2 \rangle, \quad (1.24)$$

kde lomené závorky představují středování přes všechny orientace polarizovatelnosti v molekule vzhledem k laboratorní soustavě a * značí komplexní sdružení. Ve vztahu (1.24) se používá Einsteinova sumační konvence pro všechny opakující se dolní řecké indexy. Konstanta K zahrnuje závislost rozptylu na frekvenci rozptýleného záření ω_R , magnetické permeability μ_0 , elektrické intenzitě budícího pole $\tilde{E}^{(0)}$ a vzdálenosti mezi rozptylující molekulou a detektorem R vztahem

$$K = \frac{1}{90} \left(\frac{\omega_R^2 \mu_0 \tilde{E}^{(0)}}{4\pi R} \right)^2. \quad (1.25)$$

V případě Ramanovy optické aktivity však místo komplexní polarizovatelnosti molekuly $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$, která je zodpovědná za Rayleighův a Ramanův rozptyl, musíme vzít komplexní rozptylový (Ramanův) tenzor $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$, který má tvar

$$\begin{aligned} \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} = \tilde{\alpha}_{\alpha\beta} + \frac{1}{c} \left[\varepsilon_{\gamma\delta\beta} n_\delta^i \tilde{G}_{\alpha\gamma} + \varepsilon_{\gamma\delta\alpha} n_\delta^d \tilde{G}_{\gamma\beta} \right. \\ \left. + \frac{i}{3} (\omega_0 n_\gamma^i \tilde{A}_{\alpha,\gamma\beta} - \omega_R n_\gamma^d \tilde{A}_{\beta,\gamma\alpha}) \right], \end{aligned} \quad (1.26)$$

kde $\varepsilon_{\alpha\beta\gamma}$ je Levi-Civitův antisymetrický tenzor třetího řádu, ω_0 je frekvence budícího záření, n_α^i a n_α^d jsou postupně propagační vektory pro budící a rozptýlené záření, c je rychlost světla. Ze vztahu (1.26) tedy vidíme, že Ramanův tenzor kromě komplexní polarizovatelnosti $\tilde{\alpha}_{\alpha\beta}$ obsahuje navíc ještě další čtyři tenzory $\tilde{G}_{\alpha\gamma}$, $\tilde{G}_{\gamma\beta}$, $\tilde{A}_{\alpha,\gamma\beta}$ a $\tilde{A}_{\beta,\gamma\alpha}$. Ty se souhrnně označují jako tenzory Ramanovy optické aktivity (ROA tenzory). Konkrétně však $\tilde{G}_{\alpha\gamma}$, $\tilde{G}_{\gamma\beta}$ jsou tenzory magnetické dipólové optické aktivity a $\tilde{A}_{\alpha,\gamma\beta}$, $\tilde{A}_{\beta,\gamma\alpha}$ jsou tenzory elektrické kvadrupólové optické aktivity. (Nafie, 2011)

Uvážíme-li případ, kdy frekvence budícího záření je dostatečně vzdálená od frekvencí odpovídajících elektronové absorpci dané molekuly, tak lze provést nerezonanční přiblížení (aproximaci). V této aproximaci se nám jednotlivé výše zmíněné (obecně komplexní) tenzory zjednoduší – tenzor polarizovatelnosti a dva tenzory elektrické kvadrupólové optické aktivity se omezí pouze na reálnou část a dva

tenzory magnetické dipólové optické aktivity budou mít pouze imaginární část. V rámci této aproximace tenzory nabývají následujícího tvaru

$$\begin{aligned}\alpha_{\alpha\beta} &= \frac{2}{\hbar} \sum_{e \neq g} \frac{\omega_{eg}}{\omega_{eg}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re}[\langle g | \hat{\mu}_\alpha | e \rangle \langle e | \hat{\mu}_\beta | g \rangle], \\ G'_{\alpha\beta} &= -\frac{2}{\hbar} \sum_{e \neq g} \frac{\omega_{eg}}{\omega_{eg}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Im}[\langle g | \hat{\mu}_\alpha | e \rangle \langle e | \hat{m}_\beta | g \rangle], \\ A_{\alpha,\beta\gamma} &= \frac{2}{\hbar} \sum_{e \neq g} \frac{\omega_{eg}}{\omega_{eg}^2 - \omega_0^2} \operatorname{Re}[\langle g | \hat{\mu}_\alpha | e \rangle \langle e | \hat{\theta}_{\beta\gamma} | g \rangle],\end{aligned}\quad (1.27)$$

kde $\hat{\mu}_\alpha$, resp. $\hat{\theta}_{\beta\gamma}$ je operátor elektrického dipólového, resp. kvadrupólového momentu, \hat{m}_β je operátor magnetického dipólového momentu a $\omega_{eg} = \omega_e - \omega_g$ je úhlová frekvence při přechodu mezi stavy e a g . V nerezonanční aproximaci jsou následující tenzorové invarianty nezávislé vůči volbě kartézských souřadnic (s rotací molekuly se v dané vztažné soustavě nemění)

$$\begin{aligned}\beta(\alpha)^2 &= \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta}\alpha_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}\alpha_{\beta\beta}), \\ \beta(G')^2 &= \frac{1}{2} (3\alpha_{\alpha\beta}G'_{\alpha\beta} - \alpha_{\alpha\alpha}G'_{\beta\beta}), \\ \beta(A)^2 &= \frac{1}{2} (\omega_0\alpha_{\alpha\beta}\varepsilon_{\alpha\gamma\delta}A_{\gamma,\delta\beta}), \\ \alpha &= \frac{1}{3} \alpha_{\alpha\alpha}, \\ G' &= \frac{1}{3} G'_{\alpha\alpha}.\end{aligned}\quad (1.28)$$

V rámci této aproximace můžeme pomocí výše zmíněných tenzorových invariantů zapsat obecné vztahy pro součet cirkulárních intenzit (CIS – Ramanův signál) a pro jejich rozdíl (CID – ROA signál), které mají tvar

$$\begin{aligned}I^R + I^L &= 4K[D_1\alpha^2 + D_2\beta(\alpha)^2], \\ I^R - I^L &= \frac{8K}{c} [D_3\alpha G' + D_4\beta(G')^2 + D_5\beta(A)^2].\end{aligned}\quad (1.29)$$

Jednotlivé parametry D_i jsou různé pro modulační schémata a geometrie experimentu. Hodnoty jednotlivých parametrů D_i pro jednotlivá modulační schémata v geometrii zpětného rozptylu jsou uvedeny v **Tabulce 2**. (Nafie, 2011)

V teorii ROA se zavádí diferenční cirkulární intenzita Δ . Jedná se o bezrozměrnou veličinu, která je analogií k poměru anizotropie zaváděné u VCD. Je definována jako poměr ROA signálu ke zdrojovému Ramanovu signálu

$$\Delta = \frac{I^R - I^L}{I^R + I^L} \quad (1.30)$$

a je užitečná pro hodnocení kvality ROA spekter.

Tabulka 2: Hodnoty parametrů D_i pro jednotlivá modulační schémata v geometrii zpětného rozptylu (180°), dle (Nafie, 2011)

Modulační schéma	D_1	D_2	D_3	D_4	D_5
ICP _u	45	7	0	12	4
SCP _u	45	7	0	12	4
DCP _I	0	6	0	12	4
DCP _{II}	45	1	0	0	0

Pozn. u...nepolarizované záření

1.5.4 Vibrační cirkulární dichroismus (VCD) a jeho teorie

Absorpční spektra látek můžeme také získat použitím kruhově polarizovaného excitačního záření. Pro achirální molekulu jsou absorpční spektra získaná pravotočivě a levotočivě kruhově polarizovaným zářením totožná. Pro chirální molekulu tomu tak však není. Speciálně zrcadlovou symetrii absorpčních spekter vykazují dva enantiomery téže látky. Metoda optické spektroskopie, která měří rozdíl absorbancí mezi levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným zářením, se nazývá cirkulární dichroismus (CD). Využívá-li se v CD infračervené záření, tak se jedná o chirálně citlivou (chiroptickou) variantu IČ spektroskopie, která se nazývá vibrační cirkulární dichroismus (VCD). Tato metoda je komplementární k ROA spektroskopii, a proto se velmi často spolu kombinují. (Stephens et al., 2012)

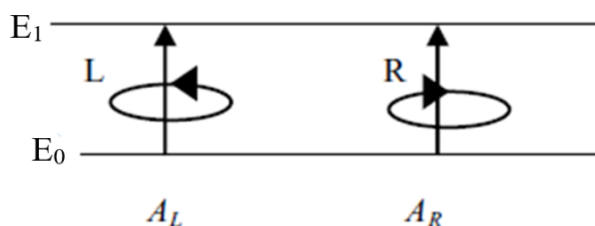
Vibrační cirkulární dichroismu je definován jako

$$\Delta A = A_L - A_R, \quad (1.31)$$

kde A_L , A_R jsou postupně absorbance látky levotočivým a pravotočivým kruhově polarizovaným zářením a ΔA se označuje jako diferenciální absorbance. Schéma procesu absorpce je uvedeno na **Obrázku 21**. Použitím Lambertova-Beerova zákona lze ΔA vyjádřit pomocí diferenciálního molárního extinkčního koeficientu $\Delta \epsilon$ jako

$$\Delta A = (\Delta \epsilon)cl = (\epsilon_L - \epsilon_R)cl, \quad (1.32)$$

kde ε_L , resp. ε_R je molární extinkční koeficient pro levotočivě, resp. pravotočivě kruhově polarizované světlo, c je molární koncentrace látky a l je optická dráha. Poměr $\frac{\Delta\varepsilon}{\varepsilon}$ se nazývá poměr anizotropie, který je obvykle pro VCD menší než 10^{-4} , (Stephens et al., 2012). Z počátku bylo měření VCD spekter limitováno optickými prvky (zejména polarizátory a detektory). Jedno z prvních měření VCD na disperzním skenovacím přístroji provedl (Osborne et al., 1973). V dnešní době však dominují VCD spektrometry, které získávají spektrum zpětnou Fourierovou transformací z interferogramu (podobně jako infračervené spektrometry). Příkladem může být komerční spektrometr druhé generace ChiralIR-2XTM, který navíc k potlačení artefaktů měření využívá dva fotoelastické modulátory – patent DualPEMTM, viz (Nafie & Dukor, 2002). Pro podrobnější popis instrumentace a nových přístupů odkazují na (Keiderling, 2018).



Obrázek 21: Energetické znázornění přechodu ze základního E_0 do prvního excitovaného stavu E_1 molekuly, způsobené levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným světlem, upraveno z (Nafie, 2011)

V tomto odstavci jen nastíníme základní úvahu a vztahy pro VCD spektroskopii. Pro detailnější odvození včetně jednotlivých kroků odkazují na publikace (Nafie, 2011) či (Stephens et al., 2012). Obecně cirkulární dichroismus, a tedy i vibrační cirkulární dichroismus má původ v rotační síle R

$$R = \text{Im}(\vec{\mu} \cdot \vec{m}), \quad (1.33)$$

kde $\vec{\mu}$ je elektrický dipólový moment přechodu a \vec{m} je magnetický dipólový moment přechodu, který je nezbytný pro objasnění VCD spekter. Pro obecný přechod mezi základním ψ_0 a excitovaným ψ_a stavem jsou dipólová D_a a rotační síla R_a definovány, dle (Nafie, 2011) jako

$$\begin{aligned} D_a &= \langle \psi_0 | \vec{\mu} | \psi_a \rangle^* \cdot \langle \psi_a | \vec{\mu} | \psi_0 \rangle, \\ R_a &= \text{Im}[\langle \psi_0 | \vec{\mu} | \psi_a \rangle \cdot \langle \psi_a | \vec{m} | \psi_0 \rangle]. \end{aligned} \quad (1.34)$$

Díky tomu, že rotační síla je skalárním součinem dvou různých vektorů přechodových momentů, tak může nabývat pozitivních (mají stejný směr), negativních (mají opačný směr) nebo nulových hodnot v případě, že jsou vektory přechodových momentů ortogonální. Pouze chirální molekuly mají nenulové hodnoty rotační síly. Pro diferenciální molární extinkční koeficient $\Delta\varepsilon$ a molární extinkční koeficient ε pak můžeme psát

$$\begin{aligned}\Delta\varepsilon(\tilde{\nu}) &= \frac{32\pi^3 N \tilde{\nu}}{3000hc \ln(10)} \sum_a R_a f'_a(\tilde{\nu}), \\ \varepsilon(\tilde{\nu}) &= \frac{8\pi^3 N \tilde{\nu}}{3000hc \ln(10)} \sum_a D_a f'_a(\tilde{\nu}),\end{aligned}\tag{1.35}$$

kde N je počet atomů molekuly, $\tilde{\nu}$ je vlnčet záření, h je Planckova konstanta, c je rychlost světla a f'_a představuje tvar absorpčního pásu. Pro poměr anizotropie g_a spojený s přechodem ze základního do excitovaného stavu ($\psi_0 \rightarrow \psi_a$) můžeme obecně pro VCD psát

$$g_a = \frac{\Delta\varepsilon(\tilde{\nu})}{\varepsilon(\tilde{\nu})} = \frac{4R_a(\tilde{\nu})}{D_a(\tilde{\nu})}.\tag{1.36}$$

1.6 Interpretace vibračních spekter

Interpretaci vibračních spekter lze provádět třemi různými metodami. První metodou je tzv. empirická. Jak již z názvu je patrné, je založena na empirii (zkušenostech či poznání), neboť vibrační spektra lze rozložit do oblastí, které jsou specifické pro určité vibrace. Například oblast 2700–4000 cm^{-1} , která je typická pro valenční vodíkové vibrace (X-H), nebo tzv. oblast otisku prstu (angl. fingerprint, cca 800 až 1800 cm^{-1}), která je jedinečná pro každou molekulu či látku. Další možností, jak empiricky interpretovat spektra je pomocí srovnávání spekter látek, které jsou si velmi podobné. Takovouto interpretaci spekter lze nalézt např. v článku (Bell et al., 1997a), kde porovnávali naměřená spektra různých nukleotidů (např. cytidin a 2'-deoxycytidin nebo uridin, 2'-deoxyuridin a 5-methyluridin). Na základě rozdílů – intenzitních změn, vlnčtového posunu pásů nebo objevení se nových pásů je pak možné popsat trend ve vibračních spektrech a charakterizovat jednotlivé pásy či oblasti.

Dalším způsobem, jak interpretovat spektra, je statistický způsob. Existuje několik různých metod, které lze použít, např. analýza hlavních komponent (PCA – Principal Component Analysis) nebo faktorová analýza, konkrétně např. její metoda SVD (Singular Value Decomposition). V obou případech je cílem zjednodušit si velké množství vstupních dat (spekter), aby mohly být rozpoznány korelované znaky. Statistický způsob se využívá zejména na sérii naměřených spekter. Příkladem může být měření pH či koncentračních závislostí Ramanových spekter, které prezentujeme ve výsledkové části této práce. Ze statistického zpracování pak lze snadno identifikovat nejen spektrální změny ale např. i různé formy, ve kterých se látka může vyskytovat. Statistické metody lze využít i k intenzitní normalizaci a odečtu pozadí, viz (Palacký et al., 2011).

Poslední způsob interpretace spekter je na základě porovnání s teoretickými výpočty (simulacemi spekter), které nám umožňují získat více informací o konfiguraci látky. Současný přístup k simulacím lze nalézt např. v (Mutter et al., 2015). Základní přístupy jsou čisté *ab initio* či metody využívající teorii hustotního funkcionalu. Prvním krokem simulace spekter je výběr vhodného konformeru, který se nejčastěji určuje geometrickou optimalizací (identifikace lokálního minima na potenciální energetické ploše). Poté následuje výpočet frekvencí a intenzit vibračních pásů. Velkou roli při simulacích hrají použité modely rozpouštědla, neboť ve většině případů

je studovaná látka rozpuštěna v nějakém rozpouštědle. Modely rozpouštědla lze rozdělit do dvou hlavních skupin na implicitní a explicitní. V případě implicitních modelů je látka uzavřena v dutině a rozpouštědlo je charakterizováno permitivitou. Naopak u explicitních modelů je látka přímo obklopena molekulami rozpouštědla. Při simulacích často dochází ke kombinování těchto modelů – do systému jsou přidány molekuly rozpouštědla přímo interagující s látkou či přímo celá první solvatační obálka, a to vše je uzavřeno do kavity. Pomocí výpočetních metod lze však běžně simulovat vibrační spektra jen malých až středně velkých molekul (do cca 100 atomů). V poslední době však byly vyvinuty aproximativní přístupy, které tento limit umožňují ve speciálních případech až několikanásobně překročit, (Kessler et al., 2015).

V naší práci se pohybujeme na úrovni empirického a statistického přístupu interpretace spekter.

2. Cíle

Hlavním cílem této diplomové práce je systematická charakterizace různých nukleotidů a jejich samouspořádání pomocí Ramanovy spektroskopie a její chirálně citlivé varianty – ROA. Chceme zjistit, jak jsou ROA spektra nukleotidů citlivá na změny fyzikálně-chemických podmínek, a zda by mohla být využita pro následný výzkum vlastností a chování nukleotidových samouspořádání, především aglomerátů G-tetrád. Velmi nás zajímá, jak informačně bohaté jsou v ROA spektrech oblasti valenčních vodíkových vibrací a oblasti nízkých vlnočtů, které doposud nebyly studovány.

Dílčí cíle této práce lze uvést v následujících bodech

1. Změření kvalitních ROA spekter adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP) a guanosin-5'-monofosfátu (5'-rGMP) v dobře definovaném nábojovém stavu, v celé oblasti fundamentálních vibrací a následně jejich porovnání s již dříve publikovanými spektry.
2. Charakterizace nábojových stavů série nukleotidů, stanovení jejich pK_A disociačních konstant na základě spekter Ramanova rozptylu, srovnání získaných výsledků s literaturou a nalezení vhodného pH pro měření ROA spekter různých nábojových forem jednotlivých nukleotidů. Změření ROA spekter různých nábojových stavů vybraného nukleotidu a analýza pozorovaných rozdílů.
3. Popis spektrálních změn spojených s různou polohou fosfátu u vybraného nukleotidu (např. adenosinmonofosfátu) v Ramanových a ROA spektrech. Charakterizace spektrálních rozdílů v Ramanových a ROA spektrech vyvolaných záměnou ribosy za 2'-deoxyribosu.
4. Charakterizace spektrálních projevů spojených se stohováním (stackingem) purinových nukleotidů v Ramanových a ROA spektrech.
5. Stanovení podmínek tvorby aglomerátů G-tetrád v přítomnosti sodných a draselných iontů a specifikace charakteristických spektrálních markerů tvorby těchto aglomerátů v Ramanových a především v ROA spektrech. Charakterizace vlivu zvýšené koncentrace sodných a draselných iontů na tyto procesy.

3. Metody

V této kapitole jsou popsány použité vzorky a jejich příprava pro měření vibračních spekter. Následuje popis Ramanova a ROA spektrometru, které jsme využívali, a popis zpracování a vyhodnocení experimentálních dat, který byl z velké části založen na použití multidimenzionálních statistických metod – faktorové analýzy.

3.1 Vzorky a laboratorní vybavení

V této diplomové práci byly použity komerčně dostupné vzorky jednotlivých mononukleotidů, jejichž výčet je následující:

- Adenosin (1400)^{0,□},
- Adenosin-5'-monofosfát (5'-rAMP, 01930)^{2,*},
- 2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát (5'-dAMP, D-6250)^{1,*},
- Adenosin-3'-monofosfát (3'-rAMP, A-9272)^{0,*},
- Adenosin-2'-monofosfát (2'-rAMP, A-9396)^{0,*},
- Adenosin-3',5'-cyklickýmonofosfát (3',5'-cAMP, A-6885)^{1h,*},
- Cytidin-5'-monofosfát (5'-rCMP, C-1006)^{2,*},
- 2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (5'-dCMP, D-7625)^{1,*},
- Guanosin-5'-monofosfát (5'-rGMP, G-8377)^{2h,*},
- Guanosin-5'-monofosfát (5'-rGMP, NG09355)^{0,○},
- 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (5'-dGMP, D-9500)^{1h,*},
- 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (5'-dGMP, ND02996)^{2,○},
- 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (5'-dTMP, T-7004)^{1,*},
- Uridin-5'-monofosfát (5'-rUMP, U-6375)^{2,*},

kde horní číselný index značí formu vzorku – volná kyselina (0), sodná sůl (1), hydrát sodné soli (1h), disodná sůl (2), hydrát disodné soli (2h) a symboly značí výrobce: * – Sigma Aldrich (nyní Merck), ○ – Carbosynth a □ – P-L Biochemicals, Inc. Produktová čísla a zkratky jednotlivých nukleotidů jsou uvedeny v závorkách tak, jak je dále využíváme v této práci. Ve všech případech se jednalo o bílé krystalické prášky.

Pro přípravu vzorků byly použity standardní laboratorní nástroje (pipety, ...), spotřební materiál (eppendorfky apod.) a následující přístroje: digitální analytické váhy – Mettler Toledo AG245, vortex, ThermoMixer comfort od fy. Eppendorf, centrifuga – GMCLab™ Gilson™ (minicentrifuga), lyofilizátor – SCANVAC CollSafe™ a pH metr – Thermo Orion model 350 PerpHecT logR meter.

3.2 Příprava vzorků

3.2.1 pH závislosti

Pro měření pH závislosti Ramanových spekter byly vždy vzorky rozpuštěny v deionizované vodě (H₂O) s výslednou molární koncentrací $c \approx 25$ mM. Takto nízká koncentrace byla zvolena proto, aby nedocházelo k asociaci jednotlivých nukleotidů do větších aglomerátů prostřednictvím např. stackingu bází. Výchozí pH jednotlivých vzorků bylo zvoleno tak, aby se při titraci pokryly všechny nábojové formy (stavy) jednotlivých mononukleotidů. Úprava pH se následně prováděla pomocí malých přídavek kyseliny chlorovodíkové (HCl) o molární koncentraci 0.5 M a 0.1 M či pomocí hydroxidu sodného (NaOH) o stejných molárních koncentracích tak, aby nedocházelo k velké změně objemu a koncentrace roztoku.

3.2.2 Koncentrační závislosti

V případě koncentračních měření byly vzorky rozpuštěny v deionizované vodě a rozsah studovaných molárních koncentrací byl v rozsahu tří řádů – dolní limit (~ 10 mM až 3 M) jsme zvolili tak, aby bylo možné naměřit kvalitní Ramanova spektra v době cca 30 minut, horní limit byl dán maximální rozpustností studovaného nukleotidu při daném pH. Pro 5'-rAMP byl rozsah $c_A = 1.56$ –2710 mM, pro 5'-rGMP – $c_G = 3.12$ –1510 mM a pro 5'-dGMP – $c_{dG} = 3.13$ –1000 mM. Pro lepší rozpustnost vyšších koncentrací byly vzorky zahřívány na teplotu 60 °C v ThermoMixeru se 300 otáčkami za minutu. Po rozpuštění byly vzorky postupně ochlazeny na pokojovou teplotu. Výjimkou byla příprava didraselné soli 5'-rGMP, kde jsme si nejprve rozpustili 5'-rGMP ve formě volné kyseliny v přibližně 20 mM koncentraci v H₂O. Poté jsme tento roztok ztitrovali pomocí hydroxidu draselného (KOH) na pH = 8.41. Tento roztok byl následně zlyofilizován a poté rozpouštěn v H₂O v požadované koncentraci (3.12–710 mM). Koncentrace jednotlivých vzorků

nukleotidů, které byly měřeny, jsou uvedeny v následující **Tabulce 3**, kde c_{rA} , c_{rG} , $c_{K_2(rG)}$ a c_{dG} jsou postupně koncentrace 5'-rAMP, 5'-rGMP, $K_2(5'-rGMP)$ a 5'-dGMP.

Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých vzorků při měření koncentračních závislostí

c_{rA} (mM)	c_{rG} (mM)	$c_{K_2(rG)}$ (mM)	c_{dG} (mM)
1.56	–	–	–
3.12	3.12	3.12	3.12
6.24	6.24	6.24	6.25
12.5	12.5	12.5	12.5
25	25	25	25
50	50	50	50
98	98	98	100
190	194	194	200
375	290	290	300
705	380	380	400
1000	460	460	500
1760	550	550	600
2710	630	630	700
–	710	710	800
–	785	–	900
–	860	–	1000
–	1040	–	–
–	1205	–	–
–	1510	–	–

Dále byly připraveny vzorky pro sledování vlivu iontové síly roztoku na samoskladbu 5'-rGMP a 5'-dGMP. Vzorky byly připraveny ve třech různých koncentracích (100, 500 a 1000 mM) s různými nadbytky sodných (Na^+) a draselných kationtů (K^+), které byly přidávány ve formě chloridových solí. Připravené vzorky jsou shrnuty v následující **Tabulce 4**, kde c_{Na^+} , resp. c_{K^+} má význam nadbytku sodných, resp. draselných kationtů a c_{rGMP} , c_{dGMP} má význam postupně koncentrace 5'-rGMP ve formě hydrátu disodné soli a 5'-dGMP ve formě disodné soli.

Tabulka 4: Připravené vzorky nukleotidů (disodné soli) s různými nadbytky Na^+ a K^+ iontů

c_{rGMP} (mM)	c_{Na^+} (mM)	c_{K^+} (mM)	c_{dGMP} (mM)	c_{Na^+} (mM)	c_{K^+} (mM)
100	0	0	100	0	0
	10	10		–	10
	50	50		–	50
	100	100		100	100
	150	150		–	150
	200	200		200	200
500	0	0	500	0	0
	50	50		100	50
	250	250		200	250
	500	500		500	500
	750	–		1000	750
1000	0	0	1000	0	0
	100	100		100	100
	–	–		200	–

3.2.3 ROA měření

Při přípravě vzorků pro měření ROA spekter se postupovalo stejným způsobem jako v případě Ramanovských měření. Hodnoty koncentrací a pH jednotlivých vzorků jsou uvedeny v **Tabulce 5**, kde c_i má význam koncentrace příslušného nukleotidu a vzorky pro pH měření byly připraveny v 50 mM koncentraci.

Tabulka 5: Připravené vzorky pro měření ROA spekter

pH měření				Koncentrační měření					
5'-rAMP				5'-rAMP			5'-rGMP		
pH	2.0	5.0	8.5	c_i (mM)	50	460	1500	190	710

3.3 Rozptylové metody

Spektra Ramanova rozptylu a ROA byla měřena na různých přístrojích, přičemž pro měření závislostí Ramanových spekter byl použit spektrometr SPEX vybudovaný na Fyzikálním ústavu MFF UK a ROA spektra byla měřena na ROA spektrometru vybudovaném dr. Kapitánem na Katedře optiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci. V této kapitole je uveden stručný popis použitých spektrometrů, postup měření a volba parametrů pro jednotlivá měření.

3.3.1 Ramanův spektrometr SPEX

Jedná se o Ramanův spektrometr vlastní konstrukce, který je založený na spektrografu SPEX 270M od firmy Jobin Yvon, a který je plně automatizovaný. Spektrometr má pravoúhlé uspořádání, kdy je rozptýlené záření sbíráno optikou v kolmém směru vůči excitačnímu záření. Jako excitační záření mohou být použity lasery o vlnových délkách 442, 488, 514 a 532 nm. K potlačení Rayleighova (pružného) rozptylu slouží Edge filtr, který je umístěn před vstupní štěrbinou spektrografu. Ten má k dispozici dvě mřížky s různým počtem vrypů na mm ($g_1 - 1200$ vrypů/mm, $g_2 - 1800$ vrypů/mm). Jako detektor slouží dusíkem chlazený CCD detektor mající rozlišení 1340×100 pixelů. Tento spektrometr slouží k makroskopickým měřením vzorků a díky teplotně stabilizovanému kyvetovému prostoru – měděný blok temperovaný vodní lázní Neslab od fy. Thermo Scientific, umožňuje měření teplotních závislostí. Navíc ke spektrometru je dostupné softwarové vybavení, které umožňuje automatické měření teplotních závislostí a kalibračních spekter.

3.3.2 Měření pH závislosti Ramanových spekter

Měřeny byly všechny mononukleotidy uvedené v kapitole 3.1 Vzorky. V případě guanosin-5'-monofosfátu byl použit vzorek ve formě disodné soli (G-8377) a v případě 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfátu byl použitý vzorek od firmy Sigma Aldrich (D-9500). Spektra byla měřena v širokém rozsahu vlnočtů (100 až 2300 cm^{-1}) při pH v rozmezí od cca 0.1 do 10. Pro všechna měření bylo použito stejné nastavení přístroje i parametry experimentu. Byla použita mřížka g_1 (1200 vrypů/mm), laser Verdi V2 o vlnové délce 532 nm a výkonu 1 W a kyveta Hellma typ 114-QS s 10 mm

optickou dráhou, která byla v průběhu měření orientována vždy stejným způsobem, aby byly potlačeny vlivy spojené s prací experimentátora. Expoziční doba byla zvolena tak, aby bylo optimálně využito intenzitní kapacity CCD detektoru (cca 5 s) a počet akumulací byl 120. Celkový čas měření jednoho spektra byl tedy 10 minut. Výchozí koncentrace c a výchozí objem vzorku V byly $c \approx 25$ mM a $V = 1$ ml.

3.3.3 Koncentrační měření Ramanových spekter

Pro měření čistě koncentračních závislostí bez dalších vlivů byly použity vzorky 5'-rAMP (01930), 5'-rGMP (G-8377), 5'-dGMP (ND02996) a námi připravená didraselná sůl guanosin-5'-monofosfátu – $K_2(5'-rGMP)$. Opět se měřila nízkofrekvenční oblast s mřížkou g1. K měření byla použita kyveta Hellma typ 110-QS s 1 mm optickou dráhou. Výkon laseru Verdi V2 o vlnové délce 532 nm se pro jednotlivé koncentrace měnil, ale vždy spolu s expoziční dobou se volil tak, aby na detektor dopadal maximální signál. Parametry nastavení experimentu pro koncentrační měření příslušných nukleotidů jsou shrnuty v **Tabulce 6**, kde c_i je koncentrace nukleotidu (vzorku), V je jeho objem a P značí výkon laseru.

Tabulka 6: Parametry experimentů pro koncentrační měření

Vzorek	c_i (mM)	V (μ l)	P (W)	Expozice (s)	Počet akumulací
5'-rAMP	≤ 12.5	100	1	25	144
	25–193	100	0.8	10	60
	≥ 375	100	0.2–0.8	5	60
5'-rGMP	≤ 12.5	200	1	6	600
	25–50	150	1	6	200
	≥ 98	100	0.5–1	5 nebo 6	120 nebo 100
$K_2(5'-rGMP)$	≤ 12.5	200	1	8	375
	24.9–49.6	200	1	6	200
	≥ 98.4	100	0.7–1	5 nebo 6	120 nebo 100
5'-dGMP	≤ 12.5	200	1	6	500
	25–50	100	1	6	200
	≥ 100	100	0.4–1	5 nebo 6	120 nebo 100

Pozn.: pro vyšší koncentrace byl volen nižší výkon laseru, v případě 5, resp. 6 s expozice se volilo 120, resp. 100 akumulací

Stejné nastavení spektrometru se využilo i ke koncentračnímu měření nukleotidů s různými nadbytky Na⁺ a K⁺ kationtů, viz 3.2 Příprava vzorků. Lišily se pouze parametry experimentu, které jsou uvedeny v **Tabulce 7** (význam veličin je shodný s **Tabulkou 6**).

Tabulka 7: Parametry experimentu pro koncentrační měření s různými poměry Na⁺ a K⁺

Vzorek	c_i (mM)	V (μ l)	P (W)	Expozice (s)	Počet akumulací
5'-rGMP	100	150	1	6	100
+	500	100	0.9	5	120
Na⁺	1000	100	0.6–0.7	5	120
5'-rGMP	100	150	1	6	100
+	500	100	0.9	5	120
K⁺	1000	100	0.6	5	120
5'-dGMP	100	100	1	6	100
+	500	100	0.8	5	120
Na⁺	1000	100	0.5	5	120
5'-dGMP	100	150	1	6	100
+	500	100	0.9	5 nebo 6	120 nebo 100
K⁺	1000	100	0.5	5	120

3.3.4 ROA spektrometr

ROA spektra byla měřena na nejnovějším prototypu ROA spektrometru (3. generace, duben 2021), který zkonstruoval dr. Josef Kapitán ve spolupráci s firmou Meopta na Univerzitě Palackého v Olomouci (Katedra optiky, Přírodovědecká fakulta). S komerční výrobou se počítá od konce roku 2021. Spektrometr popíšeme pouze povšechně, neboť některé konstrukční detaily jsou předmětem patentové ochrany. Konstrukce ROA spektrometru je z velké části založena na koncepci W. Huga, která je podrobně popsána ve (Werner Hug & Hangartner, 1999). Současně spektrometr využívá korekci na virtuální enantiomer (W. Hug, 2003), která odstraňuje posuvy (offsety) v ROA spektrech, které nepocházejí od vzorku. Takovou korekci lze

provést čistě optickými prvky – systémem rotujících půlvlnných destiček. Oproti původní konstrukci W. Huga je navíc nultý řád difrakce záření přiveden do druhého detektoru, což umožňuje rozšíření měřicí oblasti – 50 až 4000 cm^{-1} . Během jednoho měření tedy pokryjeme celou oblast fundamentálních vibrací. Spektrometr umožňuje měření všech modulačních schémat ROA (**Obrázek 20**) a současně také umožňuje měřit v geometrii zpětného a dopředného rozptylu (nutná modifikace). Jako zdroj záření je použit pevnolátkový Nd:YAG laser o vlnové délce 532 nm a aparatura využívá vláknovou optiku. Vzorkový prostor i zbytek spektrometru je teplotně stabilizován a profukován stlačeným sušeným vzduchem, aby se zamezilo sedání prachu na optické prvky a jejich rosení při měření při nižších teplotách. Spektrometr je optimalizován pro měření v oblasti nízkých vlnočtů, kde je možné reprodukovatelně a s vysokou citlivostí detekovat vibrační módy již od cca 50 cm^{-1} . Kalibrace vlnočtové škály je prováděna pomocí spektra neonové výbojky. Standardně je též prováděna korekce na přístrojovou funkci, a to pomocí kalibrované wolframové žárovky (NIST).

3.3.5 Měření spekter Ramanovy optické aktivity

V případě měření ROA byly vybrané nukleotidy měřeny zvlášť při různých hodnotách pH a při různých koncentracích, viz **Tabulka 5**. Pro měření byla použita nízkoobjemová kyveta od firmy Starna 3×4 mm. Objem vzorků byl přibližně 100 μl a akumulací časy se pro různě koncentrované vzorky lišily. Pro nejméně koncentrované vzorky dosahovaly akumulací časy přibližně 30 hodin. Středně koncentrované vzorky byly měřeny cca 10 hodin a vysoce koncentrované pak jednotky hodin.

3.4 Zpracování dat

V této kapitole si uvedeme postup, jakým jsme zpracovávali naměřená spektra, jejichž finální podoba je prezentovaná v kapitole 4. Výsledky. Zaměříme se také na statistickou metodu – faktorovou analýzu, která byla pro zpracování a následnou analýzu dat hojně využívána.

3.4.1 Zpracování spekter

Prvním krokem po naměření spekter byla kalibrace. Ramanovská spektra byla kalibrována pomocí neonové výbojky (13 nejintenzivnějších čar). K tomu jsme použili interní programy Neokalspex2 a Neokalspex3, které byly naprogramovány docentem Jiřím Bokem. U měření koncentrační a pH závislosti Ramanových spekter bylo použito ke kalibraci jedno kalibrační spektrum neonové výbojky. V případě teplotních měření bylo každé Ramanovo spektrum při dané teplotě kalibrováno příslušným kalibračním spektrem. Kalibrace ROA spekter byla provedena také na neonovou výbojku. Kromě toho byla prováděna též intenzitní korekce na přístrojovou funkci, a to pomocí sekundárního standardu – certifikované wolframové žárovky (NIST).

V dalším kroku jsme zkalibrovaná spektra zpracovávali v programu Matlab (verze R2011a). Nejprve bylo nutné od spekter odečíst pozadí, které je tvořeno signálem kyvety a rozpouštědla. Ve všech našich měřeních byla jako rozpouštědlo použita deionizovaná voda. Pro vhodný odečet pozadí jsme nejdříve spektra normalizovali na kombinační pás vody (cca 2150 cm^{-1}) a následně jsme pak provedli odečet pozadí. V případě teplotních měření bylo vždy odečteno spektrum vody při dané teplotě. Dále jsme korigovali pozadí (splíny), abychom odstranili případnou reziduální fluorescenci, vliv rozptylu atd. V případě různých závislostí byla Ramanova spektra normována na první faktorovou komponentu (průměrné spektrum). ROA spektra byla normována stejnými faktory jako jim příslušná Ramanova spektra.

3.4.2 Faktorová analýza

Faktorová analýza je statistická metoda. Obecná definice dle (Malinowski, 2002) zní, že se jedná se o vícerozměrnou techniku pro redukci experimentálních dat (matice dat) na jejich nejnížší dimenzi pomocí ortogonálního faktorového prostoru a transformací, které poskytují predikce a/nebo rozpoznatelné faktory. Jejím cílem

tedy je, jednak redukce počtu experimentálních dat bez ztráty informace a zároveň odhalení struktury jejich vztahů. Z původního souboru náhodných veličin se vybere menší soubor náhodných veličin, který jej nejlépe nahradí (charakterizuje). Lineární kombinace původních veličin představuje nejjednodušší způsob řešení. (Anděl, 1985)

Speciální metodou faktorové analýzy je tzv. metoda singulárního rozkladu (Singular Value Decomposition, SVD), kterou v našem případě používáme na sérii naměřených spekter (pH, teplotní a koncentrační měření) $Y_i(\tilde{\nu}_k)$. Tato spektra jsou pak reprezentována Y , kde sloupce odpovídají naměřeným spektrům a řádky jsou funkcí vlnočtu. Singulární rozklad matice Y je pak roven

$$Y(\tilde{\nu}) = V \cdot W \cdot S(\nu), \quad (3.1)$$

kde $S(\nu)$ je matice subspekter, W je diagonální matice, jejíž čísla mají význam statických vah a V je unitární matice, která kombinuje subspektra do jednotlivých spekter (koeficienty, skóre). Ve složkách má pak rovnice (3.1) tvar

$$Y_i(\tilde{\nu}_k) = \sum_{j=1}^n w_j V_{ij} S_j(\tilde{\nu}_k), \quad (3.2)$$

kde $S_j(\tilde{\nu}_k)$ jsou jednotlivá subspektra, w_j jsou jejich statistické váhy, V_{ij} odpovídají normalizovaným koeficientům (skóre), $\tilde{\nu}_k$ představují body spektra a i indexuje spektra v sérii. Normalizované koeficienty V_{ij} a subspektra $S_j(\tilde{\nu}_k)$ splňují relace ortonormality

$$\begin{aligned} \sum_{k=1}^K S_j(\tilde{\nu}_k) S_m(\tilde{\nu}_k) &= 0 \text{ pro } j \neq m, \\ \sum_{i=1}^n V_{ij} V_{im} &= 0 \text{ pro } j \neq m, \\ \sum_{k=1}^K S_j(\tilde{\nu}_k) S_j(\tilde{\nu}_k) &= 1, \\ \sum_{i=1}^n V_{ij} V_{ij} &= 1. \end{aligned} \quad (3.3)$$

Do této doby jsme stále uvažovali celý soubor spekter n . Abychom zredukovali počet dat, musíme se omezit ve vztahu (3.2) na menší počet spekter M ($M < n$), tak aby se vztah (3.2) lišil nejvíce o experimentální chybu. Tím získáme vhodnou aproximaci původní spektrální série. V takovém případě M odpovídá počtu nezávislých spekter v sérii a označuje se jako faktorová dimenze. Faktorovou dimenzi lze odhadnout

například na základě šumu v jednotlivých subspektech anebo na základě poklesu statických vah. Vhodnější je se však podívat na průběh reziduální chyby σ_R na počtu započítaných subspekter, protože nad vhodným M je její závislost téměř lineární (započítání dalšího subspektra nám nepřinese žádnou novou informaci). Reziduální chyba σ_R je definována vztahem

$$\sigma_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=M+1}^n W_j^2}{K(n-M)}}, \quad (3.4)$$

kde K je počet bodů subspektra.

Pokud budeme předpokládat, že v sérii naměřená spektra můžeme vyjádřit součtem M spekter čistých forem $Z_n(\tilde{\nu}_k)$ vynásobených jejich váhami γ_{in}

$$Y_i(\tilde{\nu}_k) = \sum_{n=1}^M \gamma_{in} Z_n(\tilde{\nu}_k), \quad (3.5)$$

pak ze vztahů (3.2) a (3.5) pro spektra čistých forem $Z_n(\tilde{\nu}_k)$ dostaneme

$$Z_n(\tilde{\nu}_k) = \sum_{j=1}^M C_{nj} S_j(\tilde{\nu}_k), \quad (3.6)$$

$$\sum_{j=1}^M \gamma_{in} C_{nj} = V_{ij} W_j. \quad (3.7)$$

Vyřešením soustavy rovnic dané vztahem (3.7) získáme koeficienty C_{nj} , pomocí nichž můžeme spektra čistých forem $Z_n(\tilde{\nu}_k)$ získat lineární kombinací $S_j(\tilde{\nu}_k)$. Pro souhrnný a podrobnější popis faktorové analýzy odkazují na (Malinowski, 2002). Metodu SVD lze například použít k intenzitní normalizaci spekter, (Palacký et al., 2011).

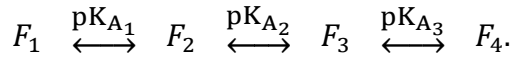
3.4.3 Určení pK_A konstant faktorovou analýzou

Cílem zpracování pH série Ramanovských spekter pomocí faktorové analýzy (konkrétně metody SVD) je získání pK_A konstant měřených mononukleotidů. Ty se mohou v závislosti na pH prostředí (kyselé či bazické) vyskytovat v různých nábojových stavech (protonovaných formách) – dochází k protonaci či deprotonaci určitých skupin. To se v Ramanových spektrech projevuje snížením/zvýšením intenzity některých pásů, posunem vlnočtů některých pásů či dokonce splnutím pásů. Jak jsme popsali výše (3.4.2 Faktorová analýza) je každé naměřené spektrum v sérii lineární kombinací spekter jednotlivých forem, které odpovídají faktorové dimenzi

spektrální série. Nafitujeme-li výsledky faktorové analýzy Hendersonovou-Hasselbachovou rovnicí (rovnice chemické rovnováhy)

$$\frac{c_D}{c_P} = 10^{\text{pH} - \text{pK}_A}, \quad (3.8)$$

kde c_D a c_P jsou postupně koncentrace disociované a protonové formy, tak získáme relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem v závislosti na pH a hodnoty pK_A konstant. Jsme schopni také určit Ramanova spektra jednotlivých forem. Rovnice (3.8) se modifikuje podle počtu přítomných forem. Pro konkrétní příklad uvažme, že se látka v závislosti na pH může vyskytovat ve čtyřech nábojových stavech F_i , kde $i \in \{1, 2, 3, 4\}$. Chemickou rovnováhu můžeme formálně zapsat jako



Využitím vztahu (3.8) pak můžeme zapsat rovnováhu pro jednotlivé nábojové stavy následovně

$$\begin{aligned} \frac{[F_4]}{[F_3]} &= 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A3}} \rightarrow [F_4] = [F_3] \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A3}}, \\ \frac{[F_3]}{[F_2]} &= 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A2}} \rightarrow [F_3] = [F_2] \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A2}}, \\ \frac{[F_2]}{[F_1]} &= 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A1}} \rightarrow [F_2] = [F_1] \cdot 10^{\text{pH} - \text{pK}_{A1}}, \end{aligned} \quad (3.9)$$

kde $[F_i]$ mají význam koncentrace jednotlivých nábojových stavů. Uvědomíme-li si, že součet koncentrací jednotlivých složek musí být roven jedné, tedy

$$[F_1] + [F_2] + [F_3] + [F_4] = 1, \quad (3.10)$$

pak si např. $[F_1]$ můžeme vyjádřit na základě rovnic (3.9) a rovnice (3.10)

$$[F_1] = \frac{1}{(1 + 10^{(\text{pH} - \text{pK}_{A1})} + 10^{(2\text{pH} - \text{pK}_{A1} - \text{pK}_{A2})} + 10^{(3\text{pH} - \text{pK}_{A1} - \text{pK}_{A2} - \text{pK}_{A3})})}. \quad (3.11)$$

Z rovnic (3.9) a (3.11) si vyjádříme koncentrace jednotlivých stavů a provedeme fit na průběhy skóre (koeficientů) podle metody nejmenších čtverců

$$\sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^4 \left[\sqrt{w_j} V_{ij} - a_{0j} F_{1i} - a_{1j} F_{2i} - a_{2j} F_{3i} - a_{3j} F_{4i} \right]^2 = \min. \quad (3.12)$$

V případě méně či více nábojových stavů se výše uvedené rovnice jen drobně modifikují.

4. Výsledky

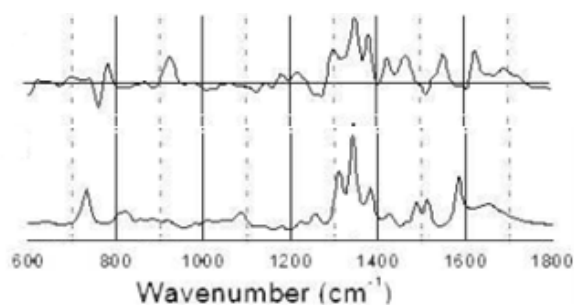
Nejprve jsme změřili Ramanovo a ROA spektrum adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP) ve formě disodné soli, tj. při pH ~ 8.5. Poté jsme se věnovali pH závislostem Ramanových spekter různých nukleotidů a charakterizovali pozorované změny s ohledem na nábojový stav, polohu fosfátové skupiny či toho, zda je v daném nukleotidu ribosa či deoxyribosa. Následně jsme se věnovali studiu samoasociací (koncentračním závislostem) purinových nukleotidů (5'-rAMP, 5'-rGMP a 5'-dGMP) a nakonec i teplotním závislostem těchto nukleotidů při různých koncentracích.

4.1 Ramanovo a ROA spektrum 5'-rAMP

Výchozím experimentem celé práce bylo změření kvalitního ROA spektra vzorku adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP). V literatuře je dohledatelné pouze jedno relevantní ROA spektrum 5'-rAMP pocházející ze skupiny prof. E. Blanche z Univerzity v Manchesteru (nyní na RMIT v Melbourne) z roku 2012, (Ostovarpour & Blanch, 2012). To má však z dnešního pohledu celou řadu nedostatků

- (i) má poměrně malé rozlišení znesnadňující identifikaci jednotlivých spektrálních rysů,
- (ii) je omezené pouze na užší spektrální oblast 600 až 1800 cm^{-1} a postrádá tedy informace o nízkofrekvenční oblasti spektra i o valenčních vodíkových vibracích (C-H, N-H a O-H skupiny),
- (iii) bylo měřeno při pH = 6, které je velmi blízko disociační konstanty fosfátové skupiny ($\text{pK}_A = 6.21$, dle (Sigel et al., 1988)) a jedná se tak o spektrum forem 5'-rAMP²⁻ a 5'-rAMP¹⁻ v poměru přibližně 5:8,
- (iv) chybí informace o intenzitním poměru mezi ROA a Ramanovým signálem, tj. o celkové intenzitě ROA spektra.

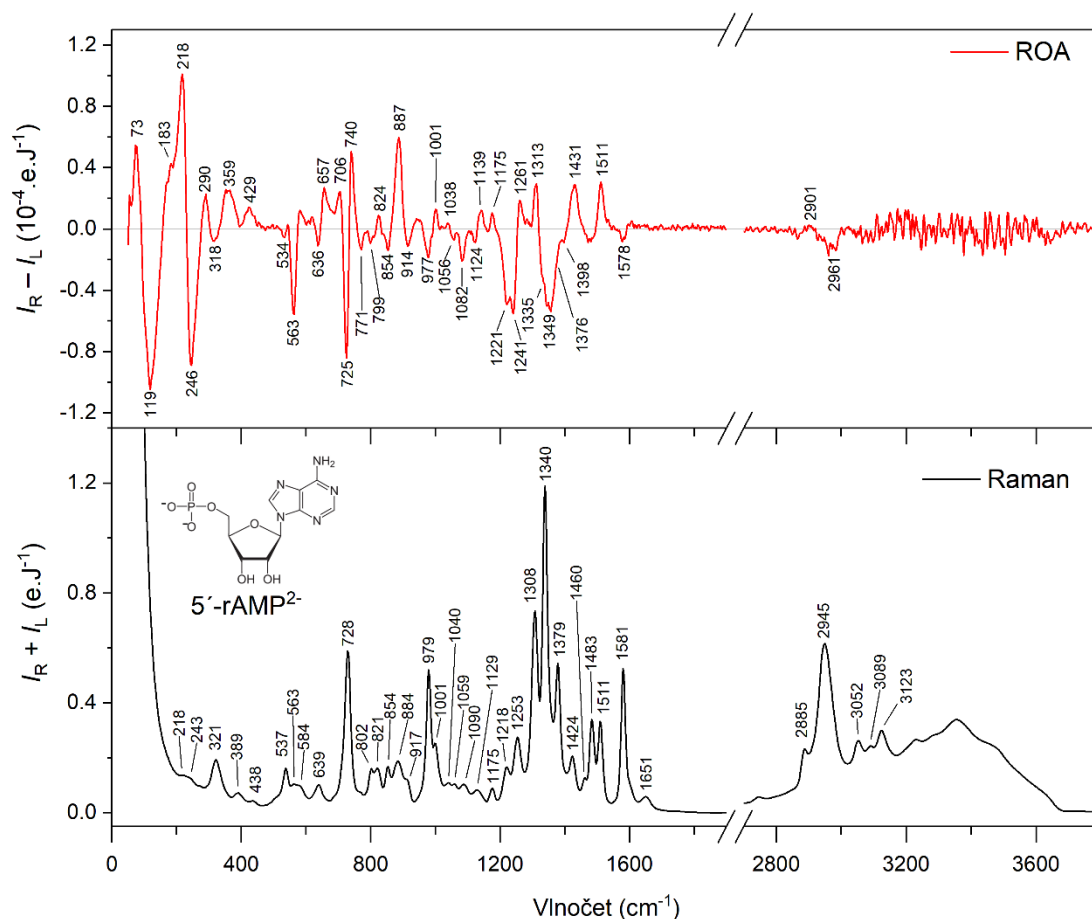
Měření bylo provedeno pro koncentraci 100 mg/ml, což odpovídá cca 255 mM či 271 mM koncentraci v závislosti na tom, zda autoři použili disodnou či monosodnou variantu 5'-rAMP. Ramanovo a ROA spektrum 5'-rAMP ze zmíněné publikace ukazujeme na **Obrázku 22**.



Obrázek 22: Ramanovo (spodní) a ROA (horní) spektrum 5'-rAMP; převzato a upraveno z (Ostovarpour & Blanch, 2012)

V našem případě jsme měření provedli při $\text{pH} = 8.7$, abychom si byli jisti, že detekujeme pouze formu 5'-rAMP²⁻, koncentraci 193 mM a teplotě při 298 K. Spektra byla měřena v téměř celém rozsahu fundamentálních molekulových vibrací od přibližně 50 do 4500 cm^{-1} , tj. včetně oblasti valenčních vodíkových vibrací. Výsledná spektra (po odečtu rozpouštědla a úpravě pozadí) můžeme vidět na **Obrázku 23**. Pomocí druhé derivace jsme schopni lokalizovat velké množství (cca 50) vibračních pásů a jejich ramen (angl. shoulders), které mohou být posléze přiřazeny některým ze 105 vibračních módů 5'-rAMP²⁻ (37 atomů). Pro přehlednost jsme v **Obrázku 23** vyznačili pouze na první pohled rozlišitelné charakteristické pásy. V Ramanově spektru jsou nejvýraznější pásy spojené s vibrací nukleobáze (1200 až 1650 cm^{-1} , dýchací vibrace na 730 cm^{-1}) a fosfátové skupiny (979 cm^{-1}). Pásy v oblasti pod 700 cm^{-1} jsou poměrně široké a mají nízkou intenzitu, naopak v oblasti pod 200 cm^{-1} je obtížné kvůli prudkému nárůstu intenzity od sebe jednotlivé pásy vůbec rozlišit. V oblasti vodíkových valenčních vibrací jsou pěkně rozlišené oblasti C-H a N-H módů, O-H vibrace jsou díky interakci s vodním prostředím velmi rozšířené a překrývají se s reziduálním signálem rozpouštědla. ROA spektrum je v oblasti pod 1800 cm^{-1} velmi informačně bohaté a dobře rozlišené. Nepozorujeme tak velké rozdíly intenzity mezi jednotlivými pásy, jako v případě Ramanova rozptylu a celkový tvar spektra je díky střídání kladných a záporných pásů velmi charakteristický. Poměrně překvapivé pro nás bylo zjištění, jak informačně bohatá je nízkofrekvenční oblast ROA spektra pod 450 cm^{-1} , přičemž pod 300 cm^{-1} můžeme mluvit již o oblasti terahertzové. Vidíme zde devět velmi dobře rozlišených pásů, z nichž pět je velmi intenzivních (73 cm^{-1} (+), 119 cm^{-1} (-), 183 cm^{-1} (+), 218 cm^{-1} (+) a 246 cm^{-1} (-)). Naproti tomu oblast valenčních vodíkových vibrací je v ROA poměrně chudá. Lze identifikovat pouze dva pásy o nízké intenzitě v oblasti C-H valenčních vibrací (2901 cm^{-1} (+)

a 2961 cm^{-1} (–)). Pásky N-H a O-H nelze rozlišit, neboť v této oblasti má spektrum zvýšený šum kvůli velmi vysokému Ramanovskému signálu vody. Celkový poměr intenzity mezi ROA a Ramanovským signálem není příliš vysoký a pohybuje se okolo 3×10^{-4} .

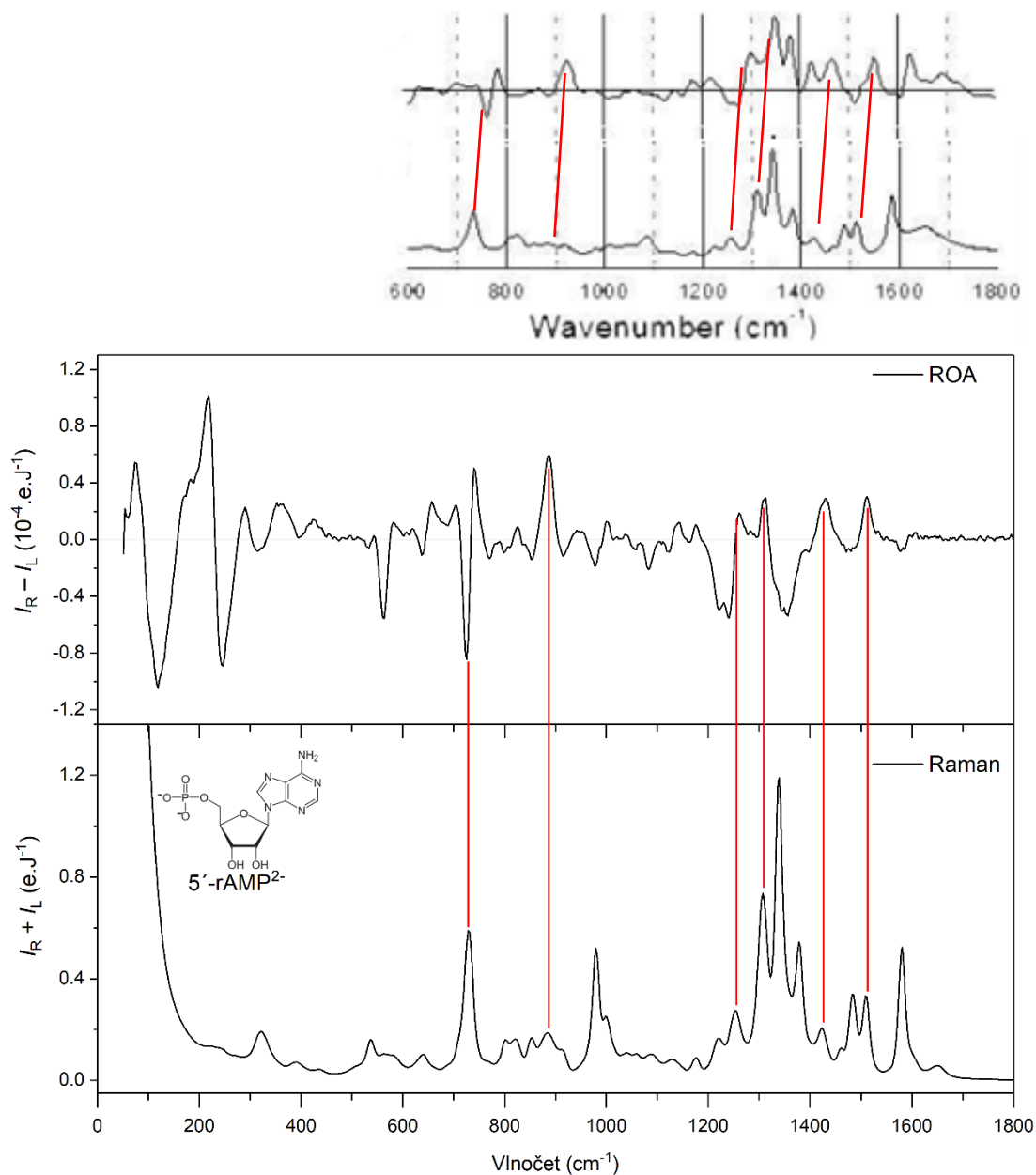


Obrázek 23: Ramanovo a ROA spektrum plně disociované formy adenosin-5'-monofosfátu ($5'$ -rAMP $^{2-}$); ROA – nahoře (červená), Raman – dole (černá)

Na **Obrázku 24** se pokoušíme srovnat naše ROA spektra $5'$ -rAMP s těmi publikovanými. Celkový tvar obou ROA signálů je shodný, ale při bližším pohledu je zřejmé, že s publikovanými daty je něco v nepořádku

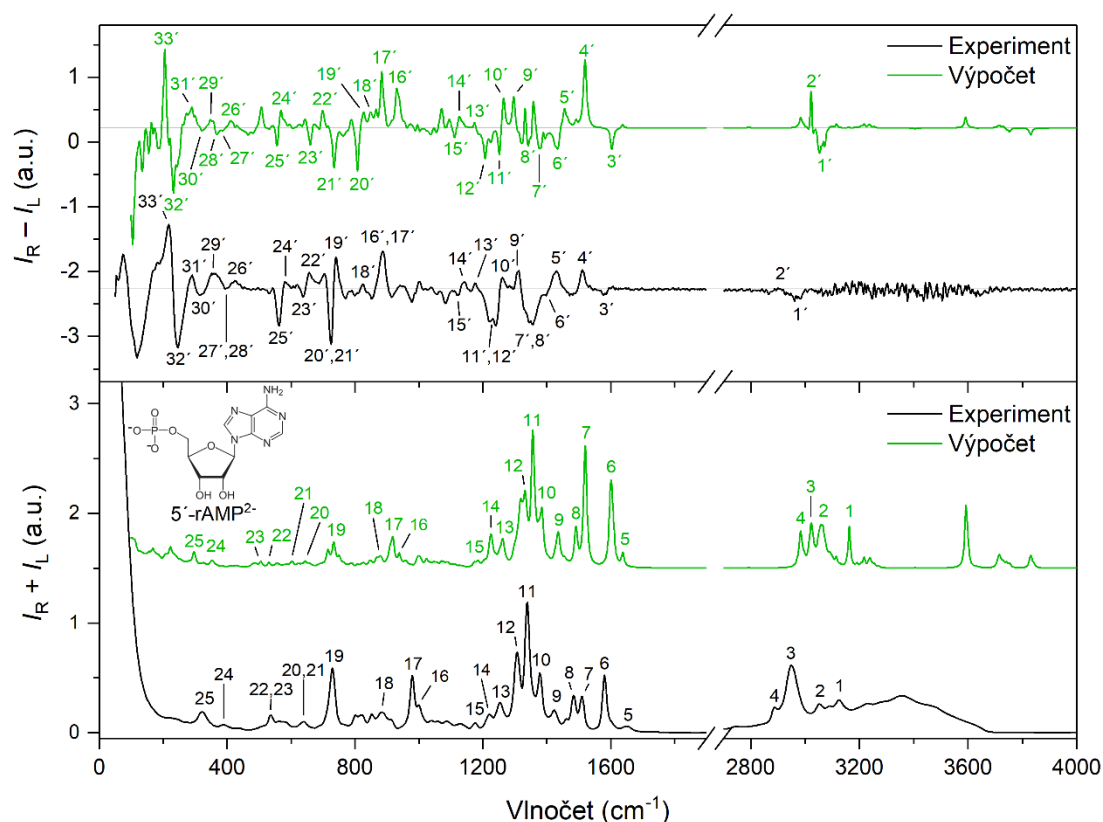
- (i) při srovnání vlnočtů odpovídajících si pásů v publikovaném Ramanově a ROA spektru je patrné, že ROA spektrum je posunuté o cca 40 cm^{-1} k vyšším vlnočtům. Původ tohoto posunu je nám nejasný,
- (ii) publikované ROA spektrum je lehce kladně převážené a je možné v něm identifikovat některé význačné pásky z Ramanovského signálu (např. 1340 , 1581 a 1650 cm^{-1}).

