



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

**FAKULTA CHEMICKÁ**

FACULTY OF CHEMISTRY

**ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE**

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**VYUŽITÍ MIKROKALORIMETRICKÝCH METOD PŘI  
STUDIU PROTEKTIVNÍCH ÚČINKŮ CHEMICKÝCH  
CHAPERONŮ**

THE USE OF MICROCALORIMETRIC METHODS IN THE STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECTS OF  
CHEMICAL CHAPERONS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

Miroslava Bohunská

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2019

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1373/2018 Akademický rok: 2018/19  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Studentka: **Miroslava Bohunská**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Jitka Krouská, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Využití mikrokolorimetrických metod při studiu protektivních účinků chemických chaperonů

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma se zaměřením na denaturaci proteinů.
2. Na základě získaných poznatků z literatury navrhnete a provedte vhodné experimenty.
3. Vyhodnotíte získaná data a provedte diskuzi výsledků.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2019:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Miroslava Bohunská  
student(ka)

-----  
Ing. Jitka Krouská, Ph.D.  
vedoucí práce

-----  
prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

-----  
prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Tato bakalářská práce se zabývá studiem ochranných látek před denaturačními procesy, označovanými jako chemické chaperony. V teoretické části byla popsána obecná charakteristika proteinů, popis vybraných chaperonů a metody diferenční kompenzační kalorimetrie.

V experimentální části byly zkoumány protektivní účinky čtyř potenciálních protektivních látek – trehalóza, guanidín hydrochloride, 3-hydroxybutyrát a hydroxyectoine – na modelovém proteinu lysozymu. Protektivní účinky jednotlivých látek byly zkoumány pomocí diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC), kterou byla stanovena denaturační teplota lysozymu v přítomnosti ochranných látek.

Ze všech zkoumaných chemických chaperonů byl nejvyšší protektivní efekt pozorován u 3-hydroxybutyrátu, který teplotu denaturace posunoval k vyšším hodnotám, a guanidín hydrochloride, který naopak denaturační teplotu snižoval. Zároveň byl u některých látek zjištěn reverzibilní denaturační proces, který byl u GuHCl nejintenzivnější.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

Protein, chemické chaperony, diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC)

## **ABSTRACT**

This bachelor thesis deals with the study of protective substances against denaturation processes, called chemical chaperones. The theoretical part describes the general characteristics of proteins, description of selected chaperones and methods of differential scanning calorimetry.

In the experimental part, the protective effects of four potential protective agents - trehalose, guanidine hydrochloride, 3-hydroxybutyrate and hydroxyectoine - were investigated on the lysozyme model protein. The protective effects of the individual substances were examined by differential scanning calorimetry (DSC), which determined the denaturation temperature of lysozyme in the presence of preservatives.

Of all the chemical chaperones examined, the highest protective effect was observed with 3-hydroxybutyrate, which shifted the denaturation temperature to higher levels, and guanidine hydrochloride, which on the other hand lowered the denaturation temperature. At the same time, a reversible denaturation process was found in some substances, which was the most intense in GuHCl.

## **KEYWORDS**

Protein, chemical chaperones, differential scanning calorimetry (DSC)

BOHUNSKÁ, Miroslava. *Využití mikrokolorimetrických metod při studiu protektivních účinků chemických chaperonů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie, 2019, 35 s. Vedoucí práce Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Bakalářská práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Tímto bych chtěla velmi poděkovat své vedoucí Ing. Jitce Krouské, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi při vypracování mé bakalářské práce věnovala. Také bych ráda poděkovala své rodině a kamarádům, kteří mě podporovali během studia na vysoké škole.

## **OBSAH**

<b>1</b>	<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>10</b>
3.1	Proteiny.....	10
3.1.1	Charakteristika proteinů .....	10
3.1.2	Struktura proteinů .....	10
3.2	Chaperony .....	11
3.2.1	Základní typy .....	11
3.2.2	Hsp60.....	12
3.2.3	Hsp70.....	12
3.2.4	Hsp90.....	12
3.2.5	Hsp100.....	12
3.3	Konkrétní proteiny .....	13
3.3.1	Lysozym .....	13
3.3.2	Lipáza .....	13
3.4	Konkrétní chaperony .....	14
3.4.1	Trehalóza .....	14
3.4.2	Guanidine hydrochlorid .....	15
3.4.3	3HB.....	15
3.4.4	Hydroxyectoine .....	16
3.5	Kalorimetrie .....	17
3.5.1	Historie .....	17
3.5.2	Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC).....	17
3.5.3	Měření DSC kalorimetrem .....	18
<b>4</b>	<b>SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY</b> .....	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST</b> .....	<b>23</b>
5.1	Použité chemikálie .....	23
5.2	Použité přístroje a pomůcky .....	23
5.3	Příprava zásobních roztoků a vzorků.....	23
5.3.1	Fosfátový pufr .....	23
5.3.2	Příprava vzorku lysozymu .....	23
5.3.3	Příprava roztoků chemických chaperonů .....	23

5.4	Studium vlivu chaperonů na teplotu denaturace pomocí DSC kalorimetru .....	23
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE.....</b>	<b>25</b>
6.1	Výběr vhodné koncentrace lysozymu pro měření .....	25
6.2	Účinek trehalózy .....	26
6.3	Účinek 3HB .....	26
6.4	Účinek guanidine hydrochloridu.....	27
6.5	Účinek hydroxyectonu .....	28
6.6	Srovnání jednotlivých chaperonů.....	29
<b>7</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>31</b>
<b>8</b>	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>35</b>

# 1 ÚVOD

Počátky poznávání proteinů sahají až do dávné minulosti, kdy první výzkumy probíhaly v rámci organické chemie. Proteiny představují základ živého organismu, bez kterého by život nemohl existovat a souvisí s každým projevem jeho existence. Kvůli jejich důležitosti byly a stále jsou středem pozornosti ve vědeckém bádání.

Proteiny jsou velmi citlivé na širokou škálu fyzikálních, chemických a biologických faktorů, kdy dochází k narušení prostorové struktury a následně ke ztrátě biologické funkce. Ovšem bylo zjištěno, že chemické chaperony jsou schopny ochránit protein před poškozením a ztrátou funkce. Chaperony se syntetizují při buněčném stresu, jako je změna teploty, změna pH, účinek toxických látek atd., a syntézou chaperonů se tedy proteiny brání denaturaci.

Téma této bakalářské práce bylo zvoleno s ohledem na současný stav výzkumu FCH v oblasti 3-hydroxybutyrát a jeho vlastností – protektivních účinků na proteiny. V letošním roce byl pořízen nový přístroj PEAQ-DSC (Malvern, USA) pro stanovení denaturační teploty kapalných vzorků, který umožnil další posun v této oblasti výzkumu. Bylo provedeno velké množství prvotních experimentů, kdy se hledaly vhodné podmínky pro měření (rychlost ohřevu), vhodné koncentrace jednotlivých vzorků, ať už se jednalo o čistý protein nebo s přídatkem chemických chaperonů. Dále bylo nutné zjistit, jakým způsobem čistit měřicí cely pro dobrou reprodukovatelnost měření.

Experimentální část je tudíž zaměřena na optimalizaci přípravy a měřících postupů různých vzorků proteinů s různými chaperony, které ovlivňují teplotu denaturace. Při měření samozřejmě vzniklo množství nepoužitelných výsledků, dokud se nepodařilo najít vhodné parametry pro modelový systém lysozymu s chaperony (trehalóza, 3HB, guanidine hydrochlorid a hydroxyectoine).



## **2 CÍL PRÁCE**

Práce se zaměřuje na studium denaturace známého modelového proteinu lysozymu. Hlavním cílem práce bylo optimalizovat podmínky měření na nově pořízeném přístroji s využitím dostupných informací v literatuře. Výsledky této práce jsou tak cenným základem pro následné využití této mikrokalořimetrické techniky v dalších oblastech výzkumu FCH VUT v Brně.

