

ANALYTICKÁ ULTRACENTRIFUGA A JEJÍ VYUŽITÍ V BIOCHEMICKÉ LABORATOŘI

ONDŘEJ VANĚK^{a,b} a KAREL BEZOUŠKA^{a,b}

^a Katedra biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, Hlavova 8, 128 40 Praha 2, ^b Mikrobiologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4

kenav3@seznam.cz, bezouska@biomed.cas.cz

Došlo 15.7.10, přijato 26.8.10.

Klíčová slova: analytická ultracentrifuga, sedimentační rychlost, sedimentační rovnováha, molekulová hmotnost, rovnovážná konstanta

Obsah

1. Úvod
2. Historie analytické ultracentrifugy
3. Přístroj a jeho parametry
4. Přehled aplikací
5. Sedimentační rychlost
6. Sedimentační rovnováha
7. Analýza sedimentačních dat
8. Příklady analýz
9. Závěr

1. Úvod

Cílem sedimentační analýzy prováděné pomocí analytické ultracentrifugy je charakterizace sedimentujících částic z hlediska jejich molekulové hmotnosti, sedimentačního koeficientu a dalších hydrodynamických vlastností. Ze sedimentačních dat lze získat odhad velikosti a tvaru částic, údaje o distribuci jednotlivých typů sedimentujících částic ve vzorku a v neposlední řadě studovat rovnovážné systémy, včetně určení příslušných rovnovážných konstant. Vztáhneme-li pojem sedimentující částice například na molekulu proteinu, je z výše uvedeného výčtu hlavních aplikací této metody zřejmé, že v oblasti výzkumu biomakromolekul, především proteinů a nukleových kyselin, může mít sedimentační analýza velké uplatnění. Je to navíc jedna z nemnoha metod, které umožňují určit molekulovou hmotnost přímo, bez nutnosti kalibrace či interakce s matricí, a to přímo ve vodném prostředí (nejčastěji v pufru) za fyziologických podmínek. A tak přestože se jedná o metodu již bezmála sto let starou, nachází stále velké uplatnění nejen ve vědě a výzkumu, ale i ve farmaceutickém průmyslu. Cílem tohoto referátu je podat přehled o principech a praktických aplikacích sedimentační

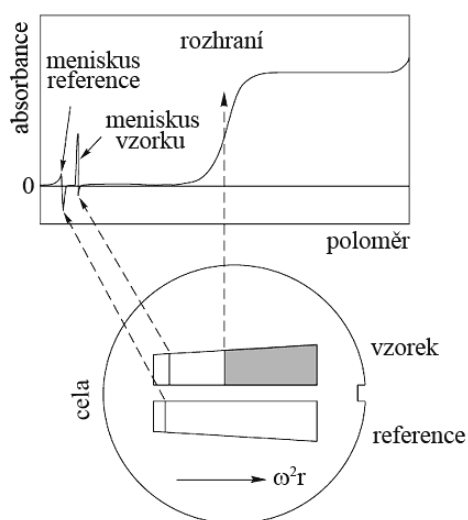
analýzy s důrazem na analýzu biomakromolekul. Tento referát je publikován ve zkrácené verzi, plnou verzi dvojnásobného rozsahu lze stáhnout ze stránek katedry biochemie UK PřF, <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/sluzby>.

2. Historie analytické ultracentrifugy

Historii analytické ultracentrifugy započal její konstruktér a objevitel metody sedimentační analýzy Theodor Svedberg (1884–1971)¹. Rodák ze švédského Fleräng, okres Gävleborg, se stal v roce 1904 studentem univerzity v Uppsale, která už také zůstala jeho hlavním celoživotním působištěm. V letech 1912–1949 zastával na této univerzitě funkci profesora fyzikální chemie. Svedbergova práce se týkala převážně koloidů a makromolekulárních látek. Spolu s četnými spolupracovníky studoval fyzikální vlastnosti koloidů, zejména jejich difuzi, absorpci světla a sedimentaci, což mu umožnilo potvrdit, že termodynamické zákony plynů lze aplikovat také na disperzní systémy. Pro studium sedimentace sestrojil analytickou ultracentrifugu, s níž sledoval sedimentaci velkých molekul (proteinů, sacharidů, polymerů) v roztoku a tato pozorování uvedl do vztahu k molekulové velikosti a tvaru sedimentujících molekul. Ukázal tak, že molekuly daného čistého proteinu mají všechny stejný tvar a že s využitím analytické ultracentrifugy lze prokázat přítomnost kontaminujících látek. Za práci na disperzních systémech mu byla roku 1926 udělena Nobelova cena za chemii.