Vysoká kvalita námi naměřeného signálu tak velmi dobře demonstruje posun v instrumentaci ROA, ke kterému došlo v posledních 10 letech, a kvalitu nového ROA spektrometru dr. Kapitána.



Obrázek 24: Srovnání Ramanových a ROA spekter 5'-rAMP²⁻ publikovaných (nahore, převzato a upraveno z (Ostovarpour & Blanch, 2012)) s našimi experimentálními spektry (dole); Raman – spodní spektrum, ROA – horní spektrum

Pro ilustraci ukazujeme na **Obrázku 25** i srovnání našich experimentálních spekter se simulovanými, která poskytl dr. Profant. Simulace byly založeny na prozkoumání konformačního fázového prostoru pomocí molekulové dynamiky, rozkládání výsledné trajektorie na přibližně 40 různých konformerů a kvantově mechanické simulaci spekter každého z nich, využívající metod založených na funkcionálu elektronové hustoty a optimalizace geometrie ve vlastních módech. Na závěr se vytvořil vážený průměr takto získaných spekter. Vypočtená spektra (bez škálovacích faktorů) velmi dobře vystihují charakteristiku (tvar i vlnočty) experimentálních spekter (viz očíslování pásů) v celém rozsahu fundamentálních molekulových vibrací. Poměrně značný posun ale vykazují pásy odpovídající fosfátovým vibracím (pásy 16 a 17). Tento posuv k nižším vlnočtům ve vypočteném spektru je daný nedostatečným zahrnutím vlivu rozpouštědla (vody), která byla zahrnuta pouze pomocí implicitního modelu solvatace (COSMO). Pro lepší shodu by bylo nutné přidat několik explicitních molekul vody vázaných vodíkovými můstky na fosfátovou skupinu.



Obrázek 25: Srovnání experimentálních a simulovaných spekter plně disociované formy adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP²⁻); ROA spektra – nahoře, Ramanova spektra – dole; (černá – experiment, zelená – simulace)

4.2 pH závislosti spekter nukleotidů

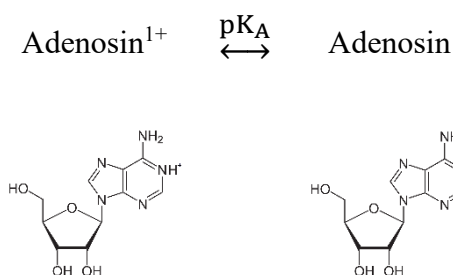
Nukleotidy se v závislosti na pH vyskytují v různě nabitých formách (stavech). K protonaci/deprotonaci dochází na fosfátové skupině a dusíkaté bázi. Při vysoce bazickém pH dochází též k deprotonaci hydroxylových skupin na ribose. To je ale většinou spojeno i s následným oxidativním poškozením vzorku. Proto jsme se vysokým hodnotám pH během našich experimentů vyhýbali a naše závislosti jsou měřeny v rozmezí cca 0 až 10 jednotek pH.

Cílem měření bylo získat pK_A konstanty a relativní zastoupení různě nabitých forem nukleotidů. Hodnoty, které lze nalézt v literatuře, mají v některých případech velký rozptyl (viz **Tabulka 9** v podkapitole 4.2.5). Při takovém pH, při kterém jednotlivé formy nejvíce převažují, pak byla změřena i ROA spektra. Výchozí (poměrně nízká) koncentrace nukleotidů $c \approx 25$ mM byla zvolena na základě toho, že

- (i) při vyšších koncentracích mají nukleotidy snahu stohovat, (Neurohr & Mantsch, 1979)),
- (ii) vícekrát protonované formy nukleotidů mají obecně nižší rozpustnost a při koncentraci vyšší, než oněch 25 mM vypadávají z roztoku.

Všechna spektra byla měřena v poměrně široké oblasti mezi 200 až 1800 cm^{-1} a byla během zpracování normována na 1. faktorovou komponentu, aby se eliminoval vliv ředění roztoku během titrace.

Nejprve jsme studovali nejjednodušší model – nukleosid adenosin, kde vlivem pH dochází pouze k jedné změně, a to k protonaci na dusíkaté bázi – dusík N(1).

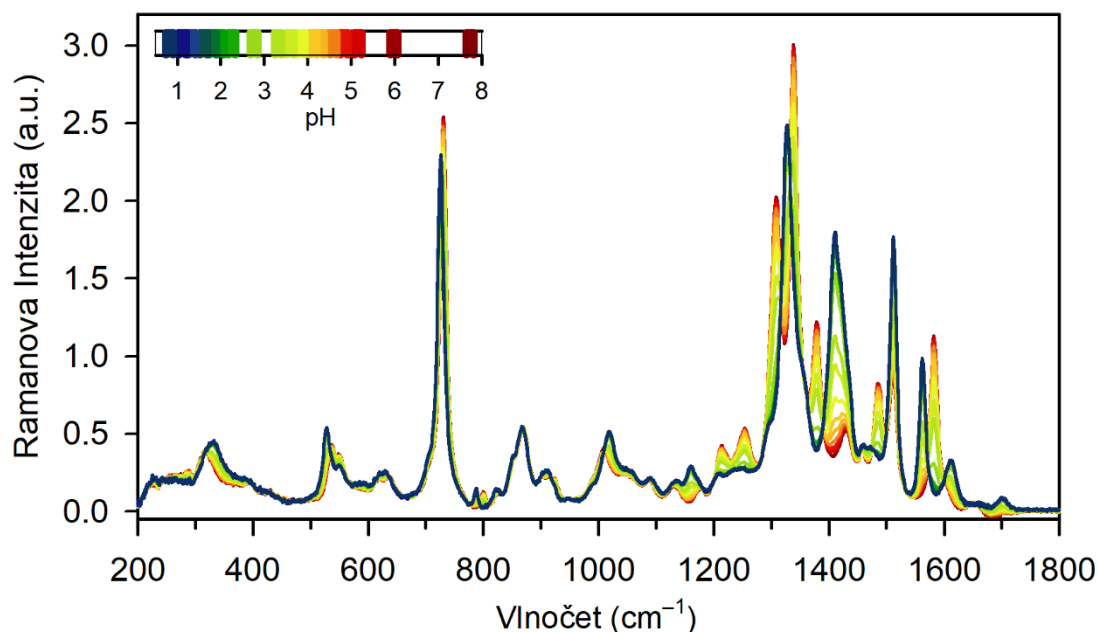


Ramanova spektra adenosinu byla měřena v rozsahu $\text{pH} = 7.74\text{--}0.82$. Celkem bylo naměřeno 18 spekter, která jsou uvedena na **Obrázku 26**. Z něj vidíme, že se nám mění intenzity několika pásů, což právě souvisí se změnou zastoupení protonované, resp. deprotonované formy adenosinu v roztoku. Tuto naměřenou sérii jsme zpracovali metodou SVD – výsledky jsou na **Obrázku 27**, kde je ze singulárních čísel i průběhu reziduálních chyb jasně patrná faktorová dimenze dvě (což odpovídá právě dvěma

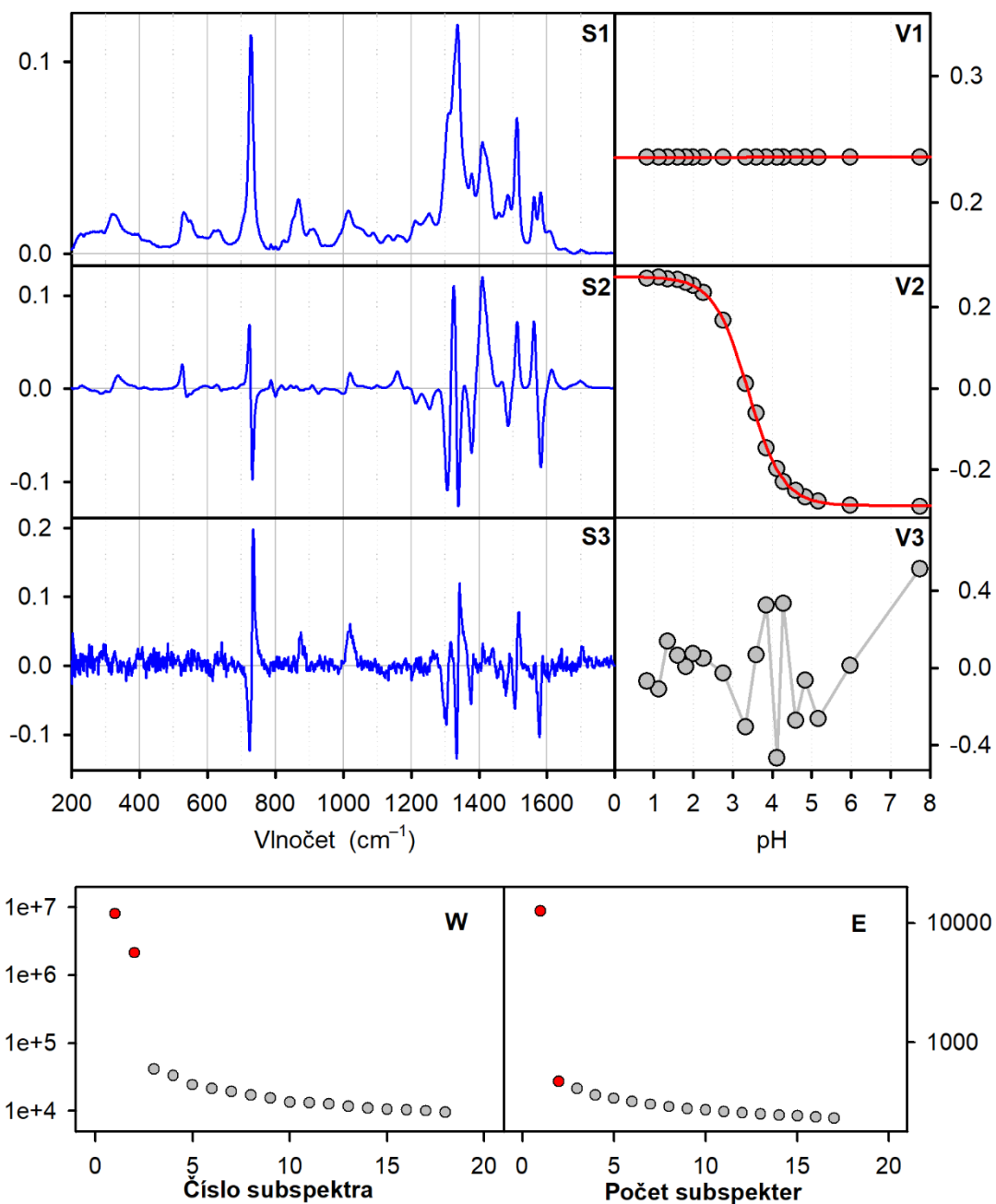
nábojovým formám adenosinu). První subspektrum má význam průměrného spektra celé série, druhé subspektrum představuje hlavní spektrální změnu a poslední prezentované subspektrum má již charakter šumu. Z fitu na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici (3.8) jsme získali pK_A konstantu přechodu mezi neutrální a kladně nabitou formou adenosinu

$$pK_A = 3.39 \pm 0.01. \quad (4.1)$$

Chyba určení hodnoty pK_A je dána přímo kvalitou fitu a nebere v úvahu nepřesnosti určení pH, popř. další experimentální zdroje chyb. Reálnou chybu určení disociační konstanty proto uvažujeme v tomto případě alespoň dvojnásobnou, tj. 0.05. Získaná hodnota disociační konstanty je v poměrně dobrém souhlasu s literaturou, $pK_{A_{ref}} = 3.5$ dle (Lundblad & Macdonald, 2010).

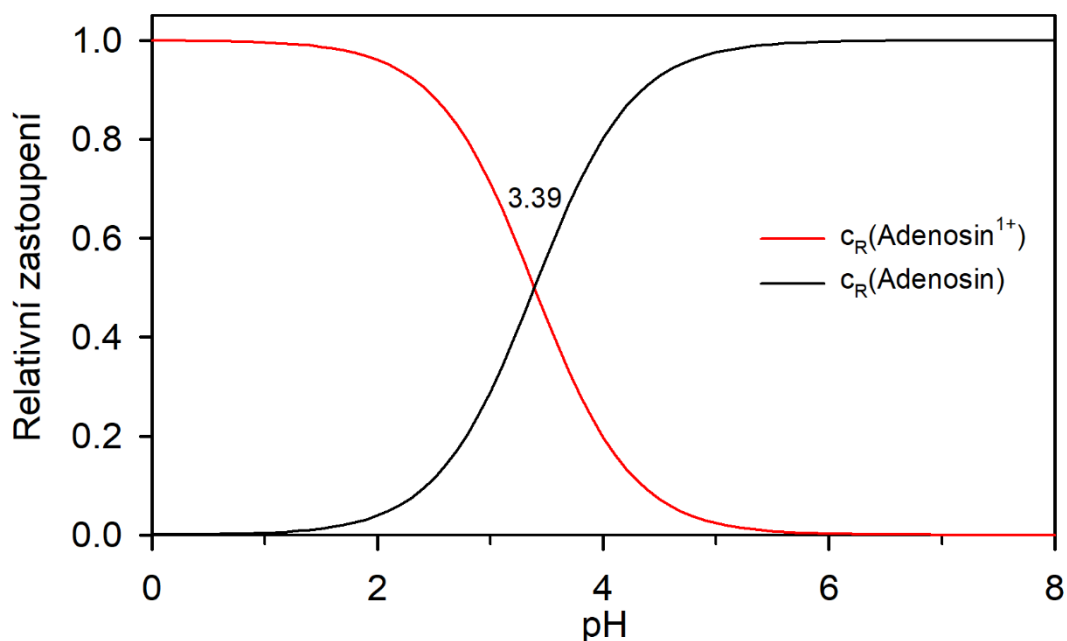


Obrázek 26: Ramanova spektra adenosinu při různých hodnotách pH (viz škála)



Obrázek 27: Výsledky faktorové analýzy adenosinu: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)

Relativní zastoupení nábojových forem je znázorněno na **Obrázku 28** včetně stanovené pK_A konstanty. Již při $pH = 5$ se adenosin vyskytuje výhradně v neutrální (deprotonované) formě ve více než 97 %. Při $pH < 5$ nám roste zastoupení kladně nabitě (protonované) a současně klesá zastoupení neutrální formy, která při $pH < 1.8$ již není v roztoku prakticky přítomna (méně než 3 %).

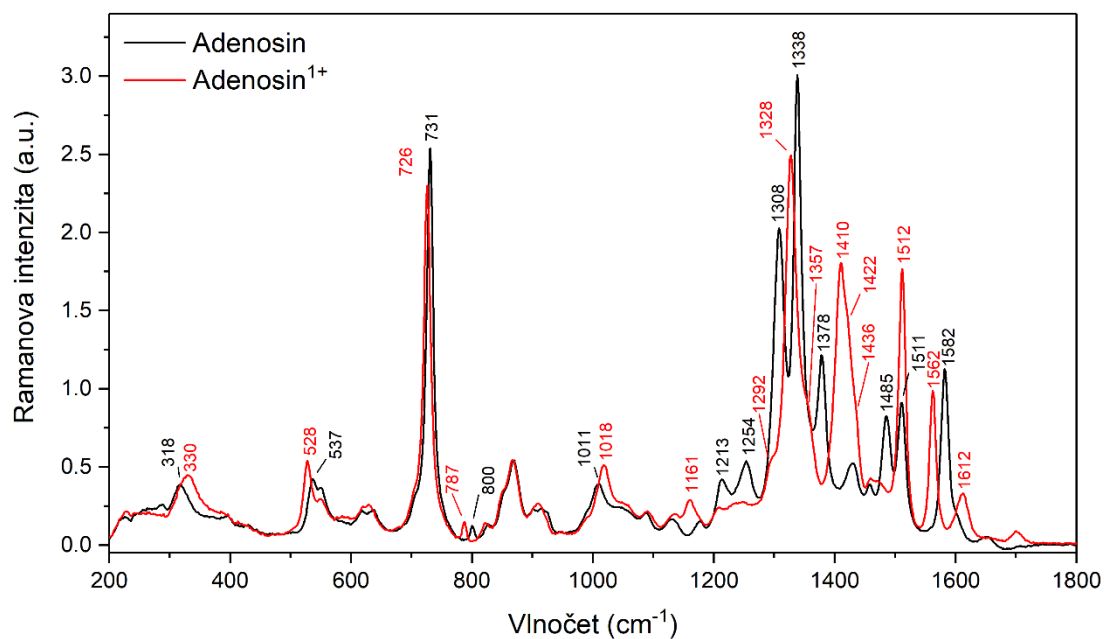


Obrázek 28: Relativní zastoupení dvou nábojových forem adenosinu při různém pH včetně pK_A konstanty přechodu

Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem jsou na **Obrázku 29**. S protonací je spojena výrazná změna v oblasti nad 1100 cm^{-1} , které dominují vibrace dusíkaté báze. V neutrálním nábojovém stavu vidíme, že v této oblasti je intenzivní trojice pásů na 1308 , 1338 a 1378 cm^{-1} . Dále je to dvojice pásů (1458 a 1511 cm^{-1}) a pás na 1582 cm^{-1} . Naopak v protonované formě je charakter spektra v této oblasti zcela odlišný. Nachází se zde čtyři jednotlivé pásy na 1328 , 1410 , 1512 a 1562 cm^{-1} , z nichž některé mají rozlišitelnou strukturu (shouldery, ramena). U pásů na 1328 a 1410 cm^{-1} jsou zřetelné dva shouldery – 1292 , 1357 , 1422 a 1436 cm^{-1} , které jsme identifikovali pomocí druhé derivace. U nižších vlnočtů do 1100 cm^{-1} můžeme pozorovat, že dochází zejména k posunu některých pásů. Při protonaci dusíkaté báze se pásy na 318 a 1011 cm^{-1} posouvají k vyšším vlnočtům na pozici 330 a 1018 cm^{-1} , které mají vyšší intenzitu než u neutrální formy. Zbylé pásy 537 , 731 a 800 cm^{-1} se

naopak posouvají k nižším vlnočtům a můžeme také pozorovat jak zvýšení, tak snížení intenzity pásů. Celkově vzato je změna Ramanova signálu spojená s protonací dusíku aromatické purinové báze velmi výrazná a snadno identifikovatelná.

Uvedený postup využívající SVD a fitu na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici se tedy zdá být pro určení disociačních konstant nukleosidů dobře využitelný.



Obrázek 29: Ramanova spektra dvou nabitých forem adenosinu; neutrální forma – černá, jednou kladně nabitá forma – červená

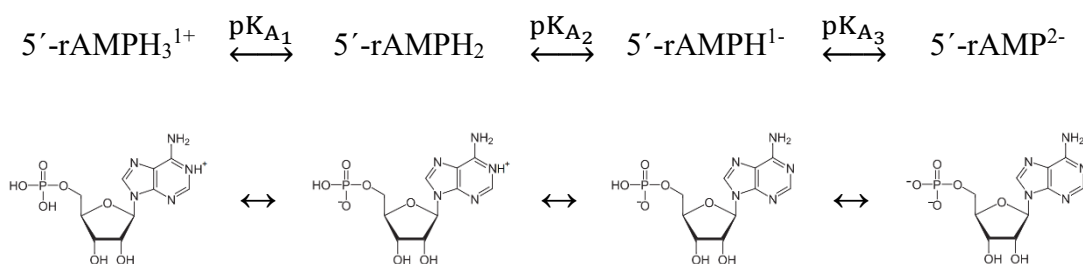
4.2.1 Adenosin-5'-monofosfát

Po aplikaci na jednoduchý model adenosinu jsme přistoupili ke studiu celého nukleotidu adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP). Celkem jsme provedli tři pH měření 5'-rAMP, abychom dobře charakterizovali reprodukovatelnost měření a chyby, které při tomto experimentu vznikají. Jednou byla výchozí koncentrace 100 mM a rozsah pH = 8.84 až 1.06 (21 spekter), dvakrát byla výchozí koncentrace 25 mM pro rozsahy

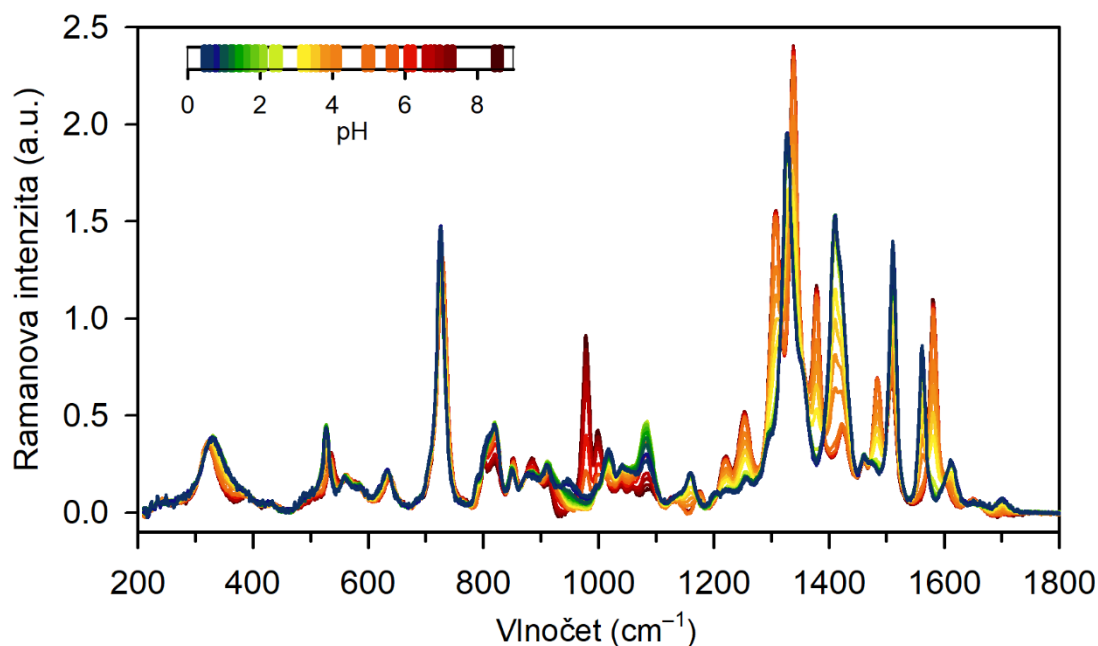
- pH = 8.55 až 0.54, 20 spekter,
- pH = 8.78 až 0.11, 22 spekter.

Ramanova spektra 5'-rAMP pro jednotlivé hodnoty pH (8.55 až 0.54) můžeme vidět na **Obrázku 30**, ze kterého je patrné, že Ramanův signál se se změnou pH mění velmi výrazně. To má co do činění se změnou zastoupení různě nabitých stavů 5'-rAMP, které se v závislosti na pH mohou vyskytovat ve čtyřech nábojových formách (**Schéma 1**).

Schéma 1: Čtyři nábojové formy adenosin-5'-monofosfátu

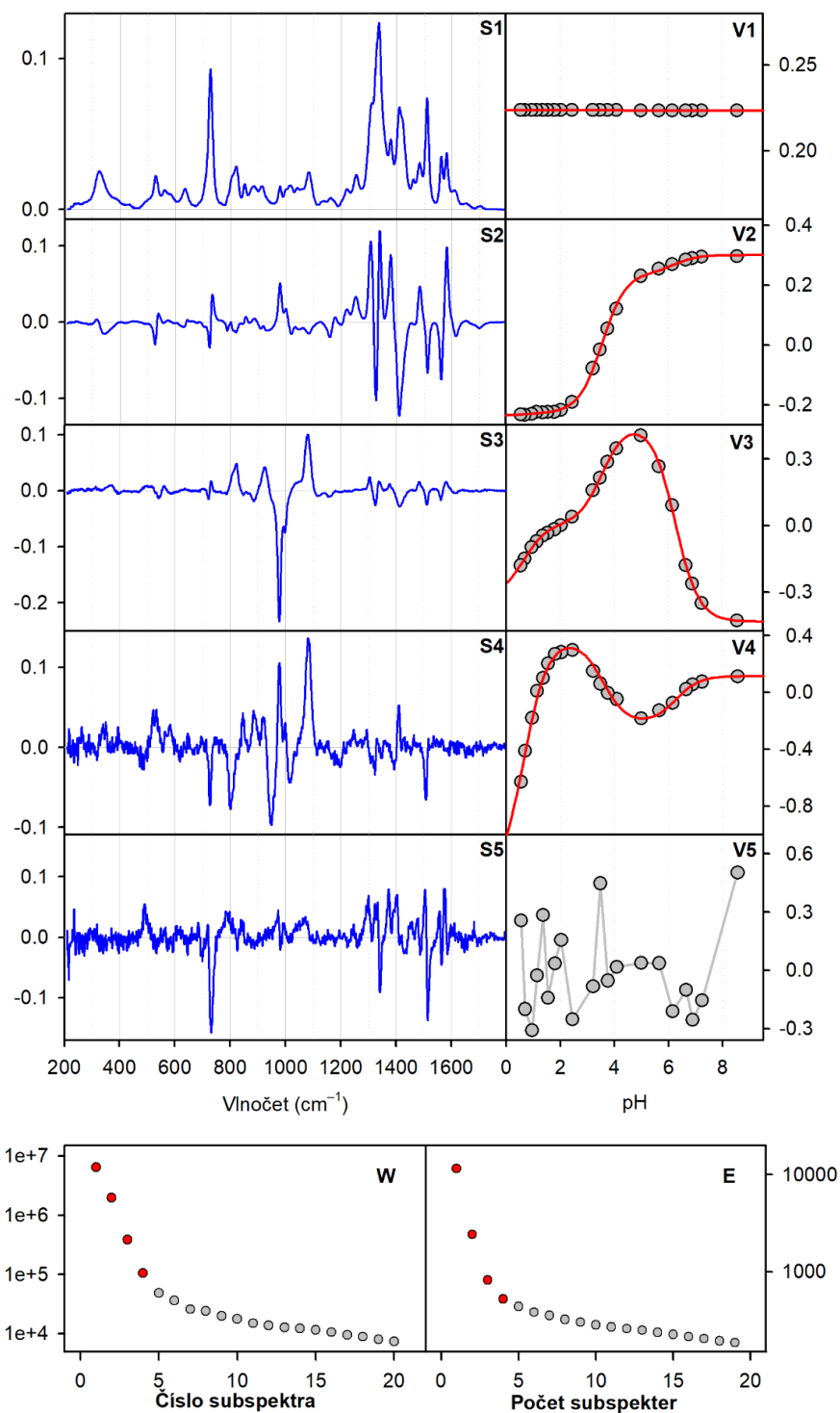


1. Plně disociovaná forma (5'-rAMP²⁻)
 - deprotonovány oba kyslíky fosfátové skupiny
2. Jednou protonová forma (5'-rAMP^{H 1-})
 - protonace jednoho kyslíku fosfátové skupiny
3. Dvakrát protonová forma (5'-rAMP^{H₂})
 - navíc oproti 2. bodu protonace na dusíku N(1) purinové báze
4. Tříkrát protonová forma (5'-rAMP^{H₃ 1+})
 - navíc oproti 3. bodu protonace na druhém kyslíku fosfátové skupiny



Obrázek 30: Ramanova spektra 5'-rAMP při různých hodnotách pH (viz škála)

Sérii naměřených spekter jsme zpracovali faktorovou analýzou, konkrétně její metodou SVD, (viz 3.4.3 Určení pK_A konstant faktorovou analýzou), jejíž výsledky jsou shrnuty na **Obrázku 31**. Vidíme z něj, že největší váhu mají první čtyři subspektra a závislost reziduální chyby od čtvrtého subspektra je téměř lineární. Na základě toho jsme identifikovali, že faktorová dimenze je čtyři, což velmi dobře odpovídá čtyřem nábojovým formám 5'-rAMP. První, statisticky nejvýznamnější subspektrum, má význam průměrného spektra v sérii a další subspektra pak prezentují spektrální změny. Vidíme, že 5. subspektrum má již spíše charakter šumu. Tyto výsledky jsme následně fitovali Hendersonovou-Hasselbachovou rovnicí (3.8), čímž jsme získali pK_A konstanty přechodu mezi jednotlivými nábojovými stavy, které jsou uvedeny v následující **Tabulce 8**, kde c má význam výchozí koncentrace 5'-rAMP. Kvalita fitu byla, jak je vidět z průběhu červených linií v **Obrázku 31**, velmi vysoká, avšak hodnotu první pK_{A_1} konstanty jsme při fitu museli zdola omezit. Jinak totiž měla tendenci jít ještě níže, ale v takovém případě se v Ramanovém spektru příslušné nábojové formy 5'-rAMP H_3^{1+} objevily záporné pásy, což neodpovídá realitě.



Obrázek 31: Výsledky faktorové analýzy 5'-rAMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)

Tabulka 8: Hodnoty pK_A konstant pro jednotlivá pH měření 5'-rAMP

c	pK_{A_1}	pK_{A_2}	pK_{A_3}
100 mM	0.65	3.58	6.27
25 mM	0.65	3.56	6.26
25 mM	0.65	3.32	6.22
Průměr	0.65	3.49	6.25

Výsledné pK_A konstanty přechodu pro 5'-rAMP jsme určili jako aritmetický průměr hodnot z **Tabulky 8**

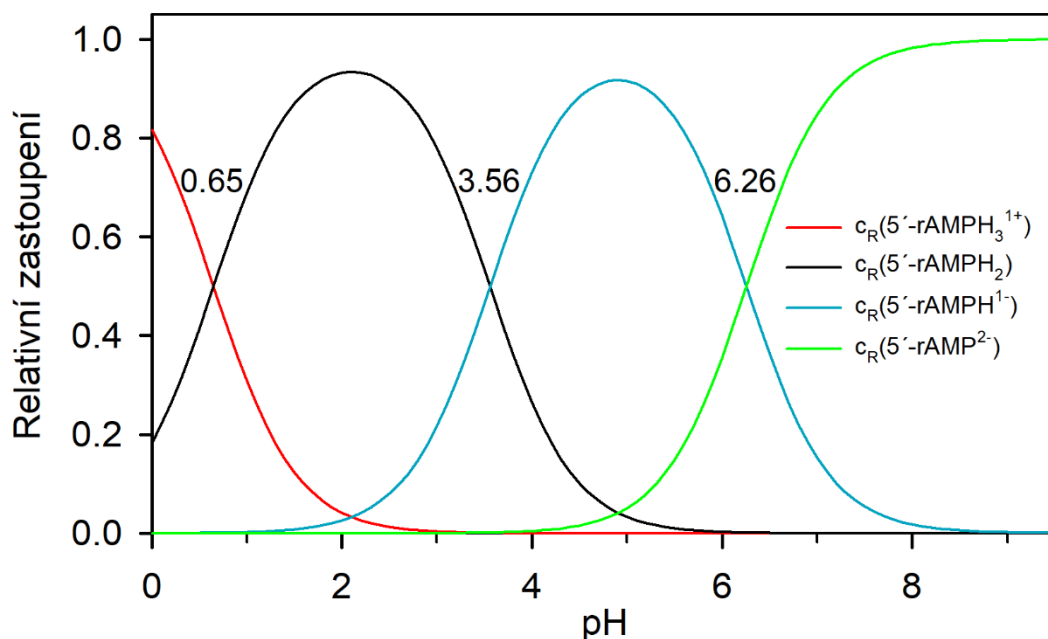
$$pK_{A_1} = 0.65 \pm 0.20,$$

$$pK_{A_2} = 3.49 \pm 0.10,$$

$$pK_{A_3} = 6.25 \pm 0.02.$$

Chybu stanovení pK_A konstant jsme odhadli na základě toho, že je daná jednak chybou fitu (velmi malá), a jednak systematickými nepřesnostmi při měření. Hlavním zdrojem chyb u nižších dvou pK_A konstant byl vliv kalibrace pH metru (optimalizován na rozsah 4–7) a u velmi nízkých pH také stoupající aktivita a iontová síla roztoku (bylo potřeba přidávat značné množství koncentrované HCl) a stoupající disperze vzorku v důsledku částečné precipitace.

Relativní zastoupení jednotlivých složek, které jsme také získali z faktorové analýzy, je znázorněno na **Obrázku 32**. Můžeme vidět, že při bazickém prostředí ($pH > 8$) se nám výhradně vyskytuje pouze disociovaná forma ($5'-rAMP^{2-}$), min. 98 %. Při postupném snižování pH začne narůstat podíl jednou protonované formy ($5'-rAMPH^{1-}$) a klesá zastoupení disociované formy, přičemž při hodnotě $pH \approx 4.8$ je zastoupení jednou protonované formy největší (93 %). Stejný efekt pak pozorujeme při dalším snižování pH, kdy zcela vymizí přítomnost disociované formy ($pH < 4$), klesá zastoupení jednou protonované formy a zvyšuje se podíl dvakrát protonované neutrální formy ($5'-rAMPH_2$), jejíž maximum 91 % pozorujeme při $pH \approx 2$. Ve velmi kyselém prostředí ($pH < 1.5$) se nám vyskytují pouze dvě formy – $5'-rAMPH_2$ a $5'-rAMPH_3^{1+}$, kdy poměr těchto dvou forem při $pH = 0$ je 1/4.



Obrázek 32: Relativní zastoupení nábojových forem 5'-rAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant; 5'-rAMP $_3^{1+}$ (červená), 5'-rAMP $_2$ (černá), 5'-rAMP $_1^-$ (modrá), 5'-rAMP $_2^-$ (zelená)

Ramanova spektra jednotlivých forem 5'-rAMP získaná z faktorové analýzy můžeme vidět na **Obrázku 33**. Největší změny pozorujeme především v oblasti 1200–1700 cm^{-1} , která odpovídá vibracím dusíkaté báze a pak v oblasti 800–1100 cm^{-1} , kde se vyskytují charakteristické vibrace fosfátové skupiny. Pro lepší přehlednost jsou pak ještě Ramanova spektra vykreslena na **Obrázku 34** po dvojicích odpovídajících přechodům mezi sousedními nábojovými formami tak, jak je znázorněno na **Schématu 1**

- a) pH přechod: 5'-rAMP $_2^- \leftrightarrow 5'-rAMP_1^-$

Tento přechod je spojen s protonací jednoho z kyslíků fosfátové skupiny, která se v Ramanově spektru projevuje velmi výrazně. Největší změnou je vymizení pásu na 978 cm^{-1} a naopak se objevuje pás na 1082 cm^{-1} . Dále se pak mění profil pásu na 820 cm^{-1} , dochází k poklesu intenzity pásu na 885 cm^{-1} a narůstá pás na pozici 916 cm^{-1} , který byl předtím ramenem (angl. shoulder).

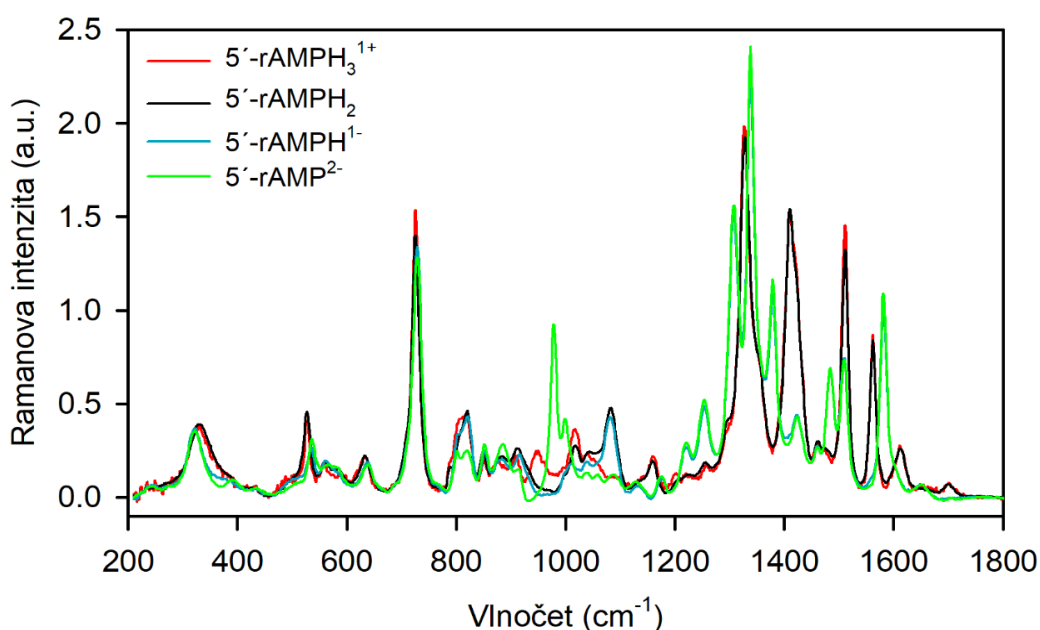
- b) pH přechod: 5'-rAMP $_1^- \leftrightarrow 5'-rAMP_2$

Při tomto přechodu dochází k protonaci dusíku N(1) na nukleotidové bázi. Pozorované změny jsou zcela analogické předešlému pozorování pro samotnou molekulu adenosinu. V oblasti nižších vlnočtů detekujeme

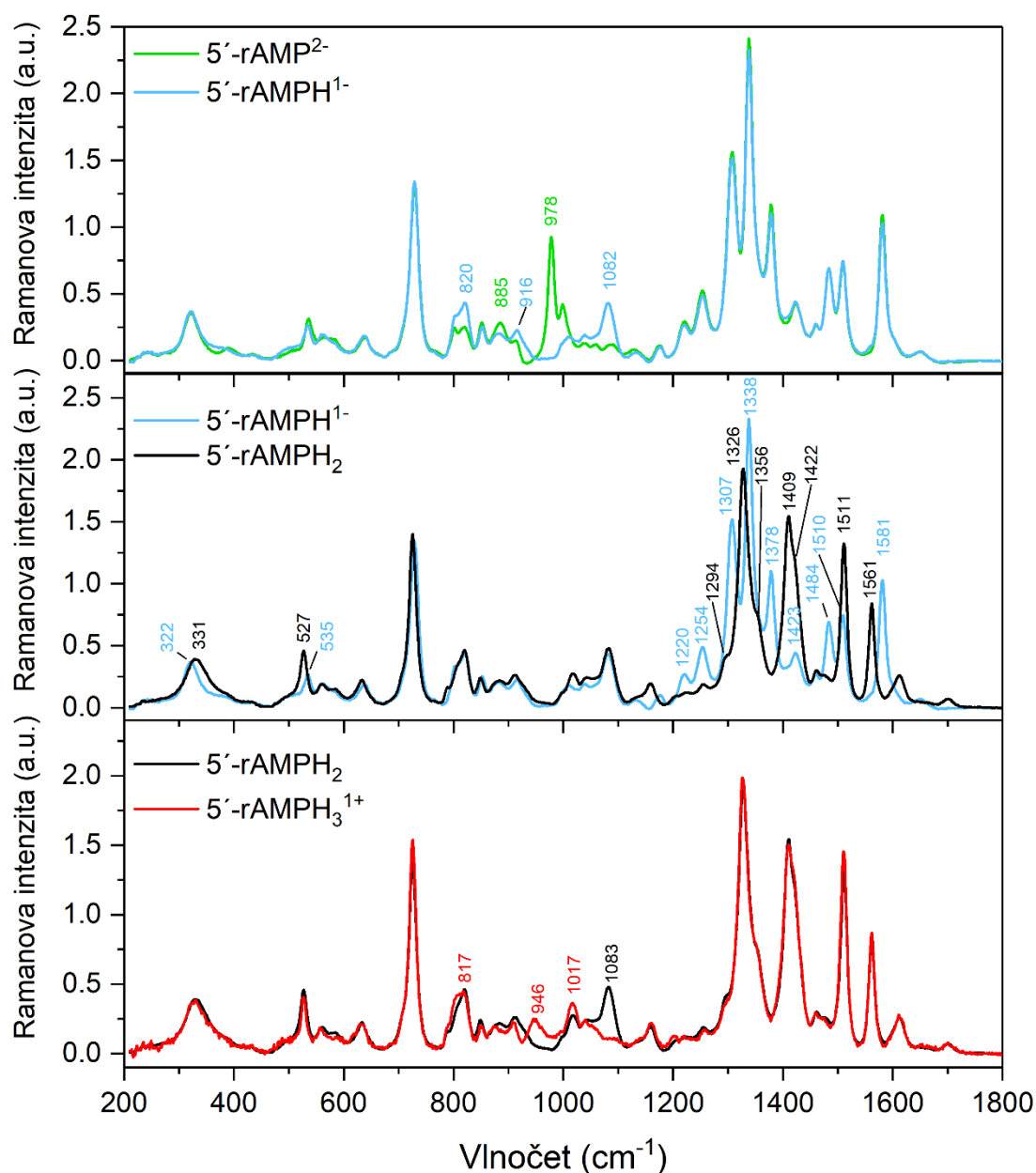
pouze posuny pásů ze 322 na 331 cm^{-1} a z 535 na 527 cm^{-1} , posun druhého z nich je současně spojen i se vzrůstem intenzity. Jinak si Ramanova spektra až do 1120 cm^{-1} velmi dobře odpovídají. Naopak v oblasti vibrační báze (nad 1120 cm^{-1}) pozorujeme výrazné změny a zcela se zde promění charakter spektra. U jedné záporně nabitě formy je nejdominantnějším rysem trojice pásů na 1307, 1338 a 1378 cm^{-1} , dvojice pásů na pozici 1448 a 1510 cm^{-1} a pás na 1581 cm^{-1} . Naopak neutrální forma má nejvýraznější pás na 1326 cm^{-1} , který má jasně zřetelnou strukturu – ramena (shoulders) na 1294 a 1356 cm^{-1} (identifikace pomocí 2. derivace). Dále má výrazný pás složený ze dvou pásů (1409 a 1422 cm^{-1}) a pás na 1561 cm^{-1} . Z hlediska protonace báze dochází ke změně jejího aromatického charakteru, který vede proměně k vibrační báze.

c) pH přechod: $5'\text{-rAMPH}_2 \leftrightarrow 5'\text{-rAMPH}_3^{1+}$

Tento přechod je opět přímo spojen s protonací fosfátu, což se projevuje pouze změnou v oblasti 800 až 1100 cm^{-1} . U kladně nabitě formy již nepozorujeme pás na 1083 cm^{-1} . Naopak vzrůstá intenzita pásů na 946 a 1017 cm^{-1} . Mírně se také mění profil pásu na 817 cm^{-1} . Jelikož při tomto přechodu nedochází k žádné změně na bázi, tak nedochází ani ke změnám v oblasti vibrační báze a Ramanova spektra těchto dvou nábojových forem jsou v této oblasti prakticky totožná.



Obrázek 33: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem adenosin-5'-monofosfátu; $5'\text{-rAMPH}_3^{1+}$ (červená), $5'\text{-rAMPH}_2$ (černá), $5'\text{-rAMPH}^{1-}$ (modrá), $5'\text{-rAMP}^{2-}$ (zelená)



Obrázek 34: Ramanova spektra nábojových forem adenosin-5'-monofosfátu seskupená po dvojicích odpovídající přechodům mezi sousedními nábojovými formami; 5'-rAMP²⁻ (zelená), 5'-rAMPH¹⁻ (modrá), 5'-rAMPH₂ (černá), 5'-rAMPH₃¹⁺ (červená)

Kombinace SVD a fitu nám tedy umožnila velmi přesně stanovit disociační konstanty 5'-rAMP a extrahovat Ramanova spektra příslušející jeho jednotlivým nábojovým formám.

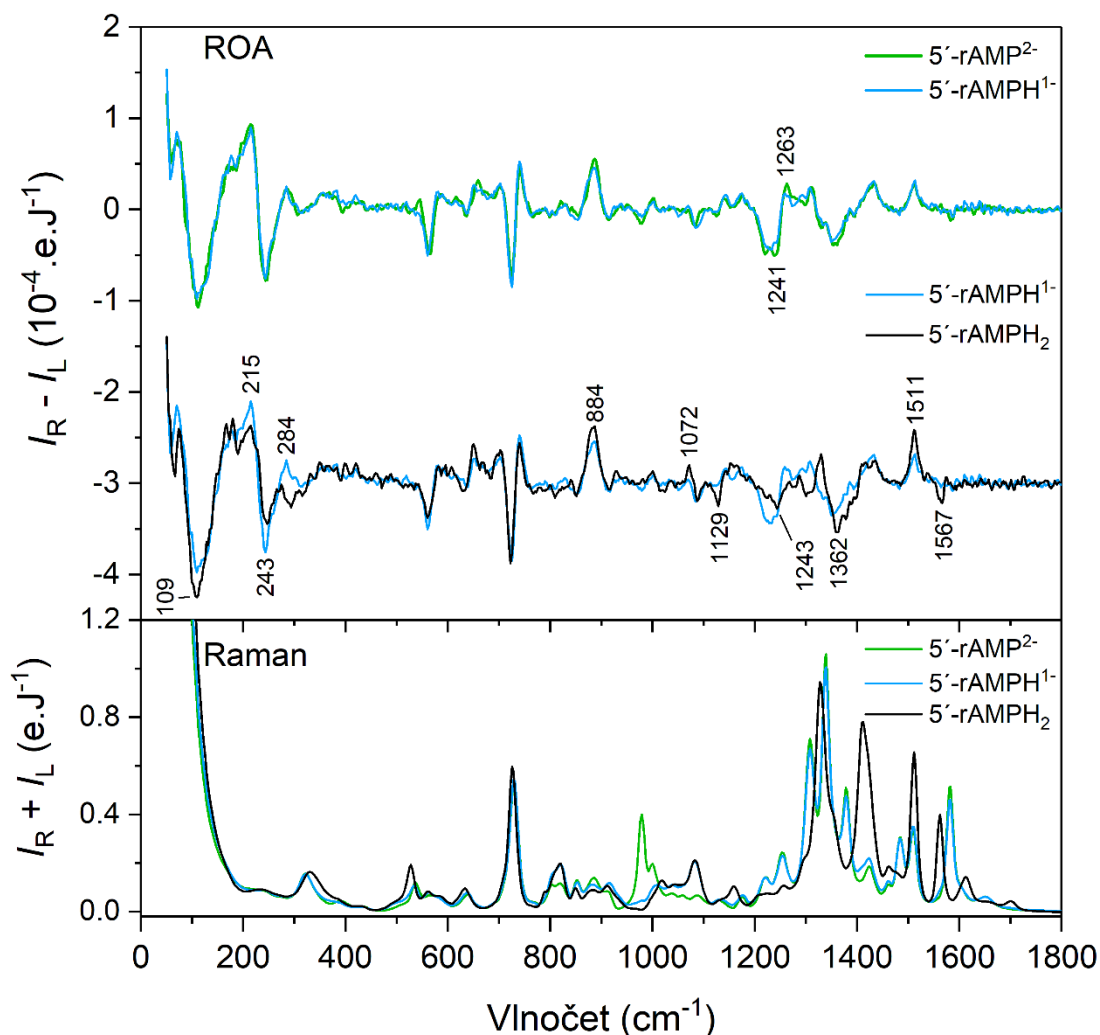
4.2.2 ROA spektra 5'-rAMP při různém pH

Na základě výsledků z pH měření jsme si připravili vzorky 5'-rAMP o pH, při kterém se jednotlivé nábojové formy vyskytují v největším zastoupení. Konkrétně se jednalo o pH = 8.5 (5'-rAMP²⁻), pH = 5.0 (5'-rAMP^{H¹⁻}) a pH = 2.0 (5'-rAMP^{H₂}). S ohledem na výsledky kapitoly 4.5 Koncentrační závislosti, která se mimo jiné věnuje stohování (stackingu) 5'-rAMP při vyšších koncentracích, bylo vhodné zvolit koncentraci vzorků co nejnižší, ideálně 25 mM. Při takové koncentraci ale ROA měření trvají velmi dlouho (více než 48 hodin) a výsledná spektra i tak vykazují poměrně nízký poměr signál/šum. Proto jsme se rozhodli připravit vzorky v koncentraci 50 mM, kdy je stohování ještě málo výrazné. Kompletně protonovaný vzorek (5'-rAMP^{H₃¹⁺}) by bylo nutné rozpouštět přímo v cca 0.5 M HCl, abychom dosáhli požadovaného pH ~ 0, a navíc má omezenou rozpustnost (maximálně cca 20 mM). Z časových důvodů jsme proto jeho měření prozatím odložili. Výsledná spektra všech tří nábojových forem jsou na **Obrázku 35**. Ramanova spektra v oblasti valenčních vodíkových vibrací jsou uvedena zvlášť na **Obrázku 36**, přičemž pro ně byla použita stejná intenzitní škála jako na **Obrázku 35**. ROA spektra v oblasti valenčních vodíkových vibrací jsou při 50 mM koncentraci zatížena příliš vysokým šumem na to, aby v nich bylo možné identifikovat nějaké pásy.

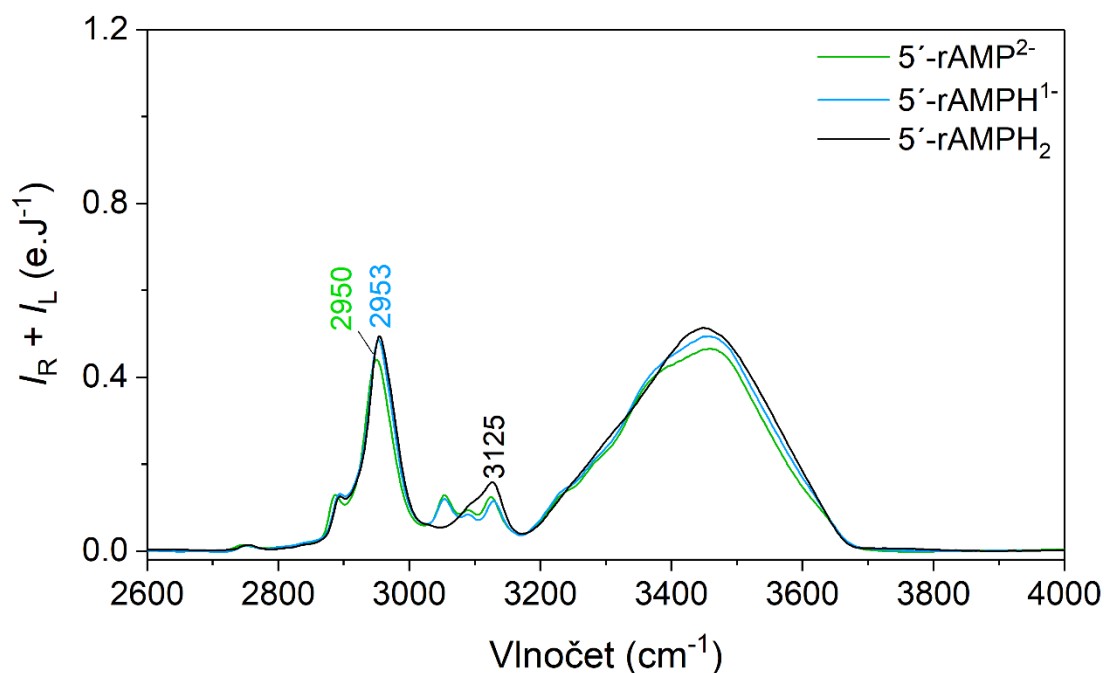
Porovnáme-li Ramanova spektra různých nábojových forem 5'-rAMP z **Obrázku 35** se spektry získanými z faktorové analýzy (**Obrázek 33**), je zřejmé, že jsou prakticky identická (až na odlišnou celkovou intenzitu danou normováním). Diskuze spektrálních změn v oblasti 50 až 1800 cm⁻¹, související s protonací 5'-rAMP, byla již provedena v předešlé kapitole 4.2.1. Zde proto okomentujeme pouze rozdíly v oblasti valenčních vodíkových vibrací (**Obrázek 36**). Při protonaci fosfátu (1. přechod) pozorujeme pouze drobný posuv pásu C-H valenčních vibrací (o 3 cm⁻¹) a jemné navýšení jeho intenzity. Při protonaci nukleobáze (2. přechod) dochází k výraznější změně v oblasti N-H valenčních vibrací – vyskytuje se pouze jeden pás na 3125 cm⁻¹.

ROA spektra 5'-rAMP ve třech nábojových stavech jsou pro přehlednost zobrazena po dvojicích nad sebou na **Obrázku 35** (podobně jako tomu bylo na **Obrázku 34**). Spektra ROA jsou normována stejným faktorem jako Ramanova spektra. Na první pohled je zřejmé, že změna protonace fosfátu (1. přechod, pK_{A1} = 6.25) se v ROA spektru téměř nijak neprojeví. Jedinou drobnou změnou je

slabé, ale pozorovatelné snížení intenzity kapletu (dvojice pásů opačného znaménka) na 1241 cm^{-1} (-)/ 1263 cm^{-1} (+). Větší spektrální změny jsou spojeny s protonací báze (2. přechod, $\text{pK}_{\text{A}_2} = 3.56$), a to především v oblasti 1100 až 1600 cm^{-1} . Ve spektru neutrální formy ($5'\text{-rAMP}_2$) se objevují pásy na 1129 a 1567 cm^{-1} a zvyšují se intenzity kladných pásů na 884 , 1072 a 1511 cm^{-1} . Dále se pak od jednou protonované formy odlišuje spektrálními profily pásů na pozicích 1243 a 1362 cm^{-1} . Malé změny jsou vidět i v terahertzové oblasti, kde dochází zejména ke změnám intenzit pásů (109 , 215 , 243 a 284 cm^{-1}). Pozorované změny však nejsou nijak výrazné, vůči změnám v Ramanových spektrech, vyvolaných protonací báze, jsou mnohem méně markantní.



Obrázek 35: Naměřená Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra nábojových forem $5'\text{-rAMP}$; $5'\text{-rAMP}^{2-}$ (zelená), $5'\text{-rAMPH}^{1-}$ (modrá), $5'\text{-rAMPH}_2$ (černá)



Obrázek 36: Oblast valenčních vodíkových vibrací Ramanových spekter nábojových forem 5'-rAMP; 5'-rAMP²⁻ (zelená), 5'-rAMP¹⁻ (modrá), 5'-rAMP⁰ (černá)

Pokud si uvědomíme, že ROA signál pochází především z chirálních částí molekuly a ROA je poměrně lokální jev, dávají tato pozorování dobrý smysl. Bez ohledu na protonaci jsou fosfátová skupina i nukleobáze samy o sobě achirální. Změny jejich vibrací v rámci nukleotidu tak vidíme především ve smyslu toho, jak se jejich vibrace spřahují s vibracemi chirální pentosy. U fosfátu je toto spřažení evidentně velmi slabé, zatímco u nukleobáze je výraznější.

V literatuře se nám nepodařilo najít žádné podobné pozorování projevů různého nábojového stavu nukleotidů na jejich ROA spektra. Zdá se, že naše měření jsou první a navíc zahrnují i oblast nízkých vlnočtů (terahertzovou oblast), která byla doposud v Ramanově a především ROA spektroskopii nukleotidů poměrně opomíjena.

4.2.3 Další purinové nukleotidy

Stejným způsobem jako v případě 5'-rAMP jsme určili i pK_A disociační konstanty dalších purinových nukleotidů. V této podkapitole se věnujeme pouze popisu společných trendů či nejvýznamnějších rozdílů, které jsme při měření pH závislosti pozorovali. Výsledné hodnoty námi určených disociačních konstant a jejich porovnání s literaturou jsou uvedeny v **Tabulce 9** (podkapitola 4.2.5). Popisu spektrálních odlišností mezi nukleotidy vyvolanými různou polohou fosfátu či srovnání spekter oxy- a deoxyribonukleotidů se věnujeme v samostatných podkapitolách (4.3 a 4.4). Výsledky měření a fitu pro každý studovaný nukleotid jsou shrnuty na obrázcích v sekci Přílohy. Vždy se jedná o obrázek celé série naměřených spekter, faktorovou analýzu a její fit, relativní zastoupení nábojových forem v závislosti na pH a čistá Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem.

Jako další purinové nukleotidy byly měřeny

- 5'-dAMP ve formě sodné soli,
- 2'-rAMP ve formě volné kyseliny,
- 3'-rAMP ve formě volné kyseliny,
- 3',5'-cAMP ve formě hydrátu sodné soli,
- 5'-rGMP (G-8377) ve formě hydrátu disodné soli,
- 5'-dGMP (D-9500) ve formě hydrátu sodné soli.

Všechny vzorky měly stejnou výchozí koncentraci $c \approx 25$ mM. Zpracování a normování spekter se provádělo stejným způsobem jako v kapitole 4.2.1 Adenosin-5'-monofosfát.

V případě adenosinových nukleotidů 5'-dAMP, 2'-rAMP a 3'-rAMP (po řadě **Obrázky P1a–e**, **P2a–e** a **P3a–e**) jsme získali pK_A konstanty, které se od těch příslušejících 5'-rAMP odlišují pouze minimálně. Záměna ribonukleotidu za deoxyribonukleotid měla zanedbatelný vliv na všechny tři disociační konstanty – pouze nejnižší pK_{A_1} konstanta je posunuta o 0.2, ale i to je stále v rámci námi odhadnuté experimentální chyby, která je pro takto kyselý přechod zvýšená. Poloha fosfátu měla vliv především na pK_{A_3} disociační konstantu odpovídající první protonaci fosfátové skupiny, zatímco pK_{A_2} konstanta odpovídající protonaci purinové báze nebyla ovlivněna. Poloha fosfátu však měla vliv i na rozpustnost vzorků v nízkém pH. U 3'-rAMP se nám tak bohužel nepodařilo spektra naměřit při dostatečně nízkých

hodnotách pH (vzorek se vysrážel), a proto jsme u něj rozlišili pouze tři nábojové formy (faktorová dimenze 3). Vzorek 3',5'-cAMP (**Obrázky P4a–e**) obsahující cyklický fosfát byl z hlediska měření pH závislosti velmi podobný samotnému adenosinu – podařilo se nám u něj určit dvě hlavní nábojové formy lišící se protonací báze. Disociační konstanta fosfátové skupiny ležela natolik nízko, že se nám ji nepodařilo určit.

U guanosinových nukleotidů 5'-rGMP a 5'-dGMP (po řadě **Obrázky P5a–h** a **Obrázky P6a–h**) je možné identifikovat celkem pět nábojových forem. Na rozdíl od 5'-rAMP zde dochází k protonaci báze dvakrát (v bazickém prostředí na N(1) a v kyselém na N(7)). Z tohoto důvodu byla Ramanova spektra měřena v širším rozsahu pH než adenosinové nukleotidy, $\text{pH} \leq 12$. Ukázalo se, že fit celé spektrální série na čtyři disociační přechody (pět nábojových forem) obsahuje příliš velké množství volných parametrů (29) a byl proto velmi citlivý na počáteční podmínky. Proto jsme naměřená data fitovali jako dvě překrývající se oblasti (tři horní a tři spodní disociační konstanty). Obě protonace báze jsou spojeny s výraznými spektrálními změnami v oblasti 1200 až 1800 cm^{-1} . Naproti tomu protonace fosfátu se projevuje stejnými, poměrně drobnými spektrálními změnami, jako v případě 5'-rAMP. Změna pK_A konstant při záměně ribonukleotidu za deoxyribonukleotid je opět velmi malá až zanedbatelná.

4.2.4 Pyrimidinové nukleotidy

Doplňkově jsme též změřili pH závislosti pro několik nejčastěji se vyskytujících pyrimidinových nukleotidů a stanovili jejich pK_A disociační konstanty a hodnoty pH, při kterých se jejich jednotlivé nábojové stavy vyskytují v největším zastoupení. Výsledná zpracovaná spektra, jejich faktorová analýza i s fitem, relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem a čistá Ramanova spektra jsou uvedeny v oddílu Přílohy.