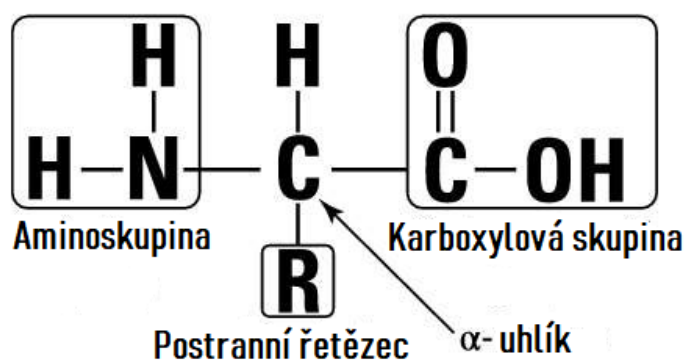
## 3 TEORETICKÁ ČÁST

### 3.1 Proteiny

#### 3.1.1 Charakteristika proteinů

Proteiny jsou rozmanité a strukturně velmi složité biologické makromolekuly. Podílejí se téměř na každém biologickém procesu. Buňky savců obsahují více než 10 000 různých druhů, které jsou syntetizovány na ribozomech jako lineární řetězce aminokyselin ve specifickém pořadí. Základní jednotkou všech proteinů jsou tudíž aminokyseliny, které jsou považovány za základní stavební kámen bílkovin a řadí se mezi organické karboxylové kyseliny. Kromě charakteristické karboxylové skupiny  $-\text{COOH}$  aminokyseliny obsahují alespoň jednu aminoskupinu  $-\text{NH}_2$  [1].

Vlastnosti molekul bílkovin jsou určeny přítomným druhem aminokyselinových zbytků a také pořadím, ve kterém jsou seřazeny. Důležité jsou i prostorové vztahy jednoho aminokyselinového zbytku ke druhému. Jedná se o kombinace 20 možných kódovaných aminokyselin [1].

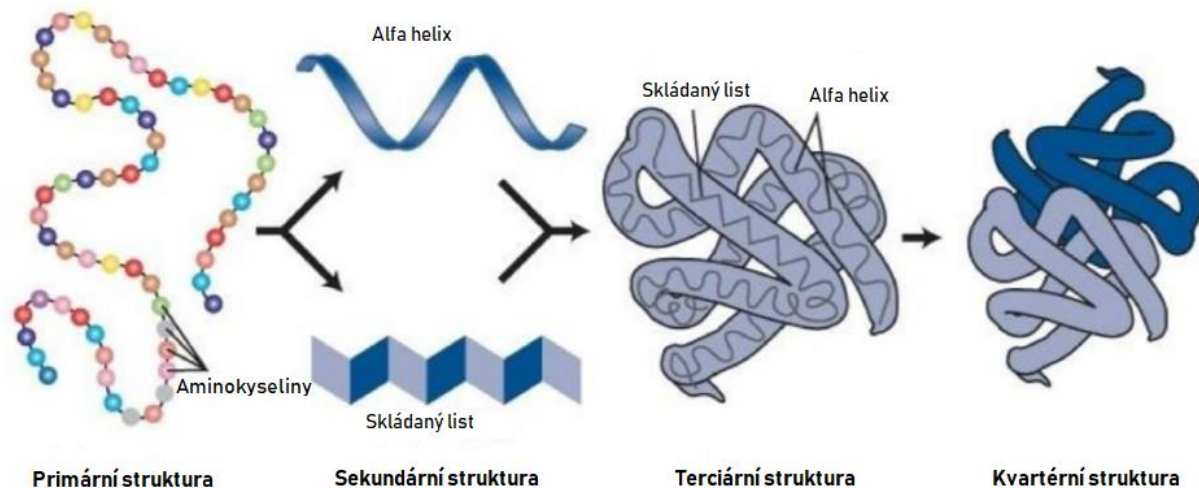


Obrázek 1: Obecný vzorec aminokyselin [2]

#### 3.1.2 Struktura proteinů

Aby lineární řetězce aminokyselin správně fungovaly, musí se skládat do svého jedinečného tzv. nativního stavu, který lze chápat jako soubor trojrozměrných struktur charakterizující každý protein [3, 4]. Proteinová struktura je definovaná do čtyř úrovní:

- **Primární** struktura určuje lineární pořadí aminokyselin v polypeptidovém řetězci a podmiňuje biologickou funkci včetně vlastností proteinů.
- **Sekundární** struktura popisuje prostorové uspořádání lineárního řetězce polypeptidu. Vzniká prostřednictvím vodíkových můstků mezi vodíkem na dusíku a kyslíkem karbonylu na čtvrtém následujícím aminokyselinovém zbytku. Nejčastější typy této struktury jsou alfa-helix a beta-skládaný list.
- **Terciární** struktura má trojrozměrné uspořádání a představuje celkové uspořádání jednoho polypeptidového řetězce v prostoru, které vzniká při balení sekundární struktury do domény. Hlavní roli zde hrají disulfidické můstky, protože dodají ještě větší stabilitu struktuře proteinu.
- **Kvartérní** struktura se vztahuje k prostorovému uspořádání jednotlivých podjednotek, ze kterých je protein složen [1].



Obrázek 2: Struktura proteinů [5]

Zmíněné strukturní skládání proteinů představuje ústřední problém v biologii. Pokud se protein nenachází ve svém nativním stavu, tudíž není správně složen do trojrozměrné konformace, nastupují do funkce opravné látky – chaperony, které zajistí správné skládání v buňce [6].

### 3.2 Chaperony

Molekulární chaperony byly původně definovány jako skupina nesouvisejících tříd proteinů, které zprostředkovávají správnou sestavu jiných proteinů, ale nejsou součástí konečných funkčních struktur. Nedávno byla jejich definice pozměněna na proteiny, které vážou a stabilizují jinak nestabilní konformery na jiném proteinu (kontrolovanou vazbou) a uvolňováním usnadňují jeho správný „osud“. Může se jednat o skládání, oligomerní sestavení, transport do určitého subcelulárního oddělení nebo zneškodnění degradací. Zabraňují tvorbě špatně složených proteinových struktur za normálních podmínek i v případě vystavení stresu (například vysoká teplota) [6].

Chaperony neobsahují informace o tom, jak by mělo probíhat správné skládání, ale naopak zabraňují nesprávným interakcím uvnitř a mezi nepřírodními polypeptidy. Zvyšují výtěžek, nikoli však rychlost skládání [6].

#### 3.2.1 Základní typy

Molekulární chaperony jsou jakékoliv proteiny, které také pomáhají jinému proteinu získat jeho funkčně aktivní konformaci, aniž by byly přítomny v jejich konečné struktuře [4].

Existuje několik různých tříd strukturně nesouvislých chaperonů, které vytvářejí kooperativní sítě a cesty v buňkách. Zástupci těchto proteinů jsou často známi jako stresové proteiny neboli proteiny tepelného šoku (HSPs), protože při stresových situacích jsou ve zvýšeném množství a zvyšují koncentraci agregačních skládacích meziproductů. Chaperony jsou klasifikovány podle jejich molekulové hmotnosti (HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100 a malé HSP) [4].

### 3.2.2 Hsp60

Hsp60 je nejlépe charakterizovaný velký chaperonový komplex, který má dvojitý kroužek s hydrofobní náplastí při jeho otevření. Liší se od jiných tříd tím, že váže „zhroucené“ proteinové konformace v centrální dutině jednoho z jeho charakteristických prstenců, přičemž exponované hydrofobní postranní řetězce váže k podšívce dutiny. Hsp60 díky multivalentní povaze přispívá k obrácení nesprávně přeložených stavů, tudíž zabraňuje v cestě nesprávného skládání. Působí také v mitochondriálním matrixu jako molekulární chaperon [7].

### 3.2.3 Hsp70

Hsp70 je pravděpodobně nejlépe charakterizovaný chaperon. Proteiny Hsp70 jsou centrální komponenty buněčné sítě molekulárních chaperonů a skládajících katalyzátorů. Pomáhají značnému množství způsobů skládání proteinů v buňce, které jsou přechodně spojeny jejich doménami vázajícího substrátu s krátkými hydrofobními peptidovými segmenty [8].

Jsou podporovány proteiny Hsp40 (DnaJ), které zvyšují spotřebu ATP a aktivitu Hsp70. Cyklus vazby a uvolňování substrátu je řízen spuštěním Hsp70 mezi stavem vázaným na ATP s nízkým afinitním stavem a stavem s vysokou afinitou na ADP. Mnoho Hsp70 kolem rozloženého substrátu stabilizuje a zabraňuje agregaci, dokud se molekula správně nerozkládá. V ten moment Hsp70 ztrácí afinitu k molekule a difunduje [8].

Hsp70 působí také jako mitochondriální a chloroplastický chaperon v eukaryotách. Pro specifické úkony je cyklus Hsp70 spojen s působením i jiných chaperonů, patří mezi ně Hsp90 a Hsp100 [8].