3. Přístroj a jeho parametry

Vzhledem k tomu, že již přes padesát let se vývoji a výrobě analytické ultracentrifugy věnuje zejména firma Beckman Coulter, výčet technologických možností metody je omezen na popis současného typu analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-A/XL-I tohoto výrobce. Z hlediska odstředivé síly lze dosahovat tíhového pole v rozmezí přibližně 60 až 300 000 × g (min. rychlost 1000 ot min⁻¹, max. rychlost 60 000 ot min⁻¹). Molekulové hmotnosti částic, které tak lze pomocí analytické centrifugy studovat, se pohybují přibližně v rozsahu 100 Da až 10 GDa. Sedimentaci biomakromolekul lze sledovat pomocí dvou nezávislých optických systémů, absorbanční (XL-A) i interferenční optiky (XL-I). Absorbanční optika sestává ze zábleskové xenonové lampy, monochromátoru (200–800 nm), pohyblivé šterbiny a fotonásobiče. V klasickém uspořádání je vzorek umístěn do kyvety se dvěma sektory. Do jednoho je umístěn analyzovaný vzorek, druhý sektor obsahuje kontrolní vzorek, zpravidla pufr, v němž je vzorek rozpuštěn, resp. do něhož je převe-



Obr. 1. Schéma kyvety se dvěma sektory a odpovídajícího sedimentačního záznamu. Roztok vzorku je umístěn do jednoho sektoru a roztok rozpouštědla (zpravidla pufru) po vzájemné rovnovážné dialýze je umístěn do druhého sektoru jako kontrola. Sektor reference se obvykle plní o něco více než sektor vzorku, aby meniskus reference nezakrýval sedimentační profil vzorku. Vzorek působením odstředivé síly sedimentuje směrem ke dnu kyvety a dojde tak k vytvoření sedimentačního rozhraní

den dialýzou. Svazky světla procházejí oběma sektory kyvety rovnoběžně s osou otáčení, štěrbinu umístěná pod kyvetou se pohybuje v radiálním směru (kolmém na osu otáčení, ve směru působení odstředivé síly), výsledkem je tedy závislost absorpance vzorku na poloměru otáčení (obr. 1). Interferenční optika naproti tomu pracuje se dvěma širokými svazky laseru, které procházejí oběma sektory kyvety v celé její radiální šířce. Po průchodu kyvetou dochází k interferenci obou svazků a vzniklé interferenční proužky jsou optickým systémem přeneseny až na CCD kameru. Při sedimentaci vzorku dochází ke změnám indexu lomu světla oproti kontrole, což se projeví zakřivením interferenčních proužků a jejich posunem oproti referenci. Tvar a posun proužků snímáný kamerou lze přímo pozorovat v reálném čase na obrazovce řídicího počítače, obraz je matematicky zpracován metodami Fourierovy transformace a výsledkem je opět závislost posunu interferenčních proužků (která přímo odpovídá změnám koncentrací látek v roztoku) na poloměru otáčení. Absorbanční optika je vhodná především pro sledování sedimentace proteinů (230 či 280 nm) a nukleových kyselin (260 nm), přičemž lze pracovat v koncentračním rozmezí přibližně $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ až 1mg ml^{-1} . Interferenční optiku lze naopak s výhodou využít při studiu neabsorbujících látek, například polysacharidů, nebo koncentrovaných roztoků látek absorbujících. Spotřeba vzorku je typicky $400 \mu\text{l}$ pro sedimentační rychlost a $110 \mu\text{l}$ pro sedimentační rovnováhu, přičemž analýza je nedestruktivní a vzorek lze po jejím ukončení odebrat zpět a použít pro jiné účely. Poslední technickou inovací

celého systému a současnou hranicí možností celé metody je sledování fluorescence vzorku, které je nyní možné s komerčně dostupným optickým systémem firmy AVIV Biomedical (Lakewood, USA, www.avivbiomedical.com).

4. Přehled aplikací

Při studiu chování makromolekul hledáme často odpovědi na následující otázky²: Je vzorek homogenní? Jaká je jeho molekulová hmotnost? Pokud je přítomno více druhů molekul, jaká je distribuce jejich molekulových hmotností? Jaká je velikost a tvar makromolekul? Můžeme mezi nimi detegovat vzájemnou interakci a určit její stechiometrii a sílu vazby? Mění se konformace makromolekul? Odpovědi na výše uvedené otázky můžeme získat sedimentační analýzou v analytické ultracentrifuze, a to provedením dvou základních typů experimentů: sedimentační rychlosti a sedimentační rovnováhy, které poskytují komplementární informace. Často je užitečné použít k vyřešení daného problému obou technik zároveň.