Studovali jsme následující nukleotidy

- 5'-rCMP ve formě disodné soli,
- 5'-dCMP ve formě sodné soli,
- 5'-dTMP ve formě sodné soli,
- 5'-rUMP ve formě disodné soli.

Všechny vzorky měly stejnou výchozí koncentraci $c \approx 25$ mM. Zpracování a normování naměřených dat se provádělo stejným způsobem jako v kapitole 4.2.1.

V případě 5'-rCMP a 5'-dCMP (po řadě **Obrázky P7a–e** a **Obrázky P8a–e**) byl postup měření a zpracování analogický jako u 5'-rAMP. Opět jsou zde dvě protonace fosfátu a jedna dusíkaté báze. Ramanovým spektrům dominují pásy související s vibracemi heterocyklické báze. Celkově jsou ale spektra jednodušší, neboť pyrimidin je na rozdíl od purinu pouze monocykus. Rozdíl pK_A konstant pro oxy- a deoxyribonukleotid je větší než u purinových nukleotidů, přibližně 0.1. I v případě 5'-dTMP a 5'-rUMP (po řadě **Obrázky P9a–e**, **P10a–e**) můžeme pozorovat dvě protonace fosfátu a jednu na bázi. K protonaci na bázi však dochází již v bazickém prostředí okolo $pH \approx 9.5$. V našem případě jsme titrovali od $pH < 8$, takže jsme tento disociační přechod nestanovili. Celkový tvar spekter zůstal při protonacích fosfátové skupiny nezměněn. Díky absenci methylové skupiny jsou Ramanova spektra 5'-rUMP o něco jednodušší než ta odpovídající 5'-dTMP.

4.2.5 Výsledky pH závislostí

Všechny pK_A disociační konstanty, které se nám podařilo určit, jsou shrnuty v **Tabulce 9** a porovnány s některými hodnotami z literatury. Konstanty pK_{A_1} a pK_{A_3} odpovídají protonaci/deprotonaci na fosfátové skupině a konstanty pK_{A_2} a pK_{A_4} odpovídají protonaci/deprotonaci na nukleotidové bázi. Je zřejmé, že mezi námi určenými hodnotami a těmi dostupnými z literatury jsou poměrně zřetelné rozdíly nezávisle na tom, o kterou pK_A konstantu se jedná. Tyto rozdíly však ve většině případů nepřesahují 0.3. Je ovšem vhodné zmínit, že značné rozdíly jsou i mezi hodnotami pocházejících z různých publikací – místy až o 0.5.

Díky těmto konstantám a známému relativnímu zastoupení jednotlivých nábojových forem pak můžeme určit pH, při kterých mají jednotlivé nábojové formy daných nukleotidů nejvyšší zastoupení a změřit při nich ROA spektra.

Tabulka 9: Výsledky pH závislostí nukleotidů

Nukleotid	pK_{A_1}		pK_{A_2}		pK_{A_3}		pK_{A_4}	
	fosfát		báze		fosfát		báze	
Adenosin			3.39	3.50 ^b 3.63 ^d				
5'-rAMP	0.65 [*]	0.9 ^d	3.48	3.84 ^a 3.74 ^d	6.25	6.21 ^a 6.05 ^d		
5'-dAMP	0.80 [*]	x	3.42	4.4 ^b	6.28	x		
2'-rAMP	0.80 [*]	x	3.43	3.8 ^b	6.05	6.17 ^c		
3'-rAMP	x	x	3.43	3.65 ^b	5.84	5.92 ^c		
3',5'-cAMP	x	x	3.27	x				
5'-rGMP	1.00 [*]	0.7 ^d	2.42	2.4 ^b 2.9 ^d	6.27	6.1 ^c 6.3 ^d	10.06	9.4 ^b 9.6 ^d
5'-dGMP	1.00 [*]	x	2.40	2.9 ^b	6.34	6.4 ^c	10.11	9.7 ^b
5'-rCMP	0.70 [*]	0.8 ^d	4.39	4.5 ^{b,d}	6.23	6.3 ^{c,d}		
5'-dCMP	0.80 [*]	x	4.59	4.6 ^b	6.33	?		
5'-dTMP	1.50 [*]	1.6 ^d			6.31	6.5 ^c	x	10.0 ^{b,d}
5'-rUMP	1.00 [*]	1.0 ^d			6.16	6.4 ^{c,d}	x	9.5 ^{b,d}

Pozn.: * – při fitu zdola omezená, x – nezměřeno/nedohledáno, ^a – (Sigel et al., 1988), ^b – (Lundblad & Macdonald, 2010), ^c – (Dawson, 1959), ^d – (Shabarova & Bogdanov, n.d.)

4.3 Vliv polohy fosfátu na Ramanova spektra nukleotidů

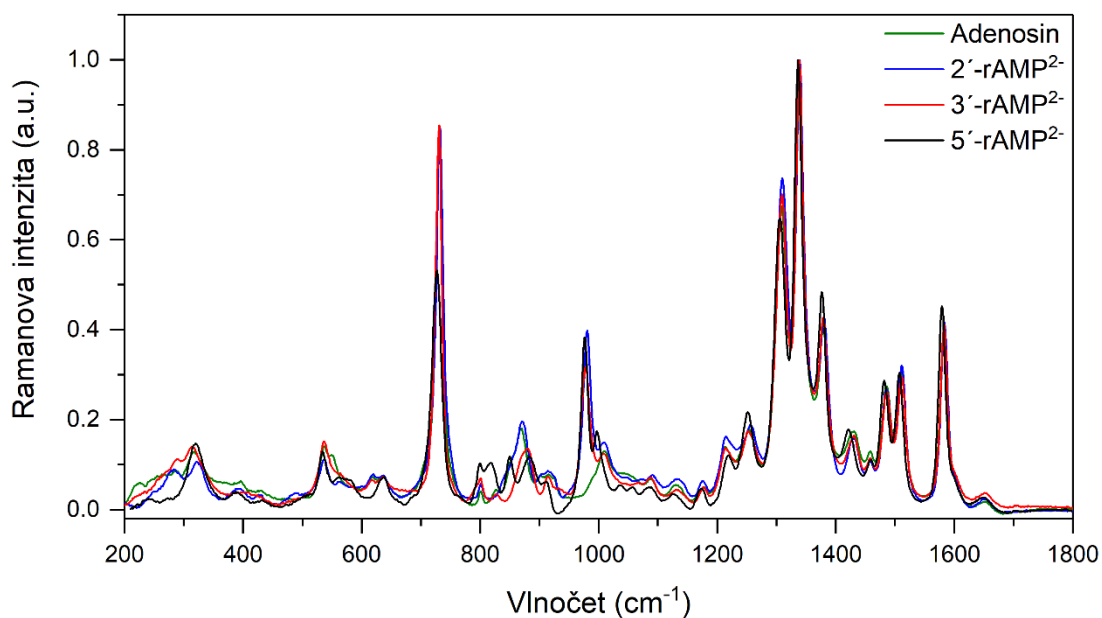
Jednou z nejčastějších modifikací nukleotidů je poloha a počet fosfátových skupin. V našem případě jsme studovali vliv polohy fosfátu u adenosin-monofosfátu (AMP), konkrétně v případech, kdy fosfátová skupina byla navázána na uhlíku C'(5) – 5'-rAMP, uhlíku C'(3) – 3'-rAMP, uhlíku C'(2) – 2'-rAMP, a také v případě, kdy zcela chybí – samotný adenosin. Popisovat vliv polohy fosfátu budeme pro plně disociovanou formu (náboj -2 , popř. 0 pro adenosin), protože ta je nejvíce zastoupena při nativním pH. Stejným způsobem by však bylo možné porovnat i ostatní nábojové formy. Ramanova spektra byla získána z měření pH závislostí spekter nukleotidů a v překryvu jsou uvedena na **Obrázku 37**. Spektra byla normována na nejintenzivnější pás na 1336 cm^{-1} . Chtěli jsme změřit i příslušná ROA spektra, ale kvůli časové náročnosti ROA měření jsme se k tomu již nedostali.

Z **Obrázku 37** je patrné, že oblasti nad 1100 cm^{-1} jsou u všech vzorků téměř identická, což nám potvrzuje, že v této oblasti dominují vibrace báze. Jediná výrazná změna, která se projevila, je přímo spojena s dýchací vibrací báze (cca 730 cm^{-1}) u 5'-rAMP²⁻ pozorujeme nižší intenzitu než u zbylých nukleotidů. Drobný posuv pozorujeme u pásu odpovídající vibraci fosfátu (5'-rAMP²⁻ – 976 cm^{-1} , 3'-rAMP²⁻ – 978 cm^{-1} a 5'-rAMP²⁻ – 981 cm^{-1}), který se samozřejmě u adenosinu nevyskytuje.

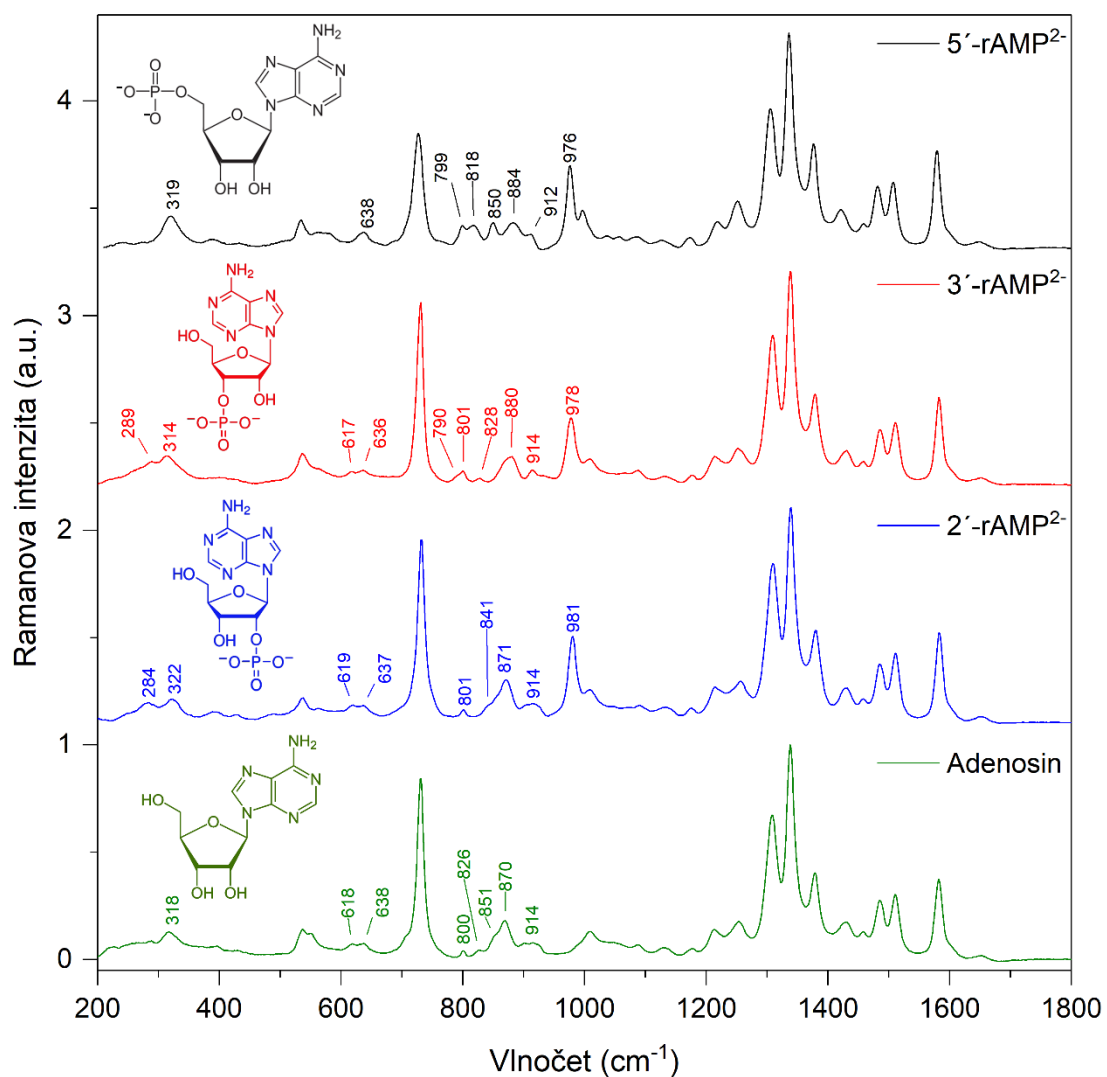
Pro lepší přehlednost změn jsou Ramanova spektra různě fosforylovaných forem adenosinu zobrazena nad sebou na **Obrázku 38**. Největší změny jsou pozorovány v oblasti 800 až 1000 cm^{-1} . V případě 5'-rAMP²⁻ jsme schopni snadno rozeznat 5 pásů – 799 , 818 , 850 , 884 a 912 cm^{-1} , kdežto u 3'-AMP²⁻ nepozorujeme pás na 850 cm^{-1} a pásy zde mají jiný spektrální profil – 790 (rameno), 801 , 828 , 880 a 914 cm^{-1} . U 2'-rAMP²⁻ této oblasti dominuje pás na 871 cm^{-1} s ramenem (shoulder, 841 cm^{-1}) a poměrně široký pás na 914 cm^{-1} .

V oblasti nižších vlnočtů detekujeme dvě velmi podobné pozorovatelné změny. První je výskyt jednoho pásu na 319 cm^{-1} u 5'-rAMP²⁻ a u zbylých dvou adenosin-monofosfátů pozorujeme dva rozlišitelné pásy (3'-rAMP²⁻ – 289 a 314 cm^{-1} , 2'-rAMP²⁻ – 284 a 322 cm^{-1}). Totéž pak vidíme na kolem přibližně 638 cm^{-1} . Celkově lze říci, že přítomnost a typ fosforylovaných nukleotidů lze z Ramanových spektrech jednoznačně určit, a to na základě pásu fosfátové vibrace na přibližně 976 cm^{-1} a celé

oblasti mezi 750 a 950 cm^{-1} . Příslušné spektrální změny ale nejsou příliš intenzivní, pohybují se v jednotkách procent Ramanovského signálu a jejich spolehlivá identifikace vyžaduje poměrně kvalitní naměřená spektra.



Obrázek 37: Ramanova spektra různě fosforylovaných forem adenosinu zobrazena v překryvu; 5'-rAMP²⁻ (černá), 3'-rAMP²⁻ (červená), 2'-rAMP²⁻ (modrá), Adenosin (zelená)



Obrázek 38: Ramanova spektra různě fosforylovaných forem adenosinu; 5'-rAMP²⁻ (černá), 3'-rAMP²⁻ (červená), 2'-rAMP²⁻ (modrá), Adenosin (zelená)

4.4 Srovnání oxy- a deoxyribonukleotidů

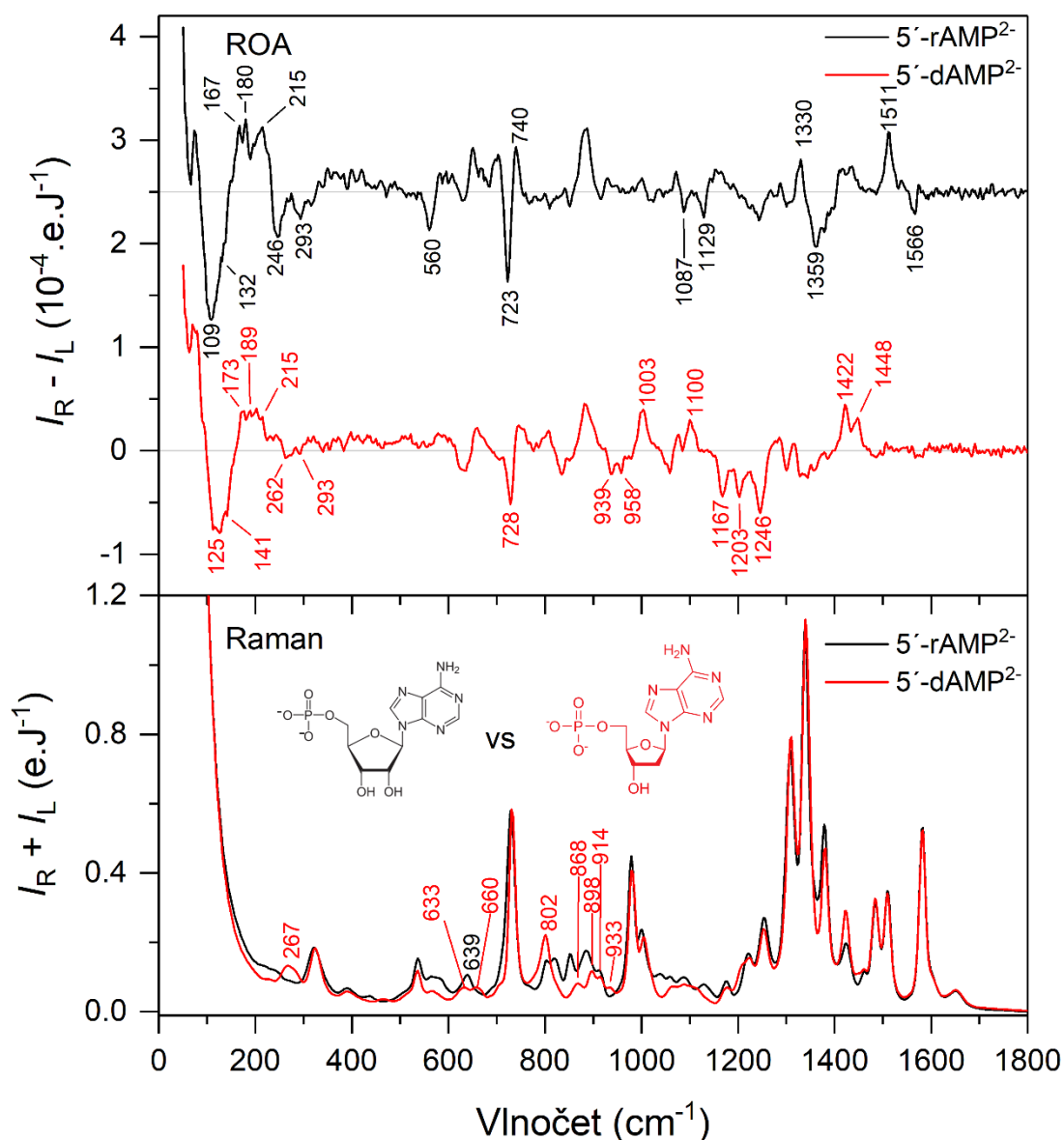
Nukleotidy mohou mít jako cukernou podjednotku ribosu či deoxyribosu. V případě ribosy tak máme čtyři chirální uhlíky, v případě deoxyribosy tři. Dá se tedy předpokládat, že na rozdíl od Ramanových spekter budou ROA spektra na záměnu těchto dvou pentos mnohem citlivější. V této kapitole jsme se proto zaměřili na charakterizace změn vyvolané právě přítomností ribosy či deoxyribosy v nukleotidu. Jako modely jsme zvolili 5'-rAMP a 5'-dAMP, 5'-rGMP a 5'-dGMP a dvojici 5'-rCMP a 5'-dCMP. Obdobně jako v předchozí podkapitole 4.3 porovnáváme nábojové formy s nábojem -2 . Příslušná ROA spektra byla z časových důvodů změřena zatím jen pro první dvojici vzorků.

4.4.1 5'-AMP

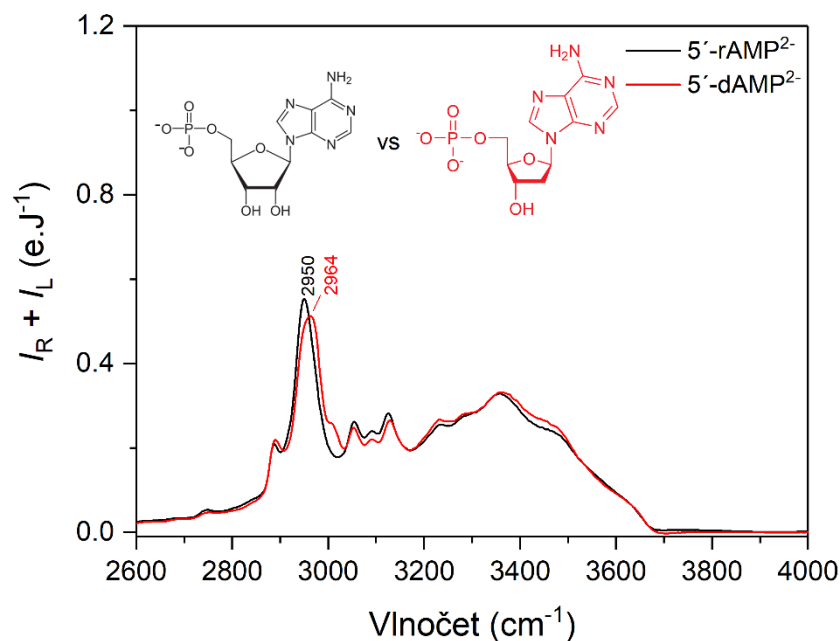
Ramanova a ROA spektra 5'-rAMP a 5'-dAMP v koncentraci 50 mM můžeme vidět na **Obrázku 39**. Opět pro přehlednost jsou valenční vodíkové vibrace Ramanových spekter zobrazeny zvlášť na **Obrázku 40** (ROA spektra v této oblasti jsou příliš zatížena šumem). Zaměříme-li se nejprve na Ramanova spektra, tak pozorujeme, že spektrální změny vyvolané s přítomností hydroxylové (OH) skupiny na uhlíku C'(2) nejsou nijak výrazné. Největší změny pozorujeme mezi cca 750 až 950 cm^{-1} , kde se mění spektrální profil pásů. Na rozdíl od ribonukleotidu zde pozorujeme jeden samostatný pás na 802 cm^{-1} a složený pás na 898 cm^{-1} se třemi rameny (868, 914 a 933 cm^{-1}). U deoxyribonukleotidu se navíc objevuje pás na 267 cm^{-1} a ribonukleotid má pás na 639 cm^{-1} (5'-dAMP – dva pásy: 633 a 660 cm^{-1}). Jinak si Ramanova spektra velmi dobře odpovídají. V oblasti valenčních vodíkových vibrací (**Obrázek 40**) detekujeme mírný posuv jednoho pásu – 2950 cm^{-1} (5'-rAMP²⁻), 2964 cm^{-1} (5'-dAMP²⁻).

U ROA dochází k proměně celkového charakteru spektra a změny vyvolané přítomností/absencí OH skupiny na ribose jsou markantní. U 5'-dAMP nepozorujeme kaplet na 1511 cm^{-1} (+)/1566 cm^{-1} (-), ale zvyšuje se intenzita dvojice kladných pásů na pozicích 1422 a 1448 cm^{-1} . Výrazným rysem je vymizení kapletu na 1330 cm^{-1} (+)/1359 cm^{-1} (-). Dále u deoxy- formy pozorujeme poměrně intenzivní trojici záporných pásů – 1167, 1203 a 1245 cm^{-1} , kde v případě oxy- formy se nacházejí pouze hůře rozlišitelná ramena (shoulders). O něco níže pozorujeme změnu

počtu pásů a znaménka – 5'-dAMP: 1100 cm^{-1} (+), 5'-rAMP: 1087(-) a 1129 (-) cm^{-1} . Navíc u deoxy- formy se zvyšuje intenzita pásu na 1003 cm^{-1} a objevují se záporné pásy na 939 a 958 cm^{-1} . Mění se také kaplet 723 cm^{-1} (-)/740 cm^{-1} (+), kde u 5'-rAMP je intenzivnější. Výraznou změnou je vymizení intenzivního pásu na 560 cm^{-1} . Změny detekujeme i v terahertzové oblasti (pod 300 cm^{-1}), kde dochází ke změně intenzit a posunu pásů k vyšším vlnočtům u deoxy- formy.



Obrázek 39: Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra plně disociovaných forem 5'-rAMP a 5'-dAMP; 5'-rAMP²⁻ (černá), 5'-dAMP²⁻ (červená)

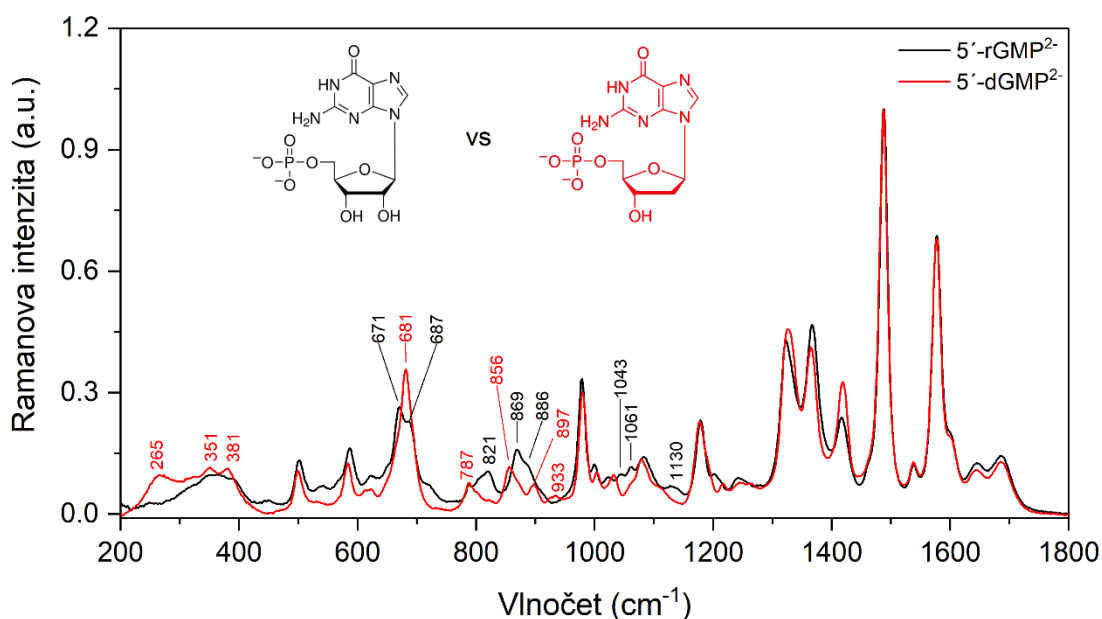


Obrázek 40: Oblast valenčních vodíkových vibrací Ramanových spekter plně disociovaných forem 5'-rAMP a 5'-dAMP; 5'-rAMP²⁻ (černá), 5'-dAMP²⁻ (červená)

Z minulé podkapitoly 4.3 již víme, že pozice fosfátové skupiny na ribose má na Ramanova spektra jen velmi malý vliv. Nyní vidíme, že totéž platí pro nahrazení ribosy za deoxyribosu. V obou případech pozorujeme některé charakteristické spektrální změny především v oblasti 800 až 1200 cm⁻¹, ale celkový charakter spektra zůstává zachován. U pH závislosti jsme dále viděli, že protonace báze způsobí obrovskou spektrální změnu. Na základě těchto pozorování je zřejmé, že veškeré velmi intenzivní rysy Ramanových spekter nukleotidů přímo souvisejí s vibracemi báze. V případě ROA je však situace zcela odlišná. V podkapitole 4.2.2 jsme viděli, že protonace fosfátu se na ROA spektru prakticky neprojeví, a že i protonace báze způsobí jen poměrně malou spektrální změnu. Naproti tomu chybějící hydroxylová skupina na pentose (a tím i ztráta chiralit na C(3')) způsobí velmi výraznou změnu celého spektrálního profilu. To ukazuje, že ROA spektrum mnohem více odráží vibrace cukerné složky nukleotidu a přináší tak k Ramanovu spektru komplementární informaci.

4.4.2 5'-GMP a 5'-CMP

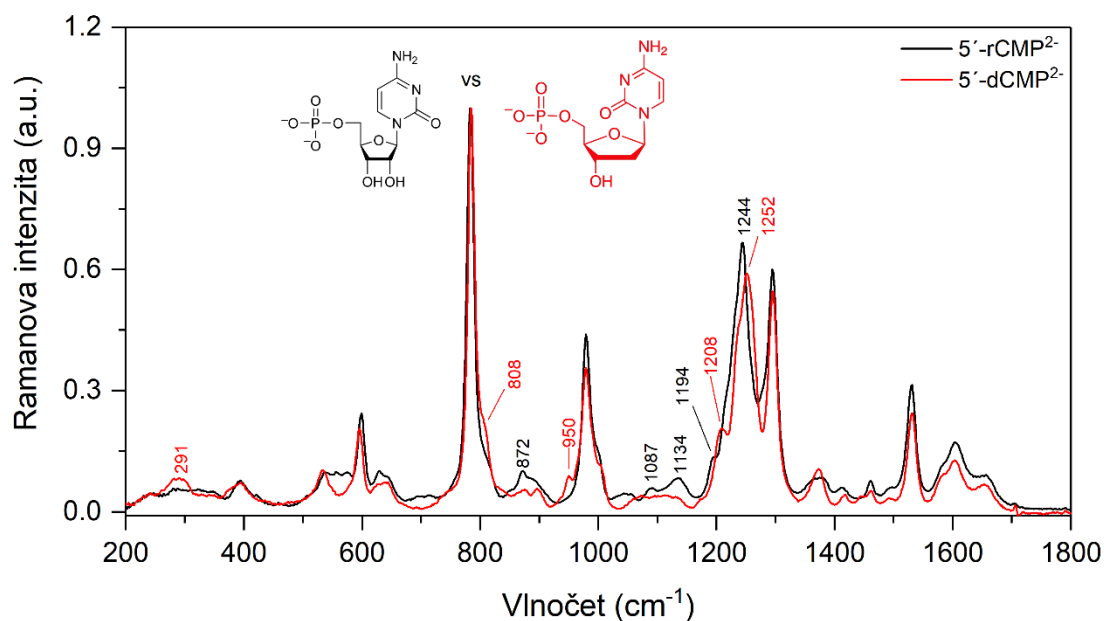
Ramanova spektra $5'$ -rGMP²⁻ a $5'$ -dGMP²⁻ jsou uvedena na **Obrázku 41**. Jedná se o spektra z pH měření jejich závislostí, která byla normována na nejsilnější pás na 1448 cm⁻¹. Podobně jako u $5'$ -rAMP a $5'$ -dAMP nejsou rozdíly nijak veliké a projevují se v podobných oblastech vlnočtové škály. U deoxy- formy se v oblasti nižších vlnočtů objevuje pás na 265 cm⁻¹ a dále dokážeme rozlišit dvojici pásů – 351 a 381 cm⁻¹. Na první pohled zřetelnou změnou je pak splnutí pásu (671 cm⁻¹) a jeho ramena (687 cm⁻¹) v jeden pás na pozici 681 cm⁻¹. Dále se pak dva pásy (821 a 869 cm⁻¹) posunují v $5'$ -dGMP²⁻ k nižším hodnotám vlnočtů – 787 a 856 cm⁻¹. V případě deoxy- formy pak můžeme ještě detekovat dva pásy na 897 a 933 cm⁻¹. Naopak u $5'$ -rGMP²⁻ jsme mezi 1000 a 1130 cm⁻¹ schopni rozlišit podrobnější strukturu pásů (1043, 1061 a 1130 cm⁻¹). Výše popsané změny nejsou nijak markantní a mimo to, Ramanova spektra mají shodný charakter a odpovídají si.



Obrázek 41: Ramanova spektra jednou protonovaných forem $5'$ -rGMP a $5'$ -dGMP; $5'$ -rGMP²⁻ (černá), $5'$ -dGMP²⁻ (červená)

Jako zástupce pyrimidinových nukleotidů jsme zvolili 5'-rCMP a jeho deoxyformu – 5'-dCMP. Ramanova spektra můžeme vidět na **Obrázku 42**. Jedná se taktéž o spektra z pH závislosti a byla normována na pás 784 cm⁻¹. Na rozdíl od prezentovaných purinových nukleotidů u cytidinových nukleotidů můžeme pozorovat změnu v oblasti kolem 1200 cm⁻¹. Konkrétně se jedná o posun pásů u deoxy- formy k vyšším vlnočtům (1194 → 1208 cm⁻¹ a 1244 → 1252 cm⁻¹). V případě 5'-rCMP²⁻ detekujeme pásy na 872, 1087 a 1134 cm⁻¹, které u 5'-dCMP²⁻ nejsme schopni rozlišit. Naopak u deoxy- formy se objevují dva pásy – 291 a 950 cm⁻¹, a jedno rameno (shoulder) – 808 cm⁻¹. Stejně jako v předešlých případech mají spektra stejný celkový charakter a velmi dobře si odpovídají.

Tato pozorování jsou v dobrém souladu s diskuzí v předešlé podkapitole. Více závěrů bude možné vyvodit, až budeme mít k dispozici i příslušná ROA spektra.



Obrázek 42: Ramanova spektra plně disociovaných forem 5'-rCMP a 5'-dCMP; 5'-rCMP²⁻ (černá), 5'-dCMP²⁻ (červená)

4.5 Koncentrační závislosti

Jedním ze stabilizujících efektů struktury nukleových kyselin je tzv. patrová interakce (také π - π interakce nebo také π - π stacking), nekovalentní atraktivní interakce mezi aromatickými kruhy. Tuto interakci, vedoucí ke stohování nukleotidů (stacking), je ovšem možné pozorovat i pro volné mononukleotidy při vyšších koncentracích, (Neurohr & Mantsch, 1979). V případě mononukleotidů obecně platí, že větší afinitu ke stohování mají purinové nukleotidy – nejochotněji stohuje adenosinmonofosfát (AMP), pak inosinmonofosfát (IMP) a nejméně guanosinmonofosfát (GMP), (Neurohr & Mantsch, 1979). Pyrimidinové nukleotidy stohují ještě o poznání méně ochotně. Cílem našich měření koncentračních závislostí byla identifikace spektrálních projevů samoasociace v Ramanových a ROA spektrech nukleotidů. Jako vhodný vzorek jsme zvolili adenosin-5'-monofosfát (5'-rAMP) právě pro jeho vyšší ochotu ke stohování.

Jak již bylo zmíněno v úvodní kapitole práce 1.2.6 G-tetrády a G-kvadruplexy, při zvyšování koncentrace nukleotidů může kromě stohování docházet i k jiným samoasociačním procesům. Velmi vhodným příkladem takového chování jsou nukleotidy guanosin-5'-monofosfát (5'-rGMP) a 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (5'-dGMP), které se mohou mezi sebou vázat pomocí Hoogsteenovského párování a vytvářet tzv. guaninové tetrády (G-tetrády). V přítomnosti jednomocných kationtů pak tyto tetrády mohou vytvářet aglomeráty podobné guaninovým kvadruplexům. Velmi zajímavá jsou zjištění, že zatímco 5'-rGMP ochotně vytváří aglomeráty i v přítomnosti lithných (Li^+) a sodných (Na^+) iontů, tak 5'-dGMP nikoliv. V přítomnosti draselných (K^+) iontů však vytváří aglomeráty jak 5'-rGMP, tak i 5'-dGMP, (Mudroňová et al., 2016) a (Hightower et al., 2009). Vytváření guaninových tetrád a jejich aglomerátů je široce studováno a to především pomocí techniky NMR a CD, např. (Hightower et al., 2009), (Wu & Kwan, 2009) a (Gray et al., 2008). V poslední době se v této oblasti uplatňuje také Ramanova spektroskopie (Mudroňová et al., 2016), infračervená spektroskopie a VCD, např. (Novotná et al., 2012), (Goncharova et al., 2012) a (Novotná et al., 2014). Domníváme se, že v této oblasti výzkumu by mohla technika ROA přinést velmi zajímavé výsledky. Proto jsme studovali i koncentrační závislost Ramanových a posléze i ROA spekter v přítomnosti Na^+ a K^+ iontů. Všechna spektra byla měřena v celé oblasti fundamentálních vibrací a byla normována na 1. faktorovou komponentu.

Před samotnými měřeními jsme si vypočítali, jaké je předpokládané zastoupení merů 5'-rAMP a 5'-rGMP v koncentračním rozmezí 1–2000 mM. Pro tyto dva nukleotidy je možné dohledat asociační konstanty určené pomocí NMR v rámci isodesmického modelu nekonečného stohování, (Martin, 1996). Tento model je také označován jako model rovnocenných asociačních konstant a vychází z předpokladu, že přidání další molekuly do stohu je charakterizováno stejnou volnou energií a rovnovážnou konstantou K jako u předešlých molekul. Běžně bývá označován jako EK (equal K) model a popisujeme jej pomocí rovnic

$$(A)_n + (A)_1 \rightleftharpoons (A)_{n+1},$$

$$K = \frac{[(A)_{n+1}]}{[(A)_n][(A)_1]}, \quad (4.2)$$

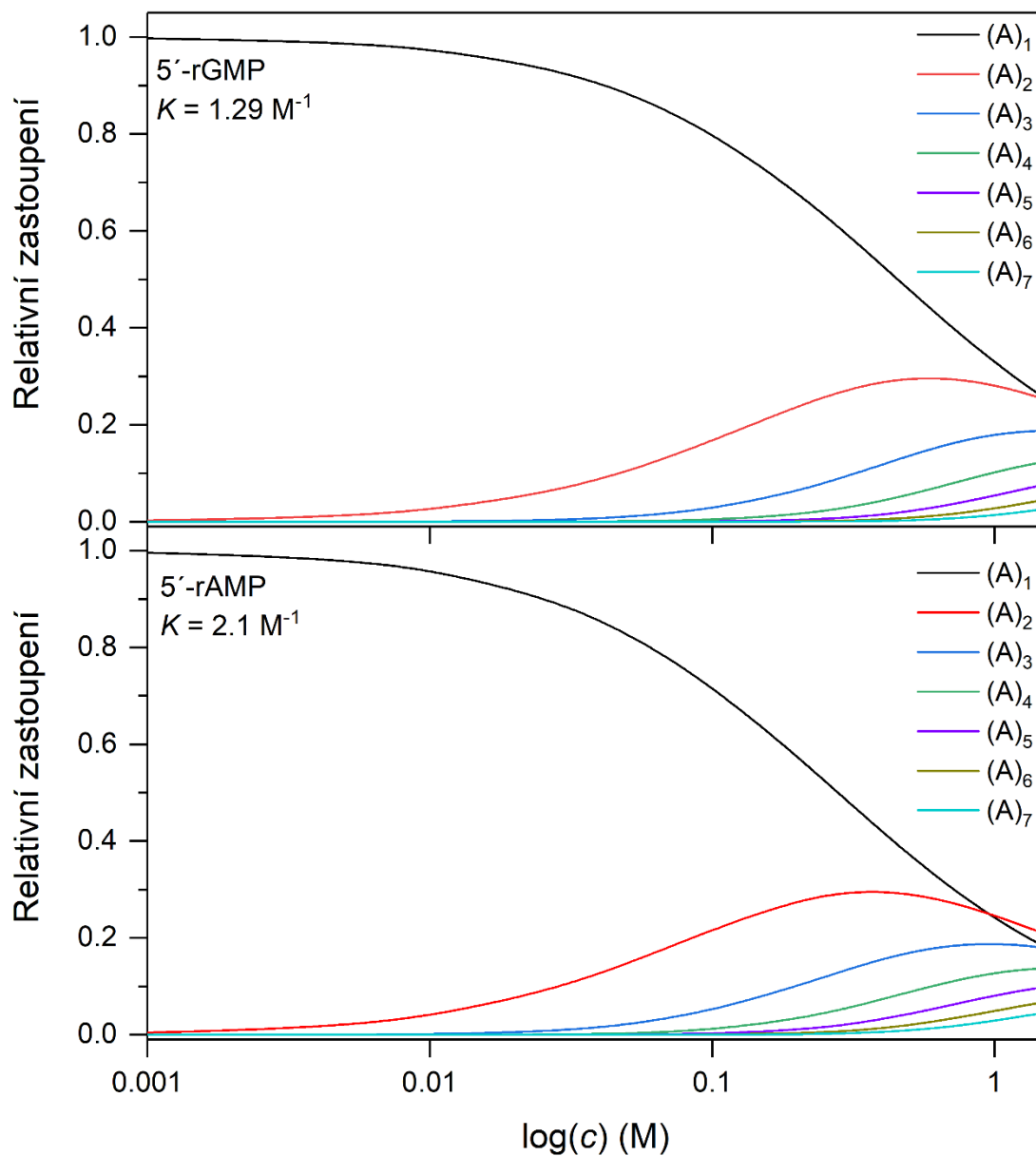
kde $(A)_i$ představuje i -mery a $[(A)_i]$ je jejich koncentrace. Pro 5'-rAMP byla hodnota této konstanty určena jako 1.92 M^{-1} při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\text{pH} = 7.4$ dle (Neurohr & Mantsch, 1979) nebo $2.1 \pm 0.3 \text{ M}^{-1}$ při teplotě $27 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\text{pD} = 8.9$ dle (Tribolet & Sigel, 1987). Pro 5'-rGMP se nám podařilo dohledat hodnotu 1.29 M^{-1} při teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ a $\text{pH} = 7.4$, dle (Neurohr & Mantsch, 1979). Pro tyto konstanty jsme vypočítali relativní zastoupení jednotlivých merů v roztoku v koncentračním rozmezí 1 až 2000 mM a ukazujeme je v **Tabulce 10** a na **Obrázku 43**.

Je patrné, že pokud chceme naměřit spektrum čistého monomeru 5'-rAMP, musíme volit koncentrace 5 mM a menší, při koncentracích přibližně 25 mM je již téměř deset procent vzorku ve formě dimeru. Při koncentracích cca 200 mM, kdy lze již měřit i ROA spektra s dobrým poměrem signálu k šumu a relativně rychle (jednotky hodin), je ve formě dimeru téměř 30 % vzorku, 5 % vzorku nalezneme ve formě trimeru a v malém množství se vyskytují i tetramery. V případě 5'-rGMP jsou tyto poměry díky nižší hodnotě asociační konstanty o něco příznivější. Z toho důvodu jsme se rozhodli pH měření prezentované v minulých podkapitolách provádět při koncentraci 25 mM, což jsme vyhodnotili jako minimální koncentraci, kdy lze ještě naměřit pěkné ROA spektrum a 90 % vzorku je ve formě monomeru. Měření při tak nízkých koncentracích vzorku ale vyžaduje precizní nastavení spektrometru a poměrně dlouhou akumulaci dobu (ideálně 48 hodin), na spektrometrech starší generace by bylo na samém limitu jejich možností, či dokonce již za ním.

Tabulka 10: Relativní zastoupení jednotlivých merů v různých koncentracích roztoku

5'-rAMP							
c (mM)	(A)₁	(A)₂	(A)₃	(A)₄	(A)₅	(A)₆	(A)₇
1	1.00	0	0	0	0	0	0
10	0.96	0.04	0	0	0	0	0
25	0.91	0.09	0.01	0	0	0	0
100	0.72	0.22	0.05	0.01	0	0	0
200	0.58	0.28	0.10	0.03	0.01	0	0
400	0.42	0.30	0.16	0.07	0.03	0.01	0.01
800	0.28	0.26	0.19	0.12	0.07	0.04	0.02
1000	0.24	0.25	0.19	0.13	0.08	0.05	0.03
1400	0.19	0.22	0.18	0.14	0.10	0.06	0.04
2000	0.15	0.18	0.17	0.14	0.11	0.08	0.06

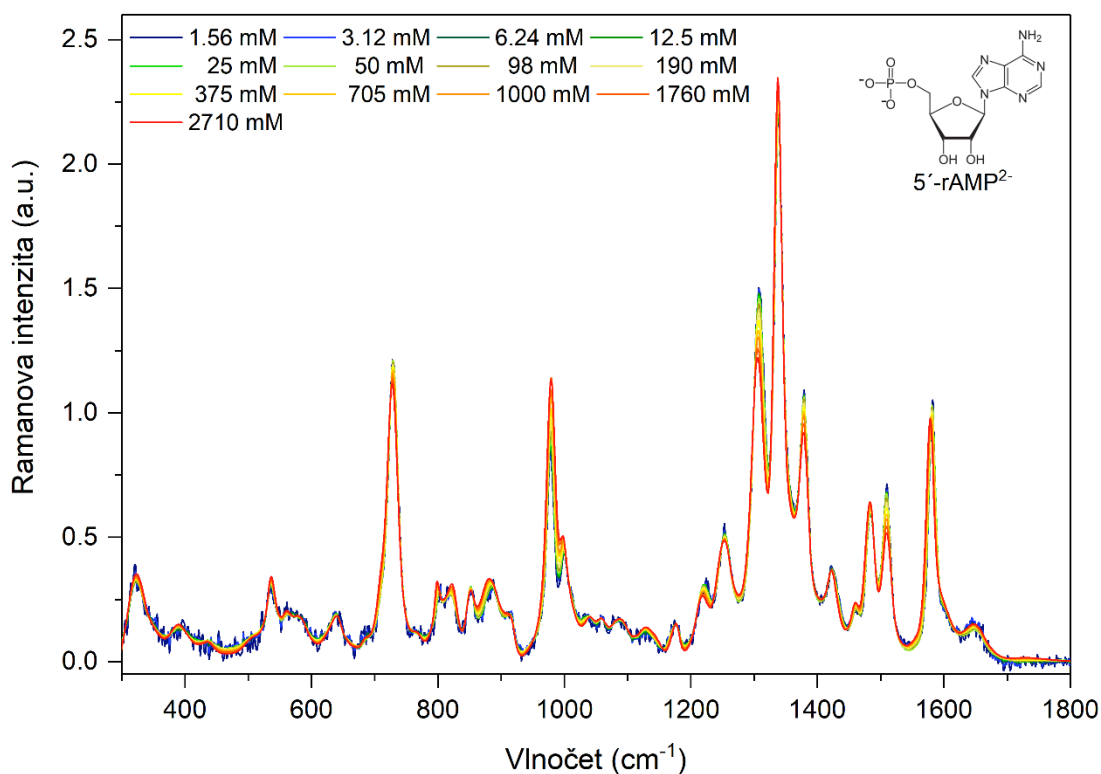
5'-rGMP							
c (mM)	(A)₁	(A)₂	(A)₃	(A)₄	(A)₅	(A)₆	(A)₇
1	1.00	0	0	0	0	0	0
10	0.98	0.02	0	0	0	0	0
25	0.94	0.06	0	0	0	0	0
100	0.80	0.17	0.03	0	0	0	0
200	0.68	0.24	0.06	0.01	0	0	0
400	0.53	0.29	0.12	0.04	0.01	0	0
800	0.38	0.29	0.17	0.09	0.04	0.02	0.01
1000	0.33	0.28	0.18	0.10	0.05	0.03	0.01
1400	0.27	0.26	0.19	0.12	0.07	0.04	0.02
2000	0.21	0.23	0.18	0.13	0.09	0.06	0.04



Obrázek 43: Teoretický model relativního zastoupení jednotlivých merů 5'-rAMP (dole) a 5'-rGMP (nahore) v různých koncentracích roztoku; (A)₁ – monomery (černá), (A)₂ – dimery (červená), (A)₃ – trimery (modrá), (A)₄ – tetramery (zelená), (A)₅ – pentamery (fialová), (A)₆ – hexamery (tmavě žlutá), (A)₇ – heptamery (tyrkysová)

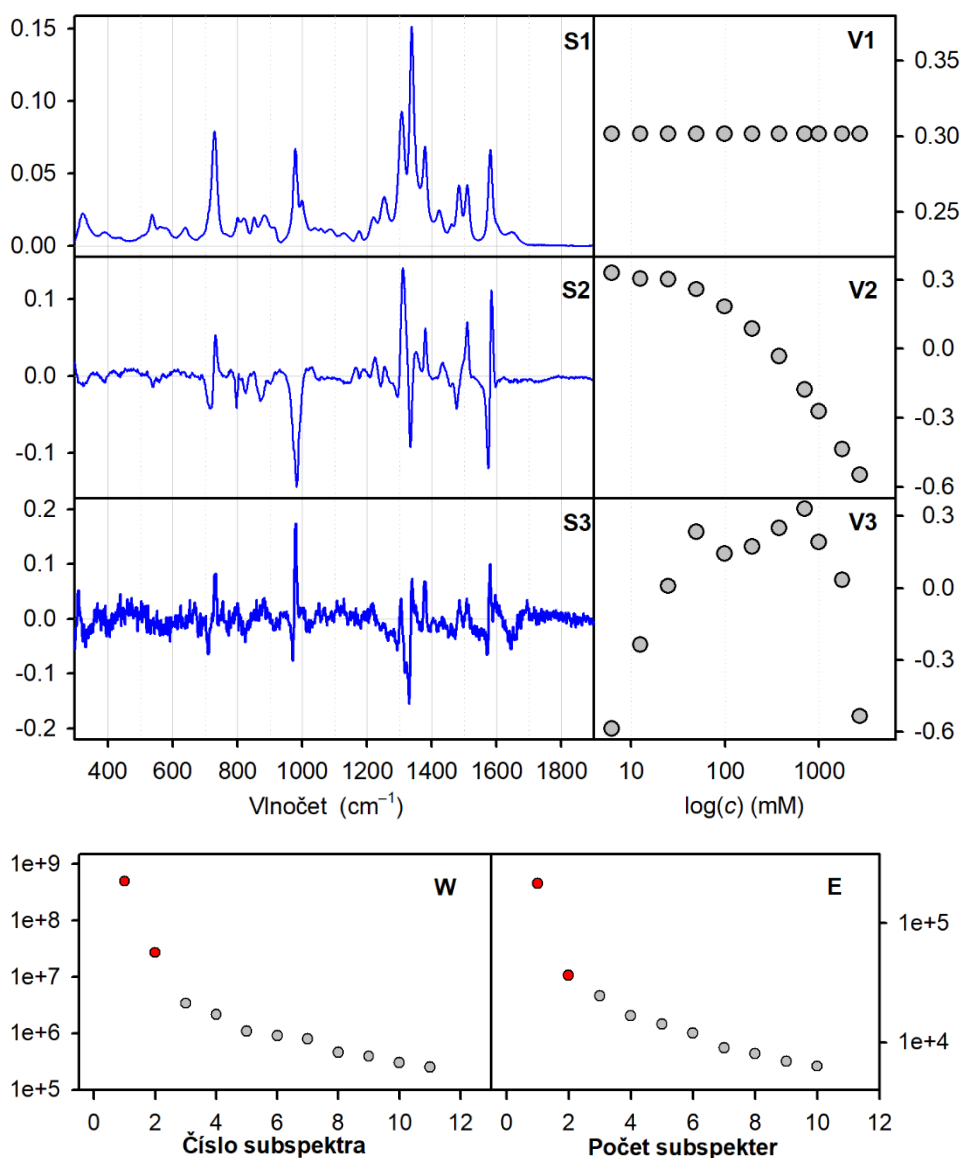
4.5.1 Stohování 5'-rAMP

Ramanova spektra adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP) ve formě disodné soli byla měřena v širokém rozsahu koncentrací $c = 1.56\text{--}2710\text{ mM}$ při teplotě 25 °C , viz **Tabulka 3**. Měření probíhala při hodnotě pH odpovídající plně disociované formě (5'-rAMP²⁻). Ramanova spektra pro jednotlivé koncentrace (13 spekter) můžeme vidět na **Obrázku 44**, ze kterého jsou patrné změny intenzity pásů. Spektra pro dvě nejnižší koncentrace (1.56 a 3.12 mM) mají i přes delší expozici a zvýšený počet akumulací poměrně vysoký šum. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli je z dalšího zpracování vynechat.



Obrázek 44: Ramanova spektra 5'-rAMP²⁻ při různých koncentracích (viz barvy)

Sérii naměřených spekter jsme zpracovali metodou SVD, jejíž výsledky jsou shrnuty na **Obrázku 45**, kde pro lepší přehlednost je vynesena závislost koeficientů V_i (skóre) na logaritmu koncentrace vzorku ($\log(c)$). Z vah jednotlivých subspekter a reziduální chyby je zřejmá faktorová dimenze dvě, což značí, že je zde pouze jeden působící proces – v našem případě stohování (stacking).



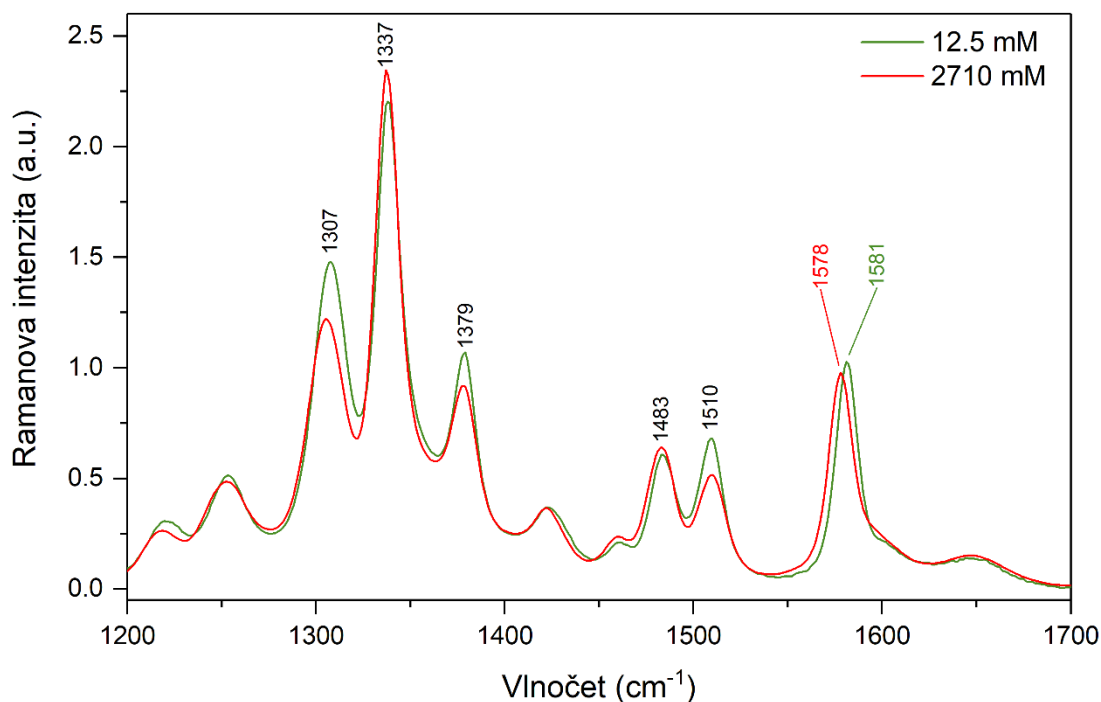
Obrázek 45: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-rAMP²⁻: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)

Už z **Obrázku 44** je zřejmé, že stohování se v Ramanových spekter projevuje jen velmi slabě. Díky SVD (viz **Obrázek 45**) vidíme, že spektrální změna je uniformní a vztažena k logaritmu koncentrace přibližně lineární. Změny ve spektru jsou dvojího typu

- (i) pozorujeme rozšíření a pokles/nárůst intenzity pásu fosfátové vibrace,
- (ii) vidíme malé změny intenzity pásů odpovídající vibracím báze a jejich drobné posuny.

Zatímco bod (i) velmi pravděpodobně nesouvisí se stohováním, ale je přímým důsledkem zahuštění roztoku, bod (ii) můžeme přímo spojit se stohováním. Na **Obrázku 46** ukazujeme překryv dvou Ramanových spekter 5'-rAMP²⁻ (koncentrace $c = 12.5$ mM a $c = 2710$ mM) v oblasti 1200 až 1700 cm^{-1} , kde je efekt stohování nejvýraznější. Jako markery stohování můžeme označit

- (a) změnu relativní intenzity pásů na 1307, 1337 a 1379 cm^{-1} , která se změní z poměru 1:1.5:0.7 na 1:1.9:0.8,
- (b) změnu relativní intenzity pásů na 1483 a 1510 cm^{-1} , která se změní z poměru 1:1.1 na 1:0.8,
- (c) posun pásu z 1581 na 1578 cm^{-1} .

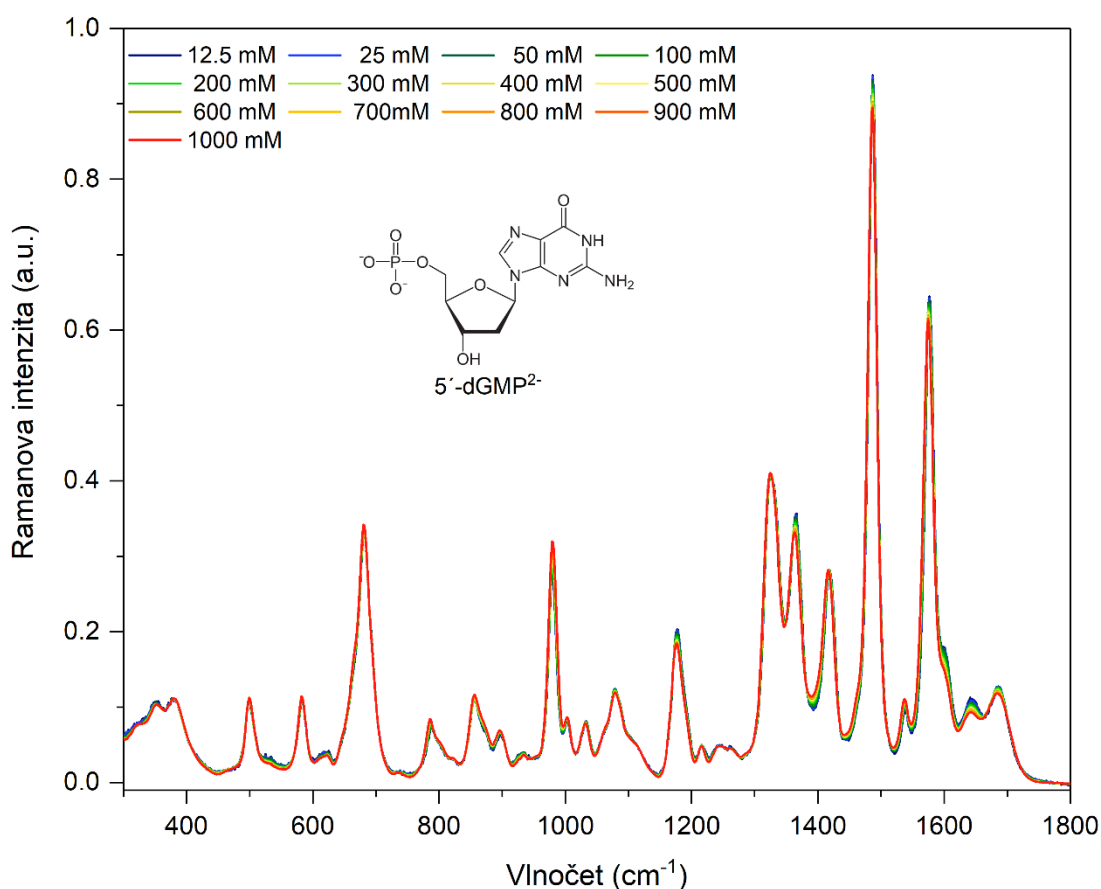


Obrázek 46: Ramanova spektra 5'-rAMP²⁻ pro dvě různé koncentrace; 12.5 mM – zelená, 2710 mM – červená

Efekt stohování 5'-rAMP je tedy v Ramanových spektrech pozorovatelný a z poměrů výše uvedených pásů i kvantifikovatelný, ale celkově vzato poměrně slabý. Jeho úspěšné vyhodnocení vyžaduje kvalitně změřená spektra, přesné odečtení signálu rozpouštědla a precizní sesazení pozadí jednotlivých spekter. Je třeba poznamenat, že naše pozorování 5'-rAMP²⁻ pomocí Ramanovy spektroskopie není novátorské, výše zmíněné spektrální změny byly publikovány již v roce 1988, (Weaver & Williams, 1988). Naše měření jsou díky časovému odstupu a novým technickým možnostem přesnější a vyhodnocení pomocí SVD využívající celé série dat je o něco sofistikovanější, avšak závěry citované publikace jsou platné.