### 3.2.4 Hsp90

Hsp90 (protein tepelného šoku) je téměř všudypřítomný chaperon zodpovědný za sestavení a regulaci mnoha eukaryotních signálních systémů a objevující se cíl pro chemoterapii mnoha druhů rakoviny. Může být nejméně chápán, ale je nezbytný pro životaschopnosti u eukaryot [9].

Byly zjištěny struktury izolovaných domén Hsp90, uspořádání a ATP-závislá dynamika v plném dimeru Hsp90, tudíž má doménu vázající ATP, střední oblast a dimerizační doménu. Dříve se předpokládalo, že se při vázání ATP připevní na substrátový protein, ovšem nedávno se zjistilo, že se proteiny mohou externě vázat na N-terminální a střední domény Hsp90 [9, 10].

### 3.2.5 Hsp100

Hsp100 proteiny byly studovány in vivo a in vitro pro jejich schopnost zaměřit a rozvinout označené a nesprávně složené proteiny. Je patrné, že rostlinné proteiny Hsp100 interagují a získávají součásti translačního mechanismu do mRNA, aby se zvýšila translace. Kromě tepelného stresu jsou tyto proteiny také vývojově regulovány a jsou rozhodující pro získání termotolerance [11].

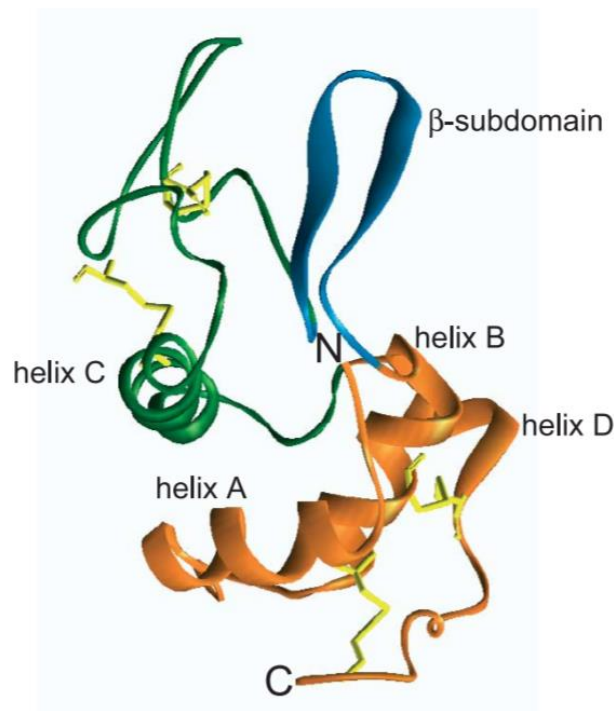
### 3.3 Konkrétní proteiny

#### 3.3.1 Lysozym

Lysozym, nebo jinými názvy N-acetylmuramidglykanhydrolasa a muramidáza, je enzym, který se řadí do skupiny hydroláz. Nachází se v buňkách, tělesných sekretech (sliny, slzy, nosní hlen a mateřské mléko, krevní plazma atd.) a téměř ve všech živých organismech. Jeden z hlavních zdrojů pro komerční účely je slepičí vaječný bílek [12, 13].

Jedná se o malý protein přibližné velikosti 14,4 kDa, který je složený ze 129 aminokyselinových zbytků seřazených v jediném polypeptidovém řetězci. Uvnitř molekuly je síťován čtyřmi disulfidickými můstky, které jsou na obrázku 3 znázorněny žlutými tyčkami a zajišťují fixaci celé molekuly. Ve své struktuře obsahuje 5  $\alpha$ -helikálních úseků a jeden úsek s uspořádáním  $\beta$ -skládaného listu. Jeho postranní řetězce jsou uvnitř molekuly nepolární, tudíž nedochází ke kontaktu s vodným rozpouštědlem [14, 15].

Lysozym je využíván kvůli své antimikrobiální aktivitě, protože při jeho účinku dochází ke štěpení glykosidické vazby v bakteriích, čímž se sníží jejich odolnost. Jedná se tudíž o termostabilní protein s enzymatickými vlastnostmi a antibakteriálním účinkem. Dokáže také inaktivovat různé druhy virů, zvýšit aktivitu fagocytózy a mnoho dalších funkcí [12].



Obrázek 3: Struktura lysozymu [16]

#### 3.3.2 Lipáza

Lipázy neboli triacylglycerolacylhydrolázy jsou všudypřítomné skupiny enzymů, které katalyzují hydrolýzu tuků a olejů [17]. Molekulová hmotnost se obecně nachází v rozmezí 20–60 kDa. Mezi lipázami různého původu existují velké rozdíly ve specifitě kvůli poloze hydrolyzované esterické vazby a v rychlosti štěpení, kdy nejčastěji jsou štěpeny krajní polohy. Napříč tomu vykazují podobnou trojrozměrnou strukturu [15].

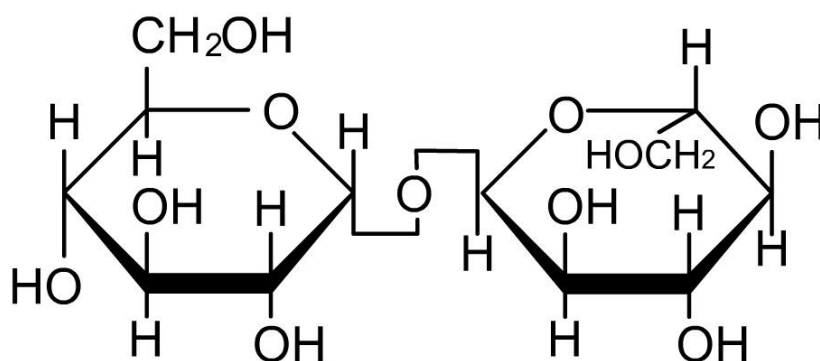
Mezifázová aktivace lipáz probíhá na rozhraní lipidu a vody. Lipázy obsahují helikální oligopeptidovou jednotku, která chrání aktivní místo. To je obklopeno hydrofobní oblastí a chráněno peptidovým řetězcem z hydrofilních aminokyselinových zbytků. Kontakt s olejovitým rozhraním způsobí konformační změnu a aktivní místo poskytne volný přístup substrátu (mezifázová aktivace). Aktivní místo je obecně charakterizováno triádou aminokyselin, která je složená ze serinu, histidinu a kyseliny glutamové nebo asparágové a je rozhodujícím meziproductem ve všech reakcích katalyzovaných lipázou. [17]

Lipázy jsou v syntetické organické chemii nejpoužívanější enzymy, které katalyzují hydrolyzu esterů karboxylových kyselin ve vodném prostředí nebo reverzní reakci v organických rozpouštědlech. Díky novým trendům a konvenčnímu použití lipáz v organické i farmaceutické chemie představuje praktickou a vyzrálou metodu, která vede k dalším praktickým aplikacím [17].

### 3.4 Konkrétní chaperony

#### 3.4.1 Trehalóza

Trehalóza má podobu bílého prášku, který je bez zápachu a obsahuje 45 % sacharózy. Po chemické stránce se jedná se o neredukující disacharid, který je složen ze dvou glukózových jednotek spojených  $\alpha$ -1,1-glykosidickou vazbou. Trehalóza je přítomná téměř všude v biologickém světě a má řadu nejrůznějších funkcí. Má výbornou bioprotektivní úlohu, za kterou jsou zodpovědné vlastnosti tuhého stavu a roztoku trehalózy. Existuje řada polymorfů jak v krystalickém, tak v amorfním stavu. Díky své struktuře má mimořádné vlastnosti [18].



Obrázek 4: Chemická struktura trehalózy [19]

Významná úloha trehalózy závisí na mechanismu interakcí s enzymy, proteiny a biomembránami, které jsou chráněny proti stresujícím podmínkám. Přesná povaha stabilizačního účinku trehalózy na proteiny je stále doposud nejasná, ale měla by působit proti interakcím protein-protein, které jsou škodlivé pro stabilitu bílkoviny. Molekuly trehalózy se nemůžou vázat přímo na povrch proteinu, který je pokryt jednou až dvěma molekulovými vrstvami vody. Stabilizující molekuly trehalózy jsou umístěny mimo hydratační vrstvu. Protein je tedy spojen prostřednictvím vodní vrstvy s pevnější strukturou trehalózy a vody, což zpomaluje dynamiku a zvyšuje stabilitu proteinu [20].