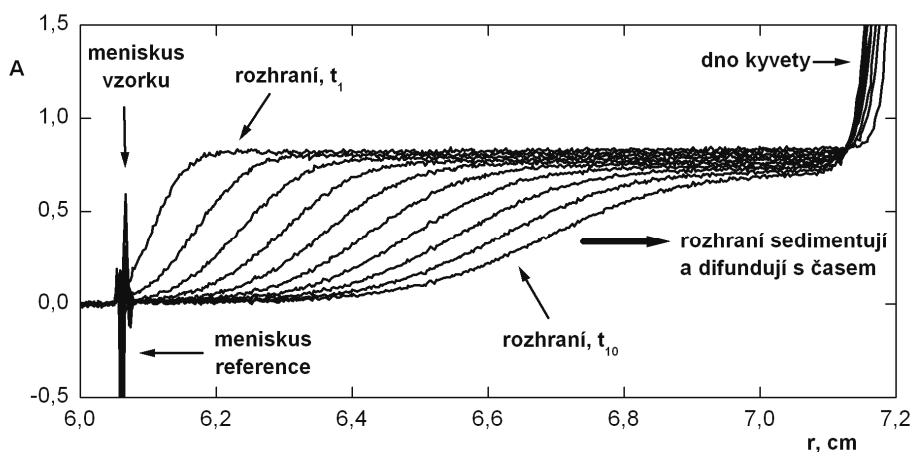
5. Sedimentační rychlost

Měření sedimentační rychlosti je hydrodynamická technika, která je citlivá k hmotnosti a tvaru makromolekul. Při použití dostatečně velké odstředivé síly za vysokých otáček se začnou všechny makromolekuly stejnoměrně pohybovat směrem ke dnu kyvety. Vytvoří se tak pohybující se rozhraní (angl. termín „boundary“) mezi sedimentujícími makromolekulami a oblastí roztoku, ve které se již nenacházejí (obr. 2). Toto rozhraní se pohybuje od menisku směrem ke dnu kyvety a rychlost tohoto pohybu je sledována sérií snímků. Vlivem difuze však zároveň dochází k rozmývání rozhraní, což se na snímcích projeví změnou jeho tvaru. Z rychlosti pohybu a tvaru rozhraní tak lze určit sedimentační a difuzní koeficient dané makromolekuly. Sedimentační koeficient makromolekuly s je určen jejími molekulárními parametry vyjádřenými ve Svedbergově rovnici^{2,3}:

$$s = u/\omega^2 r = M(1 - \bar{v}\rho)/N_A f = MD(1 - \bar{v}\rho)/RT$$

kde je u pozorovaná radiální rychlost pohybu makromolekuly, ω^2 úhlová rychlost rotoru, r vzdálenost od osy otáčení, $\omega^2 r$ odstředivá síla, M molekulová hmotnost, \bar{v} parciální specifický objem molekuly, ρ hustota roztoku, N_A Avogadrova konstanta, f frikční koeficient, D difuzní koeficient a R univerzální plynová konstanta; k úpravě rovnice do tvaru na pravé straně bylo použito vztahu $D = RT/N_A f$. Hodnota sedimentačního koeficientu se běžně udává v jednotkách Svedberg (S), přičemž 1 S odpovídá 10^{-13} s. Hodnotu frikčního koeficientu pro hladkou, kompaktní kulovitou částici můžeme určit pomocí Stokesova zákona jako $f_0 = 6\pi\eta R_0$, kde f_0 je frikční koeficient sférické částice, η je viskozita roztoku a R_0 je poloměr koule. Můžeme pak kombinovat Svedbergovu a Stokesovu rovnici, v níž je poloměr koule R_0 vyjádřen jako $(3M\bar{v}/4\pi N_A)^{1/3}$ do tvaru:

$$s_{\text{koule}} = [M(1 - \bar{v}\rho)]/[N_A 6\pi\eta (3M\bar{v}/4\pi N_A)^{1/3}]$$



Obr. 2. **Měření sedimentační rychlosti.** Soubor deseti snímků byl zaznamenán analytickou ultracentrifugou ProteomeLab XL-I s použitím absorbanční optiky při 280 nm. První a poslední snímek je označen t_1 a t_{10} , časový rozdíl mezi jednotlivými křivkami činí 25 min. První křivka zaznamenaná po 25 min sedimentace již vykazuje mírné rozmytí v důsledku difuze, které se zvětšuje během měření vzorku (40 kDa rekombinantní NK buněčný receptor rClrb, 45 000 ot min⁻¹)

Dosadíme-li za všechny konstanty číselné hodnoty (η pro vodu při 20 °C), získáme sedimentační koeficient koule vyjádřený pouze pomocí M , \bar{v} a ρ (v jednotkách: $M - \text{Da}$, $s - \text{S}$, $\bar{v} - \text{ml g}^{-1}$ a $\rho - \text{g ml}^{-1}$):

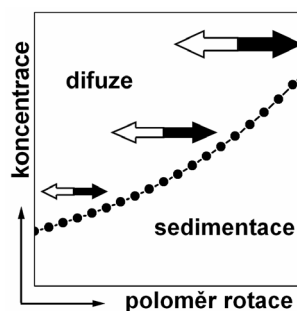
$$s_{\text{koule}} = 0,012[M^{2/3}(1 - \bar{v}\rho)]/\bar{v}^{1/3}$$

Tato hodnota sedimentačního koeficientu je maximální možná hodnota, kterou lze získat pro protein o dané hmotnosti, protože koule má nejmenší plochu povrchu v kontaktu s rozpouštědlem a tedy i nejmenší frikční koeficient f_0 . Pro účely srovnání dat z různých laboratoří či různých experimentálních podmínek je třeba převést určenou hodnotu sedimentačního koeficientu do standardního stavu vody a 20 °C $s_{20,v}$. Poměr maximálního a pozorovaného sedimentačního koeficientu $s_{\text{koule}}/s_{20,v}$ je roven poměru pozorovaného a minimálního frikčního koeficientu, ff_0 , což udává maximální možnou odchylku od tvaru koule. Toho lze využít pro odhad velikosti a tvaru částice, jak bude ukázáno v následujícím příkladu. Pro jednoduchost uvažujme sedimentaci pouze jednoho druhu částic. Jakmile byla určena hodnota $s_{20,v}$, můžeme se ptát: je tato hodnota konzistentní s molární hmotností sekvence monomeru proteinu? Pomocí rovnice pro výpočet s_{koule} můžeme určit maximální hodnotu $s_{20,v}$ pro jeho monomer. Pokud je pozorovaná hodnota $s_{20,v}$ výrazně vyšší, protein není monomerní, zatímco nižší hodnota naznačuje protáhlý tvar monomerního proteinu (vyšší ff_0). Předpokládejme, že máme protein o molární hmotnosti 50 kDa a získali jsme hodnotu sedimentačního koeficientu $s_{20,v}$ 5,87 S. Na základě molární hmotnosti monomeru proteinu jsme vypočítali maximální hodnotu $s_{20,v}$ jako 4,93 S. Pozorovaný $s_{20,v}$ je zjevně mnohem vyšší než teoretická hodnota pro monomer proteinu tvaru koule, což svědčí o tvorbě větší částice. Dimer proteinu by měl teoretické $s_{20,v}$ 7,77 S. Poměr $s_{\text{koule}}/s_{20,v}$ určuje asymetrii proteinu ff_0 , a pro výše uvedený příklad dostáváme $ff_0 = 1,33$, což odpovídá protáhlému rotačnímu

elipsoidu s rozměry os 17,3 nm (2a) a 4,3 nm (2b). Z jednoho experimentu tak lze získat poměrně velké množství informací, v současnosti i o rovnovážných reakcích⁴.