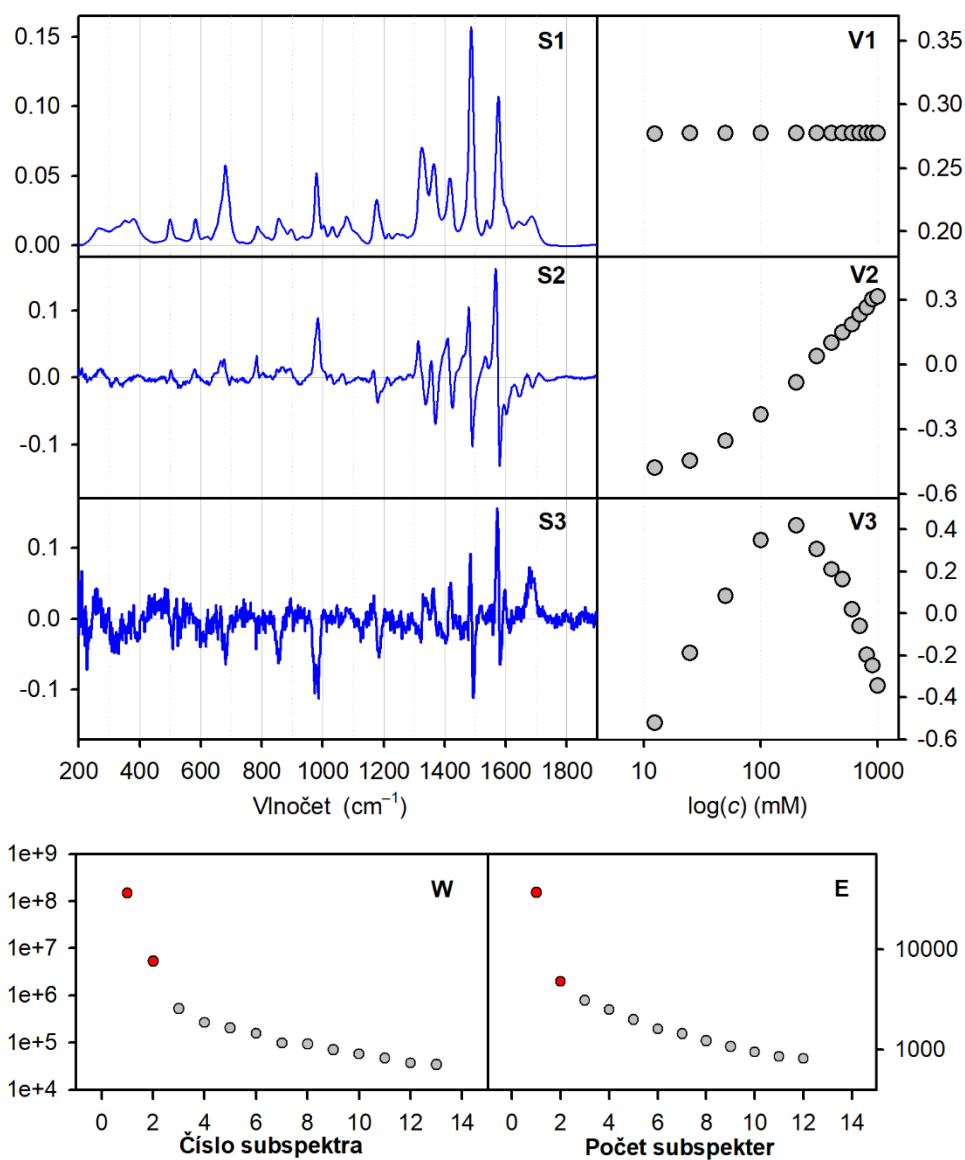
4.5.2 Stohování 5'-dGMP

Stejně jako u 5'-rAMP jsme studovali stohování (koncentrační závislost) 2'-dexoxygenosin-5'-monofosfátu ve formě sodné soli. Měřena byla Ramanova spektra při pH odpovídajícímu celkovému náboji -2 (5'-dGMP²⁻) v rozsahu koncentrací $c = 3.12$ – 1000 mM a teplotě 25 °C, viz **Tabulka 3**. Ramanova spektra pro jednotlivé koncentrace jsou uvedena na **Obrázku 47**. Spektra pro dvě nejnižší koncentrace (3.12 a 6.25 mM) byla příliš zašuměná, a proto nejsou zde prezentována a ani nebyla dále zpracovávána. Jediné, co lze na první pohled pozorovat, je drobná změna intenzity několika pásů zejména v oblasti nad 1200 cm⁻¹.



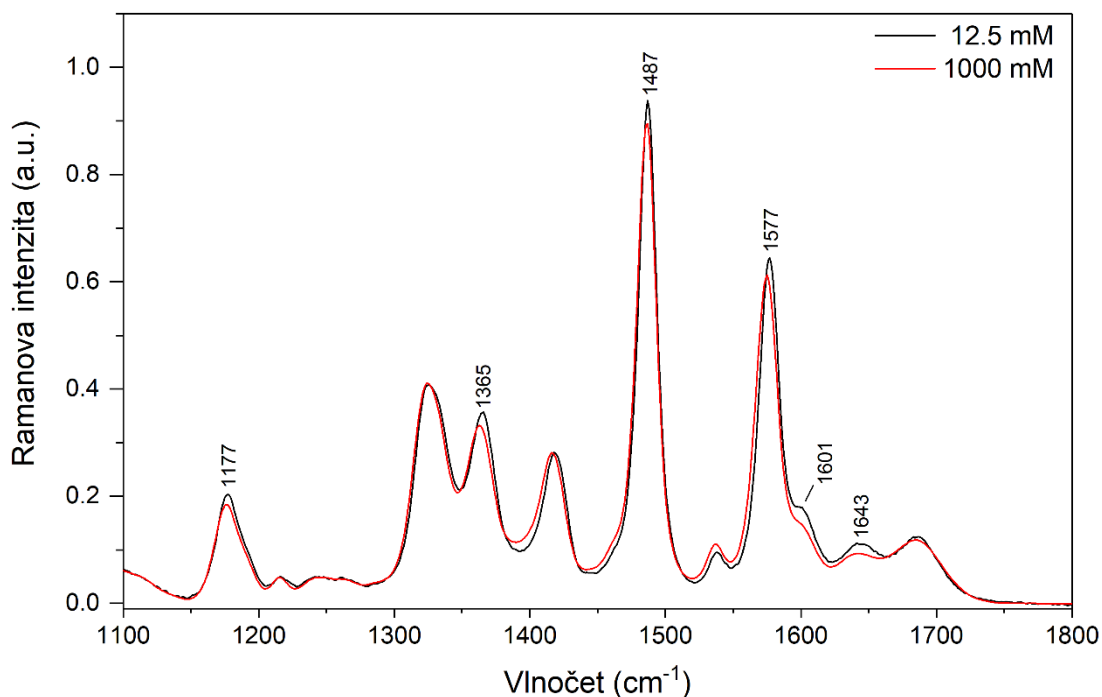
Obrázek 47: Ramanova spektra 5'-dGMP²⁻ při různých koncentracích (viz barvy)

Spektrální sérii jsme zpracovali stejným způsobem jako u 5'-rAMP. Výsledky SVD můžeme vidět na **Obrázku 48**. Taktéž je průběh koeficientů V_i zobrazen pro lepší přehlednost v závislosti na logaritmu koncentrace ($\log(c)$). Z těchto výsledků (reziduální chyby a vah jednotlivých subspekter) jsme identifikovali faktorovou dimenzi dvě (stejně jako u 5'-rAMP). To nám ukazuje pouze na proces stohování (stacking).



Obrázek 48: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-dGMP²⁻: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)

Z **Obrázku 47** a **Obrázku 48** vidíme velkou podobnost s chováním 5'-rAMP, které bylo rozebíráno v předešlé podkapitole 4.5.1. Spektrální změna vlivem stohování je jednotná a téměř lineární, pokud ji vztáhneme k logaritmu koncentrace a projevuje se jen velmi málo. Pozorovat lze změny intenzit pásů odpovídající vibracím báze (1100 až 1800 cm^{-1} a dýchací vibrace na 681 cm^{-1}). Taktéž roste intenzita pásů fosfátu, která ale je spíše spjata se zahuštěním vzorku než se stohováním. Pro lepší znázornění změn jsou Ramanova spektra pro nejméně a nejvíce koncentrovaný vzorek (12.5 a 1000 mM) vykreslena v překryvu na **Obrázku 49** v oblasti 1100 až 1800 cm^{-1} , kde lze detekovat největší změny. Je patrné, že i přes velkou změnu koncentrace zůstává charakter spektra prakticky identický a pozorované změny jsou pouze kosmetického charakteru. Lze identifikovat drobnou změnu relativní intenzity pásů na 1365, 1487 a 1577 cm^{-1} (z poměru 1:2.6:1.8 na poměr 1:2.7:1.8) a mírný pokles intenzity pásů na 1177, 1601 (rameno) a 1643 cm^{-1} . Nic z toho se ale nedá považovat za významný marker stohování 5'-dGMP.

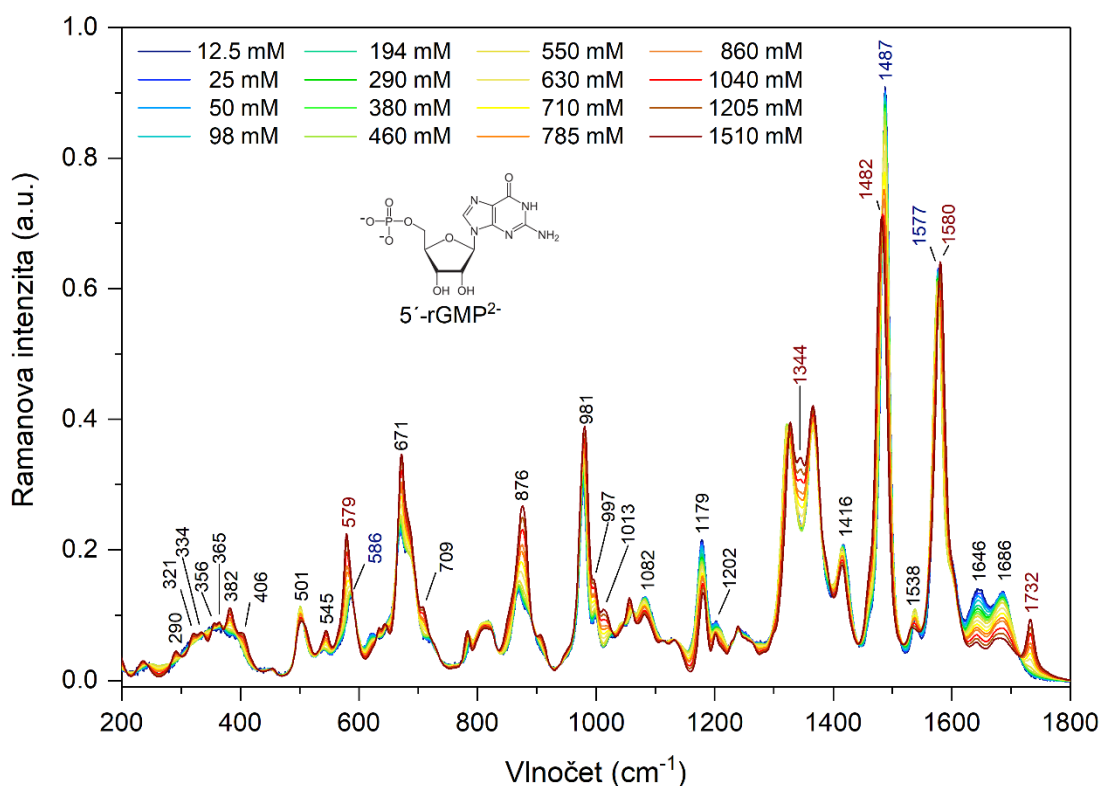


Obrázek 49: Ramanova spektra 5'-dGMP²⁻ pro dvě různé koncentrace; 12.5 mM – černá, 1000 mM – červená

4.5.3 Stohování 5'-rGMP

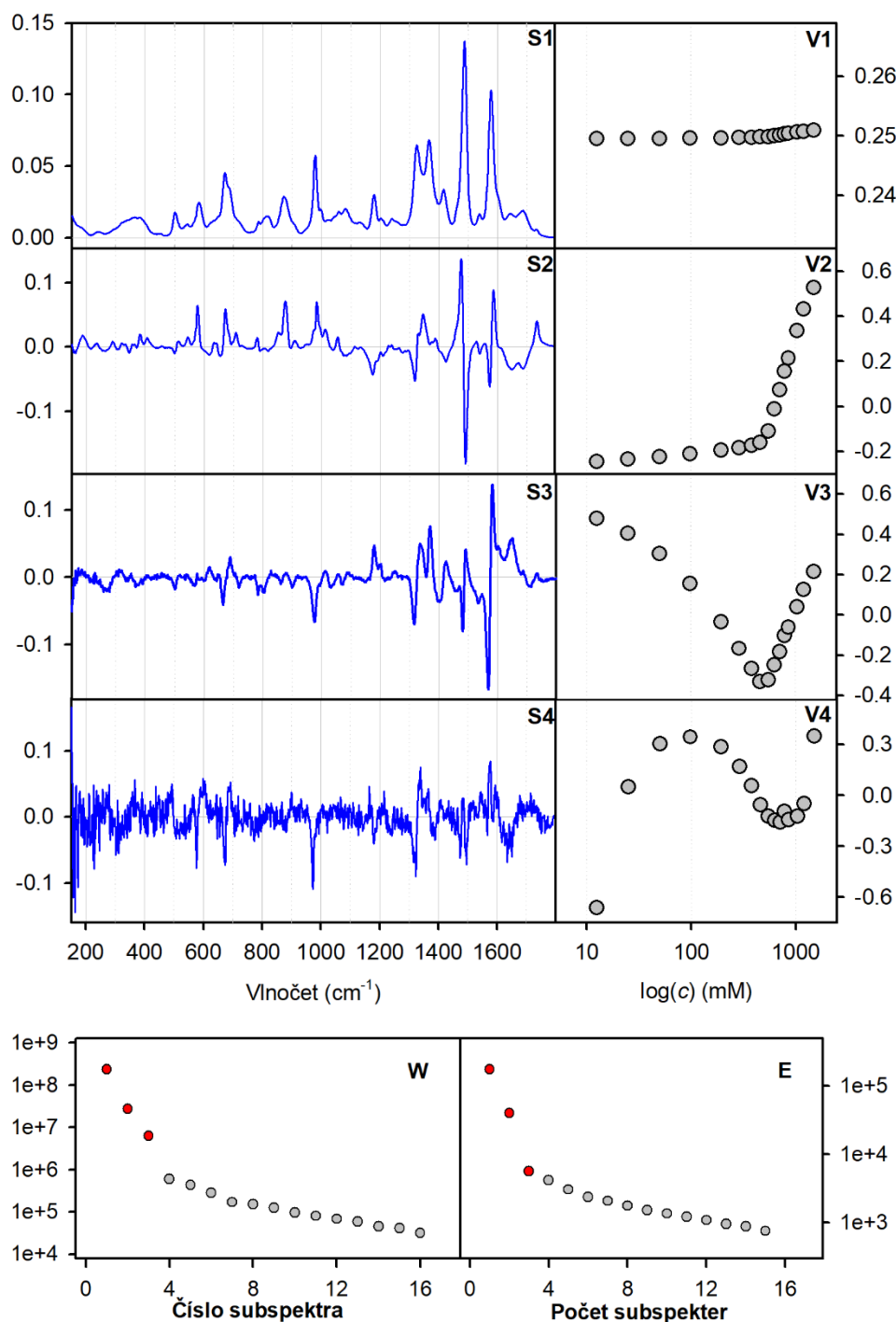
Guanosin-5'-monofosfát (5'-rGMP), který může vytvářet tzv. G-tetrády, jsme měřili v rozsahu koncentrací $c = 3.12$ až 1510 mM při 25 °C, viz **Tabulka 3**. Kvůli zvýšenému šumu jsme ze zpracování vyřadili spektra odpovídající dvěma nejméně koncentrovaným vzorkům (3.12 mM a 6.24 mM). Ramanova spektra byla měřena pro 5'-rGMP ve formě dihydrátu sodné soli a při pH odpovídajícímu dvakrát záporně nabitě formě (5'-rGMP²⁻). Spektra pro jednotlivé koncentrace (16 spekter) jsou uvedena na **Obrázku 50**. Z něj vidíme, že spektrální změny vyvolané změnou koncentrace jsou mnohem markantnější než u 5'-rAMP – ty nejvíce zřetelné jsme označili. Změny ve spektru můžeme rozdělit podle jejich projevu

- (i) malý posun pásů – z 1487 na 1482 cm^{-1} a z 586 na 579 cm^{-1} ,
- (ii) pokles intenzity pásů – 1686 , 1646 , 1482 , 1416 , 1179 , 1082 a 501 cm^{-1} ,
- (iii) nárůst intenzity pásů – 1538 , 1013 , 997 , 981 , 876 , 671 a 545 cm^{-1} ,
- (iv) objevení nových pásů – 1732 (marker pro G-tetrády) a 1344 cm^{-1} ,
- (v) rozlišení struktury pásů v oblasti pod 400 cm^{-1} .



Obrázek 50: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ při různých koncentracích (viz barvy)

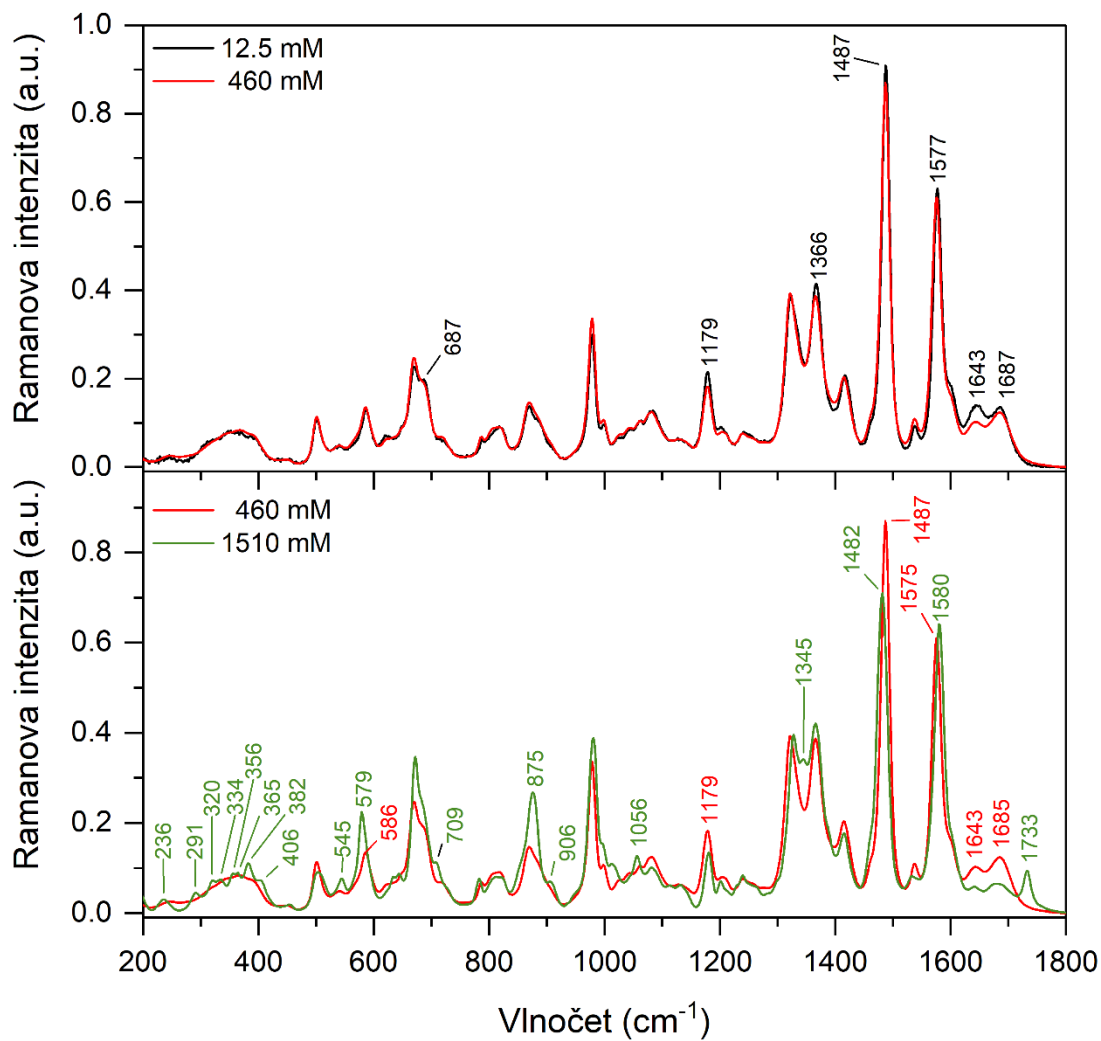
Více informací lze získat z vyhodnocení této spektrální série pomocí SVD, jejíž výsledky můžeme vidět na následujícím **Obrázku 51**.



Obrázek 51: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-rGMP²⁻: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)

Pro přehlednost jsou průběhy koeficientů V_i zobrazeny v logaritmické škále koncentrace vzorku ($\log(c)$). Z průběhu reziduální chyby a vah subspekter je patrná faktorová dimenze tři. Ta nám v našem případě ukazuje na dva procesy – stohování (stacking) bází a tvorba guaninových tetrad pomocí Hoogsteenovského párování bází. Tedy spektrální změny již nejsou uniformní (jako tomu bylo u 5'-rAMP a 5'-dGMP) a z **Obrázku 51** vidíme, že ke zlomu dochází při koncentraci cca 450 mM (při teplotě 25 °C). Pro lepší přehlednost zobrazujeme Ramanova spektra po dvojicích pro tři různé koncentrace (12.5, 460 a 1510 mM) na **Obrázku 52**. Rozdíly mezi spektry pro nejnižší koncentraci (12.5 mM) a střední koncentraci (460 mM) jsou jen velmi malé a souvisí čistě se stohováním bází, podobně jako u 5'-rAMP. Pozorujeme převážně poklesy intenzit pásů. Výjimkou je nárůst intenzity pásu odpovídající vibraci fosfátu (979 cm^{-1}). Naopak tvorba guaninových tetrad se projevuje ve spektrech mnohem výrazněji (spodní část **Obrázku 52**). Velmi zajímavá je oblast pod 410 cm^{-1} , kde u nejméně koncentrovaného vzorku jsme schopni identifikovat až sedm dobře rozlišitelných pásů (viz **Obrázek 52**), kdežto v případě středně koncentrovaného vzorku můžeme vidět jeden široký pás s náznakem struktury (pomocí druhé derivace lze rozlišit tři složky). Dále se objevují nové pásy na 709 (rameno), 1056, 1345 a 1733 cm^{-1} , kde poslední z nich je v literatuře označován jako marker pro guaninové tetradu dle (Mudroňová et al., 2016). Nárůst intenzity je pak spojen s pásy na 545, 579, 671 a 875 cm^{-1} . Drobný posuv pásů o 5 cm^{-1} můžeme pozorovat u pásů na 1482 a 1580 cm^{-1} , které jsou současně také spojeny se změnou intenzity. Výraznější pokles intenzity je pak detekován pro pásy na pozici 1643 a 1685 cm^{-1} .

Proces stohování bází je podobně jako 5'-dGMP velmi slabý. Naopak vytváření G-tetrad se projevuje výraznými spektrálními změnami a je tedy velmi snadno identifikovatelné a rozpoznatelné. Výsledky našich experimentů a jejich zpracování jsou v dobrém souhlasu s již dříve publikovanými pozorováními, (Mudroňová et al., 2016). Na rozdíl od nich však pozorujeme i velmi zajímavé chování v oblasti nízkých vlnočtů (většina předchozích měření se omezovala na interval 600 až 1800 cm^{-1}).



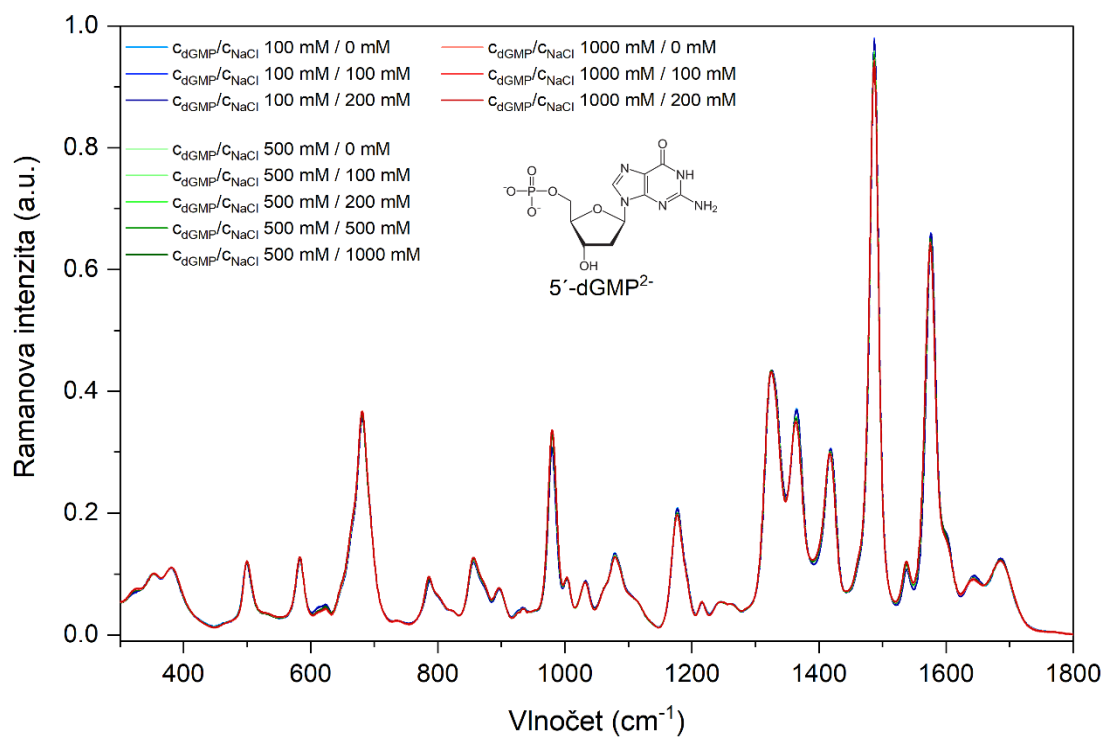
Obrázek 52: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ pro tři různé koncentrace seskupená po dvojicích; 12.5 mM – černá, 460 mM – červená a 1510 mM – zelená

4.5.4 Vliv zvýšené koncentrace Na^+ iontů na stohování $5'$ -rGMP a $5'$ -dGMP

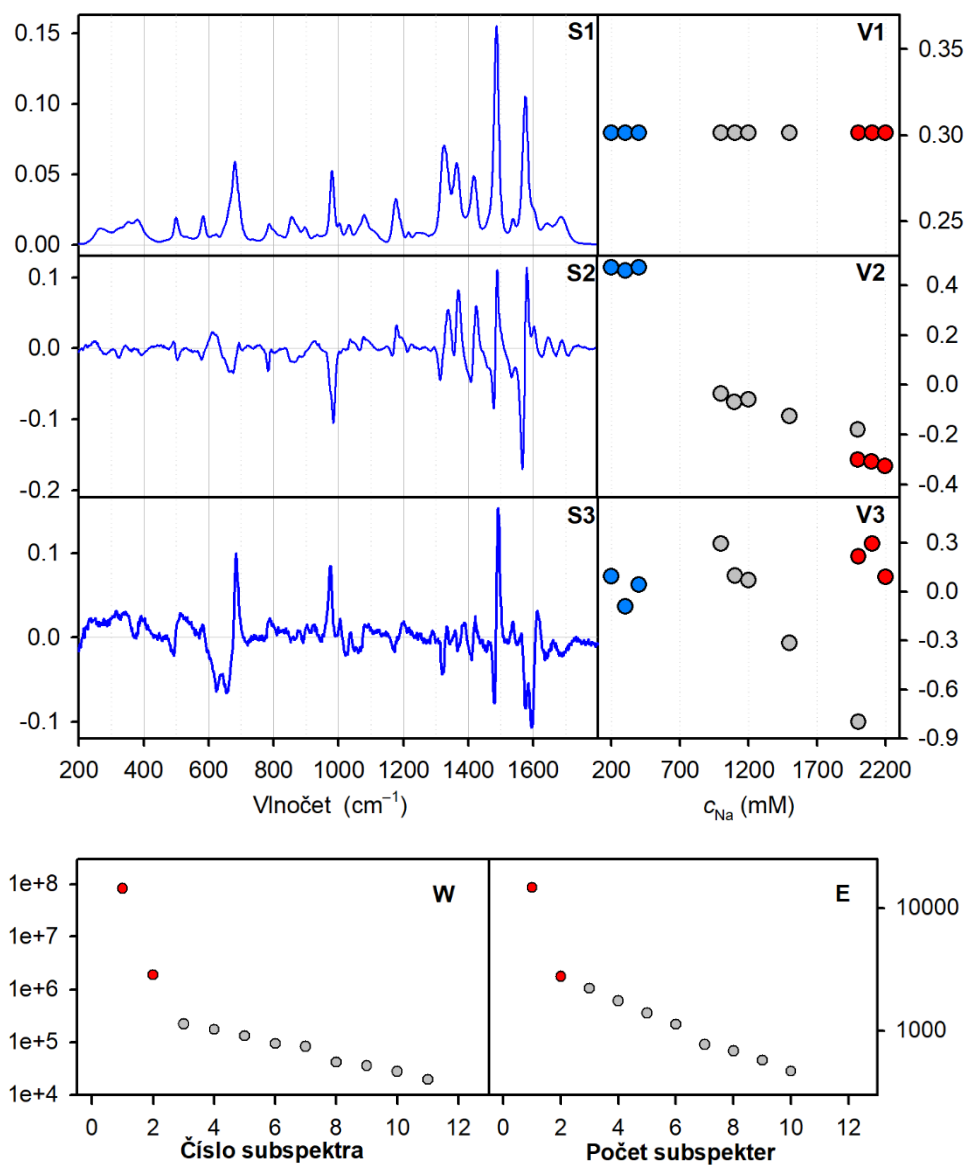
V předchozích dvou podkapitolách 4.5.2 a 4.5.3 jsme studovali stohování (stacking) $5'$ -rGMP a $5'$ -dGMP. V případě $5'$ -rGMP jsme pozorovali i tvorbu guaninových tetrad a stanovili jsme koncentraci, při které začne docházet k jejich vytváření. Jelikož byly použity vzorky ve formě hydrátu disodné soli ($5'$ -rGMP), resp. disodné soli ($5'$ -dGMP), tak při dané koncentraci těchto nukleotidů máme současně v roztoku dvojnásobnou molární koncentraci sodíkových iontů (např. $c_{\text{GMP}} = 100 \text{ mM} \rightarrow c_{\text{Na}^+} = 200 \text{ mM}$). Z tohoto důvodu jsme se rozhodli věnovat studiu vlivu zvýšení koncentrace Na^+ (zvýšení iontové síly roztoku) na samoskladbu $5'$ -rGMP a $5'$ -dGMP. Na^+ ionty byly přidávány titrací 2.0 M chloridu sodného (NaCl). Opět jako vzorky byly použity $5'$ -rGMP ve formě hydrátu disodné soli a $5'$ -dGMP ve formě disodné soli a pH vzorků odpovídalo dvakrát záporně nabitě formě. Jednotlivé koncentrace vzorků a příslušné nadbytky Na^+ iontů jsou uvedeny v **Tabulce 4**. Horní limit nadbytku Na^+ iontů byl omezen rozpustností vzorků.

Ramanova spektra $5'$ -dGMP²⁻ pro tři koncentrace tohoto nukleotidu ($c = 100, 500$ a 1000 mM) s různými nadbytky Na^+ iontů můžeme vidět na **Obrázku 53**. Spektra byla normována na stejnou integrální intenzitu. Pozorujeme jen velmi nepatrné změny intenzit pásů. Porovnáme-li je s čistě koncentračním měřením (**Obrázek 47**), tak pozorované spektrální změny jsou identické.

Podobnost s koncentračním měřením $5'$ -dGMP můžeme vidět i ve výsledcích faktorové analýzy (konkrétně SVD), které jsou shrnuty na následujícím **Obrázku 54**. Tentokrát je průběh koeficientů V_i (skóre) zobrazen v závislosti na celkové koncentraci sodíkových iontů (c_{Na}), kde pozorujeme tři oblasti odpovídající koncentraci vzorku – 100 mM (modrá), 500 mM (šedá) a 1000 mM (červená). Z průběhu koeficientů druhého subspektra (V_2) lze usuzovat, že přidávání NaCl má vliv na stabilizaci stohování (přiblížení šedého bodu k červenému). Tento vliv však způsobuje pouze „kosmetické“ změny ve spektrech a v rámci Ramanovy spektroskopie jej lze jen těžko vyhodnocovat.

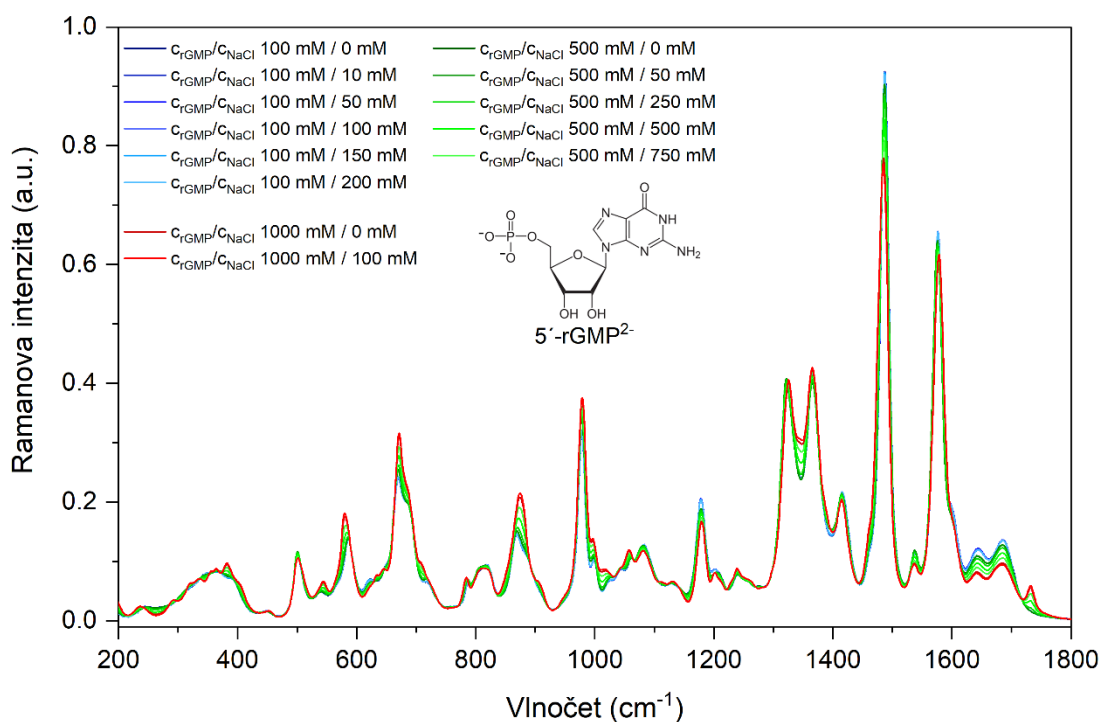


Obrázek 53: Ramanova spektra 5'-dGMP²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky Na⁺ iontů; $c = 100$ mM (odstíny modré), $c = 500$ mM (odstíny zelené), $c = 1000$ mM (odstíny červené)

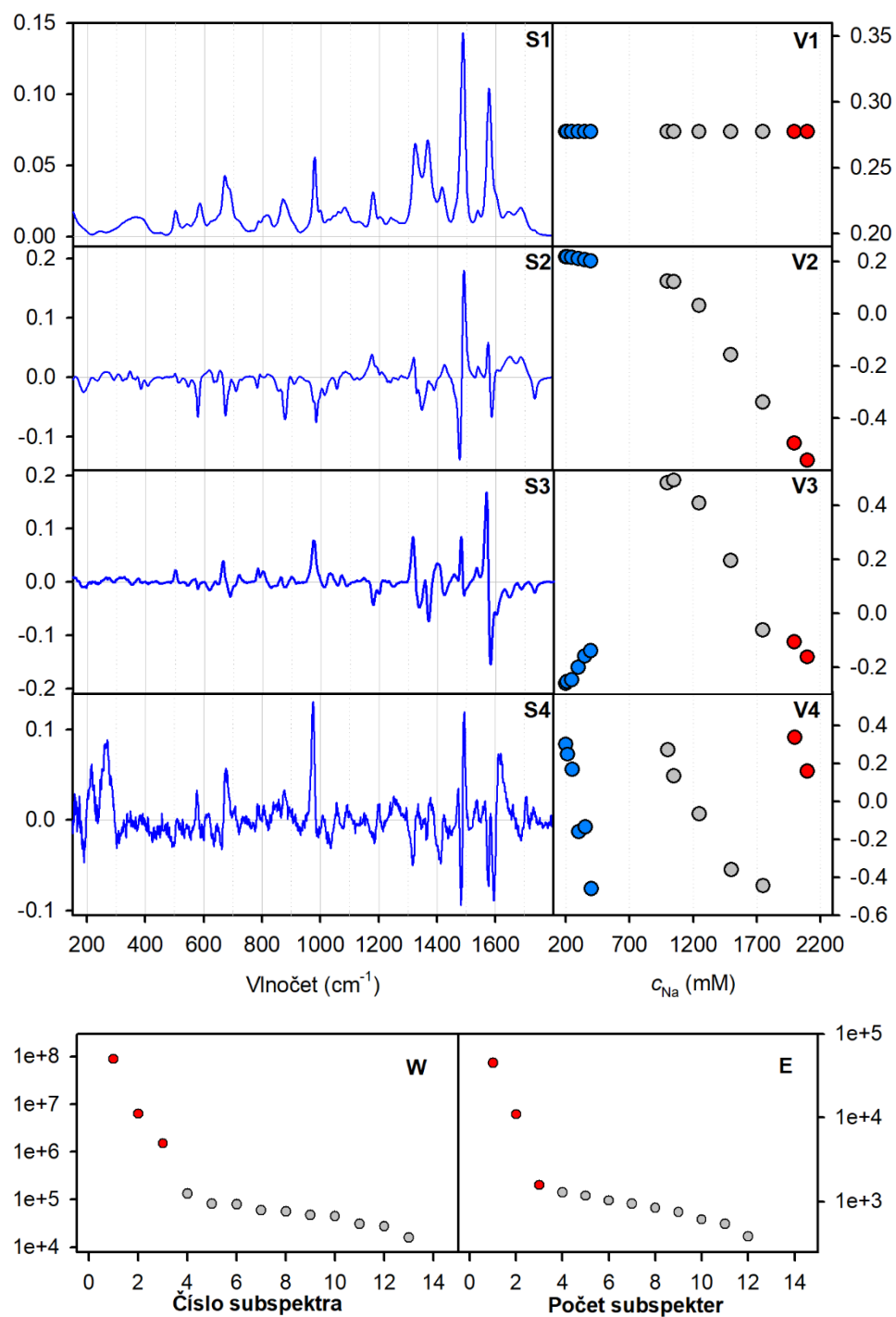


Obrázek 54: Výsledky faktorové analýzy vlivu Na^+ iontů na $5'$ -dGMP $^{2-}$: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na^+ iontů (vpravo dole)

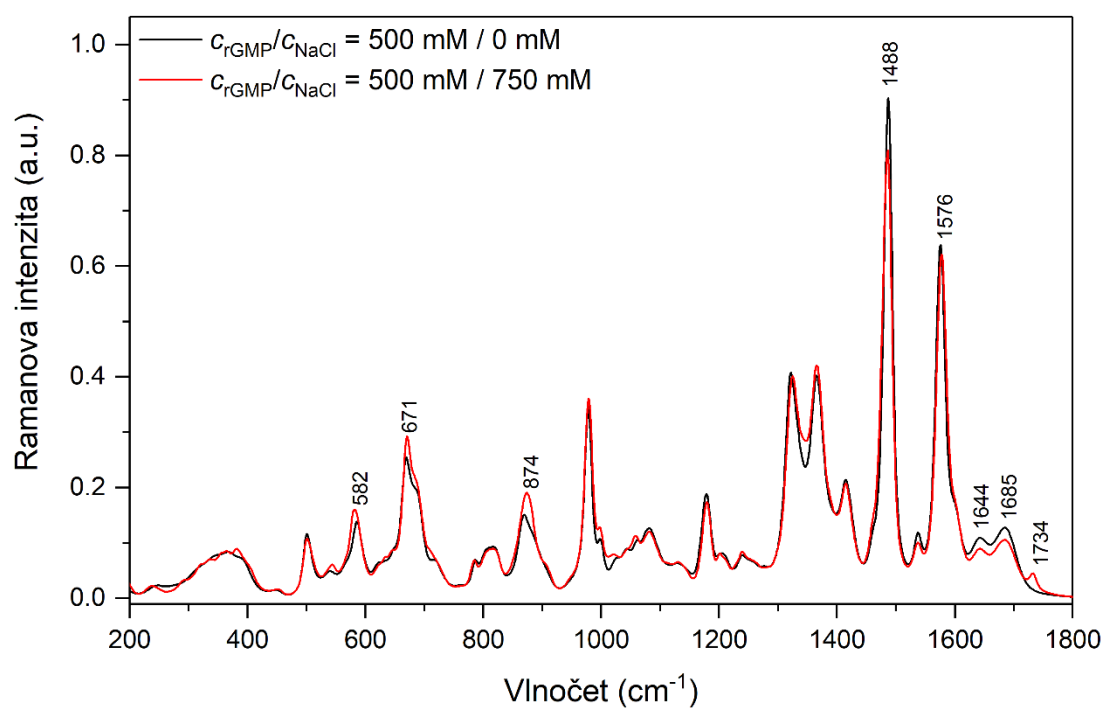
Měření za stejných podmínek jsme provedli i pro 5'-rGMP, jen s větším počtem přidávaných Na^+ iontů ke třem koncentracím vzorku ($c = 100, 500$ a 1000 mM), viz **Tabulka 4**. Sérii naměřených Ramanových spekter můžeme vidět na **Obrázku 55**, spektra jsou opět normována na stejnou integrální intenzitu. Z tohoto obrázku jsou jasně patrné změny intenzity popsané v podkapitole 4.5.3. Lze tedy vyvozovat, že přidávání Na^+ iontů navíc ke vzorkům vede ke vzniku a stabilizaci aglomerátů, které pak díky tomu ochotně vznikají již při nižších koncentracích vzorku. K tomuto závěru přispívají i výsledky SVD, které jsou uvedeny na dalším **Obrázku 56**. Faktorová dimenze je tři, stejně jako u čistě koncentračního měření 5'-rGMP (podkapitola 4.5.3). Průběhy koeficientů V_i jsou vyneseny v závislosti na celkové koncentraci Na^+ iontů ve vzorku (c_{Na}). Pozorujeme, že přidávání Na^+ iontů navíc ke vzorku vede ke stabilizaci a tvorbě G-tetrád a jejich asociátů – téměř lineární závislost koeficientů V_2 a V_3 , což lze demonstrovat na **Obrázku 57**, kde jsou v překryvu porovnána spektra pro stejnou koncentraci 5'-rGMP ($c_{\text{rGMP}} = 500$ mM) bez přidaného Na^+ ($c_{\text{NaCl}} = 0$ mM) a s nadbytkem Na^+ ($c_{\text{NaCl}} = 750$ mM). Při přítomnosti nadbytku Na^+ iontů pozorujeme podobné změny jako u čistě koncentračního měření (podkapitola 4.5.3, **Obrázek 50**), proto je zde nerozebíráme a nejvýraznější změny jsme označili příslušnou hodnotou vlnočtu.



Obrázek 55: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky Na^+ iontů; $c = 100$ mM (odstíny modré), $c = 500$ mM (odstíny zelené), $c = 1000$ mM (odstíny červené)



Obrázek 56: Výsledky faktorové analýzy vlivu Na⁺ iontů na 5'-rGMP²⁻: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na⁺ iontů (vpravo dole)



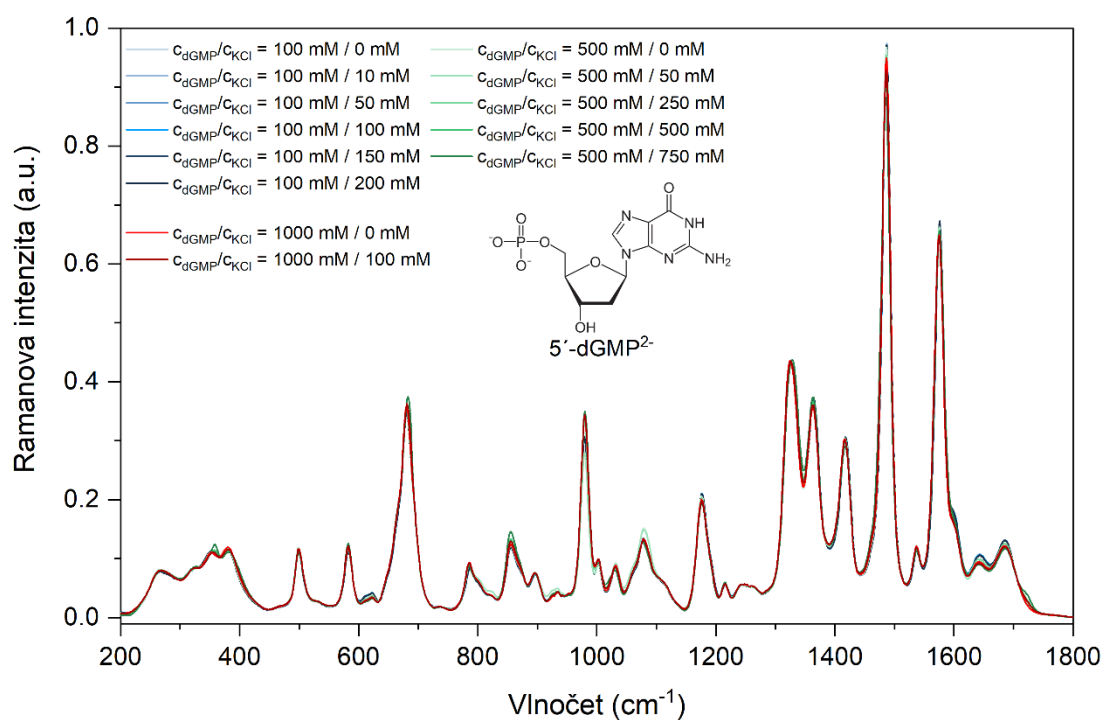
Obrázek 57: Srovnání Ramanových spekter bez přítomnosti Na^+ (0 mM, černá) s nadbytkem Na^+ iontů (750 mM, červená) pro 500 mM koncentraci $5'$ -rGMP²⁻

4.5.5 Vliv zvýšené koncentrace K^+ iontů na stohování $5'$ -rGMP a $5'$ -dGMP

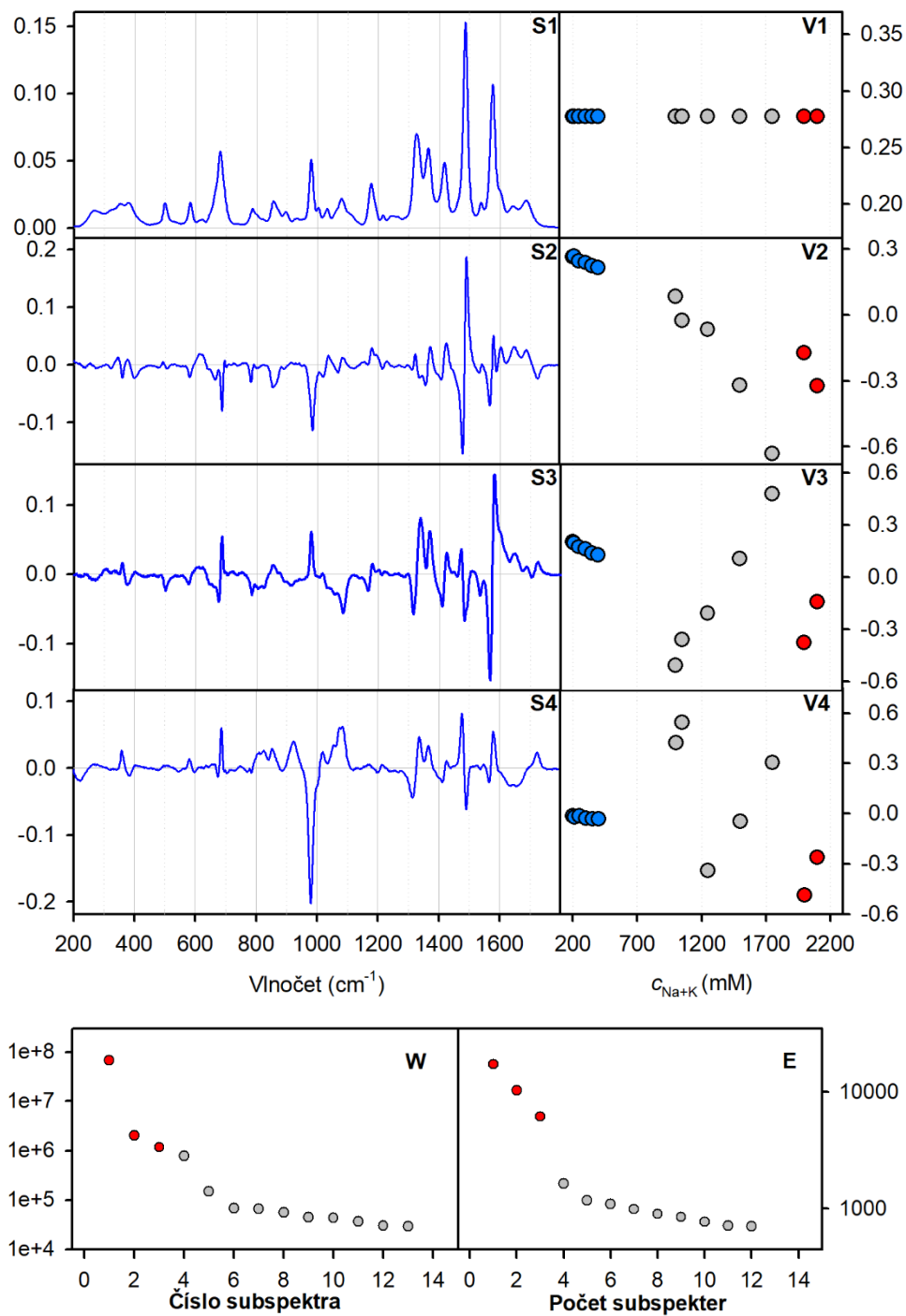
Důležitou roli pro stabilizaci a tvorbu samotné struktury G-tetrád mají různé kationty, (Hightower et al., 2009). Kromě studia vlivu zvýšené koncentrace Na^+ iontů na tvorbu G-tetrád jsme se zaměřili na další alkalický kov draslík (K), který má větší atomový poloměr. V přítomnosti draslíku u $5'$ -rGMP dojde po vytvoření G-tetrád k jinému způsobu jejich asociace – namísto „head to tail“ uspořádání pak pozorujeme střídavé uspořádání „head to head“ a „tail to tail“. Navíc v přítomnosti draslíku dochází k vytváření asociátů G-tetrád i u $5'$ -dGMP, (Hightower et al., 2009; Mudroňová et al., 2016).

Použili jsme vzorky $5'$ -rGMP ve formě hydrátu disodné soli a $5'$ -dGMP ve formě disodné soli, ke kterým jsme přidávali K^+ ionty pomocí titrování 2.0 M chloridu draselného (KCl). Koncentrace vzorků a nadbytku K^+ iontů jsou uvedeny v **Tabulce 4**. Horní hranici nadbytku K^+ iontů jsme stanovili jako dvojnásobnou pro danou koncentraci. Toho se nám nepodařilo dosáhnout vždy z důvodu nerozpuštění vzorku (při vysoké koncentraci bylo nutné je rozpouštět přímo v roztoku KCl). Měření probíhala při teplotě 25 °C a pH odpovídajícím dvakrát záporně nabitým formám – $5'$ -rGMP²⁻ a $5'$ -dGMP²⁻.

Série Ramanových spekter $5'$ -dGMP²⁻ pro různé nadbytky K^+ iontů je vyobrazena na **Obrázku 58**. Na první pohled můžeme vidět, že spektrální změny způsobené zvýšením iontové síly roztoku (pomocí zvyšování koncentrace K^+ iontů) jsou mnohem výraznější, než jsme mohli pozorovat u čistě koncentračního měření (podkapitola 4.5.2, **Obrázek 47**) a u vlivu přidávání Na^+ iontů (podkapitola 4.5.4, **Obrázek 53**). Pro lepší popis změn intenzit je nutné tuto sérii vyhodnotit pomocí SVD. Výsledky jsou shrnuty na **Obrázku 59**, kde jsou průběhy koeficientů V_i vyneseny v závislosti na celkové koncentraci Na^+ a K^+ iontů (c_{Na+K}). Koncentrace sodných iontů je vždy dvojnásobná oproti koncentraci vzorku. Z vah subspekter a reziduální chyby jsme určili faktorovou dimenzi tři, která nám poukazuje na dva procesy – stohování bází $5'$ -dGMP²⁻ a vytváření G-tetrád, které jsme doposud u $5'$ -dGMP²⁻ nepozorovali.

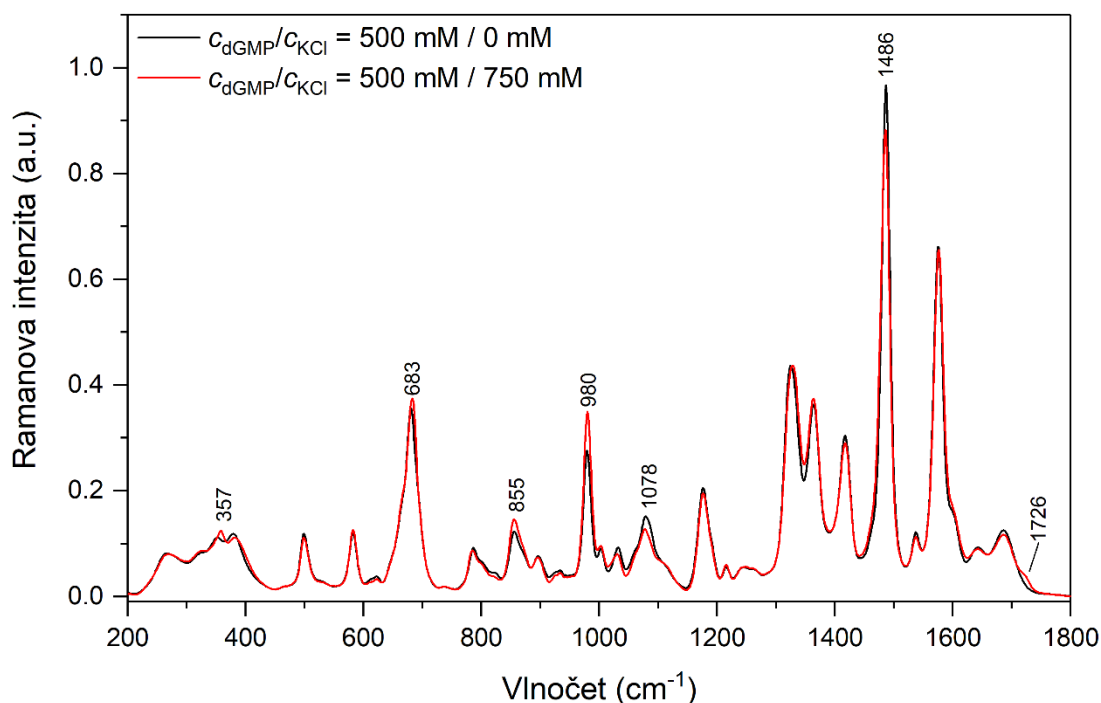


Obrázek 58: Ramanova spektra 5'-dGMP²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky K⁺ iontů; $c = 100 \text{ mM}$ (odstíny modré), $c = 500 \text{ mM}$ (odstíny zelené), $c = 1000 \text{ mM}$ (odstíny červené)



Obrázek 59: Výsledky faktorové analýzy vlivu K⁺ iontů na 5'-dGMP²⁻: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na⁺ a K⁺ iontů (vpravo dole)

Pro přehlednější znázornění změn jsou Ramanova spektra bez přítomnosti K^+ iontů ($c_{KCl} = 0 \text{ mM}$) a s nadbytkem K^+ iontů ($c_{KCl} = 750 \text{ mM}$) pro 500 mM koncentraci vzorku ($5'-dGMP^{2-}$) vykreslena v překryvu na **Obrázku 60**, kde se objevuje rameno na 1726 cm^{-1} . Dále pozorujeme změny intenzity několika pásů, kde ty nejvýraznější jsme v **Obrázku 60** označili. Je patrné, že rozhodující pro tvorbu G-tetrád a jejich asociátů je celková koncentrace vzorku a draselných iontů – u 100 mM $5'-dGMP$ nepozorujeme žádné změny bez ohledu na množství přidávaných draselných iontů, zatímco u 500 mM $5'-dGMP$ začne přidávek draselných iontů způsobovat podobnou (ale nikoli stejnou) spektrální změnu, jakou jsme pozorovali u $5'-rGMP$.



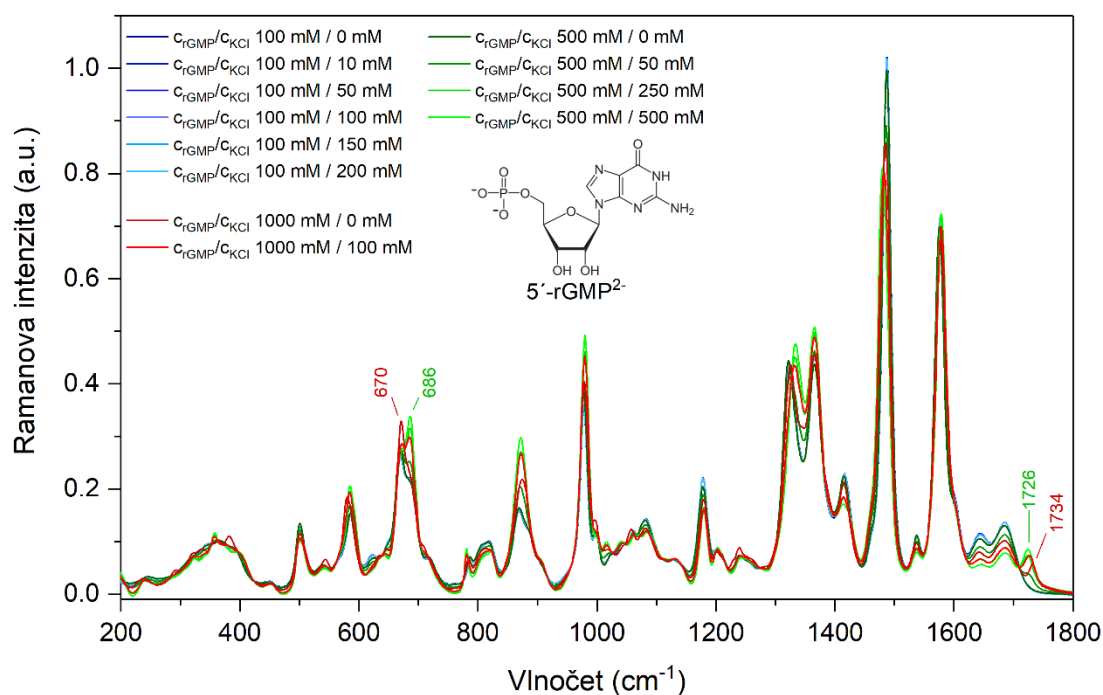
Obrázek 60: Srovnání Ramanových spekter bez přítomnosti K^+ iontů (černá) s nadbytkem K^+ iontů (750 mM , červená) pro 500 mM koncentraci $5'-dGMP^{2-}$

Stejný postup i měření jsme provedli i pro $5'-rGMP^{2-}$, jehož sérii Ramanových spekter můžeme vidět na **Obrázku 61**, kde identifikujeme podobné spektrální změny jako u čistě koncentračního měření i měření vlivu nadbytku Na^+ iontů (tj. poměrně výrazné změny intenzit pásů). Nicméně jednou výraznější odlišností je pás na 670 cm^{-1} a jeho rameno (686 cm^{-1}), které si v přítomnosti draselných iontů prohodí vzájemnou relativní intenzitu (rameno – 670 cm^{-1} , pás – 686 cm^{-1}). Pro další interpretaci je nutná faktorová analýza, jejíž výsledky jsou uvedeny na **Obrázku 62**.