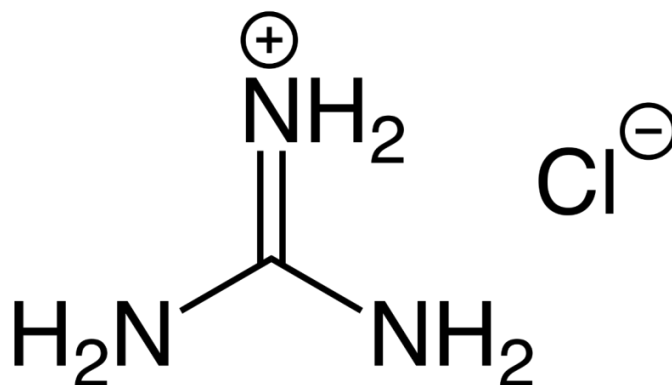
Co se týče teploty denaturace proteinu, která je určena stabilitou proteinu, přidání trehalózy do roztoku poskytne výrazné zvýšení této teploty. Toto zvýšení lze vysvětlit zvýšenou

viskozitou, která ovšem vzrůstá pro všechny přírůstky jak trehalózy, tak proteinu. Je nutné poznamenat, že i když viskozita a hustota všech vzorků vzrůstá s rostoucím obsahem bílkovin, dochází k silnějšímu zvýšení viskozity se zvyšujícím se obsahem proteinu u vzorků obsahujících více trehalózy. Kombinací analýzy denaturační teploty se studií viskozity je zřejmé, že protein není nutně stabilizován zvýšenou viskozitou, protože i když trehalóza zvyšuje jak denaturační teplotu, tak viskozitu, zvyšuje se koncentrace proteinu denaturační teploty, i když se zvyšuje viskozita [20].

### 3.4.2 Guanidine hydrochlorid

Guanidine hydrochlorid neboli guanidinium chlorid se zkráceně označuje jako GuHCl. Jedná se o hydrochloridovou sůl guanidinu a zároveň je slabou kyselinu s pKa 13,6. Jeho chemická struktura je znázorněna na obrázku 5. Skládá se ze sítě guanidiniových kationtů a chloridových aniontů spojených vodíkovými vazbami mezi vodíkem na dusíku a chloridovým aniontem [21].

Guanidine hydrochlorid je jeden z nejčastěji používaných denaturantů proteinů, protože má velmi silný účinek jak denaturační, tak destabilizační. Vyvolává výrazný teplotní posun denaturačních křivek směrem k nižším teplotám a indukuje konformační změny, které jsou spojené s malou ztrátou aktivity (maximálně 40 %). Jeho denaturační síla souvisí s dynamikou rozpouštědel a bílkovin, což odráží přímou interakci mezi GuHCl a proteinem, jelikož molekuly GuHCl přímo interagují s hydrofobními skupinami proteinu. Je prokázáno, že dynamika rozpouštědel řídí dynamiku proteinu a dynamika roztoků GuHCl je zodpovědná za významnou denaturační sílu, proto se jedná o silnější denaturační látku oproti jiným látkám (např. močovina) [22].



Obrázek 5: Chemická struktura GuHCl [23]

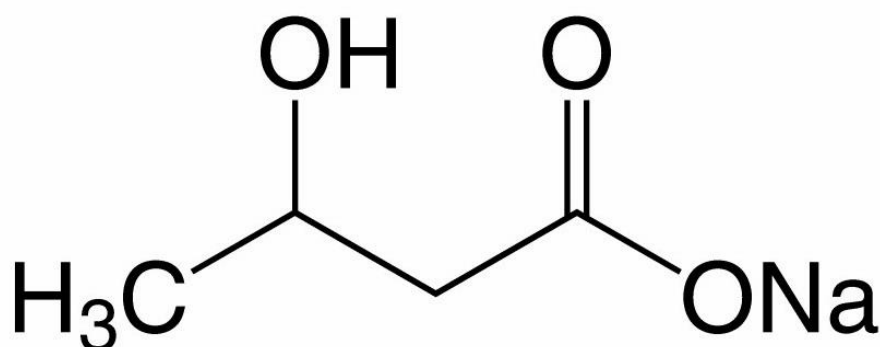
### 3.4.3 3HB

Poly(3-hydroxybutyrát) (PHB) je sloučenina pro ukládání uhlíku a současně produkované energie. Degraduje se na svůj monomer 3-hydroxybutyrát (3HB) pomocí bakterií metabolickou cestou zvanou PHB cyklus. Jedná se o chemický chaperon, který je schopný chránit proteiny a enzymy před nepříznivými podmínkami vysoké teploty a oxidace. 3HB může být použito v různých aplikacích a formulacích jako účinná enzymatická stabilizace a přísada, který chrání enzymy [24].

PHB mají významnou roli, pokud jsou bakteriální buňky vystaveny stresovým podmínkám (např. vysoká teplota, oxidační stres apod.). Metabolismus PHB vykazuje cyklický charakter –

v buňkách probíhá současně odbourávání i syntéza polymeru. Je tudíž zřejmé, že cyklický charakter je důležitý faktor, který navyšuje stresovou odolnost [24].

V porovnání základních fyzikálně-chemických parametrů, 3HB vykazuje nejvyšší ochranný účinek proti denaturaci oproti jiným chaperonům ve stejné koncentraci. Tato vynikající ochranná účinnost se vysvětluje díky karboxylové skupině, která je navázána na 3-hydroxybutyrát, tudíž lze ochranný účinek přičíst jeho chemické struktuře. Přidáním 3HB se bude postupně posunovat denaturační teplota proteinu do vyšších hodnot s rostoucí koncentrací 3HB [24].



Obrázek 6: Chemická struktura sodium 3-hydroxybutyrátu [25]

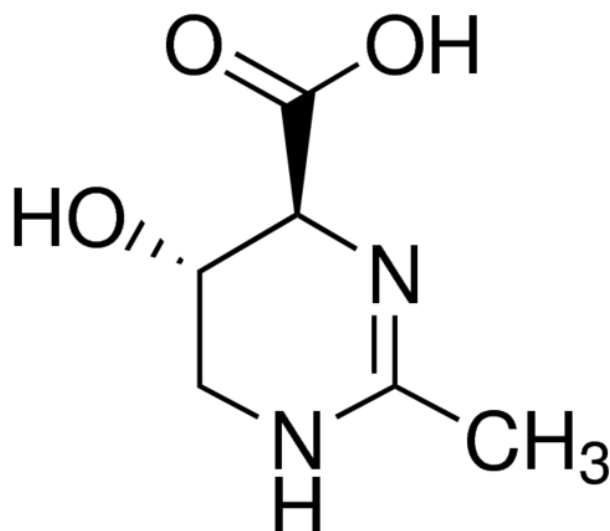
#### 3.4.4 Hydroxyectoine

Hydroxyectoine neboli systematickým názvem (4S,5S)-5-hydroxy-2-methyl-1,4,5,6-tetrahydropyrimidin-4-karboxylová kyselina je kompatibilní solut, který je syntetizován bakteriemi k fyziologickému vyrovnání s osmotickým stresem a slouží jako chemický chaperon zachovávající funkčnost makromolekul. Je produkován z ectoinu přes stereo-specifickou hydroxylaci, enzymatickou reakcí, která je katalyzovaná ectoinhydroxylázou [26].

Hydroxylovaný derivát ectoinu, hydroxyectoine, byl cílem ekonomického zájmu vzhledem ke svým specifickým biologickým schopnostem, kterými se odlišuje od dalších kompatibilních solutů. Jeho využití je v řadě odvětví, ovšem v této studii je nejvýznamnější zlepšení termorezistence proteinů a větší stabilizační schopnost oproti ectoinu. I když je hydroxyectoine téměř chemicky identický s ectoinem, poskytuje další ochranné vlastnosti spojené s jeho hydroxylovanou povahou. Zatímco hlavní funkcí ectoinu je sloužit jako osmoprotektant, hydroxyectoine hraje také důležitou roli v ochraně před tepelným stresem [27].

Bylo dokázáno, že hydroxyectoine při reakci akumuluje teplotní posun k vyšším teplotám. Tato schopnost je způsobena hydroxylovou skupinou, jelikož přidává další molekulu do chirálního centra. Hydroxyectoine je tudíž velmi účinným stabilizátorem, který je díky svým vlastnostem používán v biotechnologických procesech, ve kterých jsou enzymy aplikovány při vysokých teplotách nebo v přítomnosti denaturantů [27, 28].