6. Sedimentační rovnováha

Sedimentační rovnováha je termodynamická technika, která je citlivá k hmotnosti, ale ne ke tvaru makromolekul^{2,3}. V tomto experimentu je vzorek centrifugován při nižších otáčkách, rozpuštěné látky sedimentují ke dnu kyvety a jak se zde jejich koncentrace zvyšuje, difuze začíná působit proti sedimentaci. Po jistém čase se tyto dva protikladné procesy dostanou do vzájemné rovnováhy a koncentrační profil se již dále nemění (obr. 3). Pro analýzu stačí 1–10 μg proteinu, tedy množství srovnatelné s nanáškou na gelovou elektroforézu. Nejdůkladnější pří-



Obr. 3. **Schématické znázornění procesů při sedimentační rovnováze.** Tok rozpuštěných částic v důsledku sedimentace (černá šipka) vzrůstá s poloměrem rotace. Tento proces je za rovnováhy vyrovnán tokem částic vlivem difuze (bílá šipka), která vzrůstá s gradientem koncentrace

stup k analýze sedimentační rovnováhy vychází z termodynamiky – za rovnováhy je celkový potenciál roztoku ve všech místech kyvety stejný. Z jednoduššího mechanického úhlu pohledu nepozorujeme žádný celkový tok částic v roztoku. Lze ukázat, že pro jedinou, ideální, neasociující částici platí²:

$$M = 2RT/[(1 - \bar{v}\rho)\omega^2] d(\ln c)/dr^2$$

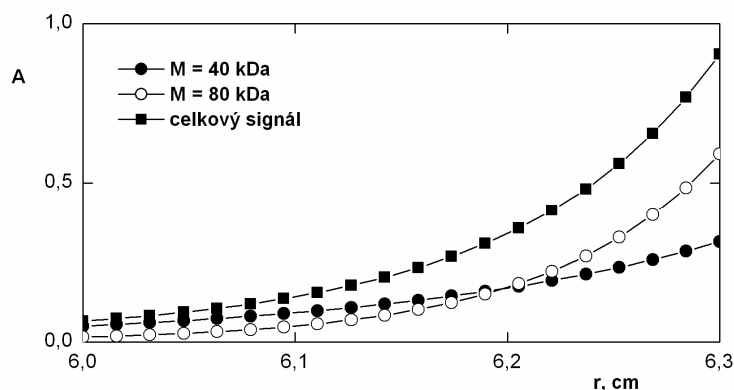
kde je M molární hmotnost částice (v g mol⁻¹), ω úhlová rychlost rotoru a c koncentrace částic (v g dm⁻³) v radiální vzdálenosti r od osy otáčení; a tedy graf závislosti $\ln c$ vs. r^2 pro jedinou, ideální částici v sedimentační rovnováze bude mít směrnici přímo úměrnou M .

Sedimentační rovnováha je jedna z nejlepších metod určování molekulové hmotnosti makromolekul². Je použitelná pro širokou škálu molekulových hmotností, od sacharózy ($M_r = 360$) až po viry ($M_r =$ mnoho milionů). Pomocí sedimentační rovnováhy provedené ve fyziologických puffrech lze určit molekulové hmotnosti stabilních nativních oligomerů proteinů či proteinových komplexů, zatímco při použití denaturujících roztoků chaotropních činidel, např. močoviny či guanidin hydrochloridu o vysoké koncentraci, lze určit hmotnost podjednotek. Pokud jsou v roztoku navzájem neinteragující částice o různé molekulové hmotnosti (směs několika různých proteinů), je výsledná pozorovaná distribuce částic superpozicí křivek rovnovážné distribuce jednotlivých složek směsi (obr. 4). Toho lze využít např. při charakterizaci čistoty a homogeneity proteinového preparátu. Skutečným vrcholem využití sedimentační rovnováhy je studium reverzibilních rovnovážných asociačních reakcí^{3,5}, kdy koncentrace všech komponent systému splní podmínky jak sedimentační, tak chemické rovnováhy, ve všech bodech kyvety. Lze sledovat reakce vedoucí k tvorbě oligomerů téže částice (např. monomer-dimer) i heterogenní interakce, kdy dvě či více částic reverzibilně tvoří komplex s definovanou stechiometrií a asociační konstantou v rozpětí řádů přibližně 10⁴ až 10⁸.