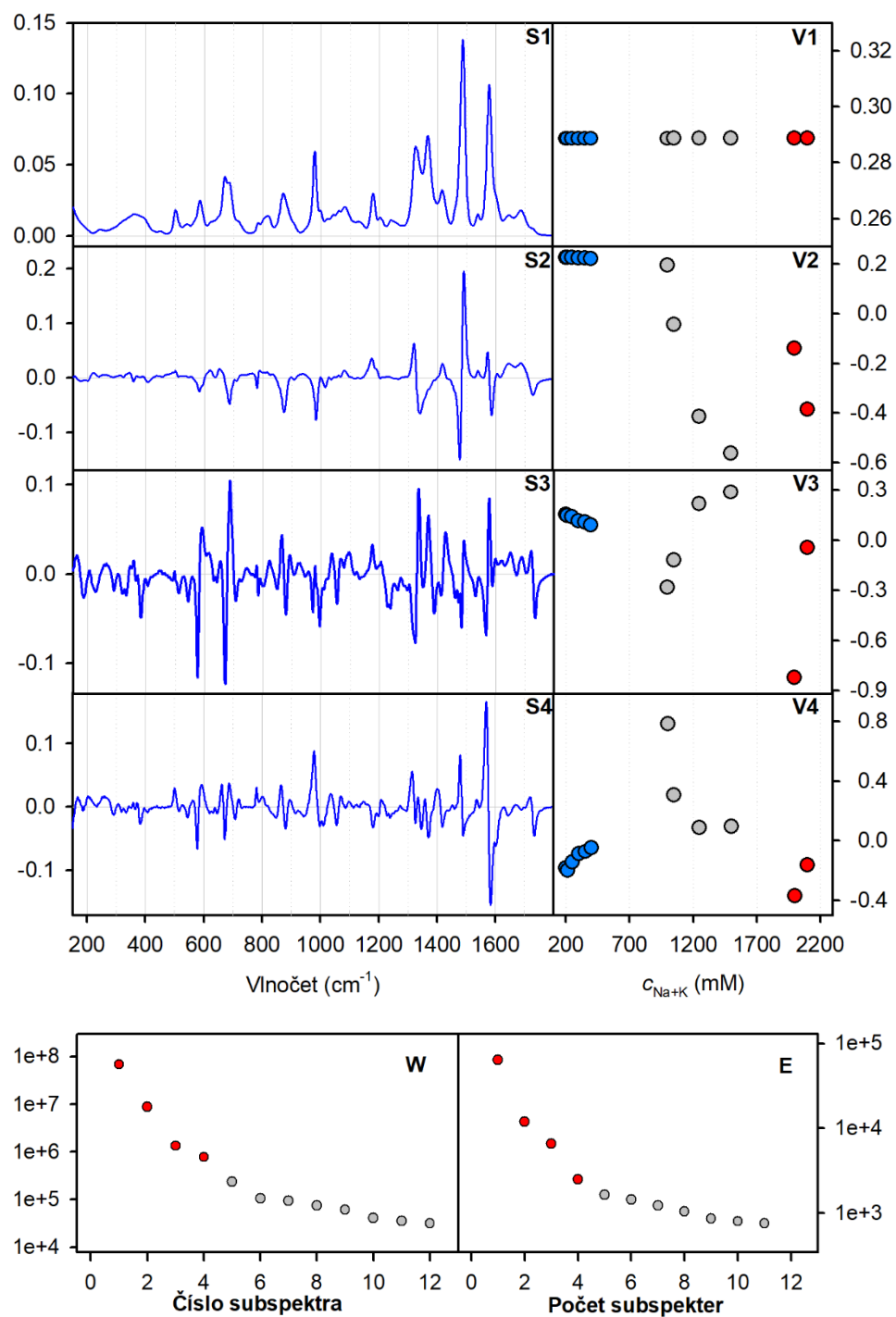
Koeficienty jednotlivých spekter V_i jsou vyneseny v závislosti na celkové koncentraci sodných a draselných iontů dohromady ($c_{\text{Na}+\text{K}}$). Reziduální chyba a váhy jednotlivých subspekter nám naznačují, že faktorová dimenze je čtyři. To odhaluje poměrně komplikované chování vzorku při vyšších koncentracích sodíkových a přidavku draselných iontů. Hlavní spektrální komponenta (první subspektrum) značí průměrné spektrum v sérii. Druhé až čtvrté subspektrum pak v sobě nesou informaci o

- (a) stohování,
- (b) asociaci G-tetrád „sodíkového“ typu,
- (c) asociaci G-tetrád „draslíkového“ typu.

Po přidání draselných kationtů jsou některé sodíkové ionty stabilizující strukturu asociátů G-tetrád vyměněny za draselné, což má za důsledek změnu jejich vyššího strukturního uspořádání. To se velmi zřetelně projeví např. v poloze pásu na 1734 cm^{-1} , který se po přidání draselných iontů posune na 1726 cm^{-1} . Abychom lépe porozuměli tomuto chování, proměřili jsme i koncentrační závislost 5'-rGMP ve formě didraselné soli.



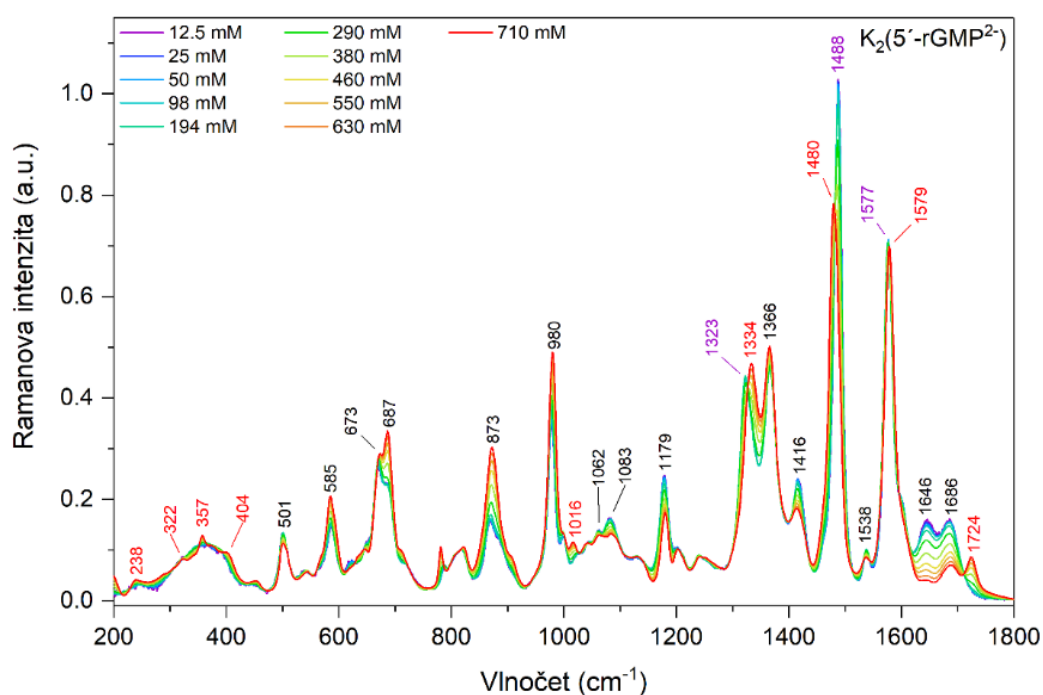
Obrázek 61: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky K⁺ iontů; $c = 100\text{ mM}$ (odstíny modré), $c = 500\text{ mM}$ (odstíny zelené), $c = 1000\text{ mM}$ (odstíny červené)



Obrázek 62: Výsledky faktorové analýzy vlivu K^+ iontů na $5'\text{-rGMP}^{2-}$: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na^+ a K^+ iontů (vpravo dole)

4.5.6 Stohování 5'-rGMP ve formě didraselné soli

V minulé podkapitole 4.5.5 jsme viděli, že při přidavku draselných iontů k dostatečně koncentrovanému 5'-rGMP ve formě hydrátu disodné soli pozorujeme odlišné změny v Ramanově spektru než v případě, že je záporný náboj kompenzován pouze sodíkem. Proto jsme se rozhodli studovat tvorbu G-tetrád guanosin-5'-monofosfátu ve formě didraselné soli. Ten jsme si připravili titrací vzorku ve formě volné kyseliny hydroxidem draselným (KOH) a následnou lyofilizací. Rozsah koncentrací vzorku byl $c = 3.12$ až 710 mM viz **Tabulka 3**. Vzorky byly měřeny při teplotě 25 °C a pH odpovídajícímu dvakrát záporně nabitě formě (5'-rGMP²⁻). Ramanova spektra pro dvě nejnižší koncentrace (3.12 a 6.24 mM) byla kvůli zvýšenému šumu vyřazena ze zpracování. Zbývajících 11 spekter je prezentováno na **Obrázku 63**, kde jsme označili nejvýraznější změny mezi nejméně a nejvíce koncentrovaným vzorkem.

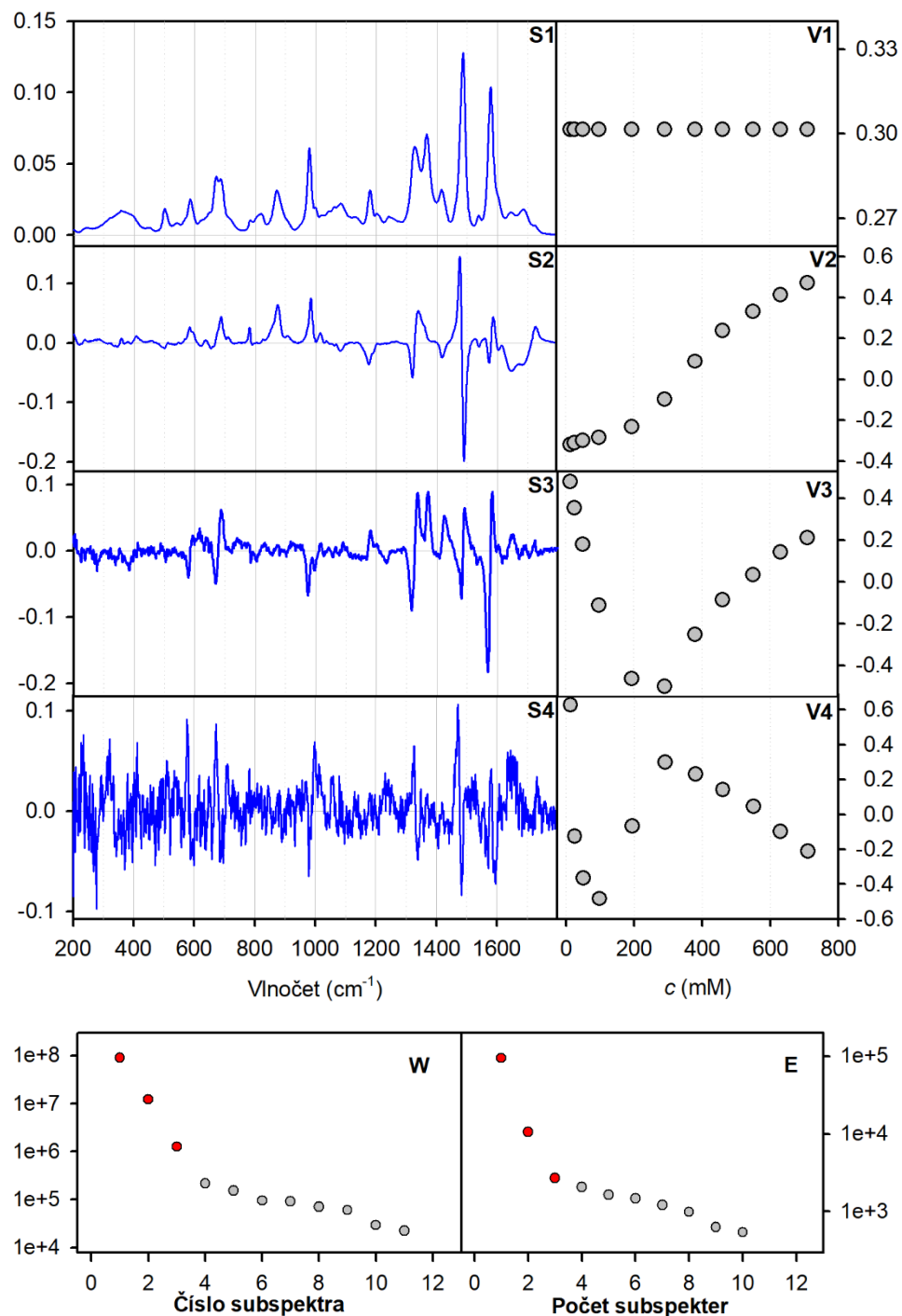


Obrázek 63: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ ve formě didraselné soli při různých koncentracích (viz barvy)

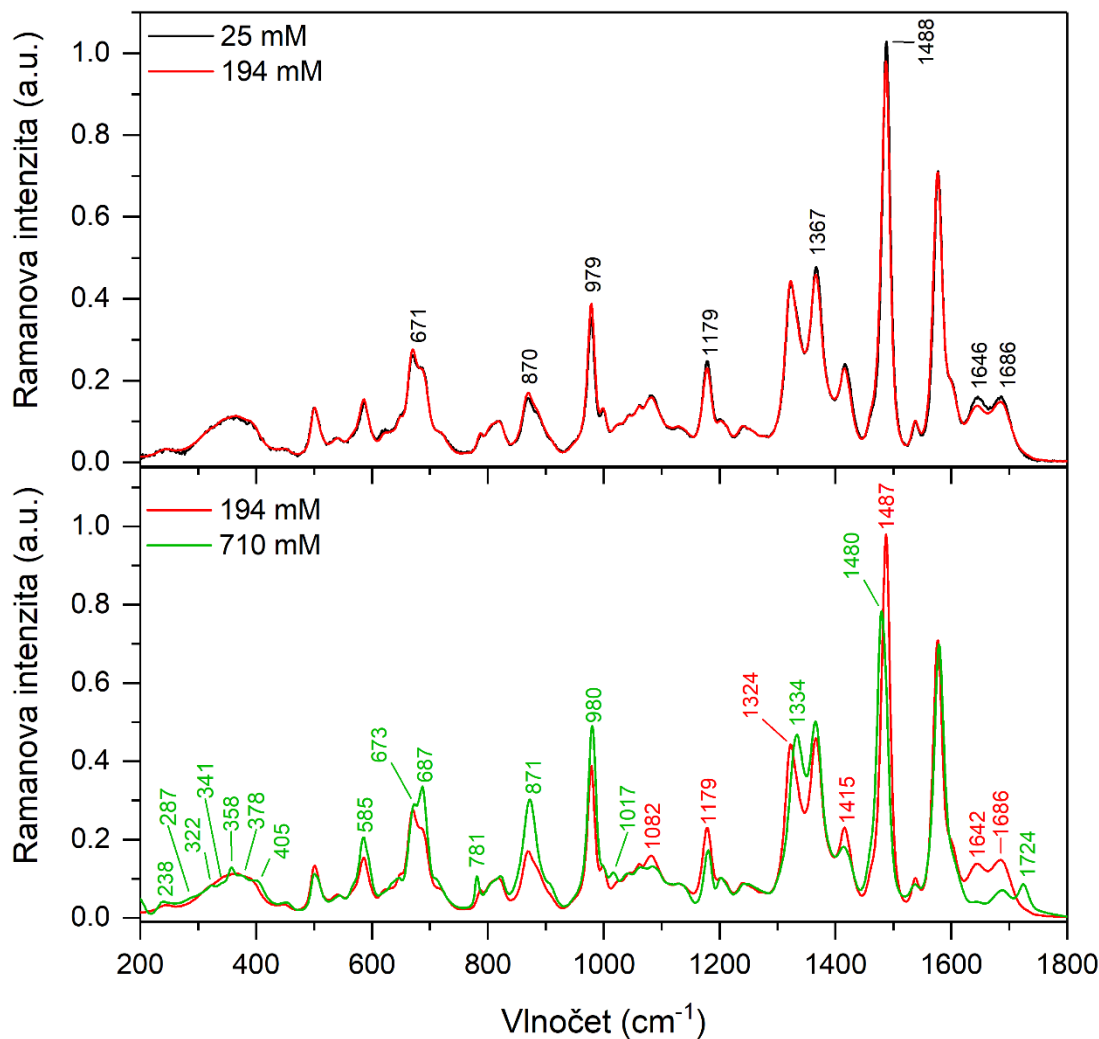
Jedná se o

- (i) posun pásů – z 1323 na 1334 cm^{-1} , ze 1488 na 1480 cm^{-1} a z 1577 na 1579 cm^{-1} ,
- (ii) objev nových pásů – 1724 a 1016 cm^{-1} ,
- (iii) rozlišení struktury pásů v oblasti pod 400 cm^{-1} – 238, 322 a 357 cm^{-1} ,
- (iv) nárůst intenzity pásů – 1366, 980, 873 a 585 cm^{-1} ,
- (v) pokles intenzity pásů – 1686, 1646, 1416, 1179, 1083, 1062 a 501 cm^{-1} ,
- (vi) změna relativní intenzity pásů na 637 a 687 cm^{-1} , kde při nižších koncentracích dominuje pás na 673 cm^{-1} , při cca 380 mM koncentraci vzorku se jejich intenzita vyrovná a při vyšších koncentracích dominuje pás na 687 cm^{-1} .

Více informací lze usuzovat z vyhodnocení této spektrální série pomocí SVD, z jejíž výsledků (**Obrázek 64**) jsme na základě vah jednotlivých subspekter, reziduální chyby a charakteru čtvrtého subspektra poměrně jasně určili faktorovou dimenzi tři. Zde jsme průběh koeficientů V_i vynesli na koncentraci vzorku c . Podobně jako u 5'-rGMP ve formě hydrátu disodné soli (faktorová dimenze tři) i v tomto případě nám to ukazuje na stohování a tvorbu G-tetrád, které se projevují neuniformními spektrálními změnami. Výrazný rozdíl oproti vzorku ve formě hydrátu disodné soli je zřetelně nižší koncentrace vzorku, při které začíná docházet k vytváření asociátů G-tetrád, a to přibližně při 290 mM (při teplotě 25 °C). Lze tedy vyvozovat, že aglomeráty G-tetrád vytvářené v přítomnosti draslíku jsou stabilnější. To dobře odpovídá i s pozorováním v předešlé podkapitole 4.5.5, kdy se tyto struktury začaly vytvářet, i když koncentrace sodíku ve vzorku byla mnohem vyšší než koncentrace draslíku. Pro lepší interpretaci spektrálních změn jsou Ramanova spektra pro tři koncentrace (25, 194 a 710 mM) zobrazena po dvojicích na **Obrázku 65**.



Obrázek 64: Výsledky faktorové analýzy 5'-rGMP²⁻ ve formě didraselné soli: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4, váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci vzorku (vpravo dole)



Obrázek 65: Ramanova spektra 5'-rGMP²⁻ ve formě didraselné soli pro tři různé koncentrace seskupená po dvojicích; 25 mM – černá, 194 mM – červená a 710 mM – zelená

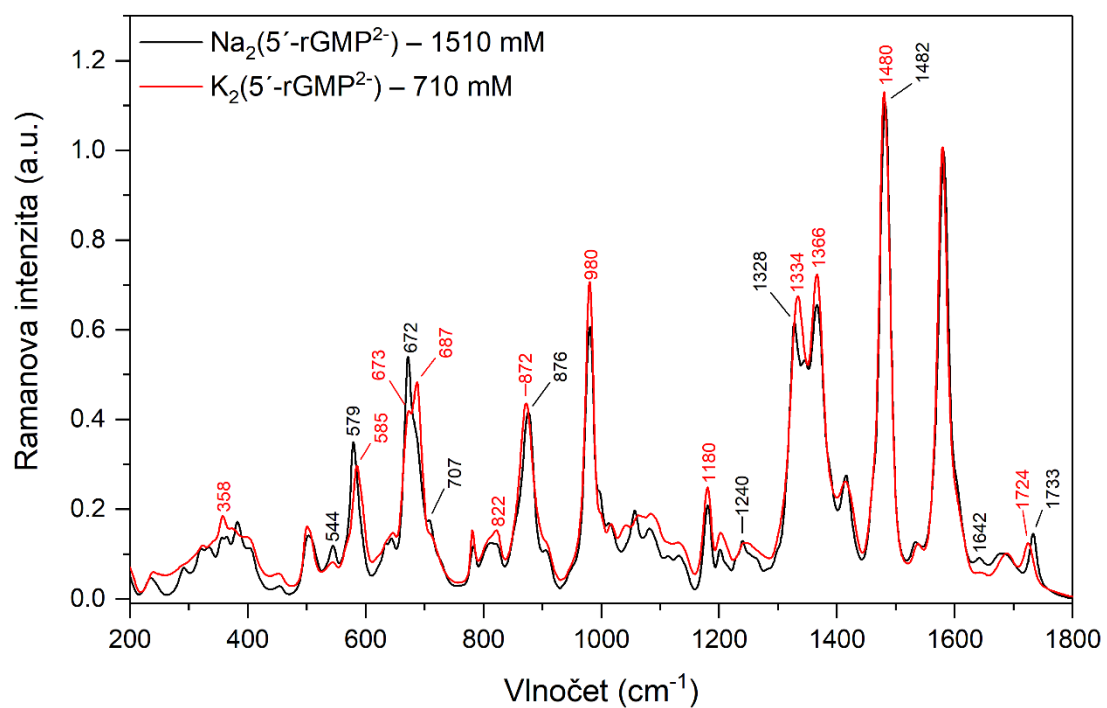
Samotné stohování bází (25 mM vs 194 mM) se neprojevuje příliš velkými spektrálními změnami, které jsme v **Obrázku 65** označili. Jedná se zejména o změny intenzity pásů. Pouze pásy na 671, 870 a 979 cm⁻¹ zvyšují intenzitu s rostoucí koncentrací vzorku. Zbylé změny intenzit pásů jsou spojeny s poklesem intenzity. Při takto nízkých koncentracích nepozorujeme žádné rozdíly způsobené tím, že kompenzujícím iontem je sodík nebo draslík. Při koncentracích vyšších než cca 300 mM se začne projevovat tvorba aglomerátů G-tetrád. Objevují se dva pásy na 1017 a 1724 cm⁻¹, kde druhý z nich je označován jako marker pro tvorbu G-tetrád. U vibrací báze (nad 1100 cm⁻¹) pozorujeme změny intenzit pásů (nárůst i pokles) a u dvou z nich drobné posuny – z 1487 na 1480 cm⁻¹, který je spojen zároveň s poklesem intenzity a posun z 1324 na 1334 cm⁻¹, který je spojen naopak s nárůstem intenzity. Dále nám

výrazně naroste intenzita vibrace odpovídající fosfátu (980 cm^{-1}) a dýchací vibrace báze (871 cm^{-1}) a pásu na 687 cm^{-1} . V oblasti nízkých vlnočtů se původně široký a špatně rozlišený spektrální profil zaostří a jsme schopni rozlišit až šest samostatných pásů a ramen – 378 , 358 , 341 , 322 , 287 a 238 cm^{-1} .

Srovnání Ramanových spekter pro disodnou (1510 mM) a didraselnou formu (710 mM) $5'$ -rGMP $^{2-}$ pro různé koncentrace můžeme vidět na **Obrázku 66**, kde spektra byla normována na intenzitu pásu na pozici 1580 cm^{-1} . Celkový charakter obou spekter je podobný, ale spektrum didraselné formy se jeví o něco zaostřenější – spektrální pásy jsou o něco málo užší a mají trochu vyšší intenzitu. Takovéto chování častou souvisí s vyšší rigiditou systému. Mezi nejvýznamnější rozdíly patří především

- (i) jiná pozice kvadruplexového markeru (1724 cm^{-1} s draslíkem, 1733 cm^{-1} se sodíkem),
- (ii) oblast 1300 – 1400 cm^{-1} , kde u sodné varianty pozorujeme tři pásy na 1328 , 1345 a 1365 cm^{-1} zatímco u draselné varianty jsou zde dva pásy na 1334 a 1366 cm^{-1} ,
- (iii) změna relativní intenzity pásů okolo 680 cm^{-1} , kde u sodné varianty pozorujeme intenzivnější pás na 672 cm^{-1} doplněný ramenem na 685 cm^{-1} , zatímco u draselné varianty je intenzivnější pás na 687 cm^{-1} a pás na 673 cm^{-1} má výrazně nižší intenzitu,
- (iv) odlišný spektrální profil mezi 1000 a 1160 cm^{-1} , kde u sodné varianty pozorujeme ostřejší dobře rozlišené pásy, kdežto u draselné formy hladší hůře rozlišený profil, a
- (v) výrazně odlišný charakter spektra v oblasti nízkých vlnočtů (250 až 400 cm^{-1}), kde pozorujeme větší množství dobře rozlišitelných pásů, přičemž nejintenzivnější je na 357 cm^{-1} pro draselnou variantu a na 382 cm^{-1} pro variantu sodnou.

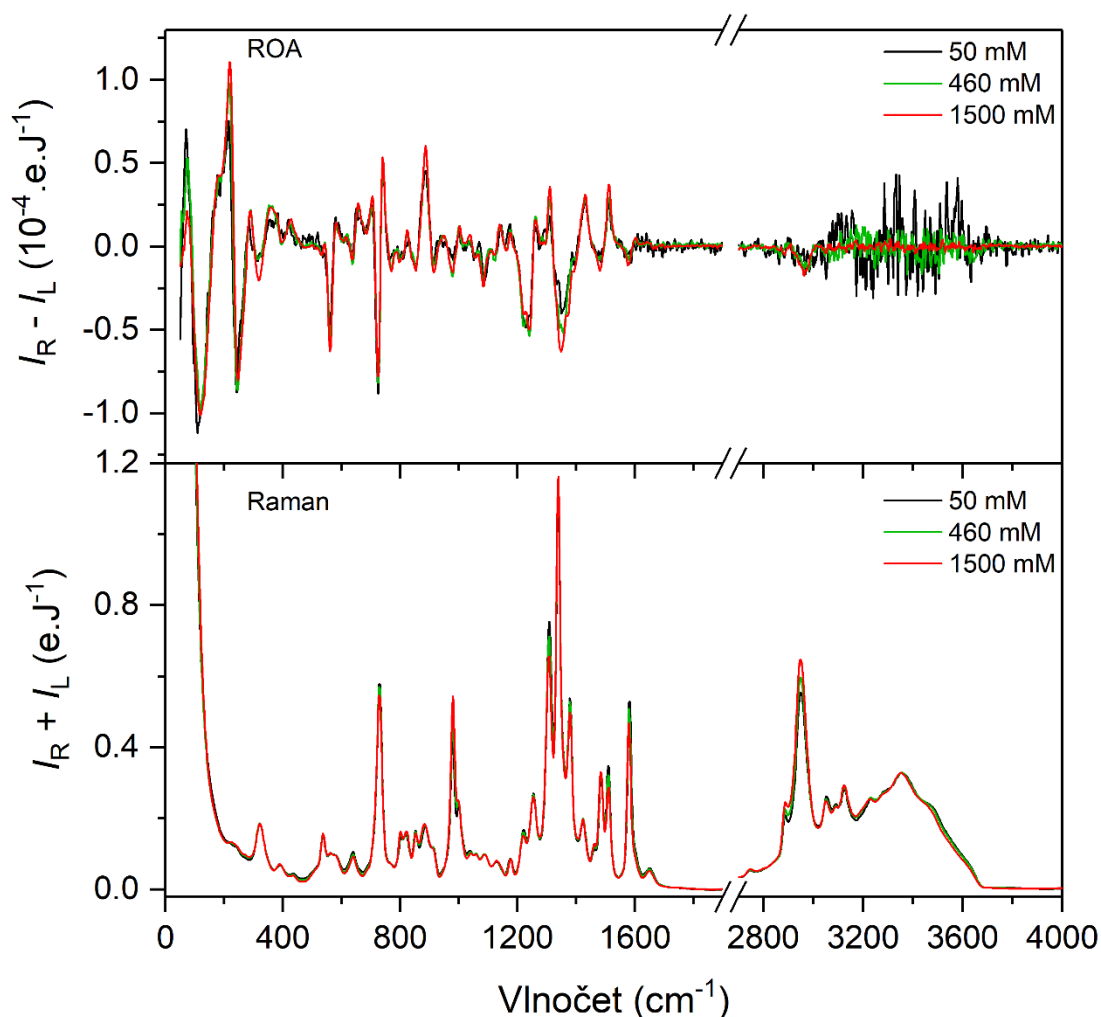
Rozdíly, které výše označujeme (i)–(iii), jsou již v komunitě známé (Mudroňová et al., 2016) a využívány jako markery jednotlivých typů uspořádání G-tetrád. Na rozdíl bodu (v) jsme však v dostupné literatuře nenarazili, což je dáno především tím, že naprostá většina skupin měří a publikuje Ramanova spektra až od cca 600 cm^{-1} . Domníváme se, že tato oblast je při studiu aglomerátů velmi důležitá, neboť poukazuje na vibrace větších částí struktury, specifické rozdíly v uspořádání aglomerátů a jejich rigiditu.



Obrázek 66: Ramanova spektra disodné (1510 mM, černá) a didraselné (710 mM, červená) formy 5'-rGMP²⁻

4.5.7 ROA spektra 5'-rAMP různých koncentrací

V podkapitole 4.5.1 jsme se věnovali stohování 5'-rAMP, kde jsme pozorovali dva výraznější spektrální markery tohoto postupného procesu (trojice pásů u 1330 cm^{-1} a dvojice pásů u 1500 cm^{-1}). Dalším krokem bylo ověření, zda a jakým způsobem se stohování projevuje v ROA spektrech. Vzhledem k tomu, že je celý proces téměř lineární s dekadickým logaritmem koncentrace, rozhodli jsme se neměřit celou koncentrační závislost, ale jen tři různé koncentrace 5'-rAMP²⁻ (Tabulka 5). Měření probíhalo při $\text{pH} = 8.5$ a teplotě $25\text{ }^\circ\text{C}$, výsledná ROA a Ramanova spektra 5'-rAMP²⁻ můžeme vidět na Obrázku 67.



Obrázek 67: Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra 5'-rAMP²⁻ pro tři různé koncentrace; 50 mM – černá, 460 mM – zelená, 1500 mM – červená

Spektrální změny v Ramanových spektrech jsme podrobně rozebrali v podkapitole 4.5.1, proto se zde zaměříme pouze na oblast vodíkových valenčních vibrací. Ani v této oblasti však nepozorujeme žádné velké změny. Stohování se projevuje pouze malým navýšením intenzity pásů C-H valenčních vibrací.

Podobně jako v Ramanových i v ROA spektrech se stohování (stacking) bázi neprojevuje nikterak výrazně. Rozdíly lze pozorovat především v oblasti mezi 1200 až 1600 cm^{-1} . Pro lepší názornost spektrálních změn jsou ROA spektra zobrazena ve dvojicích nad sebou na **Obrázku 68**. Oblast valenčních vodíkových vibrací je i pro více koncentrované vzorky nevýrazná a zatížena šumem, který znesnadňuje vyhodnocení trendů, proto se jí dále nebudeme věnovat. Spektrální změny:

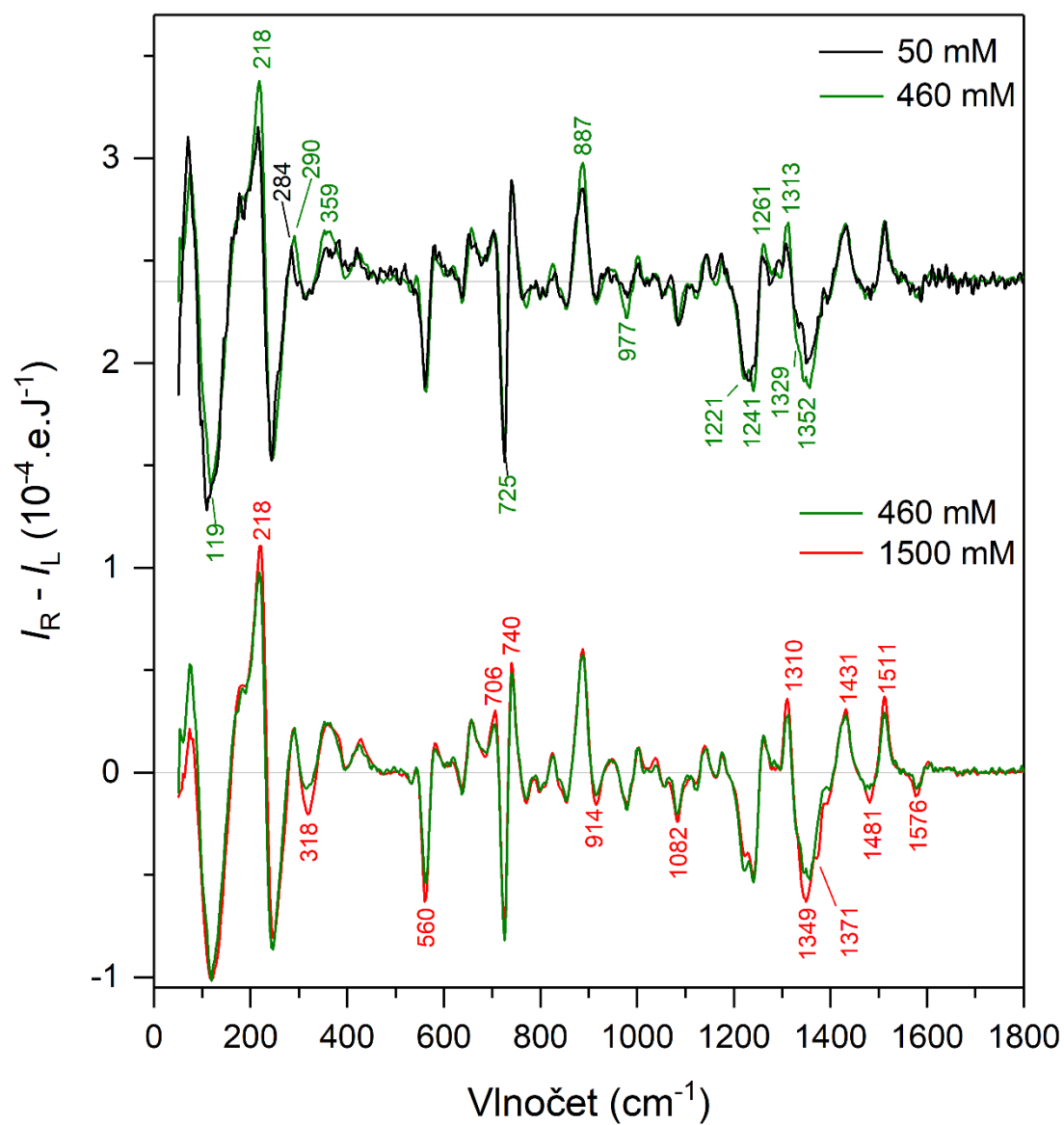
(a) 50 mM vs 460 mM

Rozdíly mezi těmito ROA spektry při této řádové změně koncentrace jsou velmi malé. Mezi výraznější patří změna struktury záporných pásů okolo 1230 cm^{-1} – při vyšších koncentracích můžeme zřetelně rozlišit dvojici pásů na 1241 a 1221 cm^{-1} . Další změnou v této oblasti je navýšení intenzity kladného pásu na 1313 cm^{-1} a záporného pásu na 1352 cm^{-1} společně s jeho ramenem na 1329 cm^{-1} . V oblasti nízkých vlnočtů zřetelně narůstá intenzita kladného pásu na 218 cm^{-1} , posouvá se pás na 284 cm^{-1} a pás na 359 cm^{-1} se stává zřetelnějším.

(b) 460 mM vs 1500 mM

Při dalším navýšení koncentrace vzorku pozorujeme zostření celé řady spektrálních pásů, což poukazuje na zvýšení rigidity struktury způsobené stohováním. Dále se navyšuje intenzita kladného pásu na 1349 cm^{-1} , vedle kterého se nově objevuje i zřetelné rameno na 1371 cm^{-1} . V oblasti nízkých vlnočtů vidíme další nárůst intenzity kladného pásu na 218 cm^{-1} a zesiluje se i záporný pás na 318 cm^{-1} .

Efekt stohování 5'-rAMP na ROA spektra je tedy podobně jako v případě Ramanových spekter pozorovatelný, ale velmi málo.

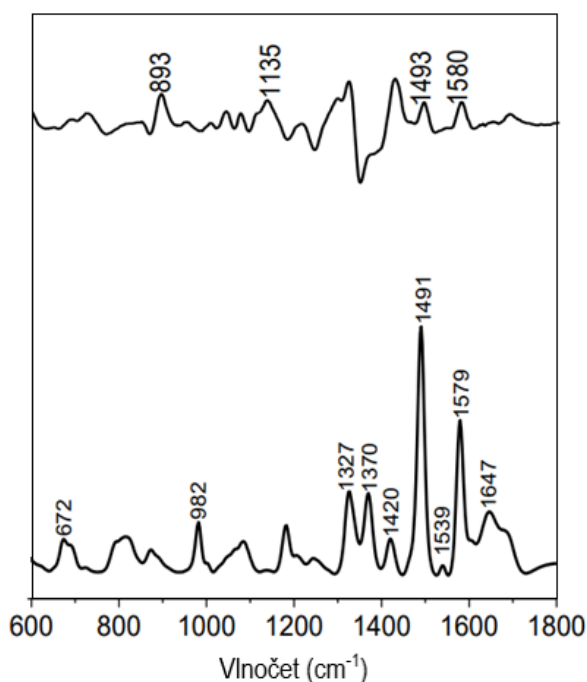


Obrázek 68: ROA spektra 5'-rAMP²⁻ seskupená po dvojicích pro tři různé koncentrace; 50 mM – černá, 460 mM – zelená, 1500 mM – červená

4.5.8 ROA spektra 5'-rGMP se sodnými ionty

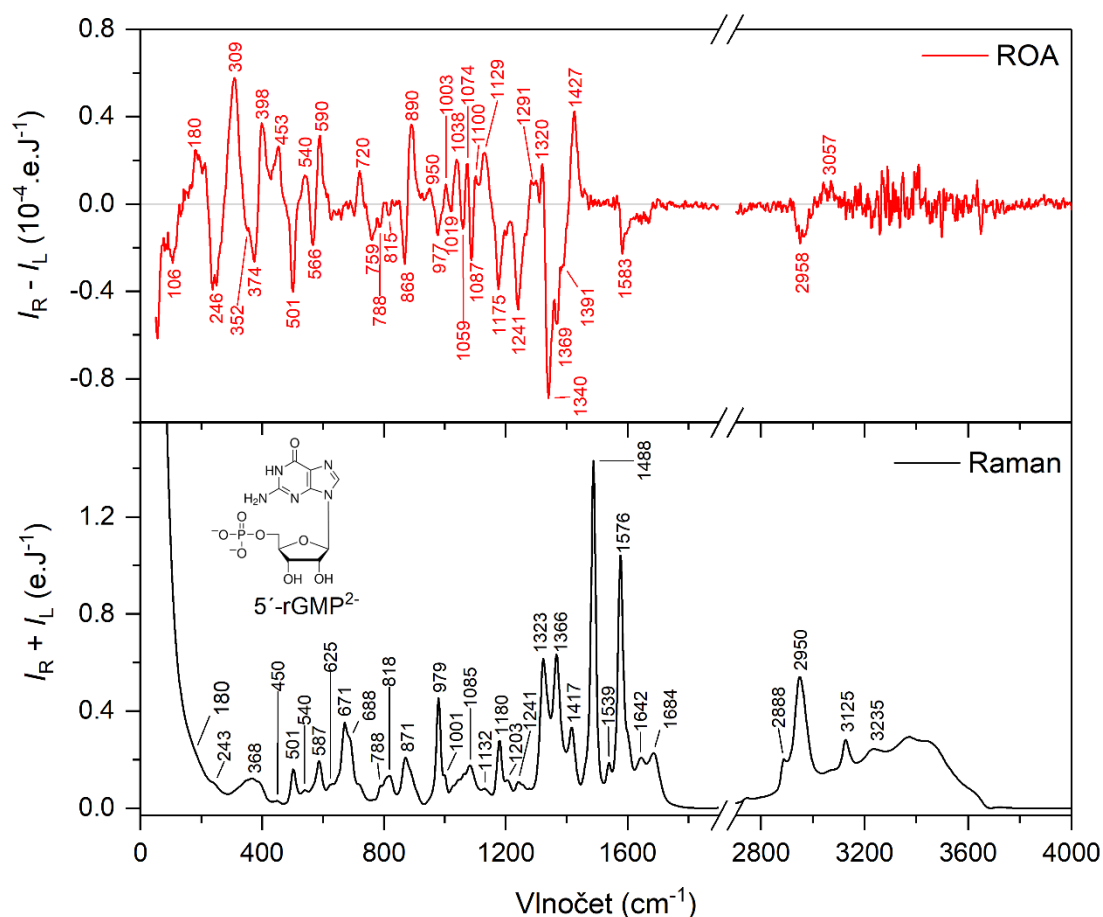
V podkapitole 4.5.3 jsme ukázali, že při zvýšené koncentraci 5'-rGMP²⁻, kdy je záporný náboj kompenzován sodíkem, dojde v roztoku nejen ke stohování této molekuly, ale začnou se také vytvářet G-tetrády a jejich asociáty. Při teplotě 25 °C je limitní koncentrace pro vznik asociátů G-tetrád asi 450 mM (pokud nejsou v roztoku přítomny dodatečné sodíkové ionty). Aglomeráty G-tetrád jsou stabilizovány nejen sodíkovými ionty, ale také vodíkovými můstky mezi hydroxyly pentosových jednotek. Díky tomu se dá předpokládat, že vznik asociátů G-tetrád bude v ROA spojen s velkou spektrální změnou. Abychom tuto domněnku potvrdili, změřili jsme v široké spektrální oblasti ROA spektra 5'-rGMP (ve formě hydrátu disodné soli) při hodnotě pH odpovídající dvakrát záporně nabitě formy – 5'-rGMP²⁻.

V dostupné literatuře se nám podařilo dohledat pouze jedno ROA spektrum 5'-rGMP, a to v rámci dizertační práce O. Azhera na Univerzitě v Manchesteru, (Azher, 2018). Toto spektrum, změřené ve spektrální oblasti 600 až 1800 cm⁻¹ při pH = 7 a koncentraci 50 nebo 100 mM (v práci není jasně specifikováno), prezentujeme na **Obrázku 69**. Spektrum je poměrně dobře rozlišené, absence šumu poukazuje na delší akumulaci dobu, či vyhlazení naměřeného spektra (v práci není specifikováno).



Obrázek 69: Ramanovo (dole) a ROA (nahore) spektrum 5'-rGMP, upraveno z (Azher, 2018)

V našem případě jsme změřili vzorek při 190 mM koncentraci, pH = 7 a teplotě 25 °C, tj. za podmínek kdy ještě nedochází k tvorbě asociátů (jak jsme ukázali dříve, vliv stohování na spektra je u 5'-rGMP minimální). Finální spektra ukazujeme na **Obrázku 70**.



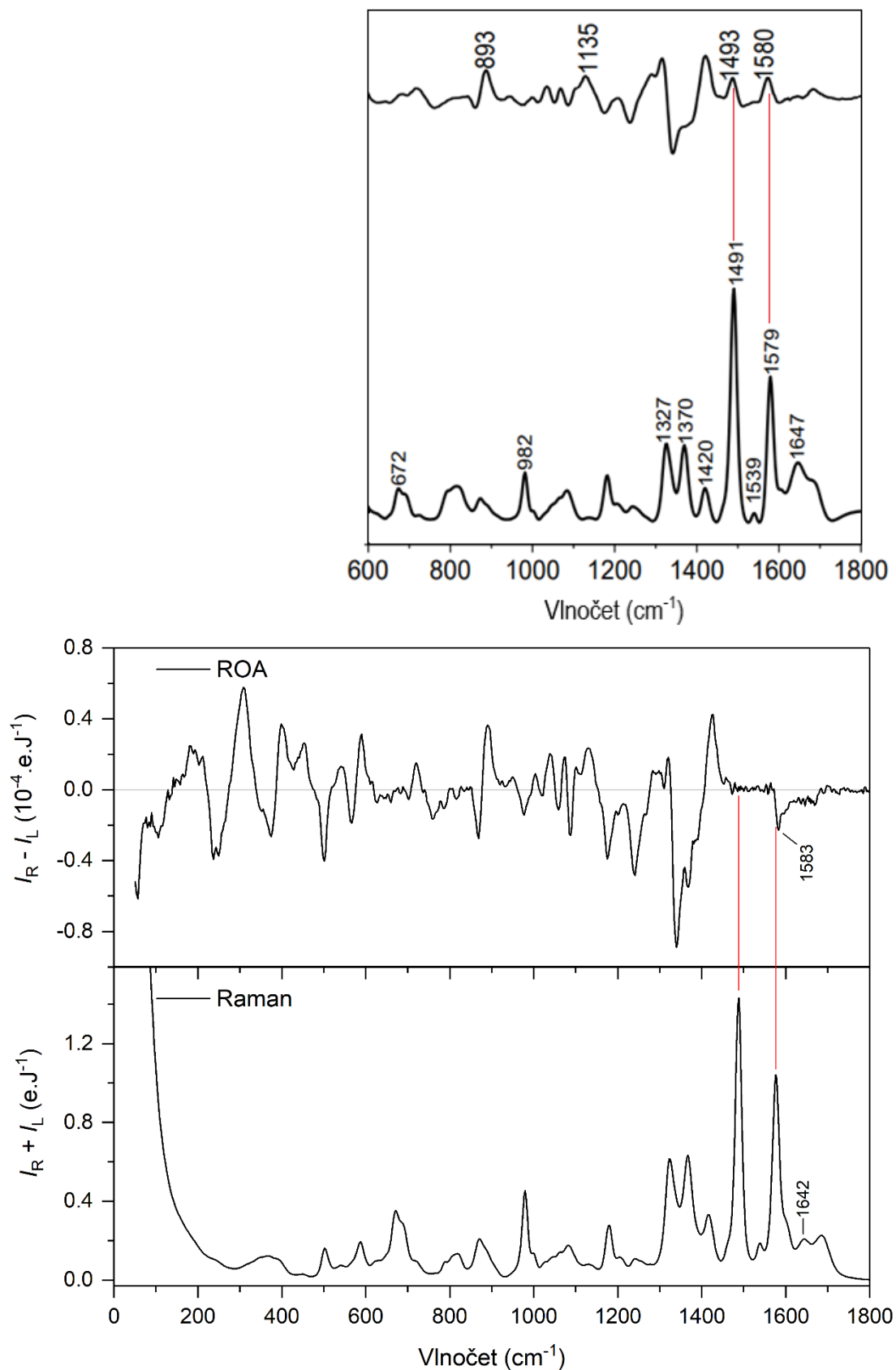
Obrázek 70: Ramanovo a ROA spektrum jednou protonované formy guanosin-5'-monofosfátu (5'-rGMP²⁻); Raman – dole (černá), ROA – nahoře (červená)

Na rozdíl od dříve prezentovaných spekter jsme změřili celou oblast fundamentálních vibrací (od 50 do 4000 cm⁻¹). V obou spektrech jsme vyznačili pouze ty nejzřetelnější pásy. Jelikož je dusíkatá báze purinová, stejně tak jako u adenosinu, tak ve spektrech můžeme pozorovat jisté podobnosti právě s adenosin-5'-monofosfátem. V Ramanově spektru dominují vibrace nukleobáze (oblast 1200–1700 cm⁻¹ a dýchací vibrace na 671 cm⁻¹) a fosfátové skupiny (979 cm⁻¹). V oblasti pod 650 cm⁻¹ detekujeme dva užší pásy (501 a 587 cm⁻¹) a zbylé pásy jsou poměrně široké a hůře rozlišitelné. Díky Rayleighově rozptylu není možné vizuálně rozlišit pásy pod 200 cm⁻¹, pomocí druhé derivace lze ještě identifikovat rameno na 180 cm⁻¹. Oblast valenčních vodíkových

vibrací je dobře rozlišitelná, pásy příslušející C-H a N-H vibračním módům jsou jasně identifikovatelné.

V ROA spektru nejsou intenzitní rozdíly mezi jednotlivými pásy tak velké jako u Ramana a díky střídání znamének jsme schopni tyto pásy lépe rozlišit. Celkově je ROA spektrum $5'$ -rGMP²⁻ velmi bohaté, je možné v něm identifikovat cca 40 vibračních pásů. Oproti Ramanovu spektru je v ROA, poměrně intenzivní signál i v oblasti pod 600 cm^{-1} (podobně jako jsme to viděli u $5'$ -rAMP²⁻). Naopak v oblasti valenčních vodíkových vibrací jsme schopni pozorovat pouze dva velmi slabé pásy (2958 cm^{-1} (-) a 3057 cm^{-1} (+)).

Na **Obrázku 71** srovnáváme naše spektra s těmi uvedenými v dizertační práci O. Azhera. Zaměříme-li se nejprve na Ramanova spektra, tak vidíme, že jsou téměř identická. Drobný rozdíl je v profilu pásu na přibližně 1642 cm^{-1} , což může být způsobeno nepřesností v odečtu signálu vody. Na první pohled větší rozdíly pozorujeme u ROA spekter. Nedetekujeme dvojice kladných pásů (1493 a 1580 cm^{-1}), ale pouze záporný pás na 1583 cm^{-1} . Domníváme se, že tyto kladné pásy mohou pocházet z reziduálního Ramanova signálu, neboť právě na těchto pozicích jsou nejintenzivnější pásy v Ramanově spektru. Poloha ostatních pásů i jejich znaménka si poměrně dobře odpovídají. V našich spektrech je ale mnohem lépe rozlišitelná jejich struktura (ramena apod.).



Obrázek 71: Srovnání Ramanových a ROA spekter guanosin-5'-monofosfátu (5'-rGMP²⁻) publikovaných (nahore, převzato a upraveno z (Azher, 2018)) s našimi experimentálními spektry (dole); Raman – spodní spektrum, ROA – horní spektrum

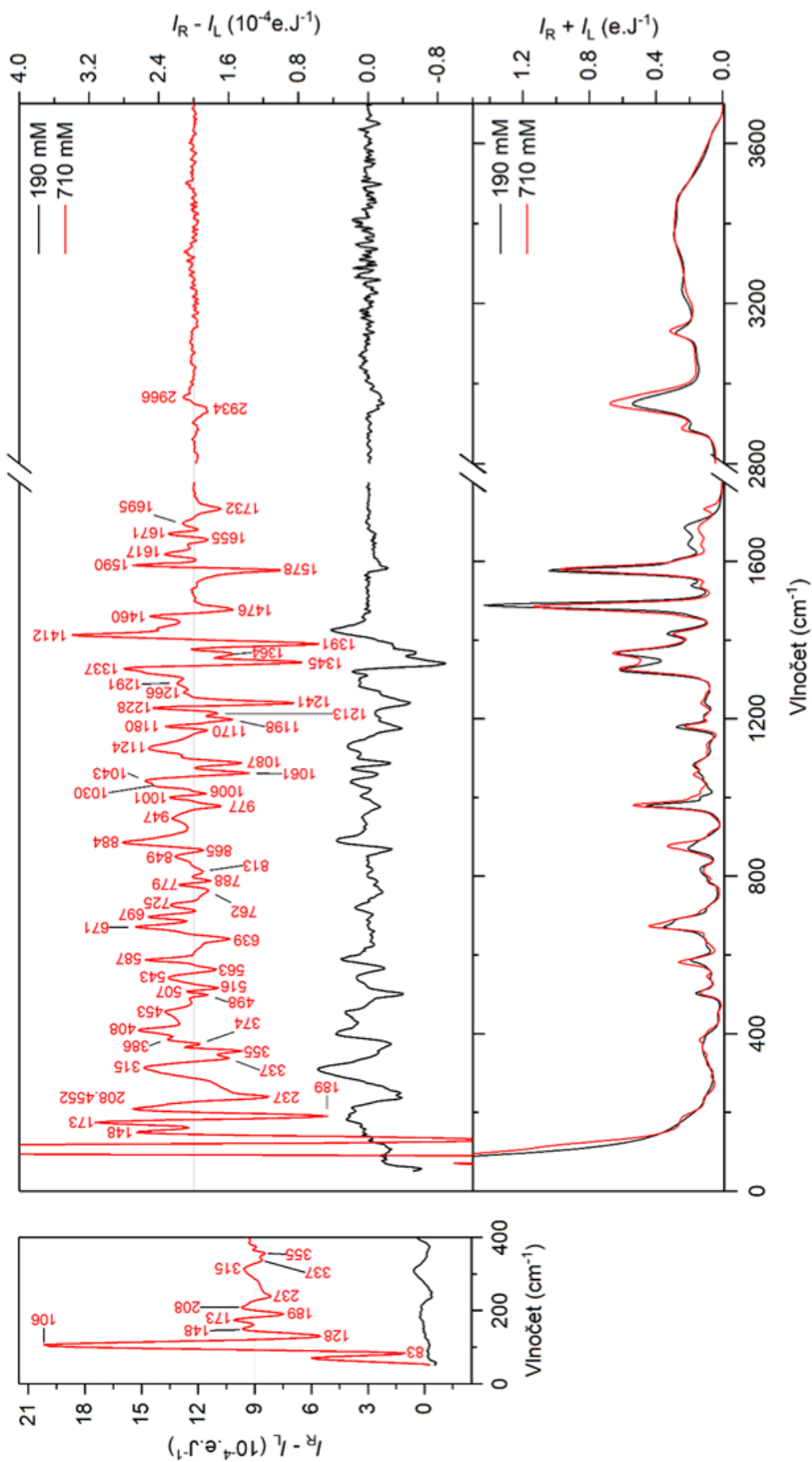
Naším posledním měřením v rámci této práce bylo ROA spektrum 5'-rGMP²⁻ ve vysoké koncentraci s nábojem kompenzovaným sodnými ionty. Experiment byl proveden při pH = 7, teplotě 25 °C a koncentraci 710 mM. Výsledné ROA a Ramanovo spektrum spolu se spektry, která jsme získali při 190 mM koncentraci (pro porovnání), je uvedeno na **Obrázku 72**. Spektrální rozdíly Ramnových spektrech ve fingerprintové oblasti již byly podrobně diskutovány v podkapitole 4.5.3. V oblasti valenčních vodíkových vibrací pozorujeme pouze nárůst intenzity pásů C-H vibrací a drobný posun pásu N-H vibrací.

Změna pozorovaná v ROA spektrech je však přímo enormní. Po vytvoření aglomerátů G-tetrád spektrum ROA získá na intenzitě (více než dvakrát), razantně se zvýší počet pozorovaných pásů a kompletně se promění jeho celkový profil (pořadí kladných a záporných pásů) v celé oblasti fundamentálních molekulových vibrací

- (i) V oblasti valenčních vodíkových vibrací se namísto negativního pásu C-H valenčních vibrací na 2958 cm⁻¹ objeví kaplet na 2934 cm⁻¹ (-)/2966 cm⁻¹ (+).
- (ii) V oblasti nad 1450 cm⁻¹, kde byl pouze negativní pás na 1583 cm⁻¹ a další slabý negativní pás na 1650 cm⁻¹, získá spektrum bohatou strukturu s několika kaplety a negativním pásem na 1732 cm⁻¹, který je v Ramanu markrem tvorby asociátů G-tetrád.
- (iii) Ve střední oblasti mezi 400 a 1500 cm⁻¹ získá spektrum bohatou strukturu s mnoha pásy, mezi kterými je ale možné nalézt několik, které dobře odpovídají těm ze spektra samotného 5'-rGMP. Jedná se např. o kaplet na 1377 cm⁻¹ (+)/1345 cm⁻¹ (-), motiv střídajících se kladných a záporných pásů mezi 977 a 1124 cm⁻¹ (- + - + - - + +), kaplet na 865 cm⁻¹ (-)/884 cm⁻¹ (+), kladný pás na 315 cm⁻¹ atd.
- (iv) V terahertzové oblasti (pod 300 cm⁻¹), která u nižších koncentrací obsahovala pouze tři širší pásy poměrně malé intenzity, se objeví osm velmi zřetelně rozlišených pásů, z nichž dva na nejnižších vlnočtech (83 cm⁻¹ a 106 cm⁻¹) mají enormně vysokou intenzitu dosahující až desetinásobku té, kterou jsme viděli u nejintenzivnějších pásů ve spektru 5'-rGMP při nižší koncentraci.

Tyto pozorování nám ukazují, že aglomerát G-tetrád v prostředí sodných iontů je rigidní (celkové zvýšení intenzity signálu) a přesně strukturovaný (bohatá terahertzová oblast). Vysoká kvalita naměřeného ROA spektra se může stát dobrým podkladem pro

budoucí kvantově chemické simulace G-tetrád a jejich asociátů. Technika ROA pak může být velmi vhodnou volbou pro studium takovýchto aglomerátů nukleotidů a následně i kvadruplexů. V nejbližší budoucnosti plánujeme experimenty s asociáty 5'-rGMP tetrád v prostředí s draselnými ionty a teplotní měření, které nám odhalí stabilitu těchto struktur.



Obrazek 72: Ramanova (dole) a ROA spektra (nahore) 5'-rGMP2- pro dve ruzne koncentrace; 190 mM – cerna, 710 mM – cervena

5. Závěr

V úvodní rešeršní části této práce jsme představili nukleotidy z hlediska jejich složení, biologického významu a vlastností umožňujících vytvářet asociáty či složitější aglomeráty (např. G-tetrády). Krátce jsme popsali teoretické základy vibrační spektroskopie a představili její jednotlivé varianty s důrazem na Ramanovu spektroskopii a Ramanovu optickou aktivitu, které byly v této práci využívány. V metodické části jsme podrobně popsali proces přípravy vzorků, používané měřicí aparatury a zejména zpracování dat pomocí faktorové analýzy, která byla při zpracování a analýze dat hojně využívána. Ve výsledkové části pak prezentujeme jednotlivé provedené experimenty a analýzu naměřených dat.

Hlavním cílem této diplomové práce bylo studium nukleotidů s různými chemickými modifikacemi (poloha fosfátu, přítomnost ribosy či 2'-deoxyribosy) pomocí Ramanovy spektroskopie a její chirálně citlivé varianty – Ramanovy optické aktivity. Značné úsilí bylo věnováno stohování purinových nukleotidů a tvorbě G-tetrád.

V rámci obecných výsledků se nám podařilo zjistit, že ROA spektroskopie může být využita pro studium struktury a vlastností nukleotidů, neboť je velmi citlivá vůči vibracím jejich cukerné složky, což vhodně doplňuje samotnou Ramanovu spektroskopii, která je citlivá především k vibracím nukleobází. Oblast valenčních vodíkových vibrací se v ROA ukázala být informačně poměrně chudá. Naproti tomu oblast nízkých vlnočtů (pod 600 cm^{-1}) a především terahertzová oblast (pod 300 cm^{-1}) byly informačně velmi bohaté – obsahovaly velké množství dobře rozlišených a intenzivních pásů a obzvláště v případě aglomerátů G-tetrád jsme zde získali naprosto bezprecedentní signál.

Dílní výsledky práce lze shrnout do následujících bodů (v souladu se značením v kapitole 2. Cíle):

1. Získali jsme vysoce kvalitní ROA spektra 5'-rAMP a 5'-rGMP v celé oblasti fundamentálních vibrací (60 až 3800 cm^{-1}) a porovnali jsme je s literaturou. V dříve publikovaných spektrech jsme i přes jejich značně užší spektrální rozsah (600 až 1800 cm^{-1}) identifikovali řadu nedostatků, které jsme podrobně diskutovali.