Obrázek 7: Chemická struktura hydroxyectoinu [29]

### 3.5 Kalorimetrie

Kalorimetrie je vědní obor zabývající se měřením tepla při různých dějích. Experimenty jsou prováděny za přesně daných podmínek, při konstantním objemu a různé teplotě. Kalorimetrie zahrnuje širokou škálu nejrůznějších technik: titrační, průtokovou, sorpční či reakční kalorimetrii. Jednotlivé metody mohou být rozděleny na základě principu měření (kompenzace tepla), konstrukce (podle počtu měřících cel) nebo způsobu provozu – operace (průtokové, skenovací, statické) [30].

Všechny chemické, biologické i fyzikální procesy vedou k uvolnění nebo spotřebě tepla v průběhu daných interakcí ve studovaném systému při určitém pochodu a těmito tepelnými činnostmi se zabývá právě mikrokolorimetrie. Zkoumány mohou být vzorky všech skupenství, tudíž pevné látky, plyny i kapaliny [31]. Výsledkem měření jsou hodnoty termofyzikálních vlastností (např. tepelná kapacita, teplota fázového přechodu, teplo s tím spojené atd.) [32].

#### 3.5.1 Historie

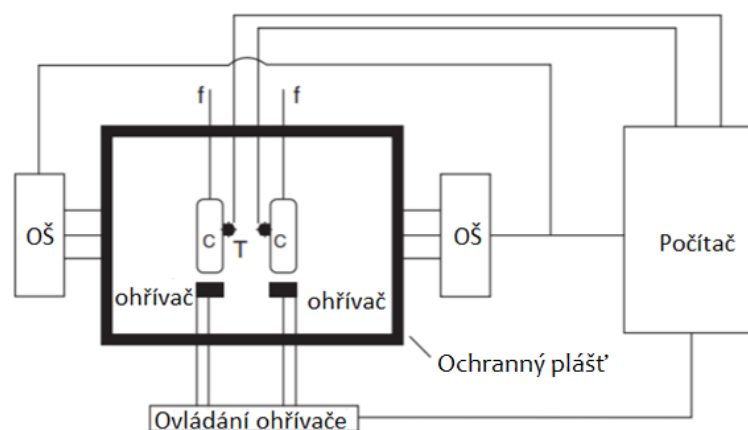
Za zakladatele kalorimetrie se považují Antoine Lavoisier a Pierre-Simon Laplace, kteří v roce 1782 poprvé změřili uvolněné teplo během chemické reakce u biologických systémů pomocí tzv. ledového kalorimetru [33].

#### 3.5.2 Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC)

DSC studuje přechody nebo procesy, které jsou indukovány změnami teploty. Protože většina biologických molekul prochází fázovými přechody, mohou být studovány pomocí DSC [34]. Diferenciální kompenzační kalorimetrie je jednou z nejdůležitějších technik [31]. Současná instrumentace kalorimetrů používá pouze malé množství materiálu a měření na přístroji je jednoduché či dokonce automatizované, což je považováno za velkou výhodu. Mezi další výhody DSC kalorimetrů patří široký pracovní rozsah teplot, velká přesnost, spolehlivost a pouze výjimečně vyžaduje předchozí úpravu vzorku [34].

DSC je účinným nástrojem pro stanovení termodynamických dat a pro zkoumání strukturních vlastností, které ovlivňují stabilitu makromolekulárních systémů. Tepelné

skenování roztoků makromolekul vede k přechodům z nativního stavu do částečně rozloženého stavu, až nakonec do zcela denaturovaného stavu. V případě proteinů může být DSC použito pro stanovení rovnovážné termodynamické stability a mechanismu skládání. Aby bylo možné tyto vlastnosti studovat, musí přístroj splňovat a zachovávat určité důležité vlastnosti. Kalorimetrické měření vyžaduje vysokou citlivost vůči malým energetickým změnám spojeným s procesy rozkládání. Obecné schéma základních složek citlivého DSC je znázorněn na obrázku 8 [34, 35].



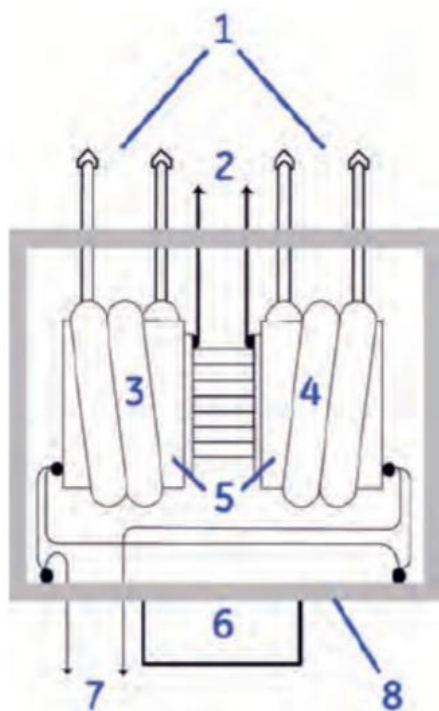
*Obrázek 8: Obecné schéma DSC kalorimetru. Cely (c) jsou umístěny uvnitř ochranného pláště, který je v kontaktu s ohřivači štítu (OŠ). Jednotlivé ohřivače buněk řídí teplotu vzorku a referenčních cel. Teplotní senzory (T) jsou umístěny na povrchu cel a určují, zda je mezi celami teplotní rozdíl. Počítač řídí kompenzační teplo na celách, aby se udržovalo na nule. Vyrovnávací energie za jednotku času se zaznamenává jako kalorimetrický signál [35].*

### 3.5.3 Měření DSC kalorimetrem

Pod pojmem „diferenční kompenzační kalorimetr“ se rozumí kalorimetry, které jsou vybaveny dvěma měřicími celami. Jedna z nich je referenční (srovnávací) a druhá slouží ke studiu vzorku, tudíž je nazvána jako vzorková. V měřeném čase je důležitá teplota a tepelný příkon, přičemž teplo slouží k definovanému ohřívání nebo ochlazení vzorku [32].

DSC přístroje skenují teplotní rozdíl mezi referenční celou, která je naplněna rozpouštědlem, a vzorkovou celou, která obsahuje vzorek ve stejném rozpouštědle. Vzhledem k tomu, že je teplota obou cel zvýšena, tepelně indukované procesy, ke kterým dochází ve vzorkové cele, mají za následek absorpci tepla. To způsobuje změnu teplotního rozdílu oproti cele referenční, kterou se snaží přístroj okamžitě kompenzovat. Ohřivače na povrchu dodávají další elektrickou energii k návratu teplotního rozdílu k počáteční hodnotě. Přídavné teplo je úměrné kapacitě nadměrného tepla tepelně indukovaného procesu. U jednoduchých proteinů je často pozorován jeden vrchol (pík) absorpce tepla, který je po úpravě integrován, aby poskytl přímé kalorimetrické měření entalpie ( $\Delta H_{cal}$ ) a teploty tání ( $T_m$ ) [34].

V této práci bylo využito mikrokolorimetru PEAQ-DSC (Malvern, USA), upořádání cel je znázorněno na obrázku 9. Vzorková a referenční cela má tvar stočené kapiláry, zbývající části odpovídají dříve zmíněnému spořádání na obrázku 8. Tento přístroj je určen pro charakterizaci kapalných vzorků s viskozitou blízké vodě, viskoznější vzorky lze do cel obtížně dávkovat bez vzniku bublin atd.



Obrázek 9: Tepelné jádro MicroCal PEAQ-DSC přístroje, kde 1 – vstupní/výstupní plnicí trubici, 2 – Peltierovo zařízení, 3 – vzorková cela, 4 – referenční cela, 5 – tepelné rozbočovače, 6 – základní štít, 7 – kabely senzoru  $\Delta T-1$  a  $\Delta T-2$ , 8 – adiabatický plášť [36]

## 4 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Použití denaturantů neboli chemických chaperonů způsobuje modifikace strukturního uspořádání a částečnou denaturaci proteinů. Ovšem mechanismy denaturačních sil látek stále nejsou stále dobře známy, vysvětlují totiž jen části mechanismů, ale stále chybí komplexní obraz.