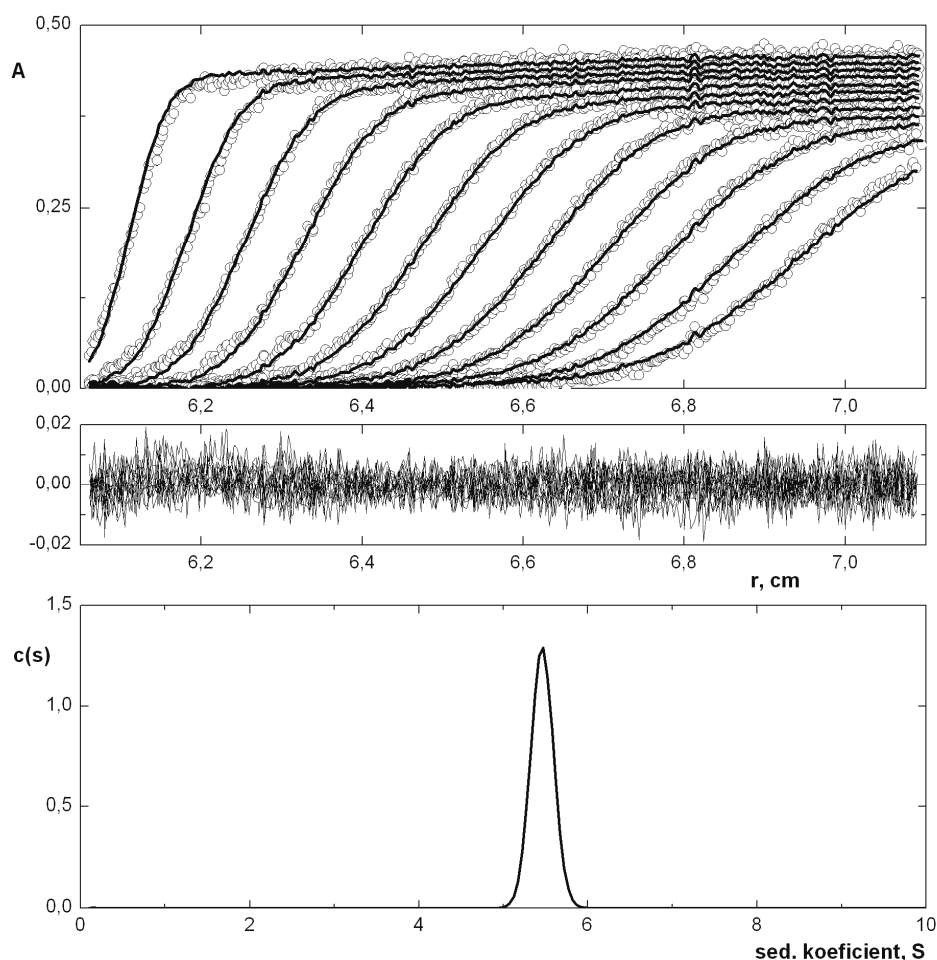
7. Analýza sedimentačních dat

Ačkoliv pokročilé matematické teorie popisující experimenty sedimentační rychlosti a rovnováhy mohou být poměrně složité, existuje dnes mnoho sofistikovaných a přitom uživatelsky snadno přístupných programů, které umožňují analýzu dat a jejich vyhodnocení i neodborným uživatelům. Jejich přehled spolu s popisem jejich aplikací lze nalézt v literatuře^{3,6}. Kromě experimentálních proměnných (počet otáček, teplota) je pro přesnou analýzu nezbytné znát také hustotu a viskozitu použitého pufru a parciální specifický objem analyzované makromolekuly. Obě tyto veličiny lze sice stanovit experimentálně, z praktických důvodů jsou ovšem zpravidla aproximovány z tabulovaných hodnot dle složení pufru a aminokyselinové sekvence, nejčastěji pomocí programu SEDNTERP⁷. Díky rozvoji výpočetní techniky se dnes nejvíce uplatňuje přímé proložení experimentálních bodů sedimentačních rozhraní funkcí vycházející z řešení Lammovy rovnice, která popisuje toky částic v sektorové kyvetě v odstředivém poli, s následnou nelineární regresí metodou nejmenších čtverců³. Tento přístup je závislý na modelu – snažíme se experimentální data co nejlépe popsat pomocí modelů jako jediná ideální částice, rovnováha monomer-dimer, $A + B \rightleftharpoons AB$, atp. a je třeba rozhodnout, který model vysvětluje získaná sedimentační data nejlépe. Na našem pracovišti se nejlépe osvědčila dvojice programů Sedfit⁸ a Sedphat⁹.

Jednoduchým způsobem analýzy sedimentačního rychlostního experimentu je použit výnos distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$, jak je znázorněno na příkladu analýzy pomocí programu Sedfit (obr. 5). Roztok rekombinantní rozpustné formy potkaního NK buněčného receptoru NKR-P1B s FcHis kotvou (cca 110 kDa glykosylovaný kovalentní dimer proteinu) o koncentraci 1 mg ml⁻¹ byl centrifugován při 20 °C a 36 000 ot min⁻¹ po dobu 5 h a každých 5 min byl zaznamenán jeho sedimentační profil



Obr. 4. Sedimentační rovnováha směsi dvou různých makromolekul. Data byla simulována pro neinteragující ideální částice o hmotnosti 40 kDa a 80 kDa při 15 000 ot min⁻¹ a $\bar{v} = 0,73$ ml g⁻¹ pro obě částice. Celkový měřený signál směsi je součtem překrývajících se dílčích signálů rovnováh jednotlivých komponent směsi