2. Určili jsme pK_A disociační konstanty přechodu mezi různými nábojovými stavy jedenácti různých nukleotidů (viz **Tabulka 9**) a srovnali jejich hodnoty s literaturou. Hodnoty jednotlivých pK_A konstant se s těmi publikovanými místy odlišují až o 0.3, avšak stejně velké rozdíly pozorujeme i u hodnot pocházejících z různých publikací. Na základě těchto měření jsme stanovili hodnoty pH, při kterých jsou nejvíce zastoupené jednotlivé nábojové stavy. Z faktorové analýzy (SVD metody) jsme získali i Ramanova spektra odpovídající jednotlivým nábojovým formám. Změřili jsme Ramanova a ROA spektra tří nábojových forem 5'-rAMP v celé oblasti fundamentálních vibrací a charakterizovali jsme spektrální změny spojené se dvěma protonacemi fosfátové skupiny a jednou protonací adeninové báze.
3. Popsali jsme rozdíly v Ramanových spektrech adenosinu a tří různě fosforylovaných AMP (na C(5'), C(3') a C(2')). Jednotlivé různě fosforylované formy je od sebe možné jednoznačně rozlišit, ale podmínkou jsou kvalitně změřená spektra. Na příkladu 5'-AMP, 5'-CMP a 5'-GMP jsme srovnali rozdíly v jejich Ramanových spektrech způsobených záměnou ribosy za 2'-deoxyribosu. Spektrální změny nebyly příliš výrazné, ale dostatečně specifické. Velké rozdíly jsme ale pozorovali v ROA spektrech 5'-rAMP a 5'-dAMP, která vykazovala velmi odlišný charakter. V tomto případě se ROA ukázala jako vysoce citlivá.
4. Stohování purinových nukleotidů jsme studovali pomocí koncentračních závislostí Ramanových spekter 5'-rAMP, 5'-rGMP a 5'-dGMP. Prokázalo se, že patrová interakce se uplatňuje již od 10mM koncentrací vzorků, avšak spektrální změny s ní spojené jsou u 5'-rAMP poměrně malé, v případě 5'-rGMP a 5'-dGMP obtížně detekovatelné až zanedbatelné. I v ROA spektrech 5'-rAMP v koncentracích lišících se o více než dva řády byly pozorovány pouze malé spektrální změny způsobené stohováním.
5. Zjistili jsme, že při teplotě 25 °C v přítomnosti sodných kationtů začne docházet k tvorbě aglomerátů G-tetrád u 5'-rGMP od cca 450 mM koncentrace. Jejich tvorba je doprovázena charakteristickými změnami ve fingerprintové oblasti Ramanova spektra. Nově jsme popsali charakteristické spektrální změny, ke kterým při tomto procesu dochází, v oblasti nízkých vlnočtů. Pro 5'-dGMP nebylo vytváření aglomerátů

v prostředí sodných kationtů pozorováno. Popsali jsme i vliv přidávání dodatečných sodných a draselných iontů na tvorbu G-tetrád. Nadbytek sodíku vede ke stabilizaci aglomerátů G-tetrád u 5'-rGMP, ale na 5'-dGMP má pouze zanedbatelný vliv. Naopak po přidání draselných kationtů začalo u obou vzorků docházet k tvorbě aglomerátů G-tetrád odlišného typu. Vyšší afinita draslíku se prokázala i u následného experimentu, ve kterém jsme viděli, že při teplotě 25 °C v přítomnosti draselných kationtů kompenzujících záporný náboj 5'-rGMP začne docházet k tvorbě aglomerátů G-tetrád již od cca 290 mM koncentrace. Velmi zajímavé výsledky přineslo měření ROA vzorku 5'-rGMP o koncentraci 710 mM s nábojem kompenzovaným sodíkem. V takovém případě jsou již vytvořeny aglomeráty G-tetrád a získané spektrum velmi dobře reflektuje rigiditu aglomerátu, která se projevila navýšením celkové intenzity ROA signálu, větším množstvím úzkých dobře rozlišených pásů a velmi bohatým a o bezmála řád silnějším signálem v terahertzové oblasti.

Některé z výsledků této práce mají spíše validační charakter. Jedná se o Ramanova spektra jednotlivých mononukleotidů a Ramanovské markery projevů stohování i vytváření aglomerátů G-tetrád. Naše data jsou s těmi již dříve publikovanými v dobrém souladu. Přínos této práce je především ve využití statistických metod zpracování spektrálních sérií, které umožňují sofistikovanější vyhodnocení pozorovaných trendů a rozšíření studované spektrální oblasti i o oblast nižších vlnočtů a oblast valenčních vodíkových vibrací. Naše ROA měření jsou však buď o mnoho kvalitnější než doposud dostupná data (dva případy zmíněné v 1. bodu) nebo zcela původní.

V plánu byla ještě další měření, např. ROA spektra různě fosforylovaného AMP, měření teplotních závislostí a doplňková VCD měření. To se však již nezdařilo, neboť tato práce vznikala v době silně ovlivněné koronavirovou situací, která po celé dva roky silně limitovala experimentální činnost a možnosti přístupu do laboratoře.

V budoucnu hodláme v nastaveném směru výzkumu pokračovat a vyjma samotných nukleotidů a studia struktury a stability aglomerátů G-tetrád (např. v prostředí s jinými ionty) se posunout i ke studiu oligonukleotidů a nukleových kyselin.

Seznam použité literatury

ADAMS, R. L. P., KNOWLER, J. T., & LEADER, D. P. (1992). *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. Dordrecht: Springer Netherlands. ISBN 978-0-412-39940-4. <https://doi.org/10.1007/978-94-011-2290-0>

ALTONA, C., & SUNDARALINGAM, M. (1972). Conformational analysis of the sugar ring in nucleosides and nucleotides. New description using the concept of pseudorotation. *Journal of the American Chemical Society*, **94**(23), 8205–8212. <https://doi.org/10.1021/ja00778a043>

ANDĚL, J. (1985). *Matematická statistika*. Praha: SNTL – Nakladatelství technické literatury.

ATKINS, P., & FRIEDMAN, R. (2005). *Molecular quantum mechanics* (4th ed.). New York: Oxford University Press.

AZHER, O. A. (2018). Spectroscopic Characterisation of Purine Nucleotides and their Interaction with Proteins. *Doctoral thesis*. The University of Manchester.

BALASUBRAMANIAN, S., HURLEY, L. H., & NEIDLE, S. (2011). Targeting G-quadruplexes in gene promoters: a novel anticancer strategy? *Nature Reviews Drug Discovery*, **10**(4), 261–275. <https://doi.org/10.1038/nrd3428>

BARRON, L. D., BOGAARD, M. P., & BUCKINGHAM, A. D. (1973a). Differential Raman Scattering of Right and Left Circularly Polarized Light by Asymmetric Molecules. *Nature*, **241**(5385), 113–114. <https://doi.org/10.1038/241113a0>

BARRON, L. D., BOGAARD, M. P., & BUCKINGHAM, A. D. (1973b). Raman scattering of circularly polarized light by optically active molecules. *Journal of the American Chemical Society*, **95**(2), 603–605. <https://doi.org/10.1021/ja00783a058>

BARRON, L. D., & BUCKINGHAM, A. D. (1971). Rayleigh and Raman scattering from optically active molecules. *Molecular Physics*, **20**(6), 1111–1119. <https://doi.org/10.1080/00268977100101091>

BARRON, L. D., HECHT, L., MCCOLL, I. H., & BLANCH, E. W. (2004). Raman optical activity comes of age. *Molecular Physics*, **102**(8), 731–744. <https://doi.org/10.1080/00268970410001704399>

BELL, A. F., HECHT, L., & BARRON, L. D. (1997a). Vibrational Raman optical activity of pyrimidine nucleosides. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, **93**(4), 553–562. <https://doi.org/10.1039/a606531g>

BELL, A. F., HECHT, L., & BARRON, L. D. (1997b). Vibrational Raman Optical Activity as a Probe of Polyribonucleotide Solution Stereochemistry. *Journal of the American Chemical Society*, **119**(26), 6006–6013. <https://doi.org/10.1021/ja9704388>

BHAGAVAN, N. V. (2002). Nucleic Acid Structure and Properties of DNA. In *Medical Biochemistry* (4th ed.) (pp. 521–543). Elsevier. ISBN 978-0-12-095440-7. <https://doi.org/10.1016/B978-012095440-7/50025-1>

BLANCH, E., HECHT, L., & BARRON, L. D. (2003). Vibrational Raman optical activity of proteins, nucleic acids, and viruses. *Methods*, **29**(2), 196–209. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(02\)00310-9](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(02)00310-9)

BRUCE, A. (2008). *Molecular biology of the cell* (5th ed.). New York: Garland Science. ISBN 978-0-8153-4464-3

BRYAN, T. M., & BAUMANN, P. (2011). G-Quadruplexes: From Guanine Gels to Chemotherapeutics. *Molecular Biotechnology*, **49**(2), 198–208. <https://doi.org/10.1007/s12033-011-9395-5>

CHANTOT, J.-F., & GUSCHLBAUER, W. (1969). Physicochemical properties of nucleosides 3. Gel formation by 8-bromoguanosine. *FEBS Letters*, **4**(3), 173–176. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(69\)80227-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(69)80227-9)

DAWSON, R. M. C. (1959). *Data for biochemical research*. Oxford: Clarendon Press.

DIEM, M. (2015). *Modern Vibrational Spectroscopy and Micro-Spectroscopy*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9781118824924 <https://doi.org/10.1002/9781118824924>

EMWAS, A.-H. M. (2015). The Strengths and Weaknesses of NMR Spectroscopy and Mass Spectrometry with Particular Focus on Metabolomics Research. In J. T. Bjerrum (Ed.), *Metabonomics* (pp. 161–193). New York: Humana Press. ISBN 978-1-4939-2377-9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2377-9_13

GELLERT, M., LIPSETT, M. N., & DAVIES, D. R. (1962). Helix Formation by Guanylic Acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **48**(12), 2013–2018. <https://doi.org/10.1073/pnas.48.12.2013>

GONCHAROVA, I., NOVOTNÁ, J., & URBANOVÁ, M. (2012). Stacked and continuous helical self-assemblies of guanosine monophosphates detected by vibrational circular dichroism. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **403**(9), 2635–2644. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6014-7>

GRANOTIER, C., PENNARUN, G., RIOU, L., HOFFSCHIR, F., GAUTHIER, L. R., CIAN, A. De, GOMEZ, D., MANDINE, E., RIOU, J.-F., MERGNY, J. L., MAILLIET, P., DUTRILLAUX, B., & BOUSSIN, F. D. (2005). Preferential binding of a G-quadruplex ligand to human chromosome ends. *Nucleic Acids Research*, **33**(13), 4182–4190. <https://doi.org/10.1093/nar/gki722>

GRAY, D. M., WEN, J.-D., GRAY, C. W., REPGES, R., REPGES, C., RAABE, G., & FLEISCHHAUER, J. (2008). Measured and calculated CD spectra of G-quartets stacked with the same or opposite polarities. *Chirality*, **20**(3–4), 431–440. <https://doi.org/10.1002/chir.20455>

- GUSCHLBAUER, W., CHANTOT, J.-F., & THIELE, D. (1990). Four-Stranded Nucleic Acid Structures 25 Years Later: From Guanosine Gels to Telomer DNA. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **8**(3), 491–511. <https://doi.org/10.1080/07391102.1990.10507825>
- HANZLÍKOVÁ, J., PRAUS, P., & BAUMRUK, V. (1999). Raman optical activity spectrometer for peptide studies. *Journal of Molecular Structure*, **480–481**, 431–435. [https://doi.org/10.1016/S0022-2860\(98\)00718-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2860(98)00718-2)
- HECHT, L., BARRON, L. D., & HUG, W. (1989). Vibrational Raman optical activity in backscattering. *Chemical Physics Letters*, **158**(5), 341–344. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(89\)87348-8](https://doi.org/10.1016/0009-2614(89)87348-8)
- HIGHTOWER, J. B., OLMOS, D. R., & WALMSLEY, J. A. (2009). Supramolecular Structure and Polymorphism of Alkali Metal Salts of Guanosine 5'-Monophosphate: SEM and NMR Study. *The Journal of Physical Chemistry B*, **113**(36), 12214–12219. <https://doi.org/10.1021/jp904383y>
- HUBÁLKOVÁ, P. (2015). G-kvadruplexy v oblasti lidských telomer a jejich terapeutický potenciál. *Chemické Listy*, **109**(12), 918–922.
- HUG, W. (2003). Virtual Enantiomers as the Solution of Optical Activity's Deterministic Offset Problem. *Applied Spectroscopy*, **57**(1), 1–13. <https://doi.org/10.1366/000370203321165142>
- HUG, W., & HANGARTNER, G. (1999). A novel high-throughput Raman spectrometer for polarization difference measurements. *Journal of Raman Spectroscopy*, **30**(9), 841–852. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4555\(199909\)30:9<841::AID-JRS456>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4555(199909)30:9<841::AID-JRS456>3.0.CO;2-1)
- HUG, W., KINT, S., BAILEY, G. F., & SCHERER, J. R. (1975). Raman circular intensity differential spectroscopy. Spectra of (-)-.alpha.-pinene and (+)-.alpha.-phenylethylamine. *Journal of the American Chemical Society*, **97**(19), 5589–5590. <https://doi.org/10.1021/ja00852a049>
- JÍLEK, Š. (2019). Vibrační optická aktivita 3-aminoquinclidinu. *Bakalářská práce*. Univerzita Karlova.
- KAPITÁN, J. (2006). Teoretický a experimentální rozvoj Ramanovy optické aktivity jako metody studia biomolekul ve vodném prostředí. *Dizertační práce*. Univerzita Karlova.
- KEIDERLING, T. (2018). Instrumentation for Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy: Method Comparison and Newer Developments. *Molecules*, **23**(9), 2404. <https://doi.org/10.3390/molecules23092404>
- KESSLER, J., KAPITÁN, J., & BOUŘ, P. (2015). First-Principles Predictions of Vibrational Raman Optical Activity of Globular Proteins. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, **6**(16), 3314–3319. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.5b01500>

- KRUPOVÁ, M., KESSLER, J., & BOUŘ, P. (2020). Recent Trends in Chiroptical Spectroscopy: Theory and Applications of Vibrational Circular Dichroism and Raman Optical Activity. *ChemPlusChem*, **85**(3), 561–575. <https://doi.org/10.1002/cplu.202000014>
- KYPR, J., KEJNOVSKÁ, I., BEDNÁŘOVÁ, K., & VORLÍČKOVÁ, M. (2012). Circular Dichroism Spectroscopy of Nucleic Acids. In N. Berova, P. L. Polavarapu, K. Nakanishi, & R. W. Woody (Eds.), *Comprehensive Chiroptical Spectroscopy* (pp. 575–586). Hoboken: John Wiley & Sons, Inc. ISBN 9781118012925. <https://doi.org/10.1002/9781118120392.ch17>
- LAM, E. Y. N., BERALDI, D., TANNAHILL, D., & BALASUBRAMANIAN, S. (2013). G-quadruplex structures are stable and detectable in human genomic DNA. *Nature Communications*, **4**(1), 1796. <https://doi.org/10.1038/ncomms2792>
- LARKIN, P. (2011). *Infrared and Raman Spectroscopy* (1st ed.). Boston: Elsevier. ISBN 9780123869845. <https://doi.org/10.1016/C2010-0-68479-3>
- LIPPS, H. J., & RHODES, D. (2009). G-quadruplex structures: in vivo evidence and function. *Trends in Cell Biology*, **19**(8), 414–422. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.05.002>
- LUNDBLAD, R., & MACDONALD, F. (Eds.). (2010). *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology* (4th ed.). Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780429185670. <https://doi.org/10.1201/b10501>
- MALINOWSKI, E. R. (2002). *Factor Analysis in Chemistry* (3rd ed.). New York: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 0-471-13479-1
- MARTIN, R. B. (1996). Comparisons of Indefinite Self-Association Models. *Chemical Reviews*, **96**(8), 3043–3064. <https://doi.org/10.1021/cr960037v>
- MUDROŇOVÁ, K., ŘÍMAL, V., & MOJZEŠ, P. (2016). Effect of ribose versus 2'-deoxyribose residue in guanosine 5'-monophosphates on formation of G-quartets stabilized by potassium and sodium cations. *Vibrational Spectroscopy*, **82**, 60–65. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2015.12.002>
- MUTTER, S. T., ZIELINSKI, F., POPELIER, P. L. A., & BLANCH, E. W. (2015). Calculation of Raman optical activity spectra for vibrational analysis. *The Analyst*, **140**(9), 2944–2956. <https://doi.org/10.1039/C4AN02357A>
- NAFIE, L. A. (2011). *Vibrational Optical Activity*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9781119976516. <https://doi.org/10.1002/9781119976516>
- NAFIE, L. A., & DUKOR, R. K. (2002). The Use of Dual Polarization Modulation in Vibrational Circular Dichroism Spectroscopy. In J. M. Hicks (Ed.), *Chirality: Physical Chemistry* (pp. 79–88). Washington D.C.: American Chemical Society. ISBN 9780841237377 <https://doi.org/10.1021/bk-2002-0810.ch006>
- NAFIE, L. A., YU, G.-S., QU, X., & FREEDMAN, T. B. (1994). Comparison of IR and Raman forms of vibrational optical activity. *Faraday Discussions*, **99**, 13–34. <https://doi.org/10.1039/fd9949900013>

- NAKAYAMA, S., KELSEY, I., WANG, J., & SINTIM, H. O. (2011). c-di-GMP can form remarkably stable G-quadruplexes at physiological conditions in the presence of some planar intercalators. *Chemical Communications*, *47*(16), 4766. <https://doi.org/10.1039/c0cc05432a>
- NASDALA, L., SMITH, D. C., KAINDL, R., & ZIEMANN, M. A. (2004). Raman spectroscopy: Analytical perspectives in mineralogical research. In *Spectroscopic methods in mineralogy* (pp. 281–343). Mineralogical Society of Great Britain and Ireland. <https://doi.org/10.1180/EMU-notes.6.7>
- NEIDLE, S. (2011). *Therapeutic Applications of Quadruplex Nucleic Acids* (1st ed.). Oxford: Academic Press. ISBN 9780123751386
- NEIDLE, S., & BALASUBRAMANIAN, S. (2007). *Quadruplex Nucleic Acids* (S. Neidle & S. Balasubramanian (Eds.)). Royal Society of Chemistry. ISBN 978-0-85404-374-3. <https://doi.org/10.1039/9781847555298>
- NELSON, D. L., COX, M. M., & LEHNINGER, A. L. (2017). *Lehninger principles of biochemistry* (7th ed.). Basingstoke: Macmillan Higher Education. ISBN 978-1-4641-2611-6.
- NEUROHR, K. J., & MANTSCH, H. H. (1979). The self-association of naturally occurring purine nucleoside 5'-monophosphates in aqueous solution. *Canadian Journal of Chemistry*, *57*(15), 1986–1994. <https://doi.org/10.1139/v79-318>
- NOVOTNÁ, J., GONCHAROVA, I., & URBANOVÁ, M. (2012). Supramolecular arrangement of guanosine/5'-guanosine monophosphate binary mixtures studied by methods of circular dichroism. *Chirality*, *24*(5), 432–438. <https://doi.org/10.1002/chir.22045>
- NOVOTNÁ, J., GONCHAROVA, I., & URBANOVÁ, M. (2014). Guanosine assemblies: newly used matrices for chiroptical studies on biliverdin. *Supramolecular Chemistry*, *26*(1), 7–14. <https://doi.org/10.1080/10610278.2013.814774>
- OSBORNE, G. A., CHENG, J. C., & STEPHENS, P. J. (1973). A Near-Infrared Circular Dichroism and Magnetic Circular Dichroism Instrument. *Review of Scientific Instruments*, *44*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1063/1.1685944>
- OSTOVARPOUR, S., & BLANCH, E. W. (2012). Phosphorylation Detection and Characterization in Ribonucleotides Using Raman and Raman Optical Activity (ROA) Spectroscopies. *Applied Spectroscopy*, *66*(3), 289–293. <https://doi.org/10.1366/11-06467>
- PALACKÝ, J., MOJZEŠ, P., & BOK, J. (2011). SVD-based method for intensity normalization, background correction and solvent subtraction in Raman spectroscopy exploiting the properties of water stretching vibrations. *Journal of Raman Spectroscopy*, *42*(7), 1528–1539. <https://doi.org/10.1002/jrs.2896>
- PROSSER, V. (1989). *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia. ISBN 80-200-0059-3

SAENGER, W. (1984). *Principles of Nucleic Acid Structure*. New York: Springer. ISBN 978-0-387-90761-1. <https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5190-3>

SASISEKHARAN, V., ZIMMERMAN, S., & DAVIES, D. R. (1975). The structure of helical 5'-guanosine monophosphate. *Journal of Molecular Biology*, **92**(2), 171–179. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(75\)90221-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90221-1)

SCHRADER, B. (1995). *Infrared and Raman Spectroscopy* (B. Schrader (Ed.)). New York: Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBN 9783527615438. <https://doi.org/10.1002/9783527615438>

SHABAROVA, Z., & BOGDANOV, A. (n.d.). Properties of Nucleotides. In *Advanced Organic Chemistry of Nucleic Acids* (pp. 93–180). New York: Wiley-VCH Verlag GmbH. ISBN 9783527290215. <https://doi.org/10.1002/9783527615933.ch04>

SIGEL, H., MASSOUD, S. S., & TRIBOLET, R. (1988). Comparison of the metal ion coordinating properties of tubercidin 5'-monophosphate (7-deaza-AMP) with those of adenosine 5'-monophosphate (AMP) and 1,N6-ethenoadenosine 5'-monophosphate (ϵ -AMP). Definite evidence for metal ion-base-backbinding to. *Journal of the American Chemical Society*, **110**(20), 6857–6865. <https://doi.org/10.1021/ja00228a040>

SIMONSSON, T. (2001). G-Quadruplex DNA Structures Variations on a Theme. *Biological Chemistry*, **382**(4). <https://doi.org/10.1515/BC.2001.073>

SKÁLA, L. (1995). *Kvantové teorie molekul*. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-007-6.

SMITH, E., & DENT, G. (2019). *Modern Raman Spectroscopy* (2nd ed.). Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9781119440550. <https://doi.org/10.1002/9781119440598>

SPENCER, K. M., FREEDMAN, T. B., & NAFIE, L. A. (1988). Scattered circular polarization Raman optical activity. *Chemical Physics Letters*, **149**(4), 367–374. [https://doi.org/10.1016/0009-2614\(88\)85109-1](https://doi.org/10.1016/0009-2614(88)85109-1)

STEPHENS, P. J., DEVLIN, F. J., & CHEESEMAN, J. R. (2012). *VCD Spectroscopy for Organic Chemists*. Boca Raton: CRC Press. ISBN 9780429094514. <https://doi.org/10.1201/b12278>

TAILLANDIER, E., & LIQUIER, J. (2006). Vibrational Spectroscopy of Nucleic Acids. In J. M. Chalmers (Ed.), *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/0470027320.s8204>

TAM, C. N., BOUŘ, P., & KEIDERLING, T. A. (1997). An Experimental Comparison of Vibrational Circular Dichroism and Raman Optical Activity with 1-Amino-2-propanol and 2-Amino-1-propanol as Model Compounds. *Journal of the American Chemical Society*, **119**(30), 7061–7064. <https://doi.org/10.1021/ja963239h>

TRIBOLET, R., & SIGEL, H. (1987). Self-association of adenosine 5'-monophosphate (5'-AMP) as a function of pH and in comparison with adenosine, 2'-AMP and 3'-AMP. *Biophysical Chemistry*, **27**(2), 119–130. [https://doi.org/10.1016/0301-4622\(87\)80052-2](https://doi.org/10.1016/0301-4622(87)80052-2)

URIDINE-MONOPHOSPHATE. *Wikipedia*. [Online]. [vid. 2021-7-20]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Uridine_monophosphate

VOET, D., & VOET, J. G. (2010). *Biochemistry* (4th ed.). John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 978-0470-57095-1.

WEAVER, J. L., & WILLIAMS, R. W. (1988). Raman spectroscopic measurement of base stacking in solutions of adenosine, AMP, ATP, and oligoadenylates. *Biochemistry*, **27**(25), 8899–8903. <https://doi.org/10.1021/bi00425a005>

WU, G., & KWAN, I. C. M. (2009). Helical Structure of Disodium 5'-Guanosine Monophosphate Self-Assembly in Neutral Solution. *Journal of the American Chemical Society*, **131**(9), 3180–3182. <https://doi.org/10.1021/ja809258y>

YAN, K., GAO, L.-N., Cui, Y.-L., ZHANG, Y., & ZHOU, X. (2016). The cyclic AMP signaling pathway: Exploring targets for successful drug discovery (Review). *Molecular Medicine Reports*, **13**(5), 3715–3723. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5005>

ZHANG, M., PERELSON, A. S., & TUNG, C.-S. (2011). RNA Structural Motifs. In *eLS*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0003132.pub2>

ZHANG, Z., KIM, S., GAFFNEY, B. L., & JONES, R. A. (2006). Polymorphism of the Signaling Molecule c-di-GMP. *Journal of the American Chemical Society*, **128**(21), 7015–7024. <https://doi.org/10.1021/ja0613714>

Seznam obrázků

Obrázek 1: Dusíkaté báze – pyrimidinové (nahore), purinové (dole), potenciální donory vodíkových vazeb (červeně) a potenciální akceptory vodíkových vazeb (zeleně);.....	9
Obrázek 2: Tautomerizace bází v DNA, převzato z (Bhagavan, 2002)	10
Obrázek 3: a) β -D-ribosa, b) β -D-2-deoxyribosa, převzato a upraveno z (Bruce, 2008)	10
Obrázek 4: Příklady různě fosforylovaných adenosinů: a) Adenosin-2'-monofosfát, b) Adenosin-3'-monofosfát, c) Adenosin-5'-monofosfát, d) Adenosintrifosfát (ATP), e) Cyklický adenosinmonofosfát (cAMP)	12
Obrázek 5: Příklady biologicky významných látek obsahujících ve své struktuře nukleotidy: a) NAD v oxidované formě (NAD^+), b) puromycin , c) FAD v oxidované formě (FAD); upraveno z (Voet & Voet, 2010)	13
Obrázek 6: Konformace syn a anti guaninu; upraveno z (Adams et al., 1992).....	13
Obrázek 7: Čtyři hlavní konformace cukru; upraveno z (Saenger, 1984).....	14
Obrázek 8: Torzní úhly nukleotidu <i>vi</i> ; upraveno z (Saenger, 1984).....	15
Obrázek 9: Struktura guaninové tetrády (G-tetráda); upraveno z (Neidle, 2011)....	16
Obrázek 10: Možnosti uspořádání G-kvadruplexů podle uspořádání a počtu vláken nukleových kyselin, (A) – tetramolekulární paralelní, (B) – bimolekulární antiparalelní, (C) – monomolekulární antiparalelní, (D) – monomolekulární paralelní, (E) – jiný typ monomolekulárního antiparalelního a (F) – monomolekulární smíšený G-kvadruplex; převzato z (Hubálková, 2015).....	17
Obrázek 11: Kationt vyskytující se mezi dvěma G-tetrádami (vlevo) a v centrální dutině jedné G-tetrády (vpravo); převzato z (Neidle & Balasubramanian, 2007).....	18
Obrázek 12: Uridin-5'-monofosfát (5'-rUMP), * značí chirální uhlíky; upraveno z (Uridine-monophosphate)	19
Obrázek 13: Nukleotidový řetězec DNA se sekvencí A – adenin, T – thymin a G – guanin, dihedrální úhly označeny řeckými písmeny; upraveno z (Nelson et al., 2017)	20
Obrázek 14: Watsonovo-Cricko párování bází; upraveno z (Voet & Voet, 2010) ..	21
Obrázek 15: Srovnání A-, B- a Z-formy DNA; upraveno z (Nelson et al., 2017) ...	23

Obrázek 16: Schéma energetických přechodů mezi vibračními stavy při infračervené absorpci, Rayleighově a Ramanově rozptylu, převzato z (Jílek, 2019).....	32
Obrázek 17: Příklad Ramanova spektra s oběma částmi – Stokesova a anti-Stokesova; upraveno z (Nasdala et al., 2004).....	34
Obrázek 18: Geometrie Ramanova spektrometru: a) pravoúhlá geometrie, b) geometrie zpětného rozptylu; upraveno z (Larkin, 2011).....	35
Obrázek 19: Schéma Michelsonova interferometru, ; upraveno z (Larkin, 2011)...	37
Obrázek 20: Metody měření ROA; upraveno z (Nafie, 2011)	40
Obrázek 21: Energetické znázornění přechodu ze základního E_0 do prvního excitovaného stavu E_1 molekuly, způsobené levotočivě a pravotočivě kruhově polarizovaným světlem, upraveno z (Nafie, 2011)	44
Obrázek 22: Ramanovo (spodní) a ROA (horní) spektrum 5'-rAMP; převzato a upraveno z (Ostovarpour & Blanch, 2012)	62
Obrázek 23: Ramanovo a ROA spektrum plně disociované formy adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP ²⁻); ROA – nahoře (červená), Raman – dole (černá).....	63
Obrázek 24: Srovnání Ramanových a ROA spekter 5'-rAMP ²⁻ publikovaných (nahore, převzato a upraveno z (Ostovarpour & Blanch, 2012)) s našimi experimentálními spektry (dole); Raman – spodní spektrum, ROA – horní spektrum	64
Obrázek 25: Srovnání experimentálních a simulovaných spekter plně disociované formy adenosin-5'-monofosfátu (5'-rAMP ²⁻); ROA spektra – nahoře, Ramanova spektra – dole; (černá – experiment, zelená – simulace)	65
Obrázek 26: Ramanova spektra adenosinu při různých hodnotách pH (viz škála) ..	67
Obrázek 27: Výsledky faktorové analýzy adenosinu: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole).....	68
Obrázek 28: Relativní zastoupení dvou nábojových forem adenosinu při různém pH včetně pK_A konstanty přechodu	69
Obrázek 29: Ramanova spektra dvou nabitých forem adenosinu; neutrální forma – černá, jednou kladně nabitá forma – červená.....	70
Obrázek 30: Ramanova spektra 5'-rAMP při různých hodnotách pH (viz škála)....	72

Obrázek 31: Výsledky faktorové analýzy 5'-rAMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole) ...	73
Obrázek 32: Relativní zastoupení nábojových forem 5'-rAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant; 5'-rAMP H_3^{1+} (červená), 5'-rAMP H_2 (černá), 5'-rAMP H^{1-} (modrá), 5'-rAMP $^{2-}$ (zelená)	75
Obrázek 33: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem adenosin-5'-monofosfátu; 5'-rAMP H_3^{1+} (červená), 5'-rAMP H_2 (černá), 5'-rAMP H^{1-} (modrá), 5'-rAMP $^{2-}$ (zelená)	76
Obrázek 34: Ramanova spektra nábojových forem adenosin-5'-monofosfátu seskupená po dvojicích odpovídající přechodům mezi sousedními nábojovými formami; 5'-rAMP $^{2-}$ (zelená), 5'-rAMP H^{1-} (modrá), 5'-rAMP H_2 (černá), 5'-rAMP H_3^{1+} (červená)	77
Obrázek 35: Naměřená Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra nábojových forem 5'-rAMP; 5'-rAMP $^{2-}$ (zelená), 5'-rAMP H^{1-} (modrá), 5'-rAMP H_2 (černá)	79
Obrázek 36: Oblast valenčních vodíkových vibrací Ramanových spekter nábojových forem 5'-rAMP; 5'-rAMP $^{2-}$ (zelená), 5'-rAMP H^{1-} (modrá), 5'-rAMP H_2 (černá)	80
Obrázek 37: Ramanova spektra různě fosforylovaných forem adenosinu zobrazena v překryvu; 5'-rAMP $^{2-}$ (černá), 3'-rAMP $^{2-}$ (červená), 2'-rAMP $^{2-}$ (modrá), Adenosin (zelená)	86
Obrázek 38: Ramanova spektra různě fosforylovaných forem adenosinu; 5'-rAMP $^{2-}$ (černá), 3'-rAMP $^{2-}$ (červená), 2'-rAMP $^{2-}$ (modrá), Adenosin (zelená)	87
Obrázek 39: Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra plně disociovaných forem 5'-rAMP a 5'-dAMP; 5'-rAMP $^{2-}$ (černá), 5'-dAMP $^{2-}$ (červená)	89
Obrázek 40: Oblast valenčních vodíkových vibrací Ramanových spekter plně disociovaných forem 5'-rAMP a 5'-dAMP; 5'-rAMP $^{2-}$ (černá), 5'-dAMP $^{2-}$ (červená)	90
Obrázek 41: Ramanova spektra jednou protonovaných forem 5'-rGMP a 5'-dGMP; 5'-rGMP $^{2-}$ (černá), 5'-dGMP $^{2-}$ (červená)	91
Obrázek 42: Ramanova spektra plně disociovaných forem 5'-rCMP a 5'-dCMP; 5'-rCMP $^{2-}$ (černá), 5'-dCMP $^{2-}$ (červená)	92
Obrázek 43: Teoretický model relativního zastoupení jednotlivých merů 5'-rAMP (dole) a 5'-rGMP (nahore) v různých koncentracích roztoku; (A) $_1$ – monomery	

(černá), (A) ₂ – dimery (červená), (A) ₃ – trimery (modrá), (A) ₄ – tetramery (zelená), (A) ₅ – pentamery (fialová), (A) ₆ – hexamery (tmavě žlutá), (A) ₇ – heptamery (tyrkysová)	96
Obrázek 44: Ramanova spektra 5'-rAMP ²⁻ při různých koncentracích (viz barvy).	97
Obrázek 45: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-rAMP ²⁻ : Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)	98
Obrázek 46: Ramanova spektra 5'-rAMP ²⁻ pro dvě různé koncentrace; 12.5 mM – zelená, 2710 mM – červená	99
Obrázek 47: Ramanova spektra 5'-dGMP ²⁻ při různých koncentracích (viz barvy)	101
Obrázek 48: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-dGMP ²⁻ : Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)	102
Obrázek 49: Ramanova spektra 5'-dGMP ²⁻ pro dvě různé koncentrace; 12.5 mM – černá, 1000 mM – červená	103
Obrázek 50: Ramanova spektra 5'-rGMP ²⁻ při různých koncentracích (viz barvy)	104
Obrázek 51: Výsledky faktorové analýzy koncentračního měření 5'-rGMP ²⁻ : Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (šedé body), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na logaritmu koncentrace (vpravo dole)	105
Obrázek 52: Ramanova spektra 5'-rGMP ²⁻ pro tři různé koncentrace seskupená po dvojicích; 12.5 mM – černá, 460 mM – červená a 1510 mM – zelená.....	107
Obrázek 53: Ramanova spektra 5'-dGMP ²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky Na ⁺ iontů; c = 100 mM (odstíny modré), c = 500 mM (odstíny zelené), c = 1000 mM (odstíny červené).....	109
Obrázek 54: Výsledky faktorové analýzy vlivu Na ⁺ iontů na 5'-dGMP ²⁻ : Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na ⁺ iontů (vpravo dole).....	110

Obrázek 55: Ramanova spektra $5'$ -rGMP ²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky Na ⁺ iontů; c = 100 mM (odstíny modré), c = 500 mM (odstíny zelené), c = 1000 mM (odstíny červené).....	111
Obrázek 56: Výsledky faktorové analýzy vlivu Na ⁺ iontů na $5'$ -rGMP ²⁻ : Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na ⁺ iontů (vpravo dole).....	112
Obrázek 57: Srovnání Ramanových spekter bez přítomnosti Na ⁺ (0 mM, černá) s nadbytkem Na ⁺ iontů (750 mM, červená) pro 500 mM koncentraci $5'$ -rGMP ²⁻ ...	113
Obrázek 58: Ramanova spektra $5'$ -dGMP ²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky K ⁺ iontů; c = 100 mM (odstíny modré), c = 500 mM (odstíny zelené), c = 1000 mM (odstíny červené).....	115
Obrázek 59: Výsledky faktorové analýzy vlivu K ⁺ iontů na $5'$ -dGMP ²⁻ : Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na ⁺ a K ⁺ iontů (vpravo dole).....	116
Obrázek 60: Srovnání Ramanových spekter bez přítomnosti K ⁺ iontů (černá) s nadbytkem K ⁺ iontů (750 mM, červená) pro 500 mM koncentraci $5'$ -dGMP ²⁻	117
Obrázek 61: Ramanova spektra $5'$ -rGMP ²⁻ pro koncentrace 100, 500 a 1000 mM s různými nadbytky K ⁺ iontů; c = 100 mM (odstíny modré), c = 500 mM (odstíny zelené), c = 1000 mM (odstíny červené).....	118
Obrázek 62: Výsledky faktorové analýzy vlivu K ⁺ iontů na $5'$ -rGMP ²⁻ : Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (modré body – 100 mM, šedé body – 500 mM, červené body – 1000 mM), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci Na ⁺ a K ⁺ iontů (vpravo dole).....	119
Obrázek 63: Ramanova spektra $5'$ -rGMP ²⁻ ve formě didraselné soli při různých koncentracích (viz barvy).....	120
Obrázek 64: Výsledky faktorové analýzy $5'$ -rGMP ²⁻ ve formě didraselné soli: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4, váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na celkové koncentraci vzorku (vpravo dole)	122

Obrázek 65: Ramanova spektra $5'$ -rGMP ²⁻ ve formě didraselné soli pro tři různé koncentrace seskupená po dvojicích; 25 mM – černá, 194 mM – červená a 710 mM – zelená.....	123
Obrázek 66: Ramanova spektra disodné (1510 mM, černá) a didraselné (710 mM, červená) formy $5'$ -rGMP ²⁻	125
Obrázek 67: Ramanova (dole) a ROA (nahore) spektra $5'$ -rAMP ²⁻ pro tři různé koncentrace; 50 mM – černá, 460 mM – zelená, 1500 mM – červená.....	126
Obrázek 68: ROA spektra $5'$ -rAMP ²⁻ seskupená po dvojicích pro tři různé koncentrace; 50 mM – černá, 460 mM – zelená, 1500 mM – červená.....	128
Obrázek 69: Ramanovo (dole) a ROA (nahore) spektrum $5'$ -rGMP, upraveno z (Azher, 2018)	129
Obrázek 70: Ramanovo a ROA spektrum jednou protonované formy guanosin- $5'$ -monofosfátu ($5'$ -rGMP ²⁻); Raman – dole (černá), ROA – nahore (červená).....	130
Obrázek 71: Srovnání Ramanových a ROA spekter guanosin- $5'$ -monofosfátu ($5'$ -rGMP ²⁻) publikovaných (nahore, převzato a upraveno z (Azher, 2018)) s našimi experimentálními spektry (dole); Raman – spodní spektrum, ROA – horní spektrum	132
Obrázek 72: Ramanova (dole) a ROA spektra (nahore) $5'$ -rGMP ²⁻ pro dvě různé koncentrace; 190 mM – černá, 710 mM – červená.....	135

Seznam tabulek

Tabulka 1: Strukturní prvky ideálních konformací A-, B-, a Z-DNA.....	23
Tabulka 2: Hodnoty parametrů D_i pro jednotlivá modulační schémata v geometrii zpětného rozptylu (180°), dle (Nafie, 2011).....	43
Tabulka 3: Koncentrace jednotlivých vzorků při měření koncentračních závislostí	51
Tabulka 4: Připravené vzorky nukleotidů (disodné soli) s různými nadbytky Na^+ a K^+ iontů.....	52
Tabulka 5: Připravené vzorky pro měření ROA spekter	52
Tabulka 6: Parametry experimentů pro koncentrační měření	54
Tabulka 7: Parametry experimentu pro koncentrační měření s různými poměry Na^+ a K^+	55
Tabulka 8: Hodnoty pK_A konstant pro jednotlivá pH měření 5'-rAMP.....	74
Tabulka 9: Výsledky pH závislostí nukleotidů	84
Tabulka 10: Relativní zastoupení jednotlivých merů v různých koncentracích roztoku	95

Seznam použitých zkratek

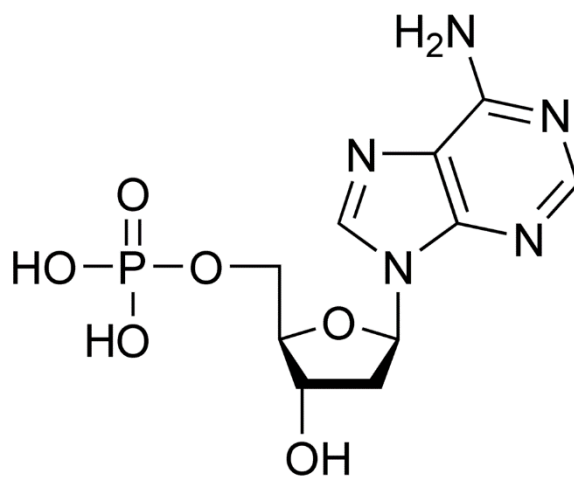
2'-rAMP	Adenosin-2'-monofosfát
3'-rAMP	Adenosin-3'-monofosfát
5'-rAMP	Adenosin-5'-monofosfát
5'-dAMP	2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát
3',5'-cAMP	Adenosin-3',5'-cyklickýmonofosfát
5'-rCMP	Cytidin-5'-monofosfát
5'-dCMP	2'-deoxycytidin-5'-monofosfát
5'-rGMP	Guanosin-5'-monofosfát
5'-dGMP	2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát
5'-dTMP	2'-deoxythymidin-5'-monofosfát
5'-rUMP	Uridin-5'-monofosfát
5'-AMP	oxy- a deoxy forma adenosin-5'-monofosfátu
5'-GMP	oxy- a deoxyforma guanosin-5'-monofosfátu
AMP	Adenosinmonofosfát
ADP	Adenosindifosfát, Adenosin-5',5'-difosfát
ATP	Adenosintrifosfát, Adenosin-5',5',5'-trifosfát
CD	Cirkulární dichroismus
CMP	Cytidinmonofosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
ECD	Elektronový cirkulární dichroismus
FAD	Flavinadenindinukleotid
G-tetráda	Guaninová tetráda či kvartet
GMP	Guanosinmonofosfát
H-vazba	Vodíková vazba, vodíkový můstek
H₂O	Voda
HCl	Kyselina chlorovodíková
IČ	Infračervená spektroskopie
IMP	Inosinmonofosfát
K⁺	Draselný kationt (iont)
KCl	Chlorid draselný
Li⁺	Lithný kationt (iont)

Na⁺Sodíkový kationt (iont)
NaCl.....Chlorid sodný
NADNikotinamidadenindinukleotid
NaOH.....Hydroxid sodný
NMRNukleární magnetická rezonance
RNARibonukleová kyselina
ROA.....Ramanova optická aktivita
VCDVibrační cirkulární dichroismus
VOA.....Vibrační optická aktivita

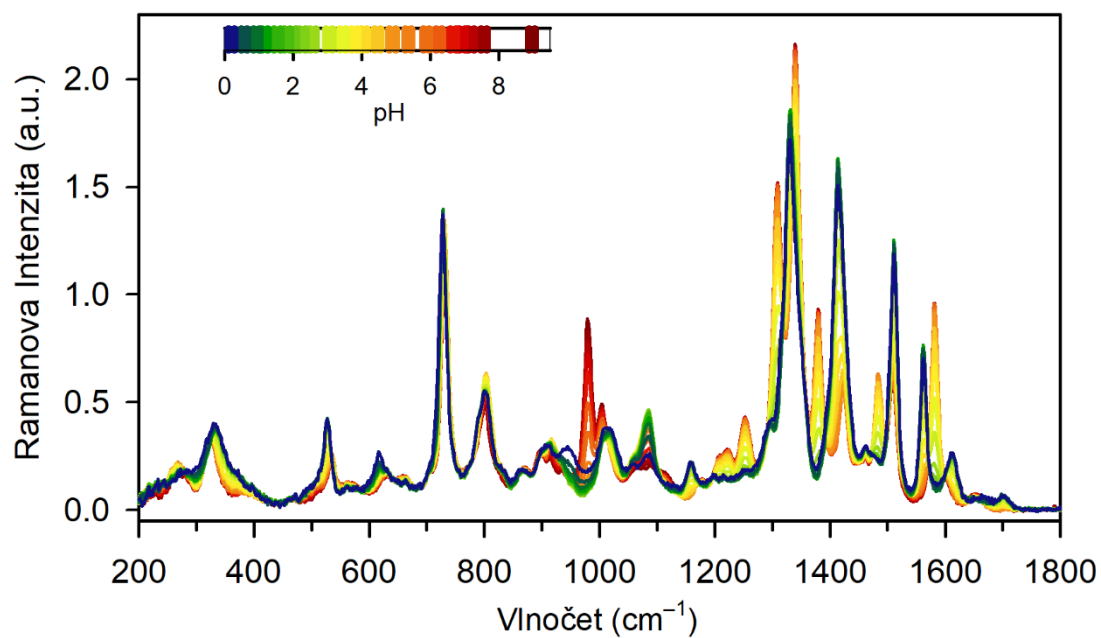
Přílohy

Seznam příloh

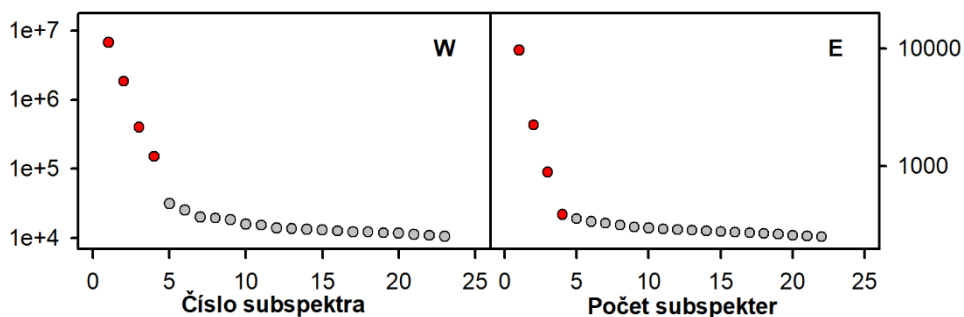
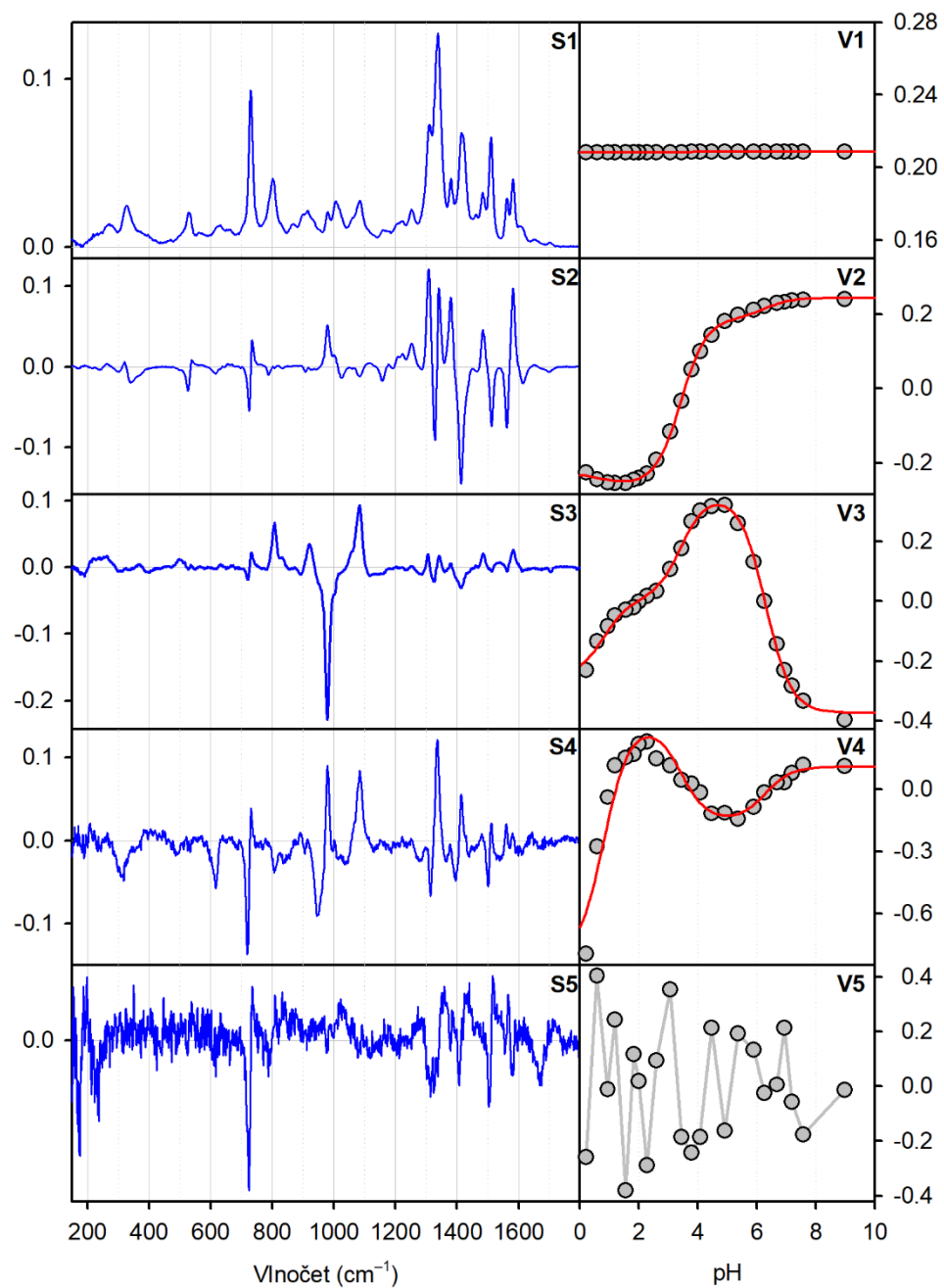
Obrázky P1a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-dAMP	157–159
Obrázky P2a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 2'-rAMP	160–162
Obrázky P3a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 3'-rAMP	163–165
Obrázky P4a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 3',5'-cAMP	166–168
Obrázky P5a–h: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-rGMP	169–173
Obrázky P6a–h: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-dGMP	174–178
Obrázky P7a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-rCMP	179–181
Obrázky P8a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-dCMP	182–184
Obrázky P9a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-dTMP	185–187
Obrázky P10a–e: Stanovení pK_A disociačních konstant 5'-rUMP	188–190



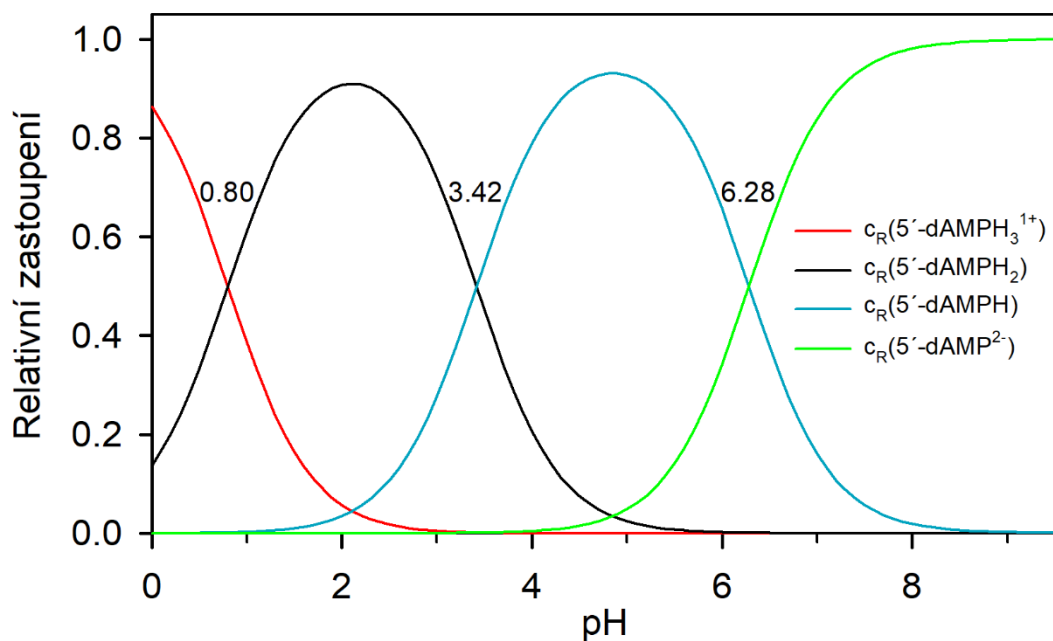
Obrázek P1a: 2'-deoxyadenosin-5'-monofosfát (5'-dAMP)



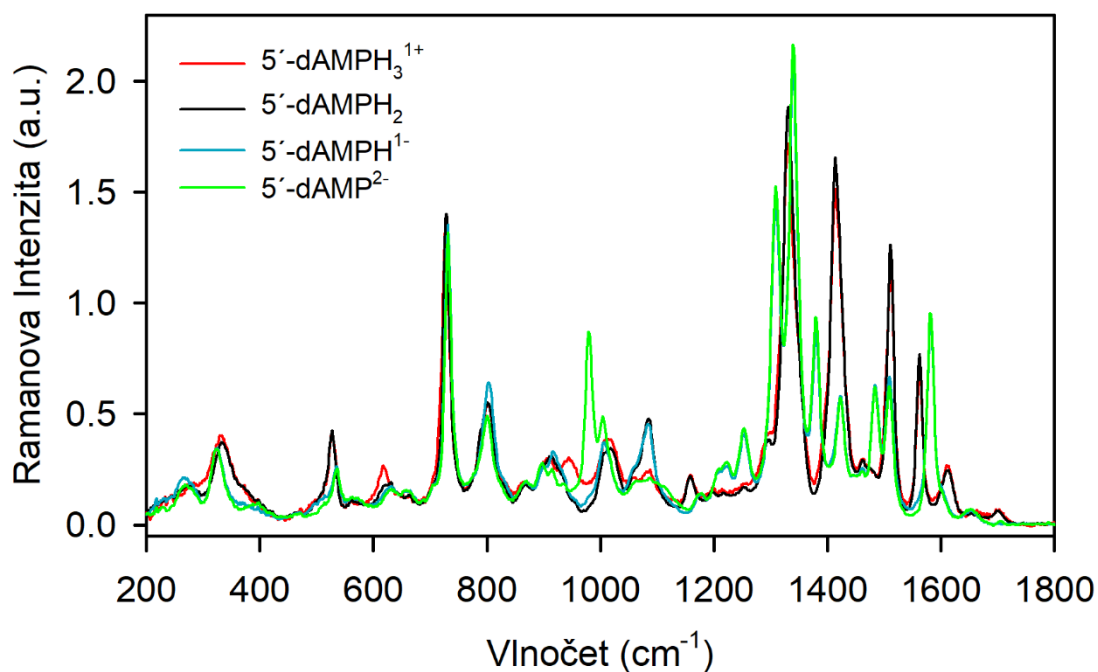
Obrázek P1b: Ramanova spektra 5'-dAMP při různých hodnotách pH (viz škála: 8.96–0.20), 20 spekter



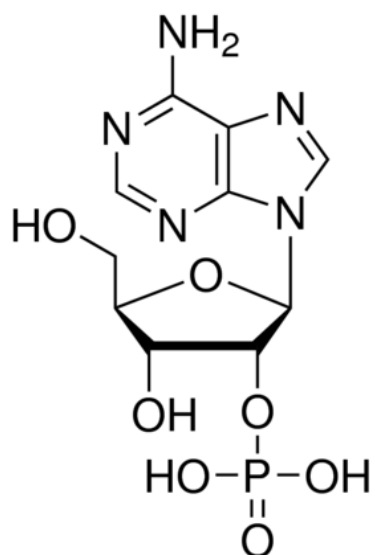
Obrázek P1c: Výsledky faktorové analýzy 5'-dAMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



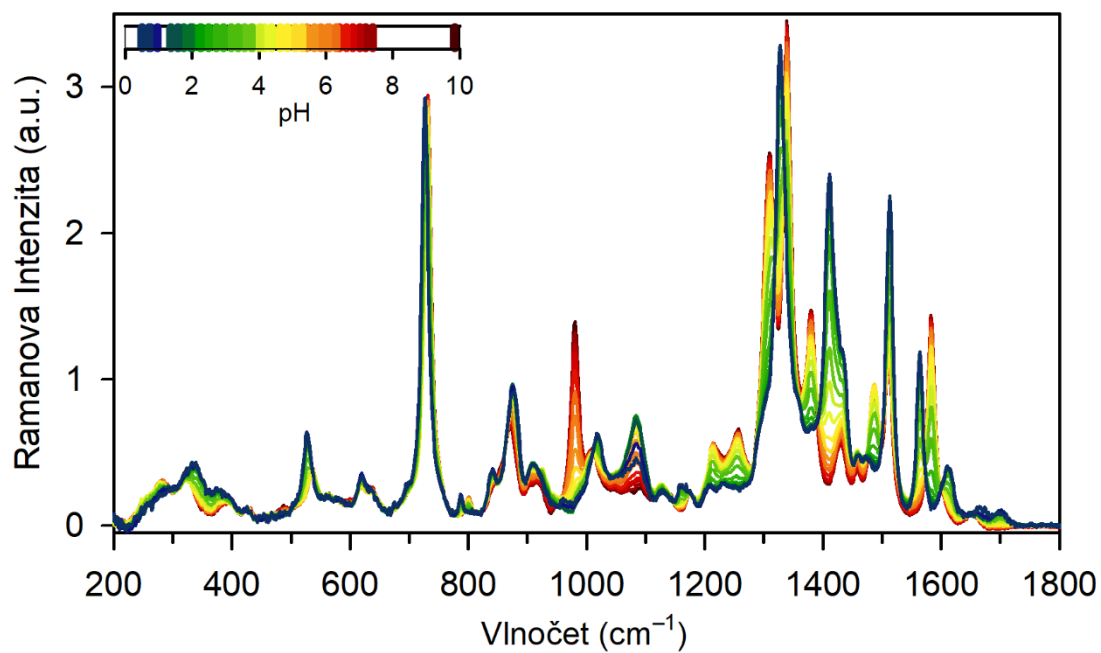
Obrázek P1d: Relativní zastoupení nábojových forem 5'-dAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



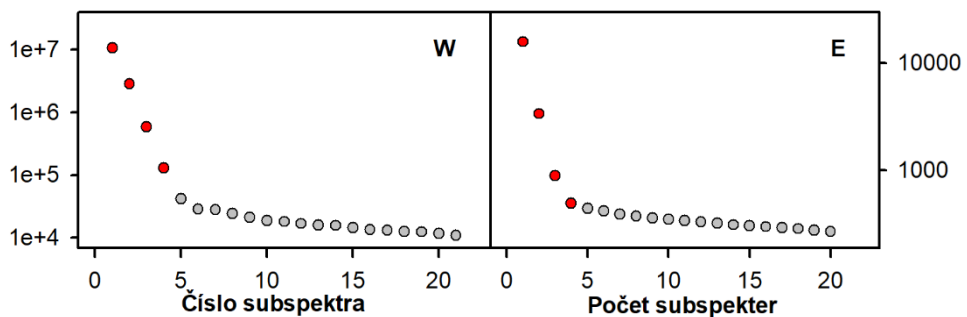
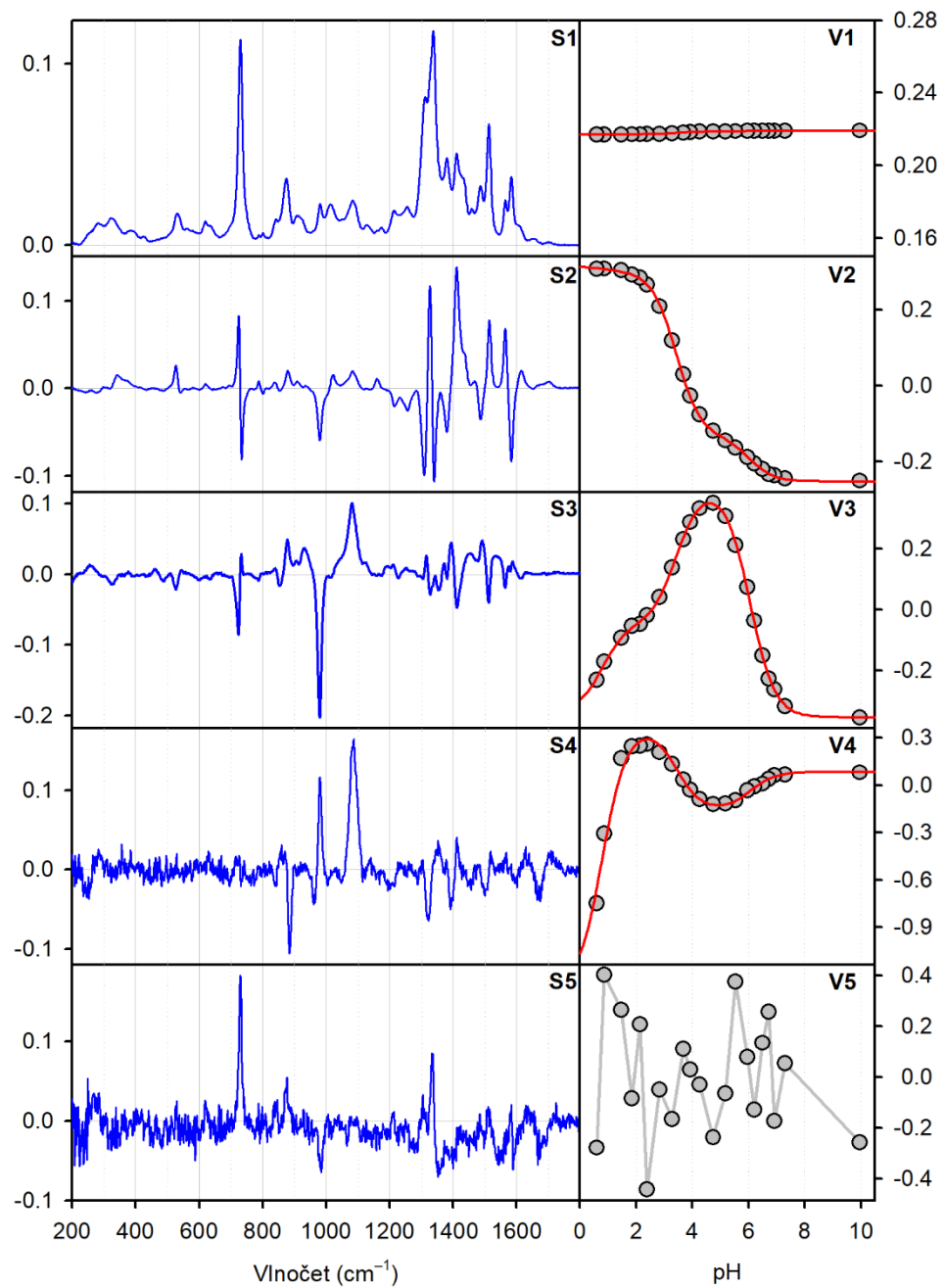
Obrázek P1e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 5'-dAMP; 5'-dAMPH $_3^{1+}$ (červená), 5'-dAMPH $_2$ (černá), 5'-dAMPH $^1-$, 5'-dAMP $^{2-}$ (zelená)