**S. Obruča, P. Sedláček a spol.** vydali v roce 2016 studii [24], ve které zkoumali 3-hydroxybutyrát jako chemický chaperon schopný chránit modelové enzymy (lipáza a lysozym) před nepříznivými účinky vysoké teploty a oxidace. Pomocí metod dynamické rozptylu světla a diferenční kompenzační kalorimetrie dokázali, že 3HB je schopen chránit oba enzymy proti tepelné denaturaci, jehož účinek roste s jeho koncentrací. Oproti jiným chaperonům, jako trehalosa nebo hydroxyectoin, 3HB vykazoval nejvyšší ochranný účinek proti denaturaci lipázy i lysozymu.

Autoři **Alain Hédoux, Stefanie Krenzlin, Laurent Paccou** a další se ve své studii [22] zabývali účinkem močoviny a GuHCl na stabilitě lysozymu. Tato studie potvrzuje, že močovina interaguje s hydrofilními zbytky, zatímco molekuly GuHCl mají přímou interakci s hydrofobními skupinami proteinu. Močovina indukuje přeměnu terciární struktury, aniž by došlo k rozvinutí sekundární struktury. GuHCl má silnější denaturační sílu, což vede k silné vazbě k lysozymu.

Autoři **A. Hédoux, J-F. Willart, R. Ionov** se v práci [37] zabývali termostabilizací ve struktuře lysozymu, která byla vyvolána třemi cukry (maltóza, sacharóza a trehalóza) se stejným chemickým vzorcem  $C_{12}H_{22}O_{11}$ . Experimenty byly prováděny pomocí Ramanova rozptylu a diferenční kompenzační kalorimetrie, kdy byly prokázány bioprotektivní vlastnosti cukrů. Ramanova rozptylová analýza přinesla přesný popis vlivu cukrů na stabilitu vodíkové vazebné sítě vody a nativního terciárního stavu. Analýza tří cukrů se stejným chemickým vzorcem a stejným počtem hydroxidových skupin umožnila přiřadit vlastnosti trehalózy ve stabilizaci proteinů, která byla vyhodnocena jako nejúčinnější. Molekulární konformace trehalózy je pravděpodobně zodpovědná za modifikaci vodíkové vazebné sítě vody, která zlepšuje stabilitu proteinu.

**Doan Van-Thuoc a spol.** v článku [38] studovali schopnost kompatibilních látek stabilizovat proteiny proti různým stresovým podmínkám. Testovali ochranný účinek ectoinů před vlivem pH a teplotnímu stresu, kdy jako model byla použita xylanáza *Bacillus halodurans*. Účinek ectoinu a hydroxyectoinu na tepelnou stabilitu xylanázy byl zkoumán při pH 9 a 10 za použití DSC kalorimetrie. Ectoiny zlepšily stabilitu enzymu při nízkých (4,5 a 5) a vysokých (11 a 12) hodnotách pH, ovšem stabilizační účinek hydroxyectoinu byl lepší než účinek ectoinu. V jeho přítomnosti se zbytková aktivita zvýšila z 45 % na 86 % při pH 5 a při pH 12 dokonce z 33 na 89 %, zatímco v přítomnosti ectoinu nebyla detekována žádná zbytková aktivita.

**Ch. Olsson, H. Jansson a J. Swenson** v práci [20] studovali stabilizační účinek trehalózy na proteiny. Autoři použili metodu diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC) k určení teploty skelného přechodu  $T_g$ , denaturační teploty proteinu  $T_{den}$  a dynamické viskozity, která závisí na koncentraci trehalózy a proteinu. Z této studie je zřejmé, že nepřímé strukturní informace o pochopení stabilizační roli trehalózy lze získat kombinací měření DSC a viskozity. Výsledky měření vylučují, že by protein mohl být stabilizován přímou interakcí s molekulami trehalózy,

ale spíše ukazují, že povrch proteinu je převážně pokryt vrstvou vody. Navzdory tomu, že molekuly trehalózy obecně neinteragují přímo s molekulami proteinů, je zřejmé, že matrice trehalóza – voda má výrazný stabilizační účinek, který se podstatně zvyšuje s množstvím trehalózy v okolí každého proteinu. Tudíž je jasné, že nedostatek molekul trehalózy mezi sousedními molekulami bílkovin, čímž vzniká tendence vysoké pravděpodobnosti blízkých interakcí protein – protein, je škodlivým účinkem pro stabilitu proteinu.

**V. Albanèse, S. Reissmann a J. Frydman** ve své studii [39] poukázali na chaperony, které se nachází v eukaryotických buňkách. Označují se jako chaperony transkripčně spojené se syntézou proteinu (CLIPS) a fyzicky spojené s ribozomy, které se podílí na biosyntéze proteinu. Zjistili, že síť CLIPS obsahující dva proteiny ukotvené na ribozomech, fungují společně s jejich partnerskými proteiny Hsp70 k zprostředkování biogeneze samotných ribozomů. Výsledky ukázaly, že kromě známých cytoplazmatických rolí při skládání proteinu, hrají některé chaperony CLIPS rozhodující roli v jaderných krocích biogeneze ribozomů.

Autoři **V. V. Marchenkov, T. N. Melnik a další** v práci [40] zkoumali vliv denaturovaných substrátových proteinů (lysozym, pepsin a sérový albumin) na strukturní stabilitu GroELu proti teplotě. GroEL patří do skupiny molekulárních chaperonů a v tomto případě se nachází u *Escherichia coli*, kdy je strukturně a funkčně téměř identický s proteinem Hsp60. Pomocí diferenční kompenzační kalorimetrie zjistili, že interakce s denaturovanými proteiny zvyšuje stabilitu GroEL, čím větší je molekulová hmotnost denaturovaných substrátových proteinů, tím vyšší je stabilita GroELu. Získané výsledky jsou důležité pro pochopení mechanismu interakcí proteinu s chaperonem a principu strukturní organizace GroEL.

**M.Ch. Naicker, Y. Kim, K. Lee a H. Im** se v článku [41] zabývali mrazícím prostředím patřící mezi hlavní podmínky, kterým čelí mnoho organismů. Zde se zabývali bakterií *Saccharomyces cerevisiae*. Vystavení nízkým teplotám snižuje rychlost skládání proteinů a indukuje tzv. studenou denaturaci, proto je vyžadována pomoc chaperonů. Byly identifikovány chaperony při nízkých teplotách, mezi kterými se nacházely peptidyl-prolyl cis-trans izomerázy (PPlázy) a byly exprimovány v *Escherichia coli*. Získané výsledky naznačují, že identifikované PPlázy zvyšují studené přežití buněk tím, že zabraňují studené indukované denaturaci proteinů a podporují jejich skládání.

Jelikož skládání bílkovin bylo ve 21. století považováno za jeden z nejvýznamnějších biologických problémů, který je ústředním dogmatem molekulární biologie, vědci **F. Huang, L. Shen, J. Wang a spol.** publikovali práci [42] o třech druzích umělých chaperonů, které mají schopnost ochránit bioaktivitu proteinů. Každý chaperon měl různý povrchový náboj založený na směsných polymerních micelách a byl zkoumán jejich ochranný účinek na lysozym při tepelném namáhání. Výsledkem bylo, že micely s různými povrchovými náboji vykazují odlišné chování chaperonů a s neutrálním nábojem je lepší než negativně či pozitivně nabitý chaperon. Je to kvůli nadměrným elektrostatickým interakcím a proteinem. Pochopení interakce mezi umělými chaperony a proteiny je rozhodující pro efektivní využití těchto materiálů v biomedicíně a aplikací v budoucnu.