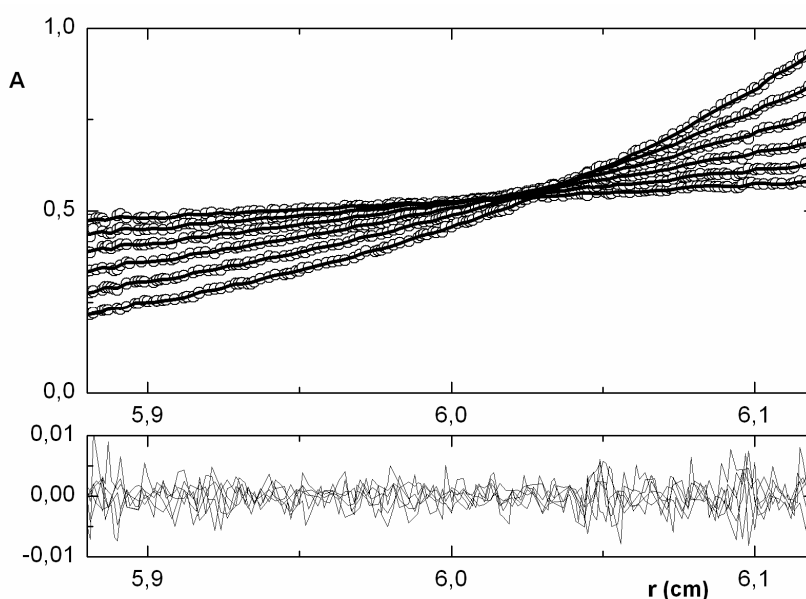


Obr. 5. Ukázka analýzy dat ze sedimentační rychlosti programem Sedfit. Nahoře: soubor změřených sedimentačních profilů vzorku (kroužky, pro srozumitelnost zobrazen pouze každý pátý snímek) a výsledek jejich modelování dle Lammovy rovnice (křivky). Uprostřed: zbytkový graf ukazující přesnost modelování. Dole: distribuce sedimentačního koeficientu v analyzovaném vzorku. Podrobný popis uveden v textu

jako absorbance při 300 nm (obr. 5, nahoře, kroužky, pro srozumitelnost zobrazen pouze každý pátý snímek). S tímto souborem dat bylo poté v programu Sedfit provedeno modelování dle Lammovy rovnice s následnou nelineární regresí funkce včetně uplatnění korekcí pro vyloučení optických artefaktů (obr. 5, nahoře, křivky). Parciální specifický objem proteinu a hustota pufru byly aproximovány programem SEDNTERP. Kvalitu výsledného modelu analýzy lze posoudit z tzv. zbytkového grafu (angl. termín „residual plot“) ukazujícího rozdíl mezi hodnotami naměřené absorbance a výsledného modelu (obr. 5, uprostřed), přičemž známkou dobrého modelu je náhodné rozložení hodnot kolem nuly s amplitudou odpovídající úrovni experimentálního šumu (pro absorbanční data asi 0,01) a absence systematických odchylek u všech křivek. Výsledkem celé analýzy je graf distribuce sedimentačního koeficientu $c(s)$, který ukazuje zastoupení částic o daném sedimentač-

ním koeficientu v analyzovaném vzorku s intervalem spolehlivosti 95 % (obr. 5, dole). Integrací plochy pod vrcholem distribuce dostaneme hodnotu pozorovaného sedimentačního koeficientu, $5,46 \pm 0,12$ S, která dobře odpovídá očekávané velikosti dimerního proteinu.

V případě sedimentační rovnováhy je přímým výstupem molekulová hmotnost, pro rovnovážné systémy je třeba navíc získat data z různých otáček při různých koncentracích a poměrech studovaných látek. Pro jednoduchý systém, jakým je roztok čistého proteinu, který sedimentuje jako ideální částice, je analýza poměrně jednoduchá (obr. 6). Roztok lysozymu o koncentraci $0,15 \text{ mg ml}^{-1}$ byl centrifugován při 20°C postupně při 9000, 12 000, 15 000, 18 000, 21 000 a 24 000 ot min^{-1} vždy 18 h a poté byla zaznamenána jeho rovnovážná distribuce při daném počtu otáček jako absorbance při 280 nm (obr. 6, nahoře, kroužky). S tímto souborem dat byla poté v programu Sed-



Obr. 6. Ukázka analýzy dat ze sedimentační rovnováhy programem Sedphat. Nahore: soubor změřených sedimentačních profilů vzorku (kroužky) a výsledek jejich modelování (křivky). Dole: zbytkový graf ukazující přesnost modelování. Podrobný popis uveden v textu

phat provedena globální analýza pro model jedné ideální částice s uplatněnými korekcemi pro vyloučení optických artefaktů (obr. 6, nahore, křivky); parciální specifický objem lysozymu a hustota pufru byly aproximovány programem SEDNTERP. Kvalitu výsledného modelu analýzy lze opět posoudit ze zbytkového grafu (obr. 6, dole). Výsledkem celé analýzy je hodnota molekulové hmotnosti, která byla v tomto případě vypočtena jako $14\,163 \pm 175$ Da s intervalem spolehlivosti 95 %. Molekulová hmotnost lysozymu je $14\,305$ Da, je ovšem třeba si uvědomit, že vypočtená molekulová hmotnost silně závisí na predikci parciálního specifického objemu, a proto je třeba uvažovat přesnost spíše v řádu několika set Da.