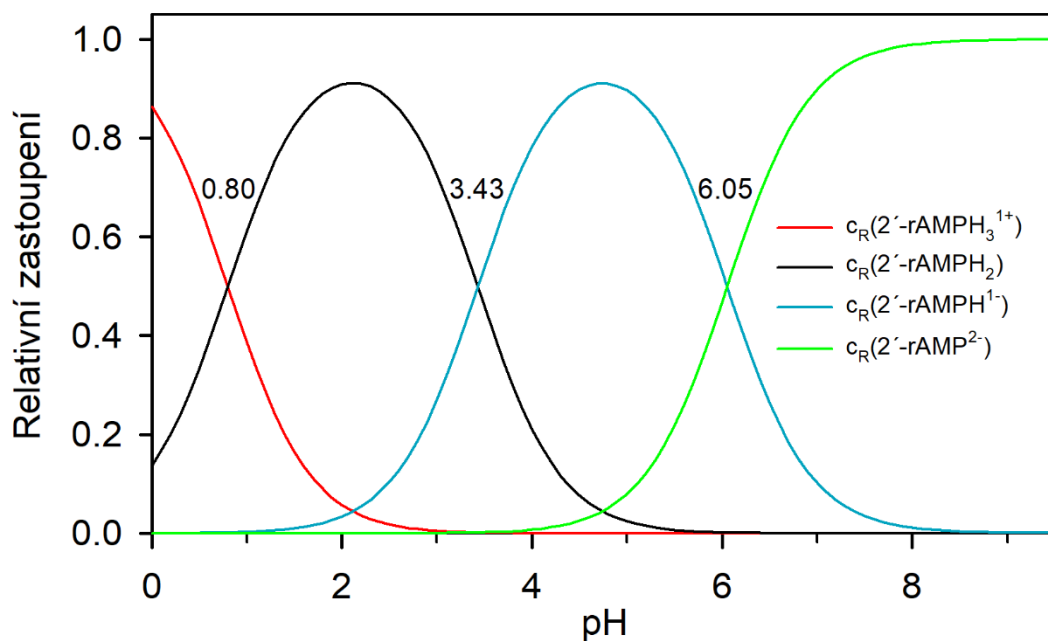
Obrázek P2a: Adenosin-2'-monofosfát (2'-rAMP)



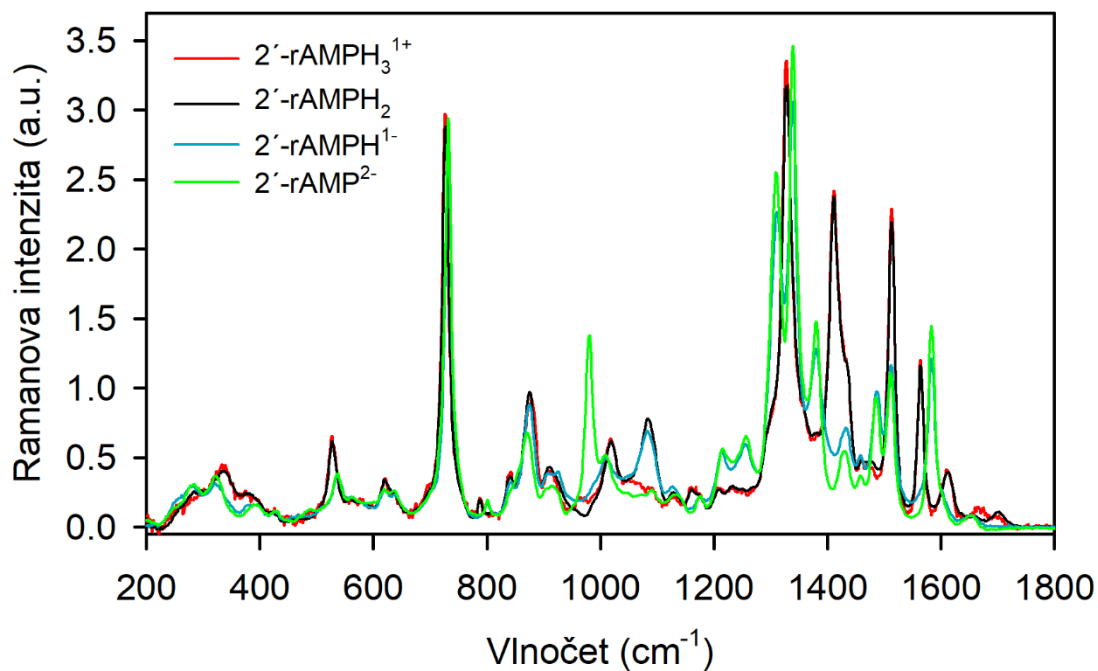
Obrázek P2b: Ramanova spektra 2'-rAMP při různých hodnotách pH (viz škála: 9.95–0.60), 21 spekter



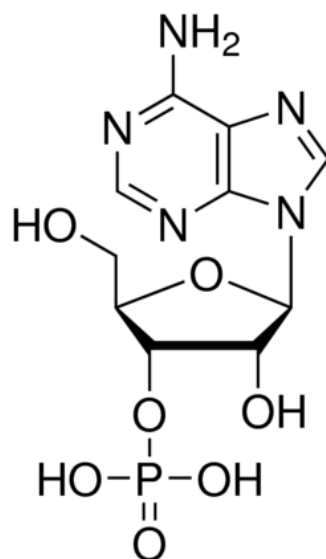
Obrázek P2c: Výsledky faktorové analýzy 2'-rAMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



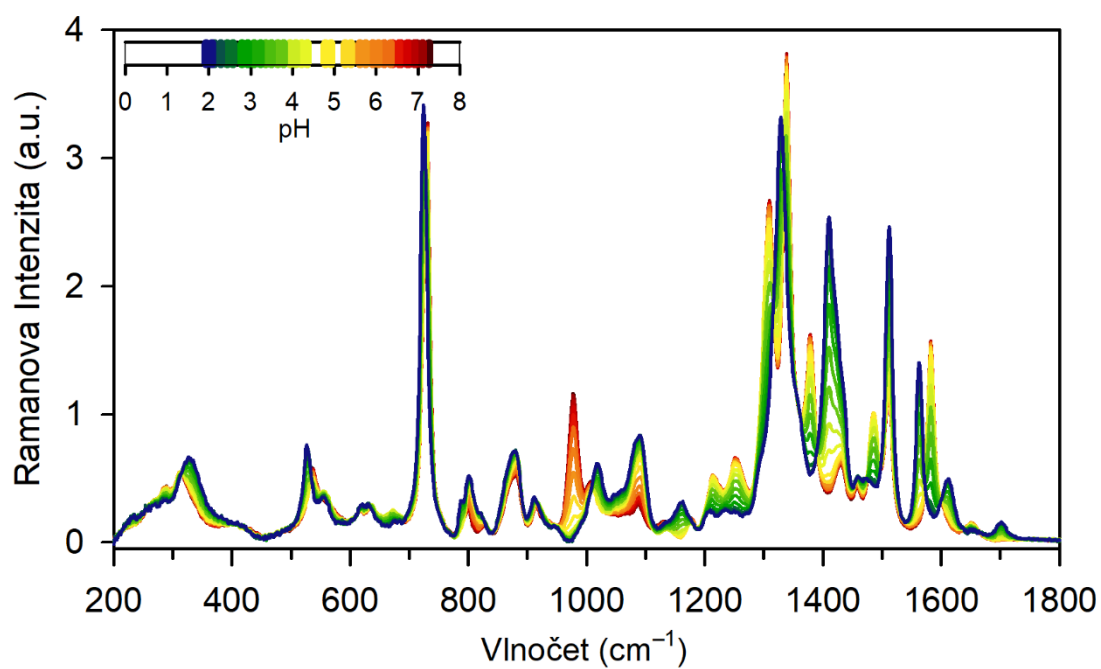
Obrázek P2d: Relativní zastoupení nábojových forem 2'-rAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



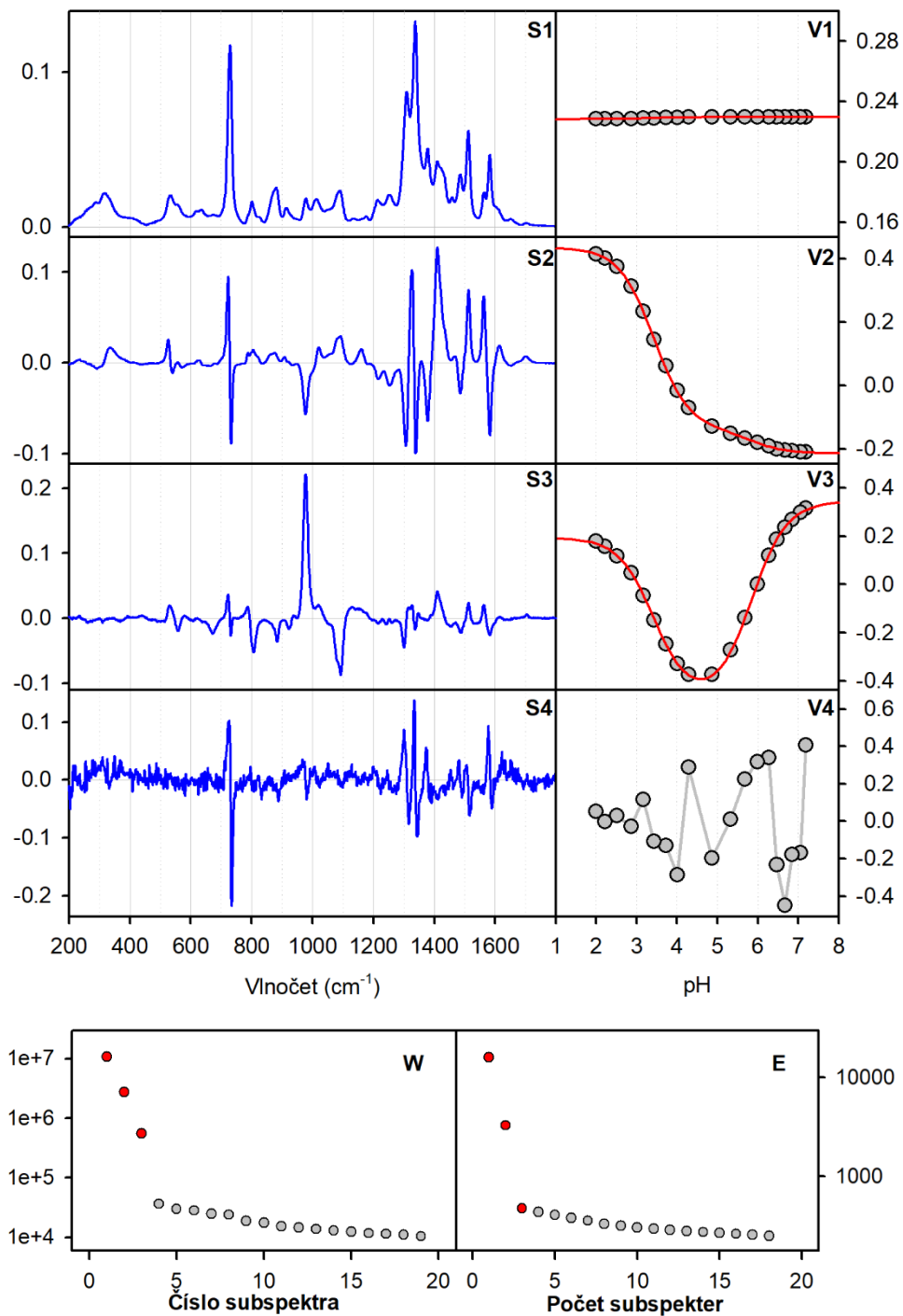
Obrázek P2e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 2'-rAMP; 2'-rAMPH $_3^{1+}$ (červená), 2'-rAMPH $_2$ (černá), 2'-rAMPH $^{1-}$ (modrá), 2'-rAMP $^{2-}$ (zelená)



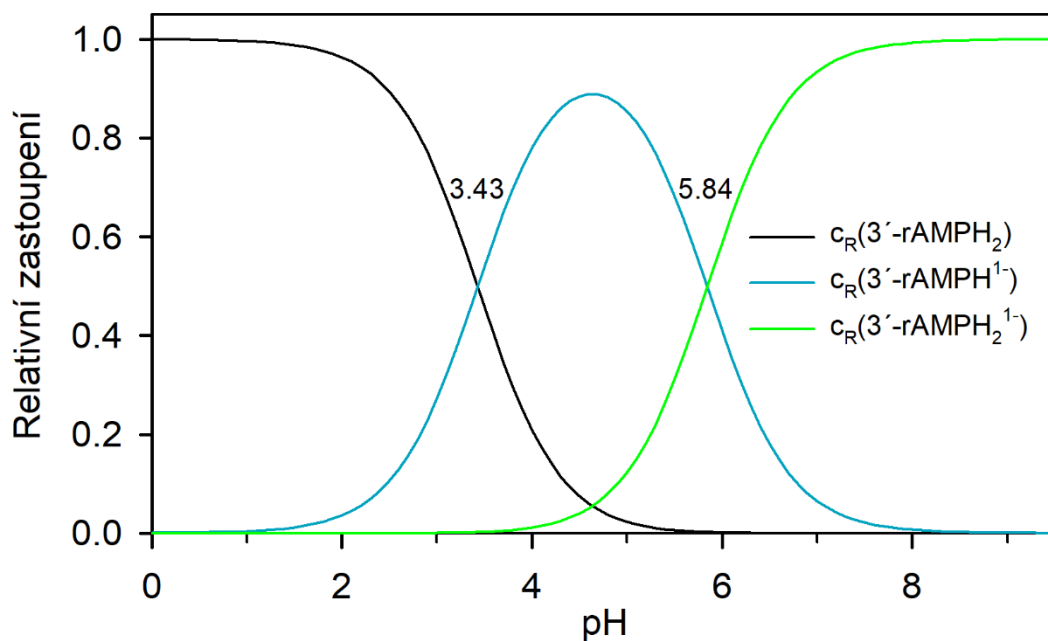
Obrázek P3a: Adenosin-3'-monofosfát (3'-rAMP)



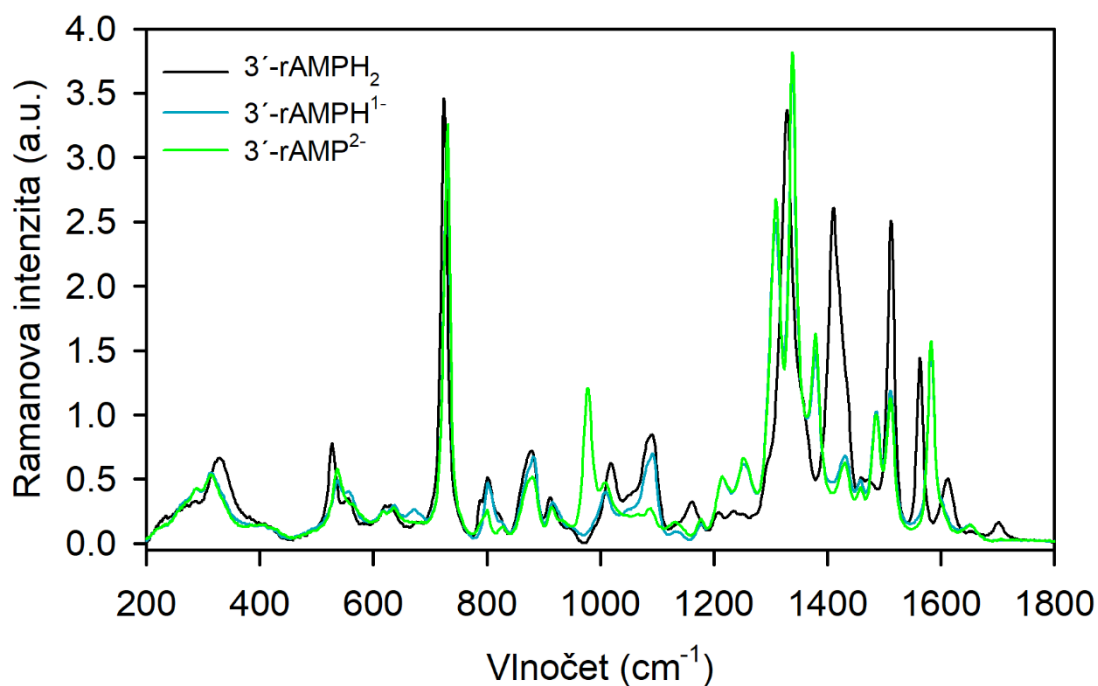
Obrázek P3b: Ramanova spektra 3'-rAMP při různých hodnotách pH (viz škála: 7.19–2.00), 19 spekter



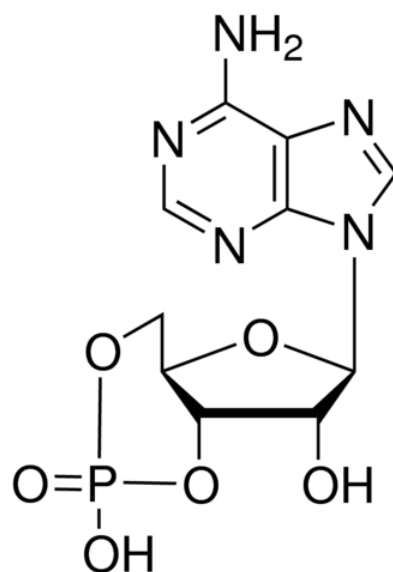
Obrázek P3c: Výsledky faktorové analýzy 3'-rAMP: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (šedé body, vpravo nahoře), fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



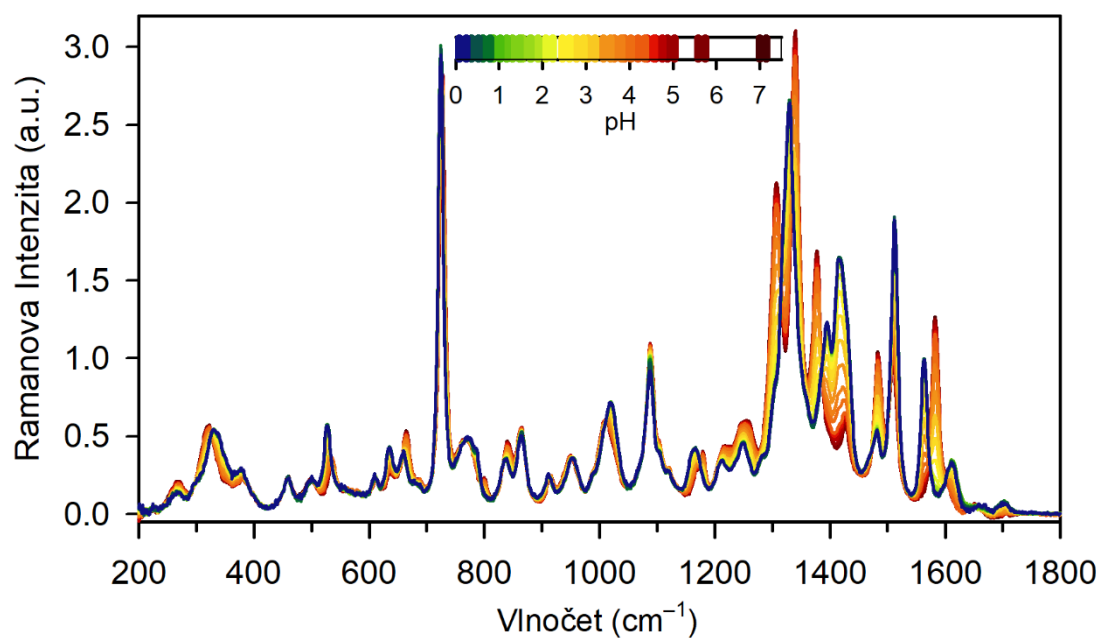
Obrázek P3d: Relativní zastoupení nábojových forem 3'-rAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



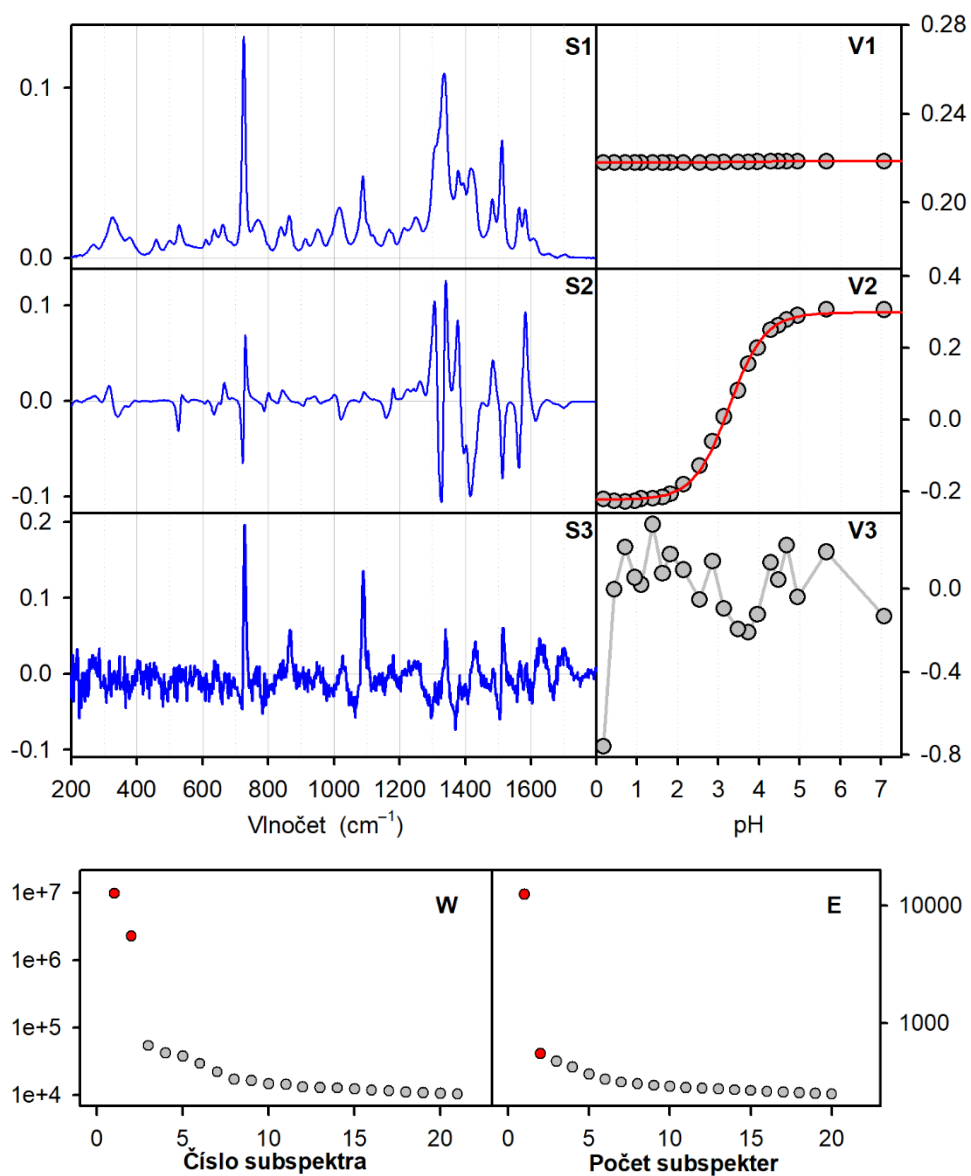
Obrázek P3e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 3'-rAMP; 3'-rAMPH₂ (černá), 3'-rAMPH¹⁻ (modrá), 3'-rAMP²⁻ (zelená)



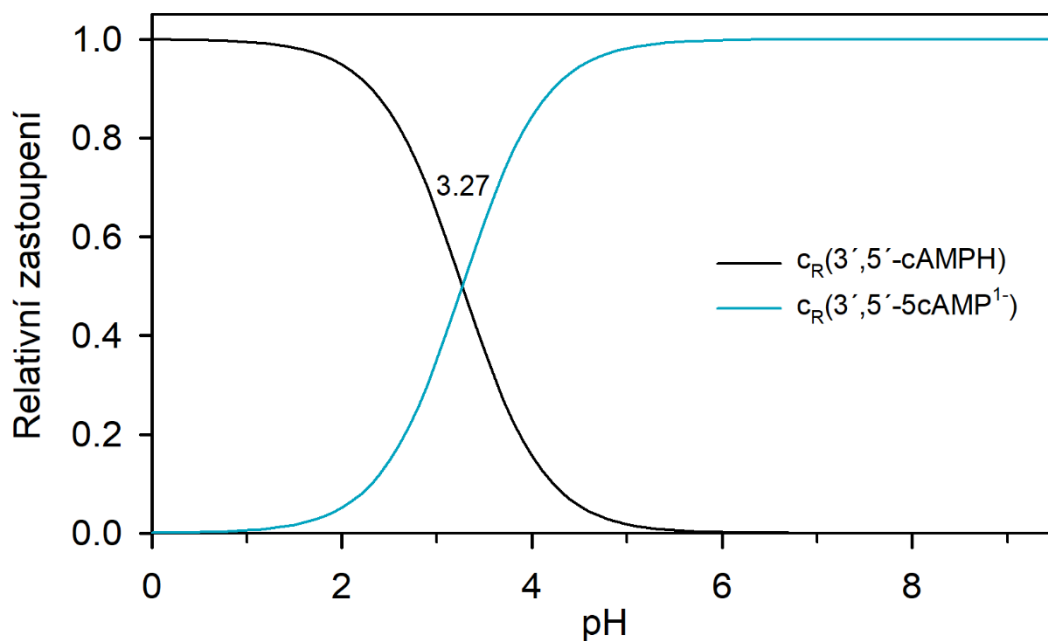
Obrázek P4a: Adenosin-3',5'-cyklickýmonofosfát (3',5'-cAMP)



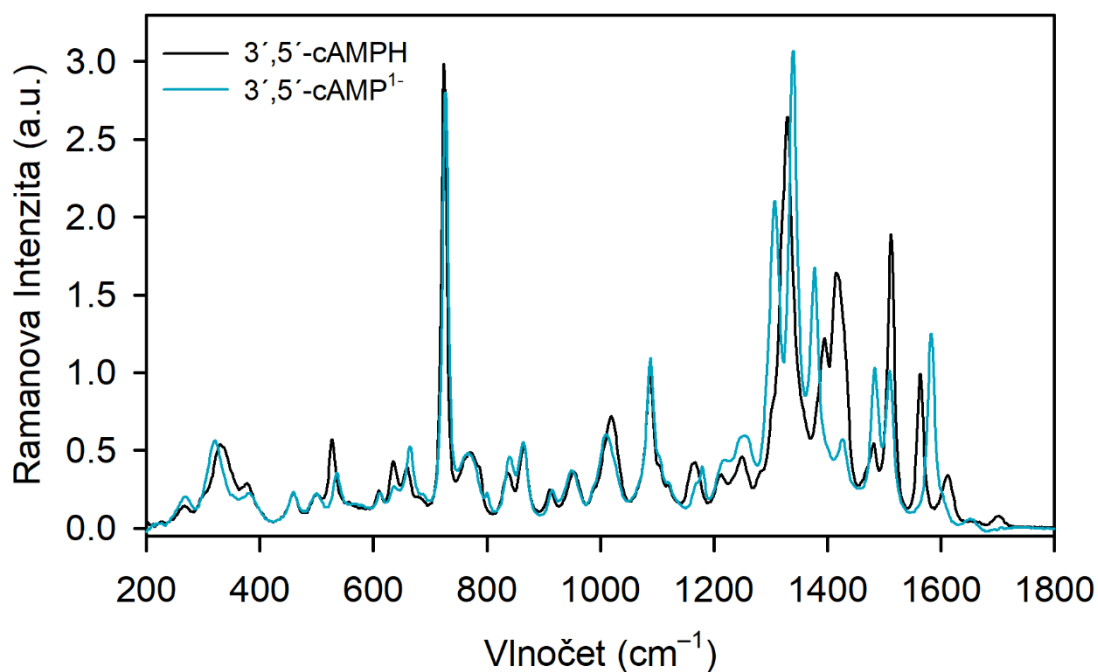
Obrázek P4b: Ramanova spektra 3',5'-cAMP při různých hodnotách pH (viz škála: 7.07–0.17), 21 spekter



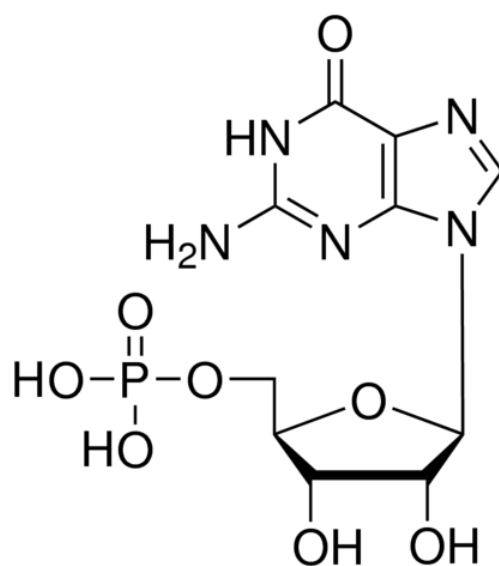
Obrázek P4c: Výsledky faktorové analýzy 3',5'-cAMP: Subspektra S1–S3 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V3 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



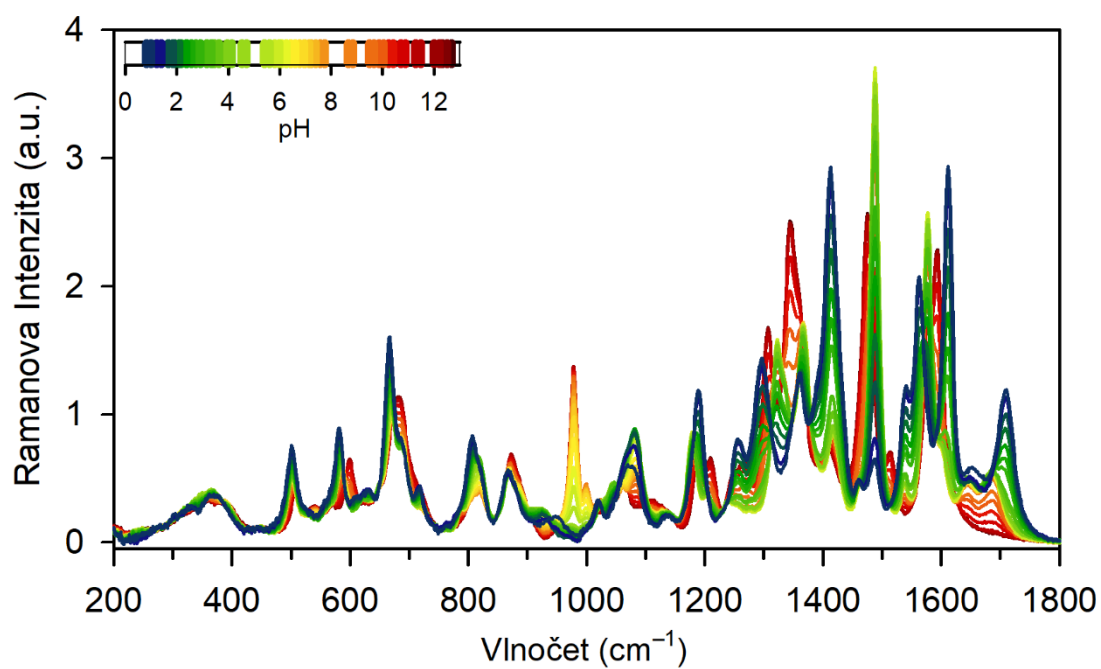
Obrázek P4d: Relativní zastoupení nábojových forem 3',5'-cAMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



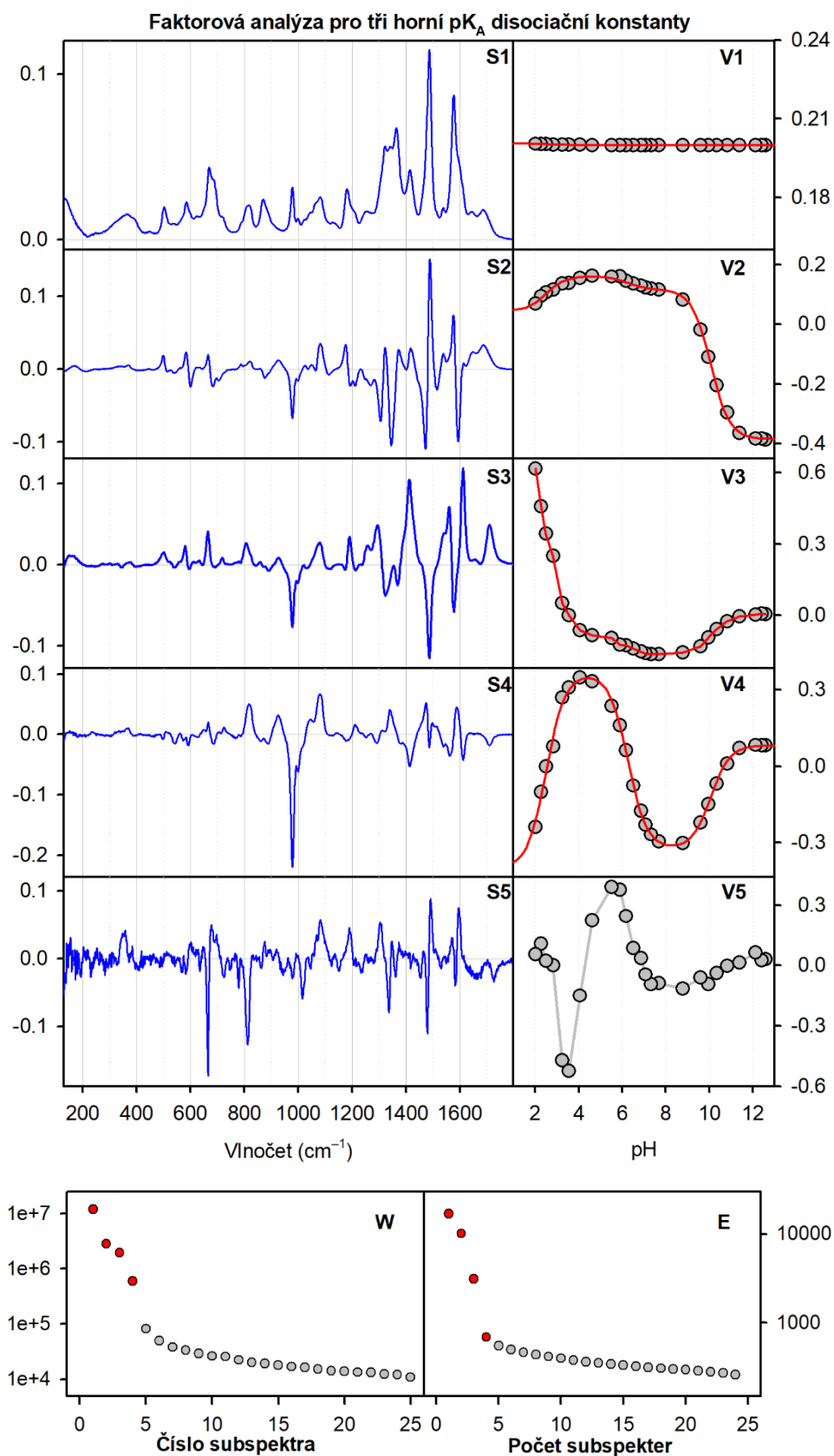
Obrázek P4e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 3',5'-cAMP; 3',5'-cAMPH (černá); 3',5'-cAMP¹⁻ (modrá)



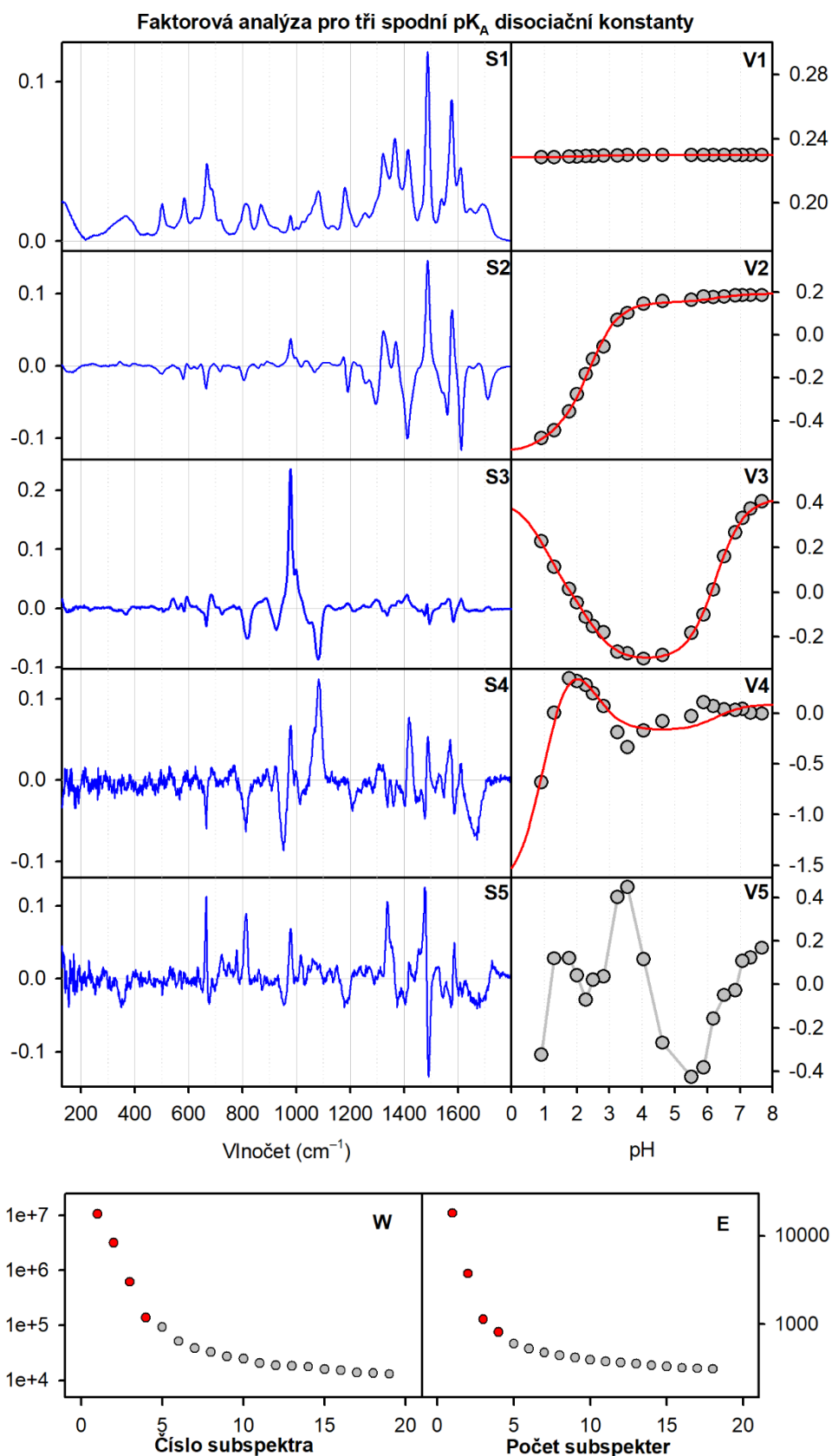
Obrázek P5a: Guanosin-5'-monofosfát (5'-rGMP)



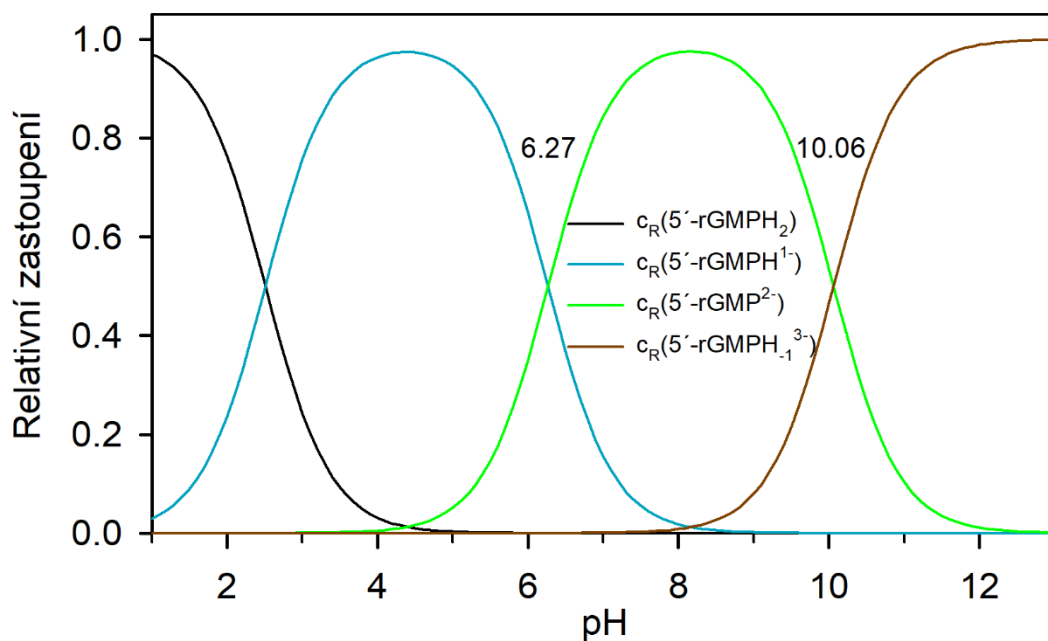
Obrázek P5b: Ramanova spektra 5'-rGMP při různých hodnotách pH (viz škála: 12.59–0.92), 28 spekter



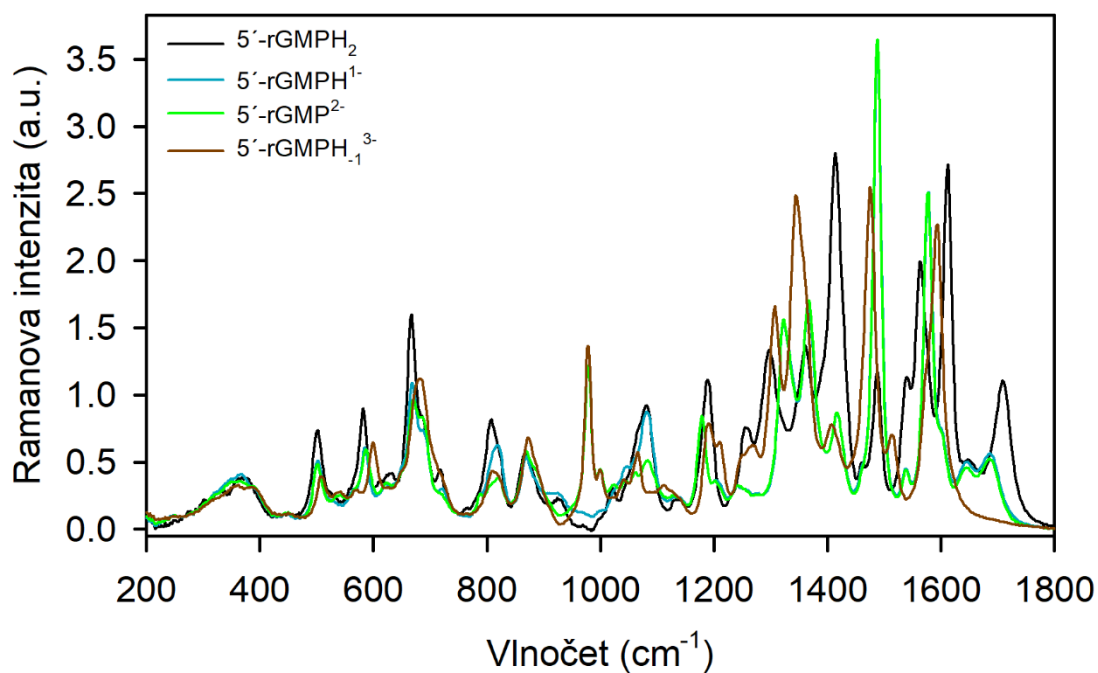
Obrázek P5c: Výsledky faktorové analýzy pro tři horní pK_A konstanty 5'-rGMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



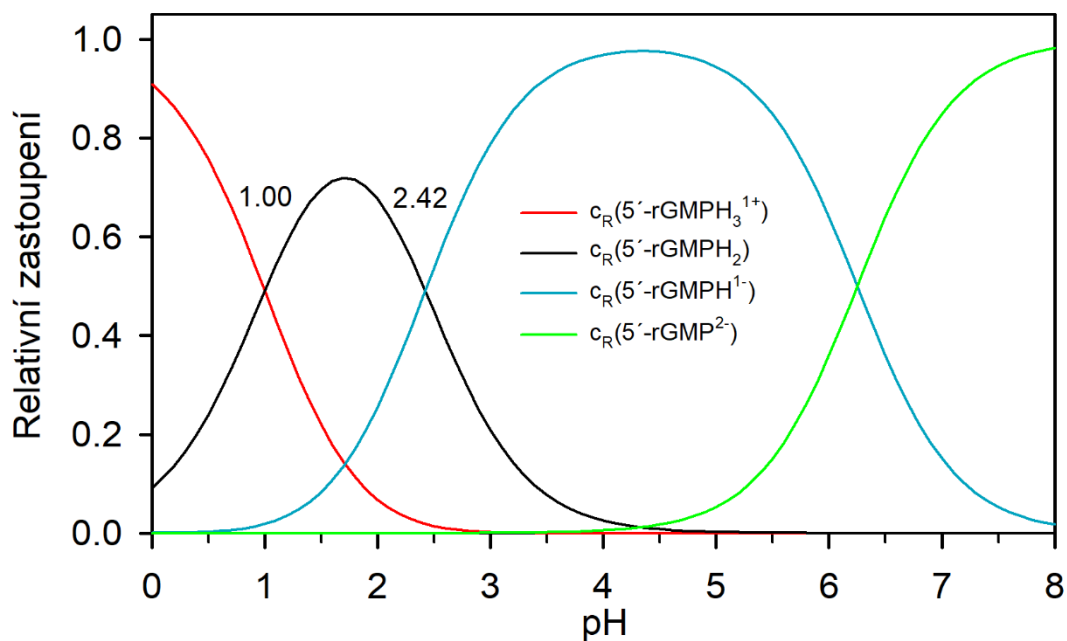
Obrázek P5d: Výsledky faktorové analýzy pro tři spodní pK_A konstanty 5'-rGMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



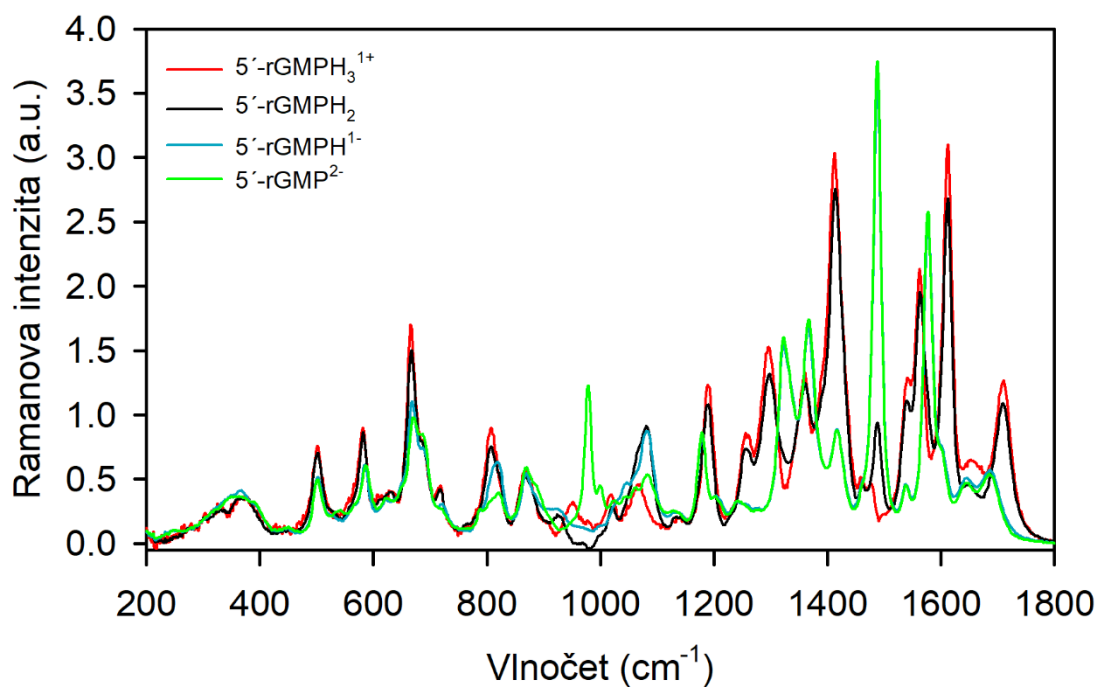
Obrázek P5e: Relativní zastoupení čtyř nábojových forem 5'-rGMP při vyšším pH včetně pK_A disociačních konstant



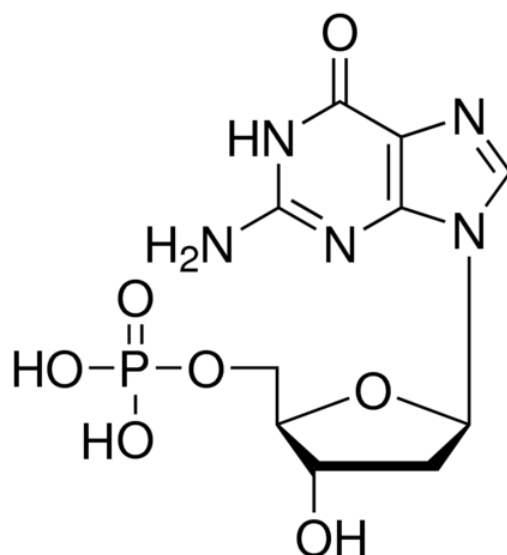
Obrázek P5f: Ramanova spektra čtyř jednotlivých nábojových forem 5'-rGMP při vyšším pH; 5'-rGMPH₂ (černá), 5'-rGMPH₁⁻ (modrá), 5'-rGMP²⁻ (zelená), 5'-rGMPH₋₁³⁻ (hnědá)



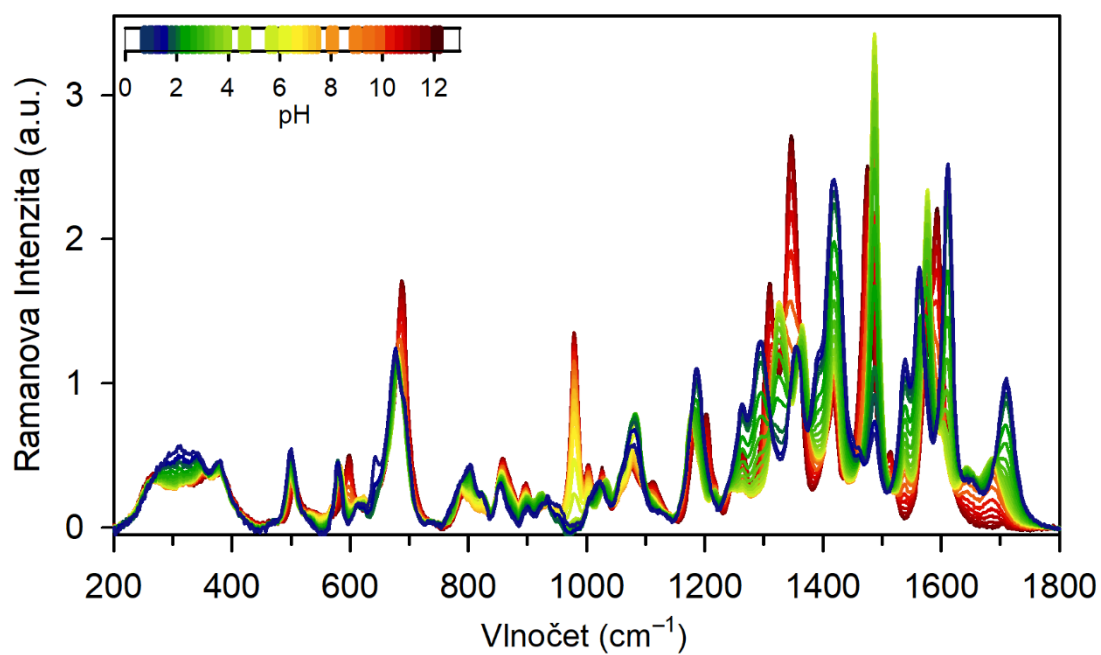
Obrázek P5g: Relativní zastoupení čtyř nábojových forem 5'-rGMP při nižším pH včetně pK_A disociačních konstant



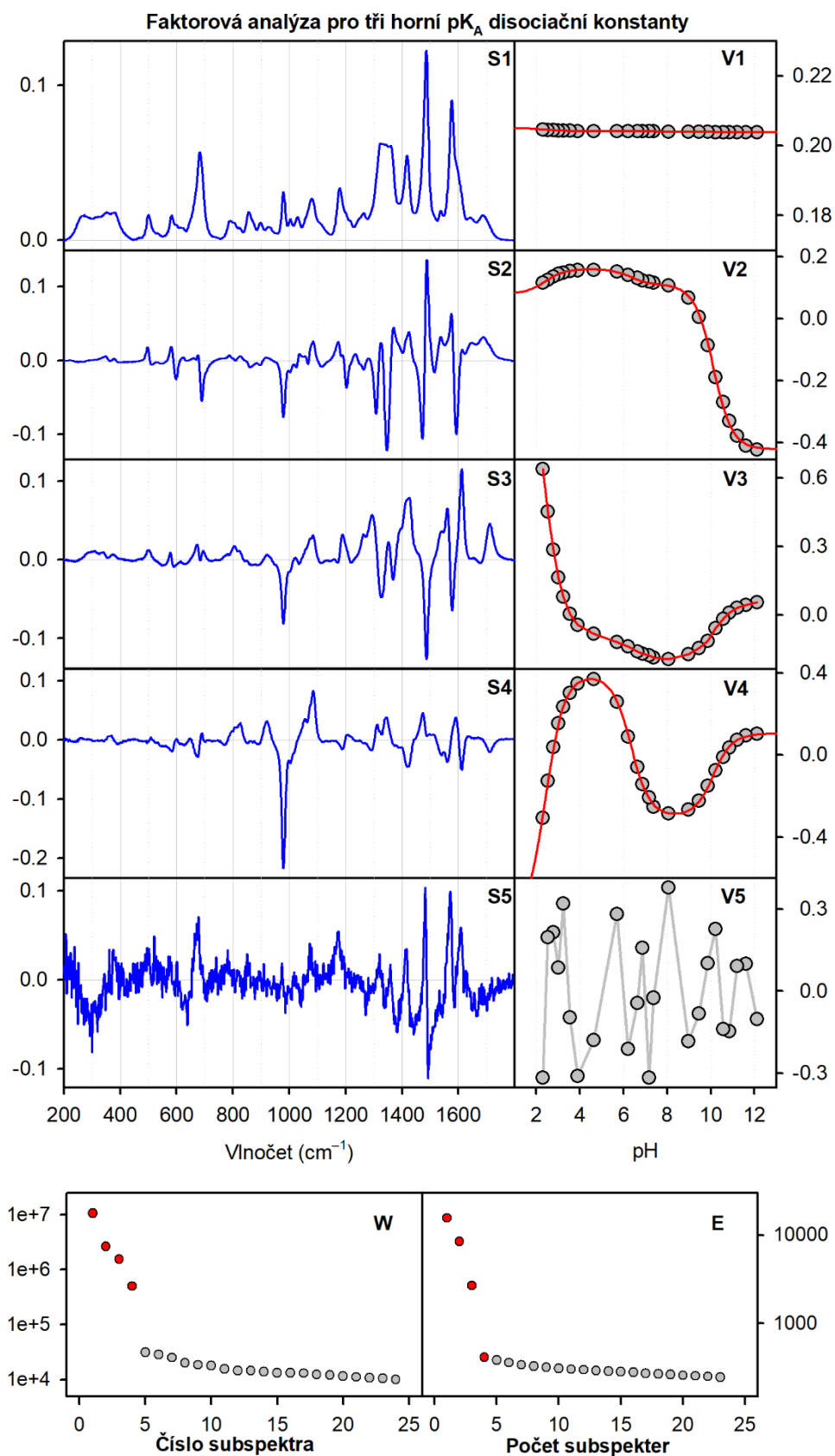
Obrázek P5h: Ramanova spektra čtyř jednotlivých nábojových forem 5'-rGMP při nižším pH; 5'-rGMPH₃¹⁺ (červená), 5'-rGMPH₂ (černá), 5'-rGMPH¹⁻ (modrá), 5'-rGMP²⁻ (zelená)



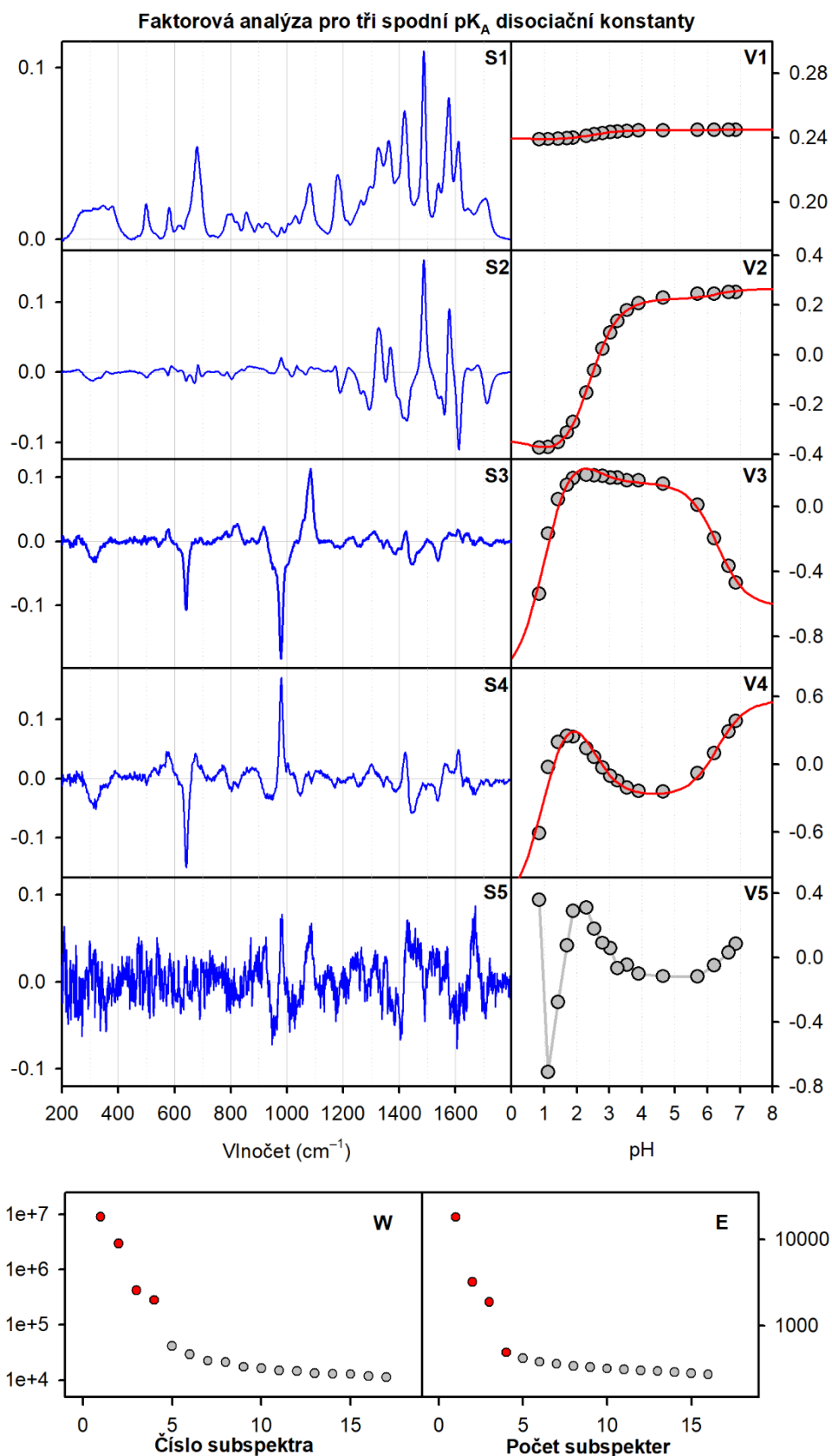
Obrázek P6a: 2'-deoxyguanosin-5'-monofosfát (5'-dGMP)