Autoři **Fei-He Ma, Yingli An a další** se v článku [43] zabývali procesem skládání proteinů, jelikož je vzhledem k velkému množství konformací, které může proteinový řetězec přijmout, chybný. Autoři se inspirovali přírodními chaperony, které jsou schopné stabilizovat proteiny a účinně jim pomáhat při skládání do bioaktivní formy. Syntetizovali řadu polymerních

nanochaperonů, které mohou usnadnit tzv. znovuskládání denaturovaných proteinů s vysokou účinností regenerace. Studovali také mechanismus, kterým nanochaperony napomáhají skládání a zavedly principy návrhu nanochaperonů pro dosažení účinně obnovy určitého proteinu z jejich denaturovaných forem.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Použité chemikálie

Ultračistá voda ze systému ELGA PURELAB flex

Lysosyme (from chicken egg white) SLBL7146V, Sigma-Aldrich (Germany)

Guanidine hydrochlorid BCBN5507V, Sigma-Aldrich (Germany)

Hydroxyectoine BCBX0515, Sigma-Aldrich (Germany)

Trehalose dihydrate from *Saccharomyces cerevisiae* SLBW6091, Sigma-Aldrich (Germany)

3HB BCBW3809, Sigma-Aldrich (Germany)

Hydrogenfosforečnan sodný dihydrát, PENTA s.r.o. (ČR)

Dihydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, PENTA s.r.o. (ČR)

Hydroxid sodný, PENTA s.r.o. (ČR)

### 5.2 Použité přístroje a pomůcky

MicroCal PEAQ-DSC (Malvern, USA)

Analytické váhy

pH metr

míchačka

### 5.3 Příprava zásobních roztoků a vzorků

#### 5.3.1 Fosfátový pufr

Pro přípravu 50mM fosfátového pufru (PBS) o pH 7,4 bylo naváženo na analytických vahách 1,761 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  a 13,86 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Navážené množství látek bylo kvantitativně převedeno do skleněné odměrné baňky o objemu 1 litr a bylo doplněno čistou vodou po rysku. Směs byla rozpuštěna a zjišťovalo se pH připraveného roztoku. Jelikož hodnota pH byla nižší než požadovaná, byl připraven 0,1 M roztok NaOH a po kapkách přidáván do roztoku, dokud nebyla dosažena požadovaná hodnota pH 7,4.

#### 5.3.2 Příprava vzorku lysozymu

Vzorek byl připraven v koncentracích 0,5 g/l, 1 g/l a 2 g/l. Na každou jednotlivou koncentraci bylo použito určité množství lysozymu, který byl navážen na analytických vahách a následně kvantitativně převeden do odměrné baňky o objemu 5 ml a doplněn fosfátovým pufrem po rysku. Po připravení všech koncentrací byly roztoky umístěny na míchačku, kde byly míchány po dobu 24 hodin, aby došlo k dokonalému rozpuštění lysozymu v pufre.

#### 5.3.3 Příprava roztoků chemických chaperonů

Vzorky roztoků jednotlivých chemických chaperonů byly připraveny stejným způsobem jako v případě lysozymu pouze s jinou koncentrací. Vzorky všech chaperonů (trehalóza, guanidine hydrochloride, 3HB a hydroxyectoine) byly připraveny s koncentrací  $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  ve fosfátovém pufre.

### 5.4 Studium vlivu chaperonů na teplotu denaturace pomocí DSC kalorimetru

Měření denaturační teploty probíhalo na přístroji MicroCal PEAQ-DSC (viz obrázek 10). Tento přístroj je výkonným analytickým nástrojem, které charakterizuje tepelnou stabilitu proteinů

a dalších biomolekul. Je schopen měřit entalpii ( $\Delta H$ ) a teplotu ( $T_m$ ) tepelně indukovaných strukturálních přechodů molekul v roztoku, která je naším hlavním cílem měření.

Po přípravě vzorku s vhodným pufrům, rozpouštědlem a pH, byl přístroj pro měření vhodně nastaven v rozsahu teplot 25–90 °C, s rychlostí ohřevu 90 °C/hod a chlazení 60 °C/hod. Měří se minimálně 3 cykly ohřev–chlazení s pufrům v obou celách, poté se ve vzorkové cele zamění vzorek za pufr a za stejných podmínek je změřen vzorek. V případě měření denaturace čistého proteinu byl v referenční cele fosfátový pufr a ve vzorkové roztoky lysozymu. Při měření směsi lysozym – chaperon byl v referenční cele roztok chaperonu ve fosfátovém pufru o koncentraci 1 mol·dm<sup>-3</sup> a v měřicí cele v objemovém poměru 1:1 roztok lysozymu a chaperonu tak, aby výsledná koncentrace lysozymu byla 1 g/l a chaperonu 1 mol·dm<sup>-3</sup>.

Surová data z měření jsou ve formátu tepelný závislosti tepelného toku na teplotě, po zadání koncentrace vzorku také tepelné kapacity na teplotě. Při vyhodnocování se pomocí vyhodnocovacího programu tzv. odečte signál pufru od měřeného vzorku a vyhodnocení píku spočívá především v určení maximální teploty  $T_m$ , která odpovídá denaturační teplotě měřeného vzorku, a plochy píku, což je hodnota entalpie energie spojená s měřeným přechodem. Pro účely této práce, která se zabývá optimalizací měření, byla vyhodnocena jen teplota denaturace. Veškeré provedené experimenty s chaperony byly změřeny pouze jednou.

Po měření je přístroj nutné řádně vyčistit. Čištění se v případě proteinů provádí s 5 % roztokem NaOH při 60 °C přibližně 30 minut (v obou celách) a případně následně roztokem komerčně dodávaného tenzidu Contrad 70 o koncentraci 10 %.



Obrázek 10: DSC kalorimetr MicroCal PEAQ-DSC, kde 1 – aspirátor, 2 – láhev na odpad, 3 – filtr aspirátoru, 4 – pipeta 250 µl, 5 – jednotka celý PEAQ-DSC, 6 – vakuový aspirátor, 7 – víčko uzavírající celý, 8 – nástroj pro ruční čištění, 9 - kohoutek [36]



## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

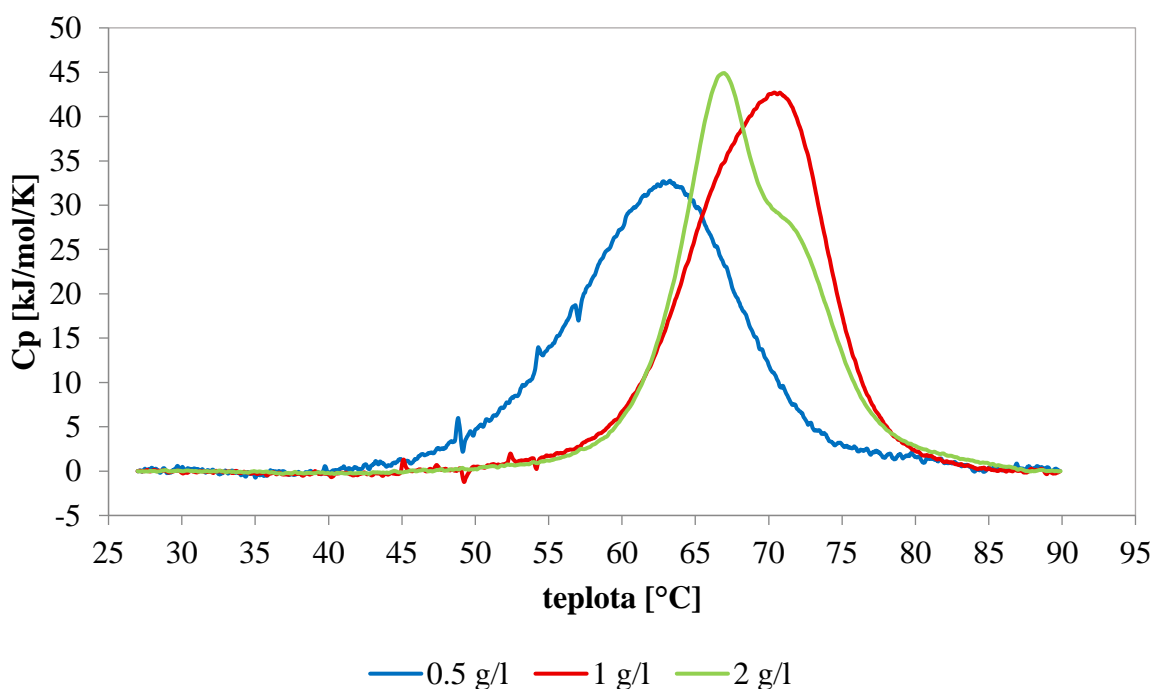
Pomocí metody diferenční kompenzační kalorimetrie je možné stanovit množství tepla, které měřená látka přijme nebo odevzdá při určitém ději. Vzniklé křivky v DSC se vyznačují píky, které jsou v závislosti na charakteru daného děje orientovány nad osu (endotermický děj) nebo pod osu x (exotermický děj). V případě denaturace lysozymu dochází k dodávání energie ve formě tepla, které tato molekula absorbuje a poté lze určit teplotu denaturace. Ve všech studovaných systémech popsaných v této práci se jedná o endotermní děje. V průběhu experimentu dochází postupně k rozpletení globulární struktury lysozymu až do jeho úplné denaturace, při které odečítáme maximum píku a teplotu v maximum pak označujeme jako teplotu denaturace. Většinou se tato teplota označuje jako  $T_m$ .