Program Sedphat navíc umožňuje globální modelování více experimentů současně (sedimentačních rovnováh, rychlostí i dat z dynamického rozptylu světla), obsahuje řadu matematických modelů a lze ho tak použít k analýze i poměrně složitých systémů. Správnost zvoleného modelu lze posoudit jednak ze zbytkového grafu, kdy systematické odchylky poukazují např. na probíhající rovnovážnou reakci, asociaci či neideální chování zkoumaného systému, a také pomocí statistických metod^{2,3,6}.

8. Příklady analýz

Také jste se asi ve škole při hodině biologie podívali, jak je možné, že se naše ribozomy skládají ze dvou podjednotek, 40S a 60S, které dohromady tvoří celý ribozom 80S – a nikoli 100S, jak by se dalo ze součtu „velikostí“ podjednotek očekávat. Toto je asi nejznámější příklad využití analytické ultracentrifugy, se kterým se

jistě potkal téměř každý student přírodních věd. V hodnotách sedimentačních koeficientů je totiž ukryta informace jak o hmotnosti, tak tvaru a proto je nelze „sčítat“. V současnosti se analytická ultracentrifugace uplatňuje především při studiu biomakromolekul a jejich komplexů na jedné straně a při rutinní kontrole kvality biofarmaceutik na straně druhé¹⁰. V případě monoklonálních protilátek se jedná především o kontrolu homogenity preparátu – a právě to je ideální použití pro metodu sedimentační rychlosti, která je citlivá i vůči malému množství přítomných agregátů¹¹. Navíc lze měření provést přímo v roztoku, v jakém bude preparát prodáván, a to i opakovaně po jeho delším skladování. Z komerčního hlediska je to nyní pro analytickou ultracentrifugu patrně dominantní oblast využití.

Aplikace analytické ultracentrifugace ve vědě a výzkumu jsou nesčetné, už roku 1999 konstatují Cole a Hansen ve svém výborném přehledu⁶, že jejich kompletní seznam nelze zprostředkovat, přesto vybírají alespoň ty nejdůležitější. Zapátráme-li v současné literatuře, zjistíme, že analytická ultracentrifugace významně přispěla např. ke studiu oligomerizace tubulinu¹², která je dynamicky regulována pomocí proteinů asociovaných s mikrotubuly, studovaných analytickou ultracentrifugací, izotermální titrační kalorimetrií a NMR¹³. Časté je využití ve strukturální biologii pro ověření, zda oligomerní stav molekuly pozorovaný v krystalu je také tvořen za nativních podmínek v roztoku, jako např. při studiu krystalové struktury proteinu m153 myšího cytomegaloviru, který imituje přirozené MHC-I molekuly napadené buňky a přispívá tak k úniku viru před imunitní odpovědí¹⁴. Podobně i studium struktury bakteriálních Lon proteas využívá kombinace dat

z analytické ultracentrifugy a elektronové mikroskopie, popisujících nativní oligomery, a z krystalových struktur jednotlivých zkrácených domén Lon proteas k rekonstrukci struktury celé molekuly¹⁵. Pěkný příklad využití sedimentační rovnováhy pro studium protein-proteinových interakcí nabízí práce K. F. Tóthové o asociaci histonového chaperonu proteinu NAP1 („Nucleosome Assembly Protein 1“) a jeho komplexech s histony¹⁶. Při studiu samo-asociace apolipoproteinů E3 a E4 (které jsou geneticky spojeny s Alzheimerovou chorobou a aterosklerózou) bylo využito série delečních mutantů a sedimentační rychlosti i rovnováhy k určení závislosti deagregace těchto proteinů na přítomnosti lipidů¹⁷. Příklad využití fluorescenčního detekčního systému nabízí např. studium oligomerizace p53 proteinu¹⁸ nebo studium lipidy indukované tvorby tetrameru apolipoproteinu C-II, vedoucí k tvorbě amyloidových vláken¹⁹.

V září roku 2009 se ve švédské Uppsale konalo u příležitosti 125. výročí narození Theodora Svedberga mezinárodní symposium o analytické ultracentrifugaci a k této příležitosti bylo také vytvořeno speciální číslo časopisu *Macromolecular Bioscience*²⁰, v němž je možno nalézt mnoho aktuálních informací a příkladů aplikace této metody. V naší laboratoři jsme využili této techniky pro objasnění nativního stavu leukocytárního antigenu CD69^{21,22} i dalších námi studovaných receptorů (obr. 2, 5 a 6).

9. Závěr

Analytická ultracentrifugace je velice užitečná technika, která umožňuje charakterizovat chování makromolekul přímo v roztoku za nativních podmínek z hlediska jejich hydrodynamických a termodynamických vlastností, a to bez nutnosti interakce s jakoukoliv maticí či povrchem. Po delší odmlce během druhé poloviny dvacátého století prožívá nyní tato metoda svou renesancí, a to díky dostupnosti moderních přístrojů a zároveň dříve nemyslitelného rychlého a výkonného zpracování získaných dat počítačem. Ve spojení se současnými metodami analýzy sedimentačních dat jsou experimenty prováděné v analytické ultracentrifuge schopné důkladně prověřit čistotu vzorku, charakterizovat mechanismy vzniku a zániku makromolekulárních komplexů, určit stechiometrii podjednotek, detegovat a charakterizovat změny v konformacích makromolekul a měřit rovnovážné konstanty a termodynamické parametry samo- i hetero-asociujících systémů. Je to vhodná metoda pro určování molárních hmotností za nativních podmínek a jedna z klíčových metod pro studium interakcí mezi makromolekulami, jako jsou interakce protein-protein, protein-nukleová kyselina a protein-malá molekula. Zásluhou podpory, kterou rozvoji této experimentální techniky věnovalo vedení chemické sekce UK PĚF v Praze, je nyní tato experimentální technika ve svém moderním provedení dostupná i pro uživatele v České republice. Případní zájemci o možnosti využití této experimentální techniky mohou získat další informace u autorů, nebo prostřednic-

tvím webových stránek katedry biochemie UK PĚF <http://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/služby>.