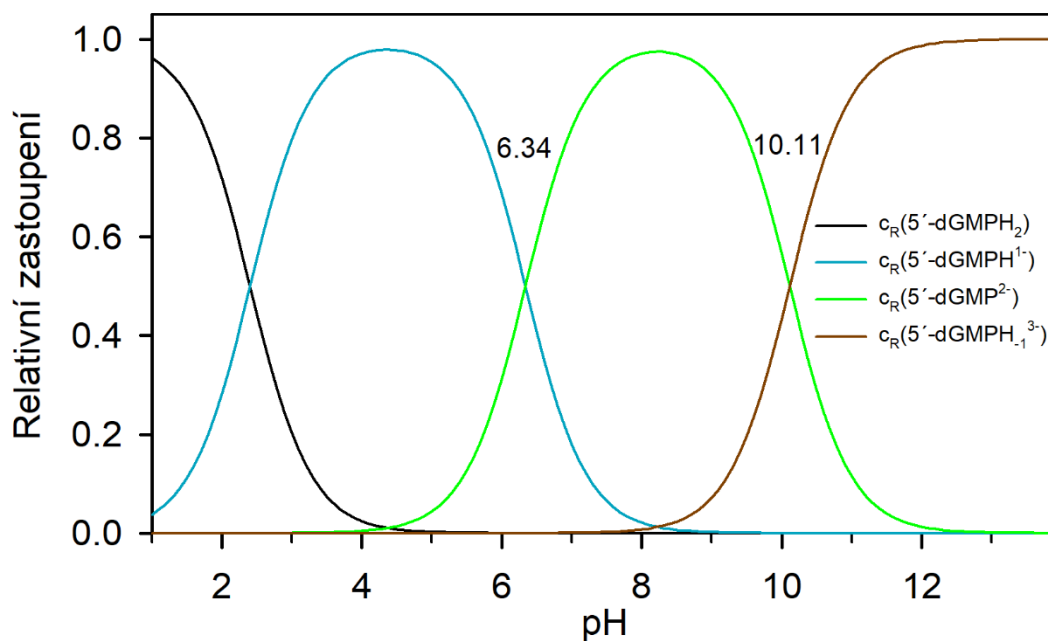
Obrázek P6b: Ramanova spektra 5'-dGMP při různých hodnotách pH (viz škála: 12.12–0.85), 29 spekter



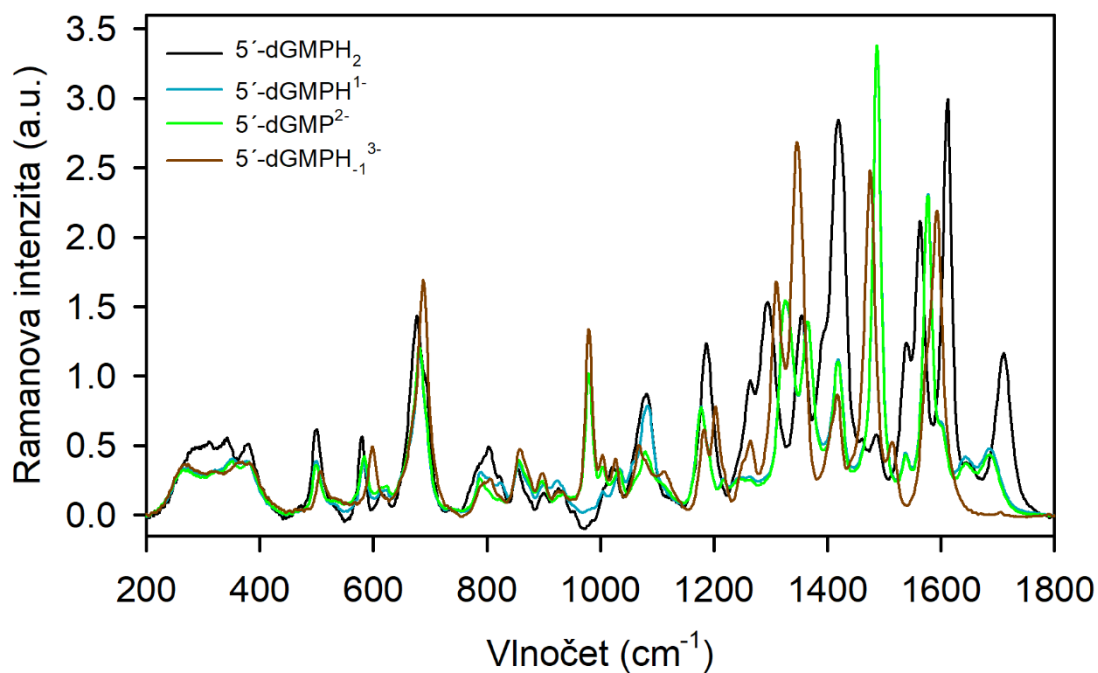
Obrázek P6c: Výsledky faktorové analýzy pro tři horní pK_A konstanty 5'-dGMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



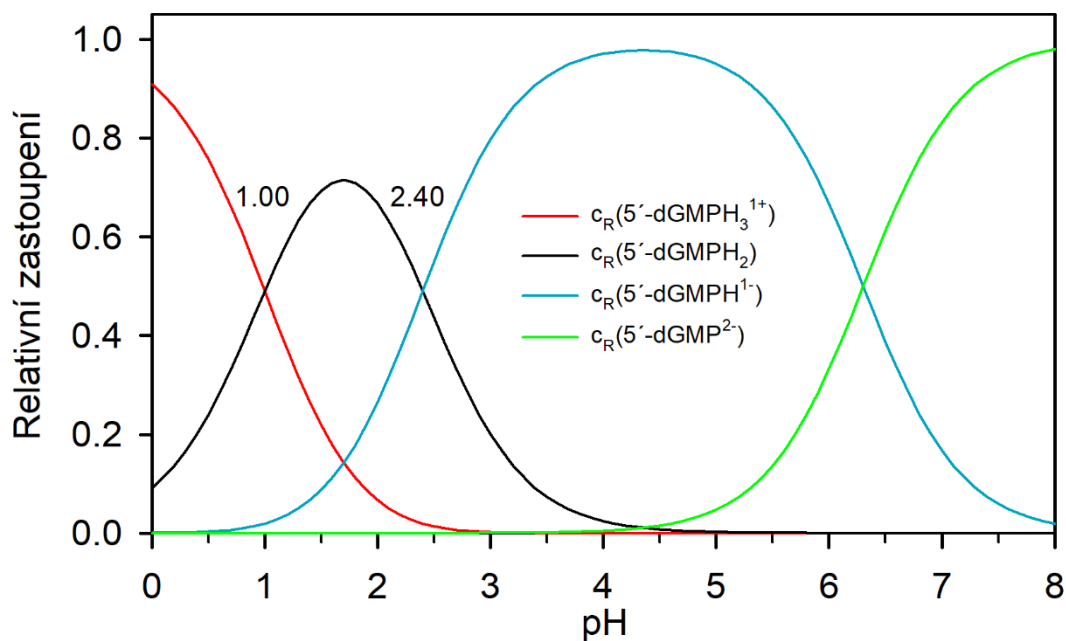
Obrázek P6d: Výsledky faktorové analýzy pro tři spodní pK_A konstanty 5'-dGMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



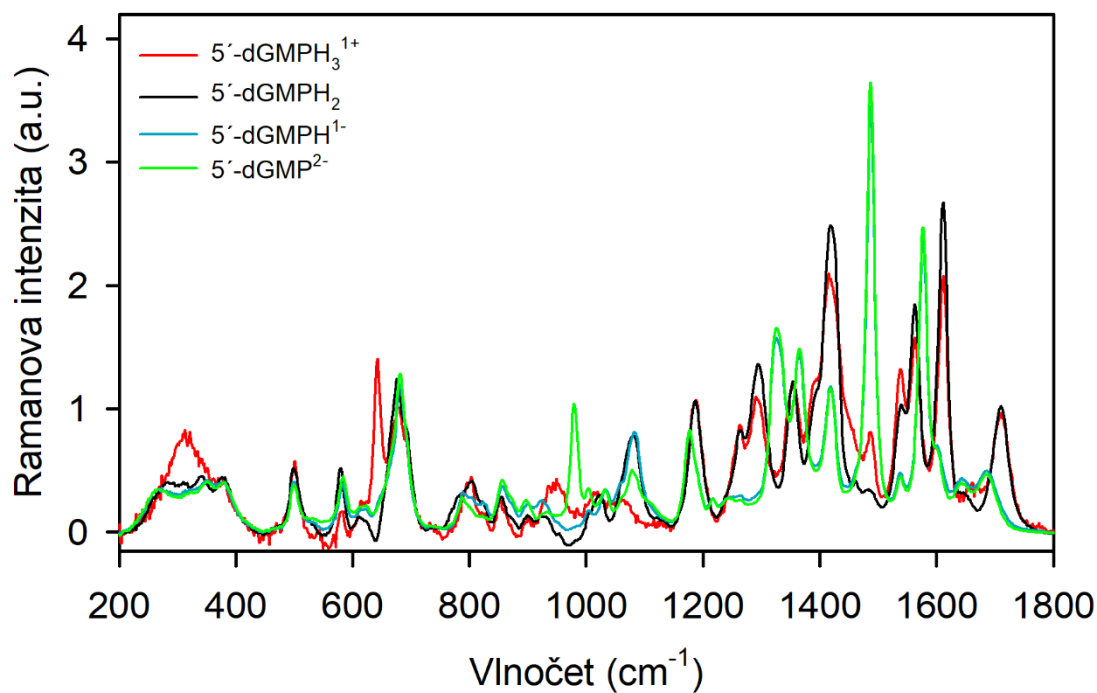
Obrázek P6e: Relativní zastoupení čtyř nábojových forem 5'-dGMP při vyšším pH včetně pK_A disociačních konstant



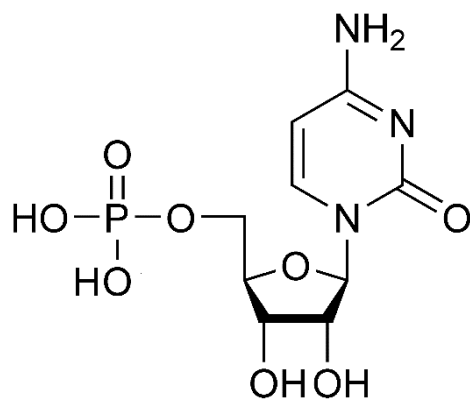
Obrázek P6f: Ramanova spektra čtyř nábojových forem 5'-dGMP při vyšším pH; 5'-dGMPH₂ (černá), 5'-dGMPH¹⁻ (modrá), 5'-dGMP²⁻ (zelená), 5'-dGMPH₋₁³⁻ (hnědá)



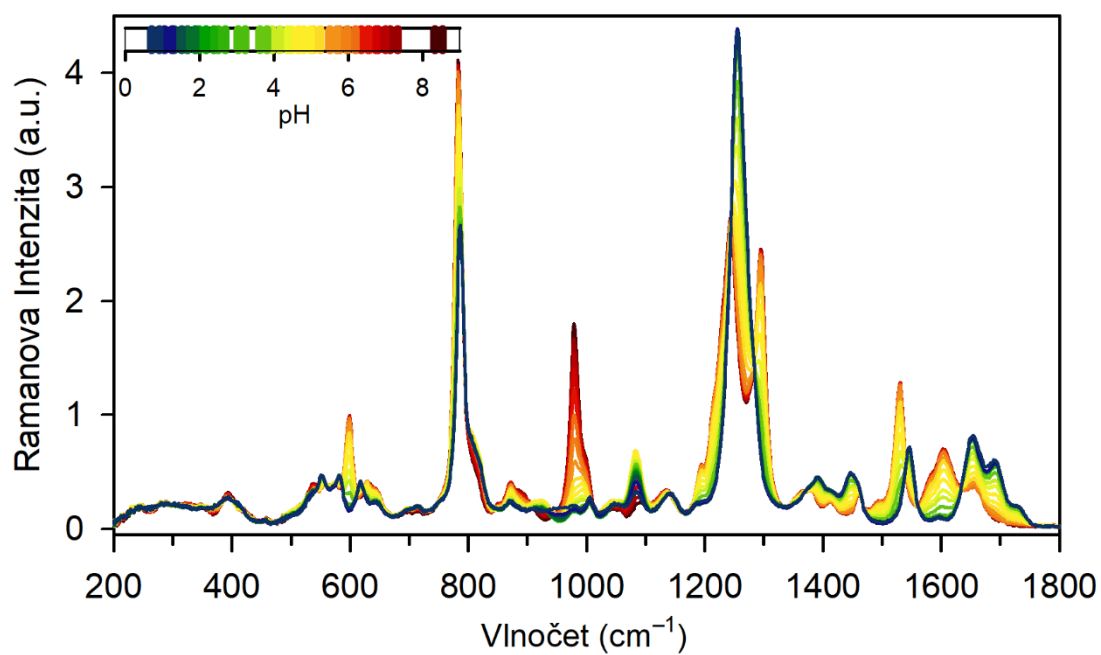
Obrázek P6g: Relativní zastoupení čtyř nábojových forem 5'-dGMP při nižším pH včetně pK_A disociačních konstant



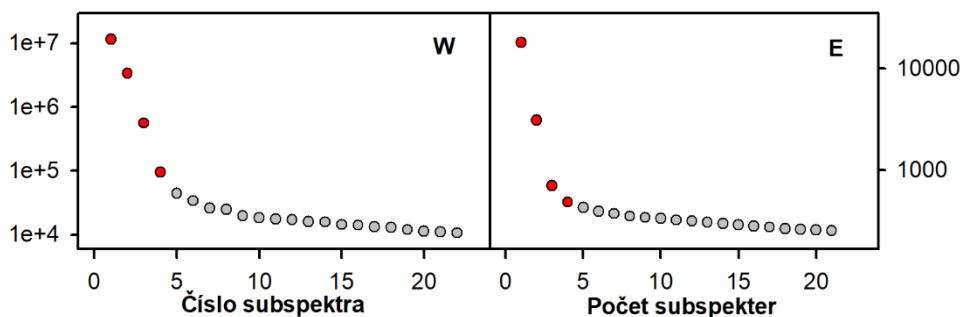
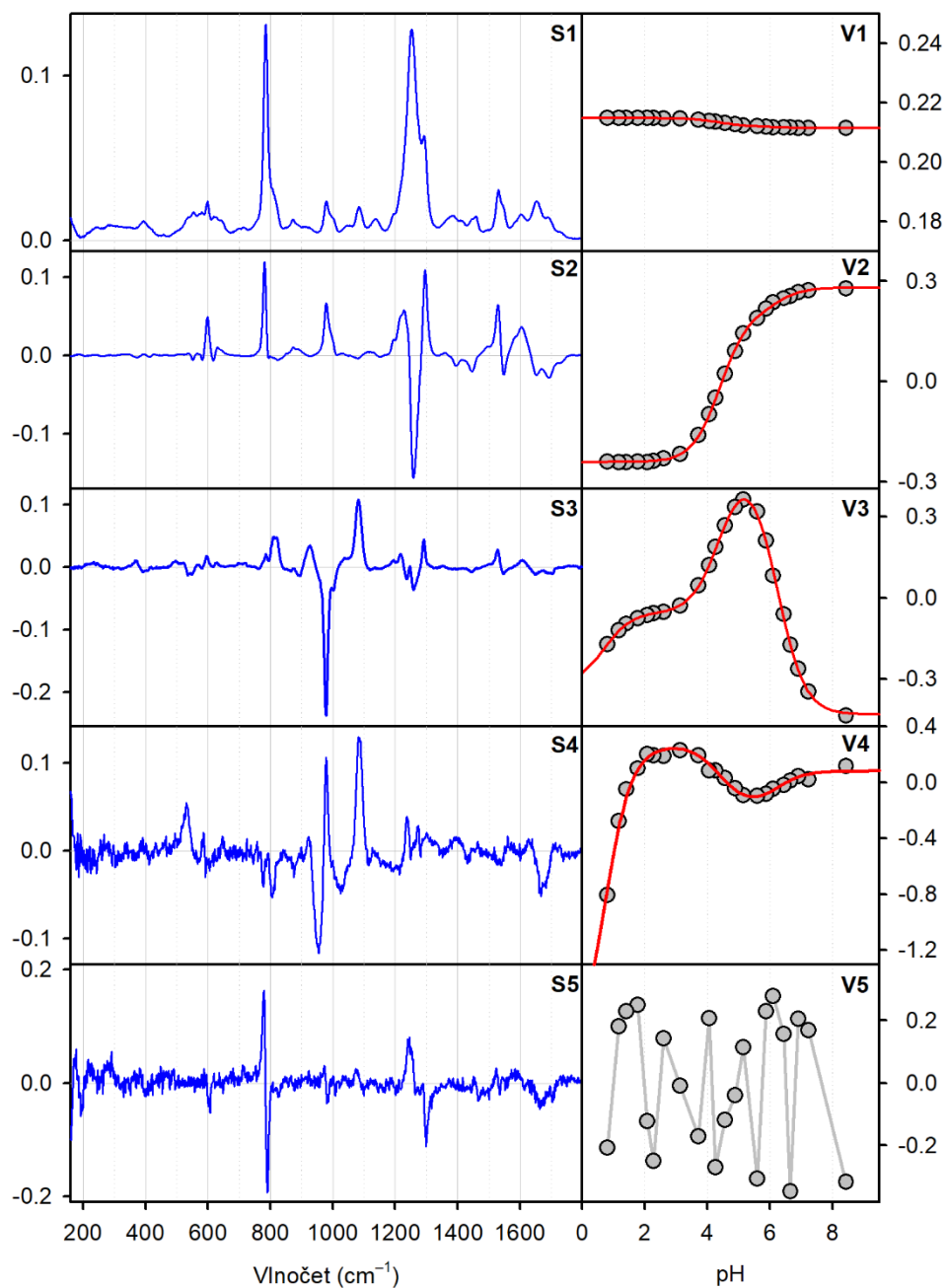
Obrázek P6h: Ramanova spektra čtyř nábojových forem 5'-dGMP při nižším pH; 5'-dGMPH₃¹⁺ (červená), 5'-rGMPH₂ (černá), 5'-rGMPH¹⁻ (modrá), 5'-rGMP²⁻ (zelená)



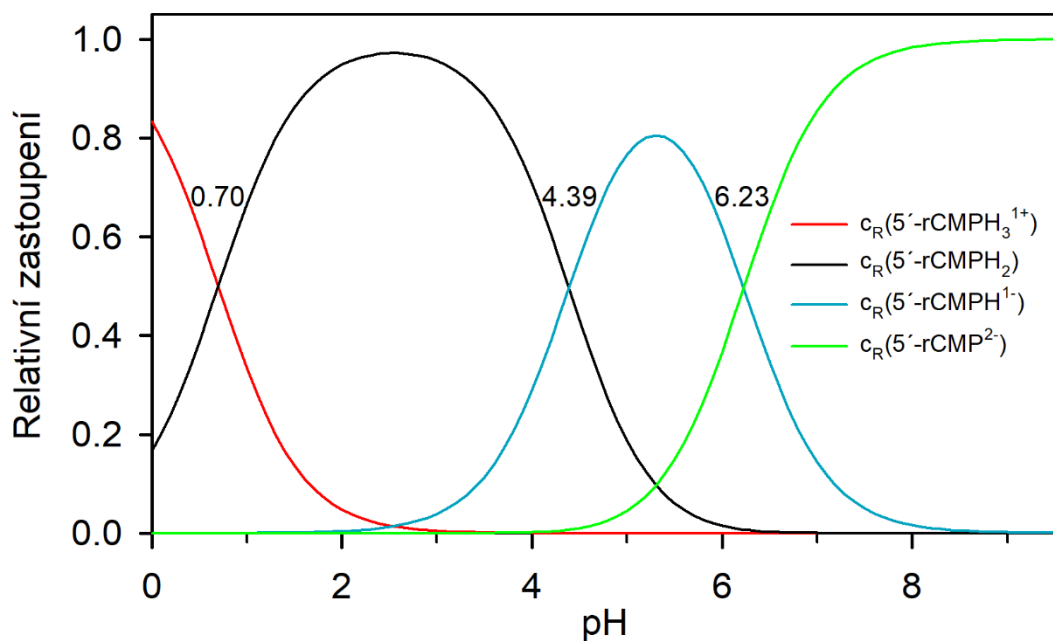
Obrázek P7a: Cytidin-5'-monofosfát (5'-rCMP)



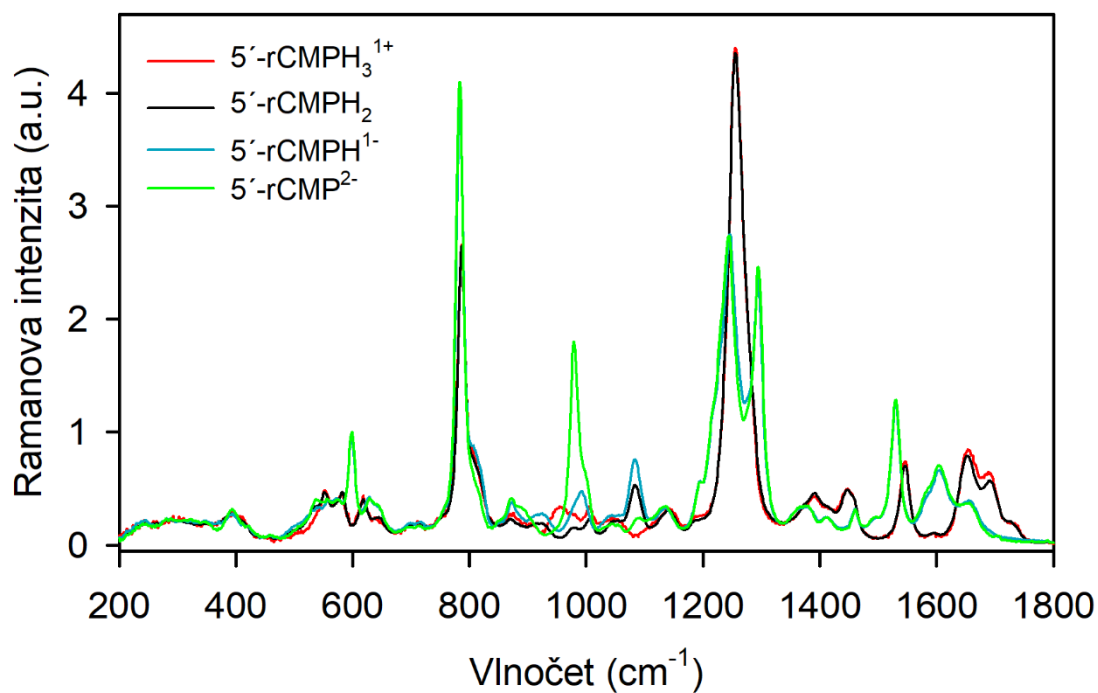
Obrázek P7b: Ramanova spektra 5'-rCMP při různých hodnotách pH (viz škála: 8.43–0.81), 22 spekter



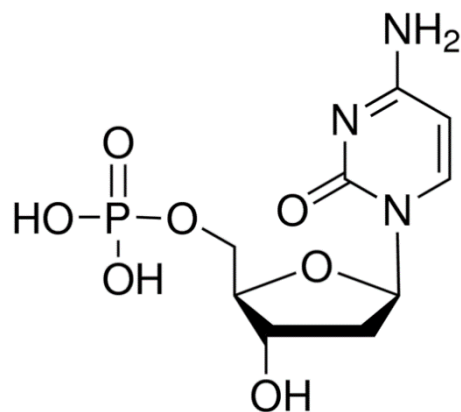
Obrázek P7c: Výsledky faktorové analýzy 5'-rCMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



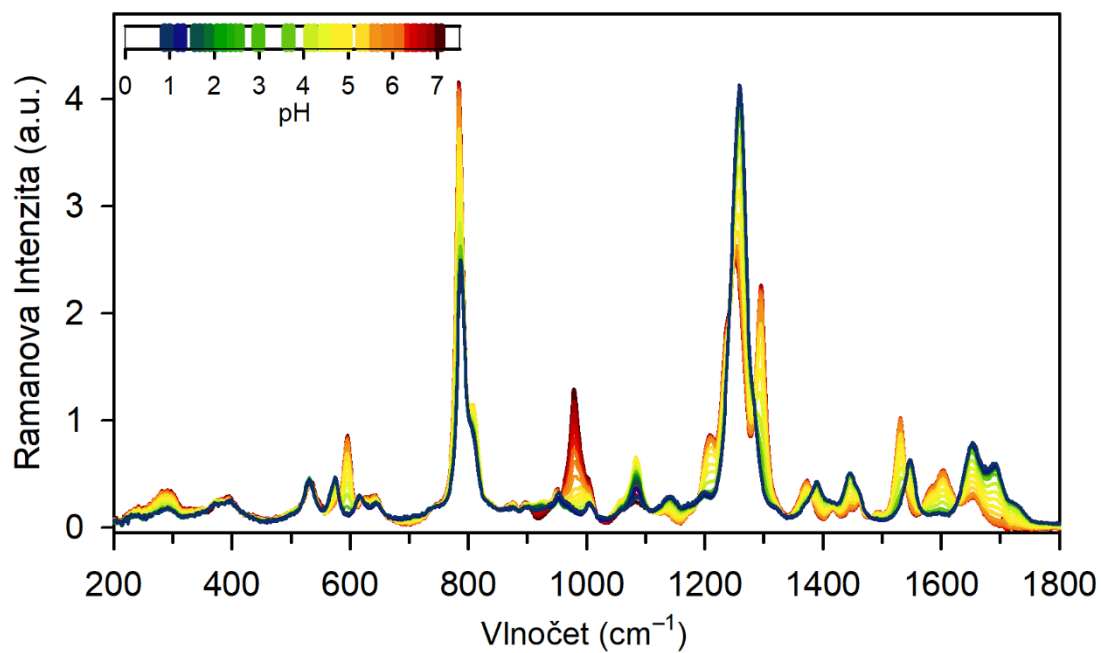
Obrázek P7d: Relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem 5'-rCMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



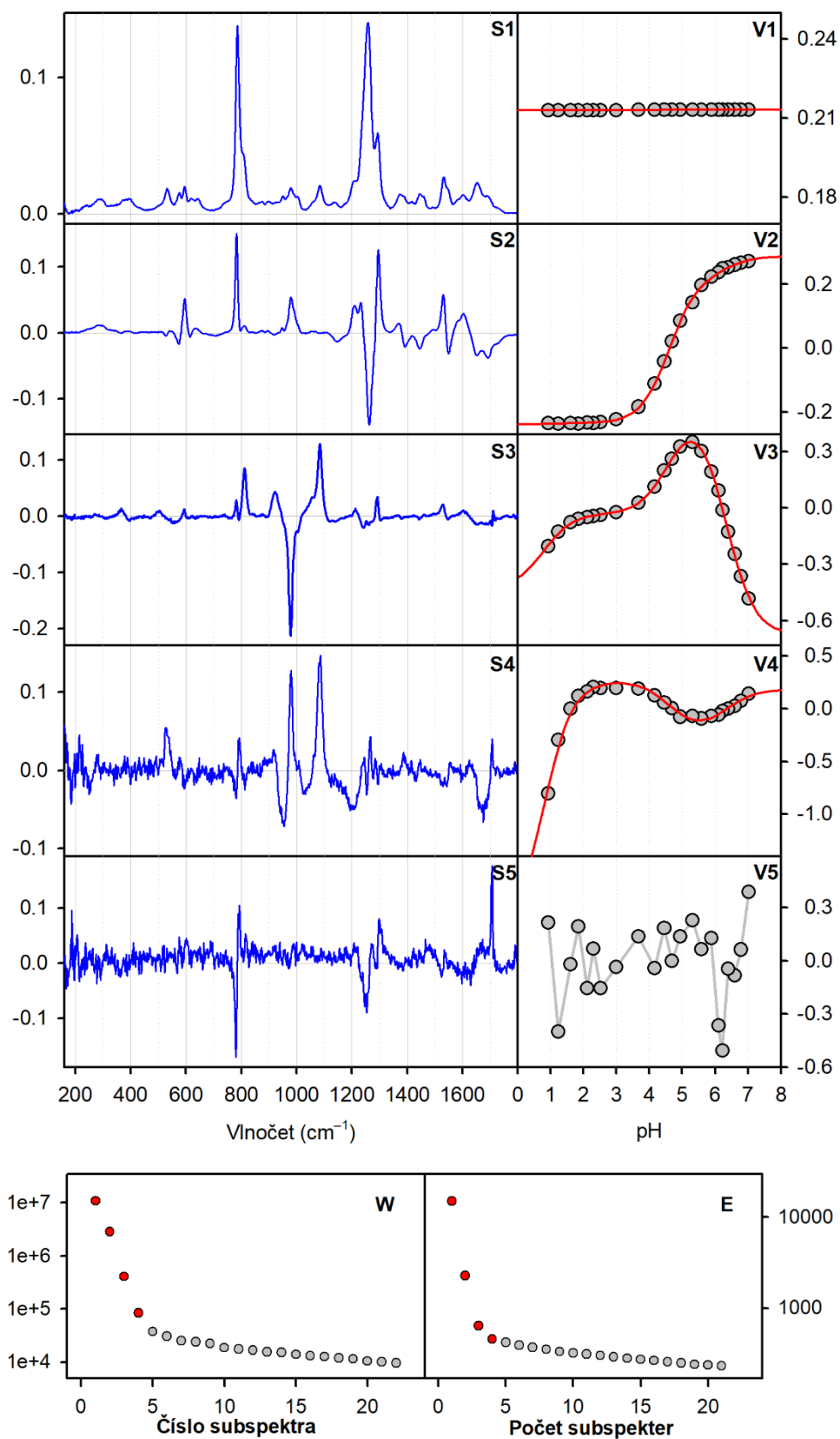
Obrázek P7e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 5'-rCMP; 5'-rCMPH $_3^{1+}$ (červená), 5'-rCMPH $_2$ (černá), 5'-rCMPH $^{1-}$ (modrá), 5'-rCMPH $^{2-}$ (zelená)



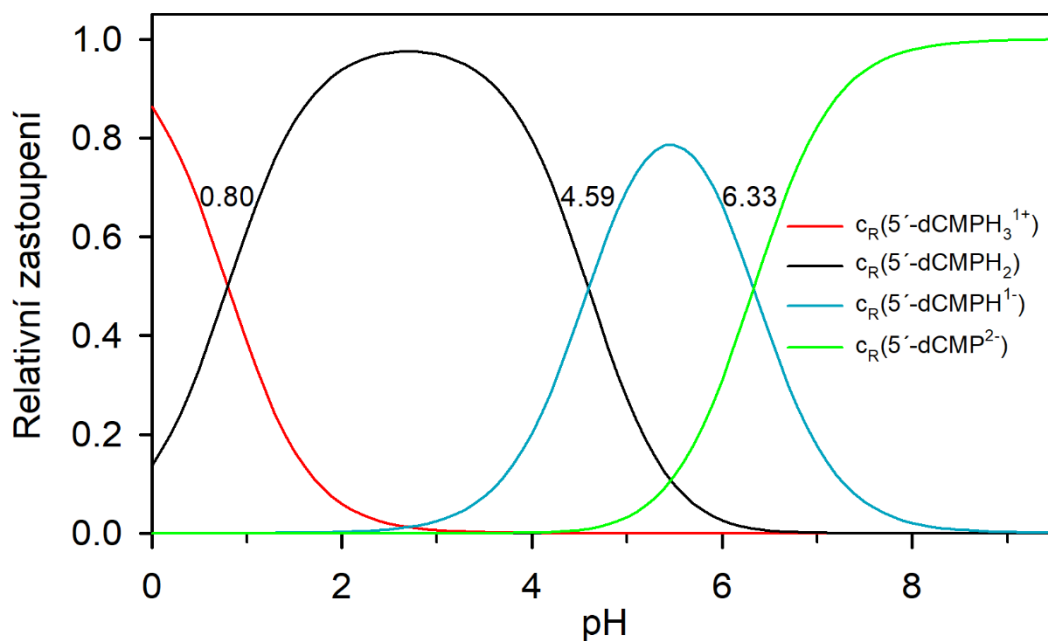
Obrázek P8a: 2'-deoxycytidin-5'-monofosfát (5'-dCMP)



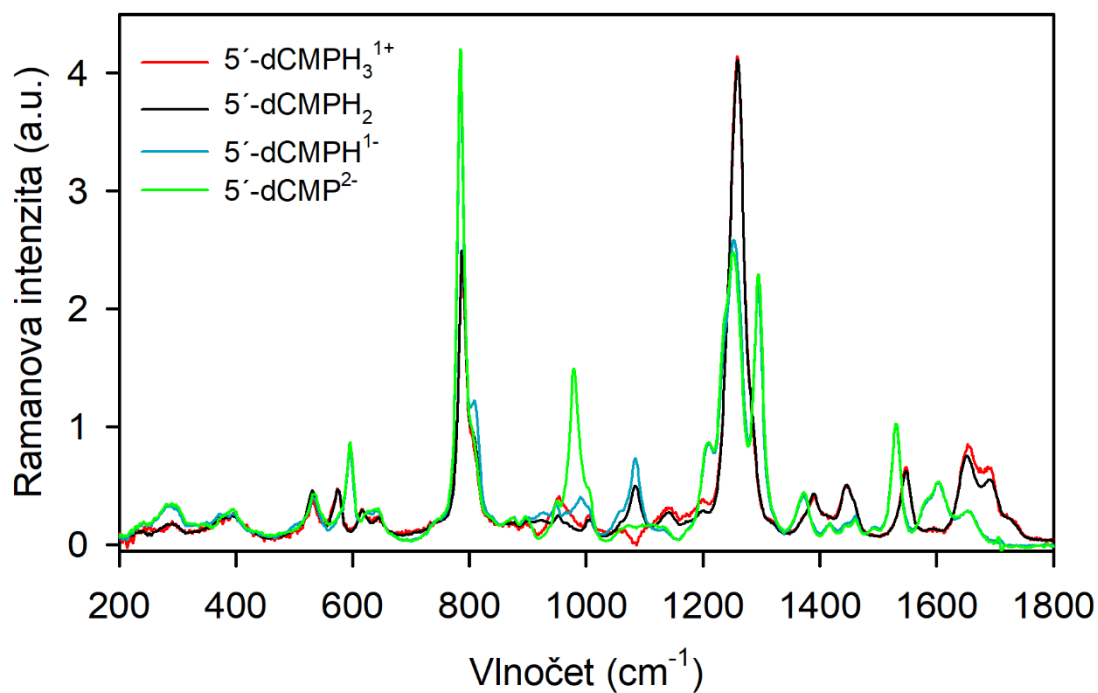
Obrázek P8b: Ramanova spektra 5'-dCMP při různých hodnotách pH (viz škála: 7.03–0.94), 22 spekter



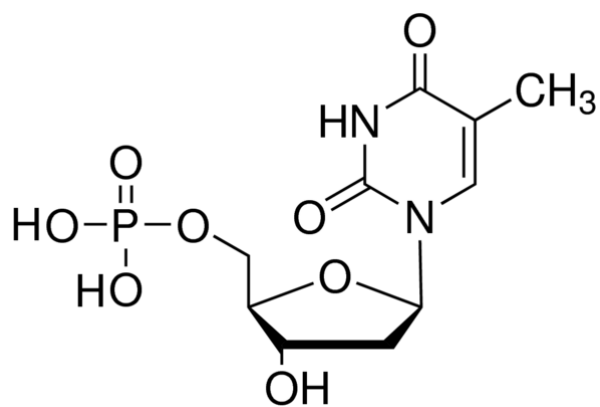
Obrázek P8c: Výsledky faktorové analýzy 5'-dCMP: Subspektra S1–S5 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V5 (šedé body, vpravo nahoře, fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



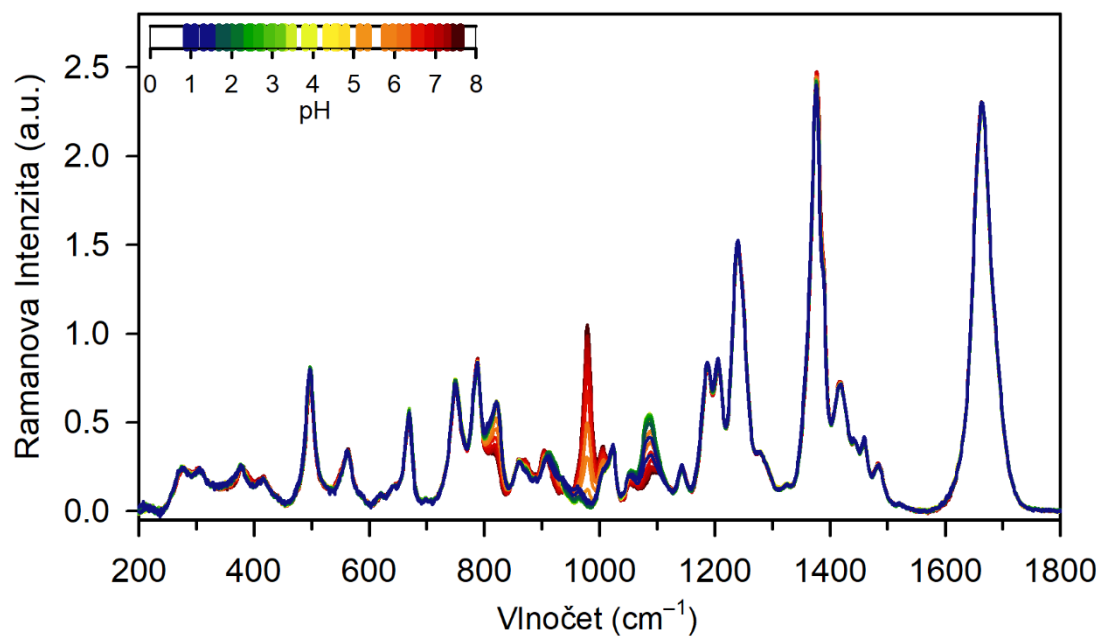
Obrázek P8d: Relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem 5'-dCMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



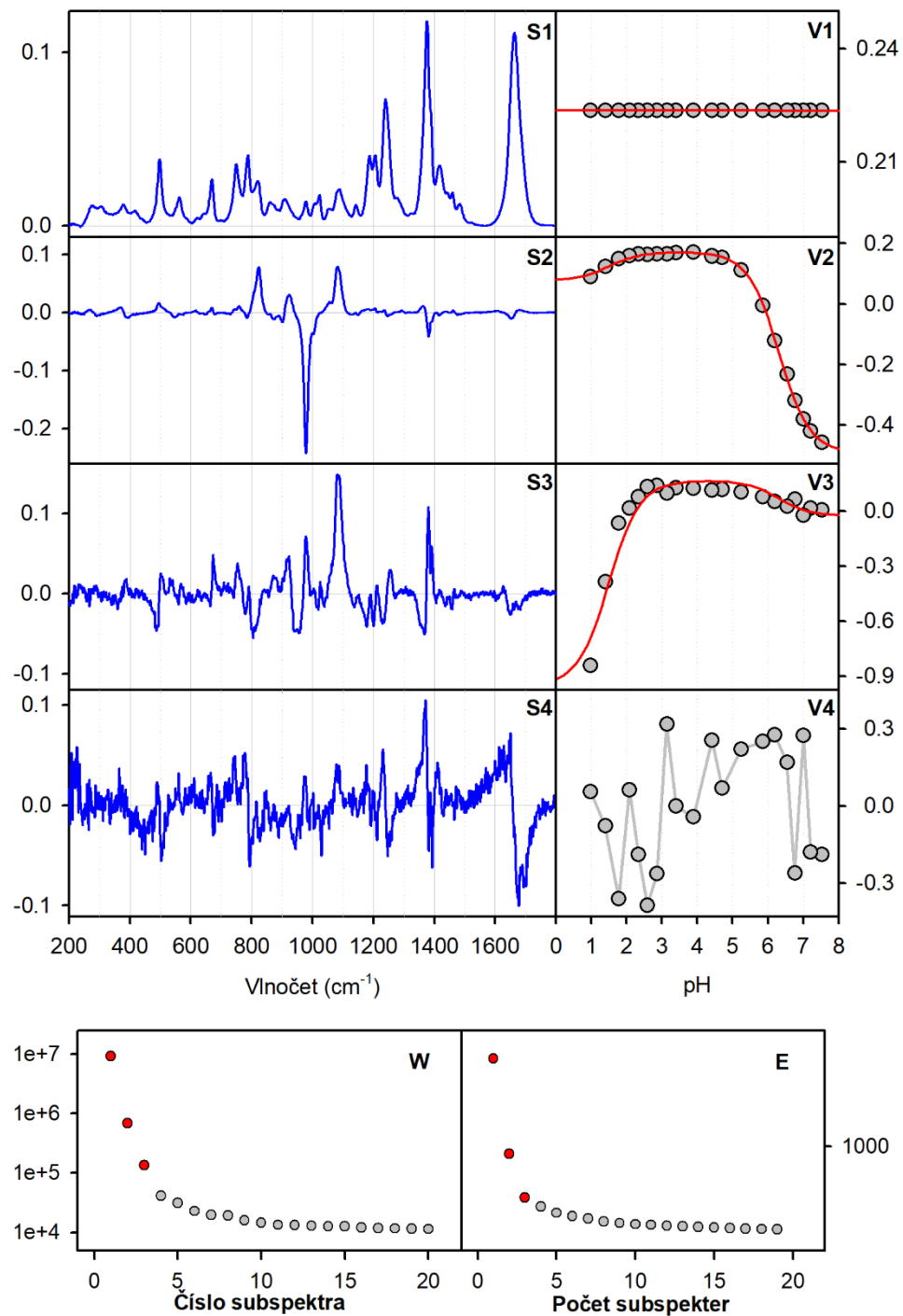
Obrázek P8e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 5'-dCMP; 5'-dCMPH₃¹⁺ (červená), 5'-dCMPH₂ (černá), 5'-dCMPH¹⁻ (modrá), 5'-dCMPH²⁻ (zelená)



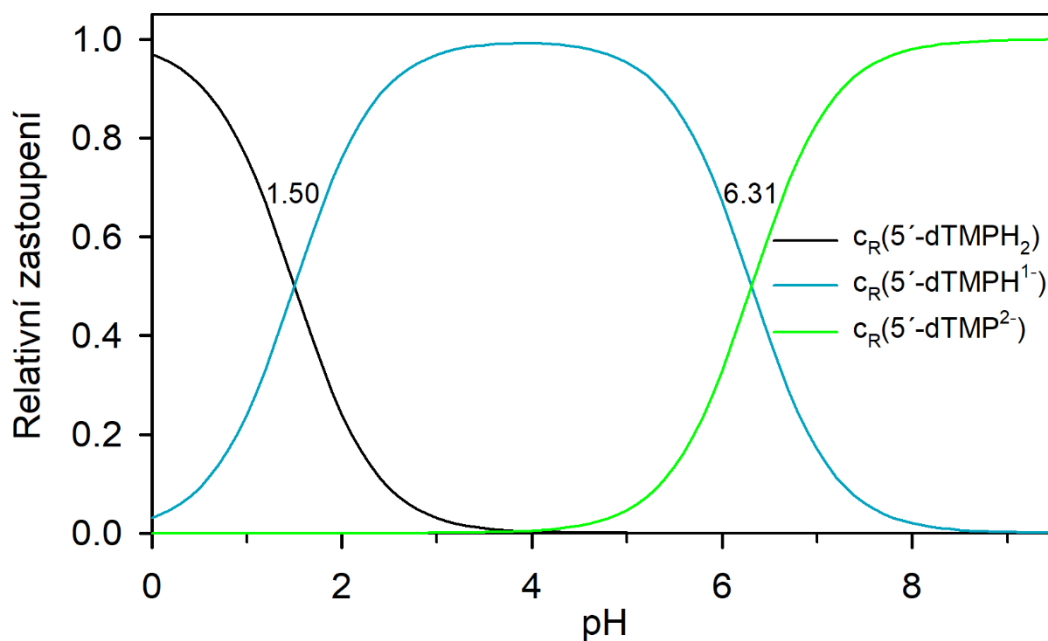
Obrázek P9a: 2'-deoxythymidin-5'-monofosfát (5'-dTMP)



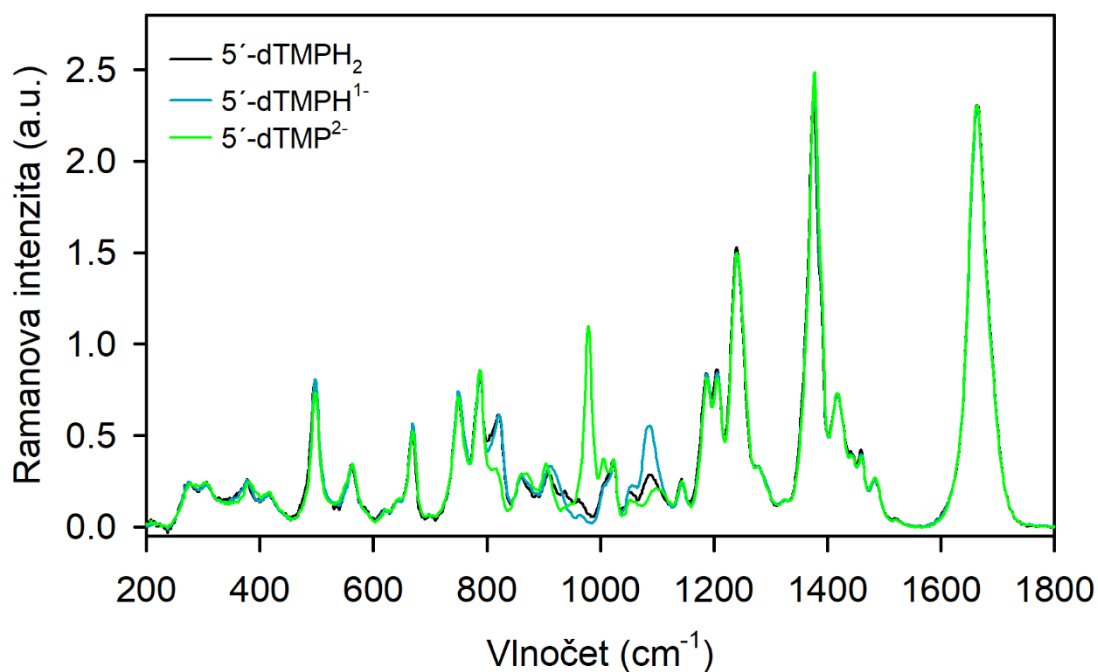
Obrázek P9b: Ramanova spektra 5'-dTMP při různých hodnotách pH (viz škála: 7.52–0.99), 20 spekter



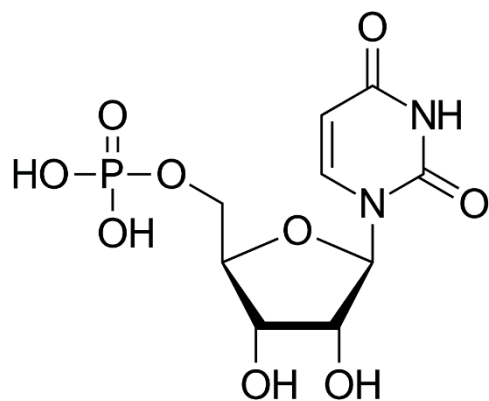
Obrázek P9c: Výsledky faktorové analýzy 5'-dTMP: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (šedé body, vpravo nahoře), fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



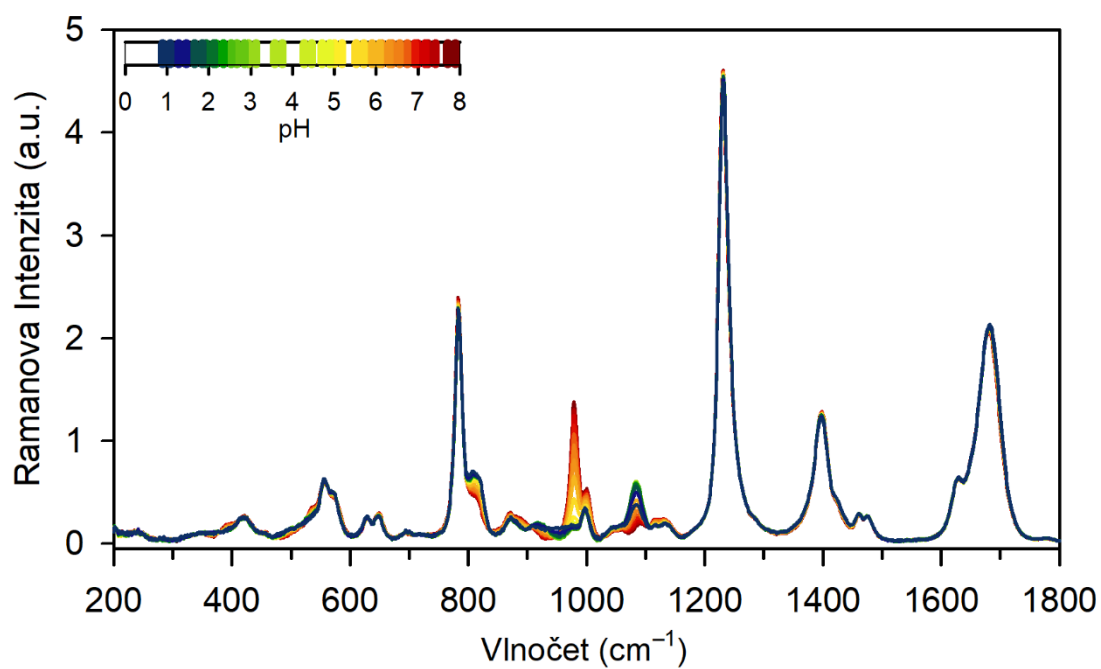
Obrázek P9d: Relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem 5'-dTMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



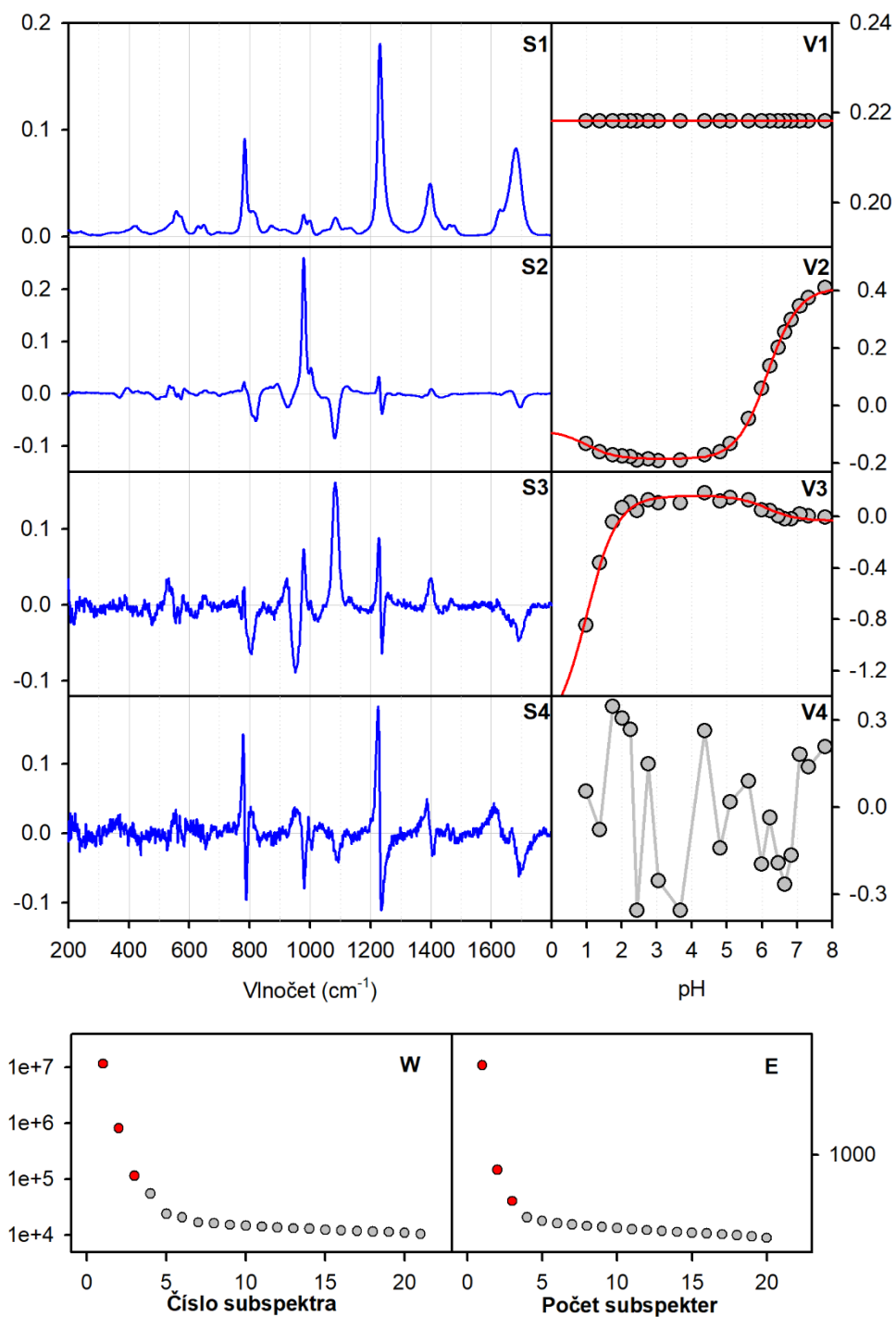
Obrázek P9e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 5'-dTMP; 5'-dTMPH₂ (černá), 5'-dTMPH¹⁻ (modrá), 5'-dTMP²⁻ (zelená)



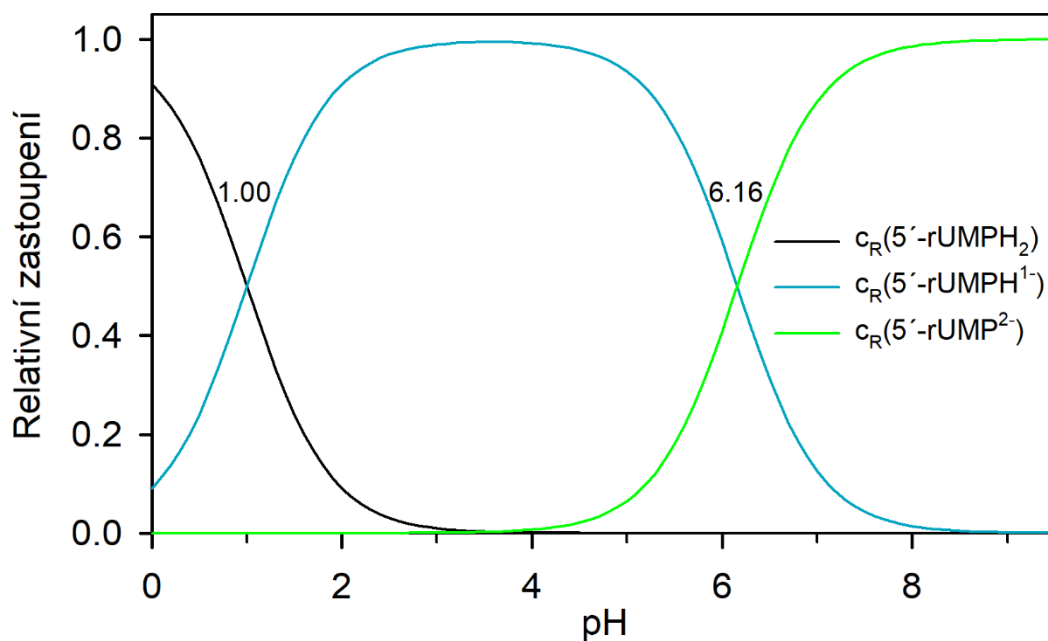
Obrázek P10a: Uridin-5'-monofosfát (5'-rUMP)



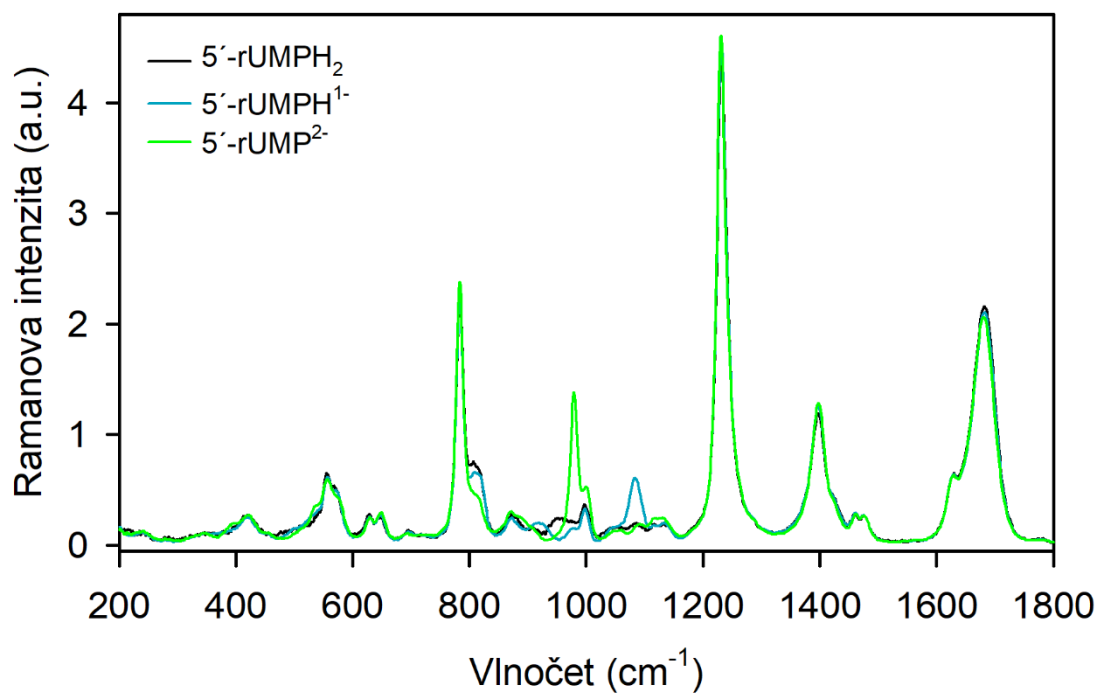
Obrázek P10b: Ramanova spektra 5'-rUMP při různých hodnotách pH (viz škála: 7.80–0.98), 21 spekter



Obrázek P10c: Výsledky faktorové analýzy 5'-rUMP: Subspektra S1–S4 (modrá, vlevo nahoře), průběhy koeficientů subspekter V1–V4 (šedé body, vpravo nahoře), fit na Hendersonovu-Hasselbachovu rovnici – červená čára), váhy jednotlivých subspekter W (vlevo dole) a závislost reziduální chyby E na počtu subspekter (vpravo dole)



Obrázek P10d: Relativní zastoupení jednotlivých nábojových forem 5'-rUMP při různém pH včetně pK_A disociačních konstant



Obrázek P10e: Ramanova spektra jednotlivých nábojových forem 5'-rUMP; 5'-rUMPH₂ (černá), 5'-rUMPH¹⁻ (modrá), 5'-rUMP²⁻ (zelená)