Zakoupení a provoz analytické ultracentrifugy ProteomeLab XL-I (Beckman Coulter) bylo umožněno finanční podporou chemické sekce Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze a MŠMT ČR (projekty MSM 21620808 a 1M0505).

LITERATURA

1. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1926/svedberg-bio.html, staženo 22.6.2010.
2. <http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/361847.pdf>, staženo 22.6.2010.
3. Lebowitz J., Lewis M. S., Schuck P.: *Protein Sci.* 11, 2067 (2002).
4. Brown P. H., Balbo A., Schuck P.: *Eur. Biophys. J.* 38, 1079 (2009).
5. <http://www.beckmancoulter.com/Literature/BioResearch/362784.pdf>, staženo 22.6.2010.
6. Cole J. L., Hansen J. C.: *J. Biomol. Tech.* 10, 163 (1999).
7. <http://www.jphilo.mailway.com/download.htm>, staženo 22.6.2010.
8. Schuck P.: *Biophys. J.* 78, 1606 (2000); program dostupný z <http://www.analyticalultracentrifugation.com/default.htm>, staženo 22.6.2010.
9. Schuck P.: *Anal. Biochem.* 320, 104 (2003); program dostupný z <http://www.analyticalultracentrifugation.com/sedphat/default.htm>, staženo 22.6.2010.
10. Berkowitz S. A.: *AAPS J.* 8, 590 (2006).
11. Brown P. H., Balbo A., Schuck P.: *AAPS J.* 10, 481 (2008).
12. Correia J. J.: *Methods Cell Biol.* 95, 275 (2010).
13. Devred F., Barbier P., Lafitte D., Landrieu I., Lippens G., Peyrot V.: *Methods Cell Biol.* 95, 449 (2010).
14. Mans J., Natarajan K., Balbo A., Schuck P., Eikel D., Hess S., Robinson H., Simic H., Jonjic S., Tiemessen C. T., Margulies D. H.: *J. Biol. Chem.* 282, 35247 (2007).
15. Duman R., Löwe J.: *J. Mol. Biol.* (2010), doi: 10.1016/j.jmb.2010.06.030.
16. Tóth K. F., Mazurkiewicz J., Rippe K.: *J. Biol. Chem.* 280, 15690 (2005).
17. Chou C. Y., Jen W. P., Hsieh Y. H., Shiao M. S., Chang G. G.: *J. Biol. Chem.* 281, 13333 (2006).
18. Brandt T., Petrovich M., Joerger A. C., Vepriřsev D. B.: *BMC Genomics* 10, 628 (2009).
19. Ryan T. M., Howlett G. J., Bailey M. F.: *J. Biol. Chem.* 283, 35118 (2008).
20. Cölfen H.: *Macromol. Biosci.* 10 (2010), doi: 10.1002/mabi.201000201.
21. Vaněk O., Nálezková M., Kavan D., Borovičková I., Pompach P., Novák P., Vinay K., Vannucci L., Hudeček J., Hofbauerová K., Kopecký V. Jr., Brynda J.,

- Kolenko P., Dohnálek J., Kadeřávek P., Chmelík J., Gorčík L., Židek L., Sklenář V., Bezouška K.: *FEBS J.* 275, 5589 (2008).
22. Kavan D., Kubíčková M., Bílý J., Vaněk O., Hofbauerová K., Mrázek H., Rozbeský D., Bojarová P., Křen V., Židek L., Sklenář V., Bezouška K.: *Biochemistry* 49, 4060 (2010).

O. Vaněk^a and K. Bezouška^{a,b} (^a *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Charles University, Prague,* ^b *Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*): **Analytical Ultracentrifuge and Its Utilization in Biochemical Laboratory**

Sedimentation analysis of macromolecules carried out with analytical ultracentrifuge is a powerful method for the study of proteins, nucleic acids and other polymers and their various complexes. Monitoring sedimentation of macromolecules in the centrifugal field allows their hydro-

dynamic and thermodynamic characterization in solution, i.e. in native conditions, without interactions with any matrix or surface. This allows direct measurement of molecular weight and sedimentation coefficient of macromolecules, monitoring of sample purity and homogeneity, prediction of size and shape of sedimenting species and, last but not least, study of equilibrium reactions, including determination of their stoichiometry and equilibrium constants. In the present review, we first focused on the history of the technique and properties and potentials of a modern instrument. Two types of experiments performed using analytical ultracentrifuge, sedimentation velocity and equilibrium, are discussed, together with a brief introduction into sedimentation theory. In the end, sedimentation data analysis is discussed and some examples of utilization of analytical ultracentrifugation are provided. Combination of new instrumentation and computational software for data analysis has led to major advances in characterization of proteins and their complexes. After temporary silence in the past decades, analytical ultracentrifugation at present experiences renaissance in proteomic research.