### 6.1 Výběr vhodné koncentrace lysozymu pro měření

Pro měření bylo nejprve nutné zjistit, jaká koncentrace roztoků vzorku lysozymu bude pro následující měření nejvhodnější. Byly připraveny roztoky o třech různých koncentracích, kdy nejvhodnějším roztokem byl zvolen vzorek o koncentraci 1 g/l, jak je viditelné na obrázku 11, kde je vyobrazen graf obsahující výsledky všech koncentrací.

Zvolení vhodné koncentrace je založeno na více parametrech. Hlavním aspektem je kvalita signálu (nejnižší šum), šířka píku a také jeho optická symetrie.

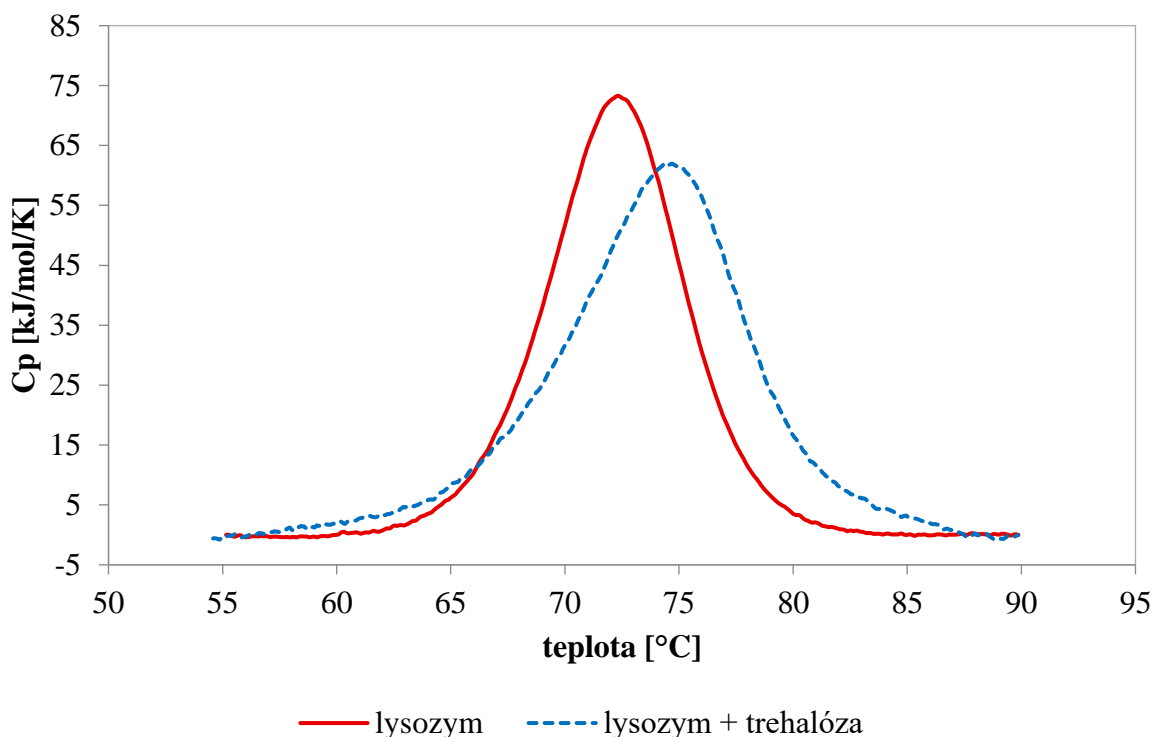
Na obrázku 11 se nachází prvotní ilustrativní výsledky, které byly změřeny pouze pro potřebu zjištění ideální koncentrace. Na dalších grafech jsou zobrazena jiná data pro čistý lysozym, ovšem tato data jsou při porovnávání směsí lysozymu s konkrétními chaperony vždy stejná.



Obrázek 11: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci lysozymu o koncentracích 0,5; 1 a 2 g/l

## 6.2 Účinek trehalózy

První běžnou látkou, která byla zvolena jako chaperon je trehalóza. Výsledek jejího účinku je znázorněn na obrázku 12, kde je viditelný posun denaturační teploty z hodnoty 72,3 °C na teplotu 74,1 °C. Koncentrace lysozymu je 1 g/l a koncentrace trehalózy 2 mol·dm<sup>-3</sup>. U této látky nebyly zpozorovány žádné reverzibilní denaturační procesy.



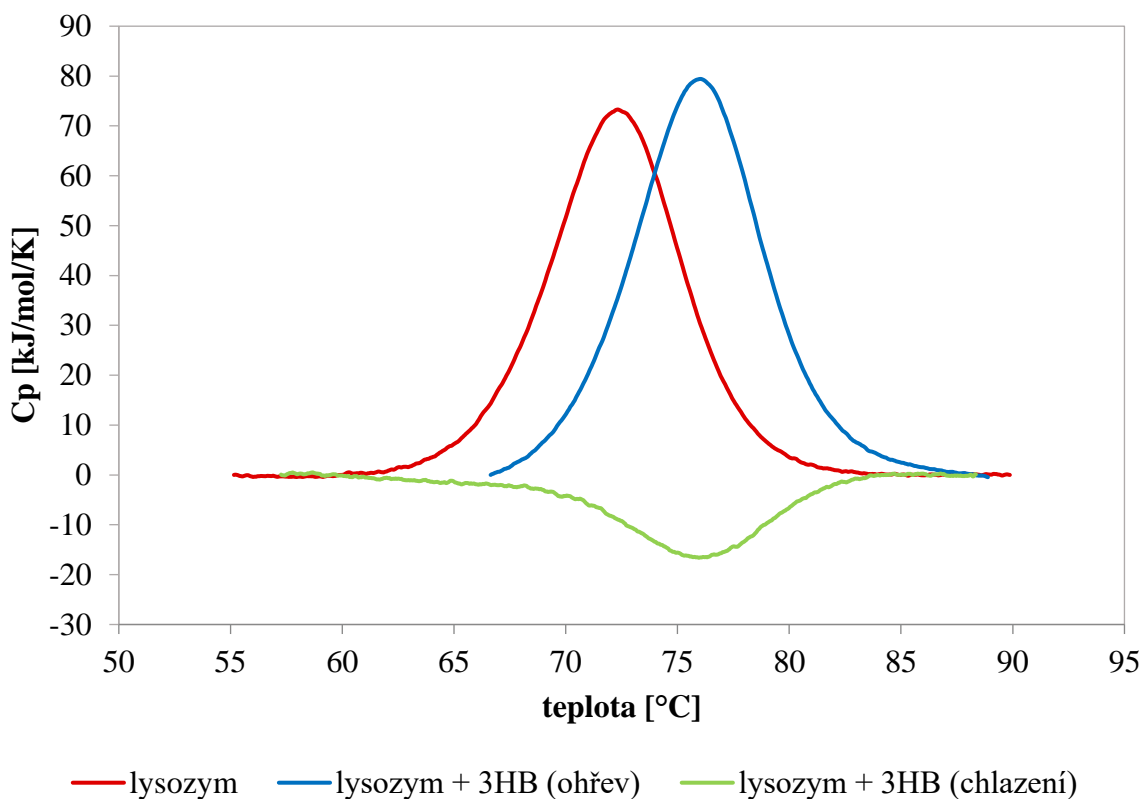
Obrázek 12: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denuraci lysozymu a směsi lysozymu s trehalózou

## 6.3 Účinek 3HB

Druhým chemickým chaperonem je 3HB, který byl vybrán díky svým silným protektivním účinkům a podrobné prozkoumanosti. Naměřené výsledky v grafu (viz obrázek 13) potvrzují jeho vynikající ochrannou činnost vzhledem k dalším použitým chaperonům. Koncentrace roztoků byla stejná jako v případě trehalózy a platí i pro následující experimenty.

Naměřená denaturační teplota čistého lysozymu byla 72,3 °C a teplota směsi lysozymu a 3HB vystoupala až na hodnotu 77,0 °C. Dalším poznatkem je zvýšení intenzity píku tepelné kapacity pro směs lysozymu s 3HB oproti píku samostatného lysozymu.

Při chlazení vzorku byl zaznamenán i reverzibilní denaturační proces, který je znázorněn na obrázku 13 zelenou křivkou. Směřuje pod osu x, jedná se tedy o exotermický proces a má výrazně nižší intenzitu než pík denaturace při ohřevu vzorku (červená křivka), který směřuje nad osu x. Tento jev byl pozorován i u následujících chaperonů.

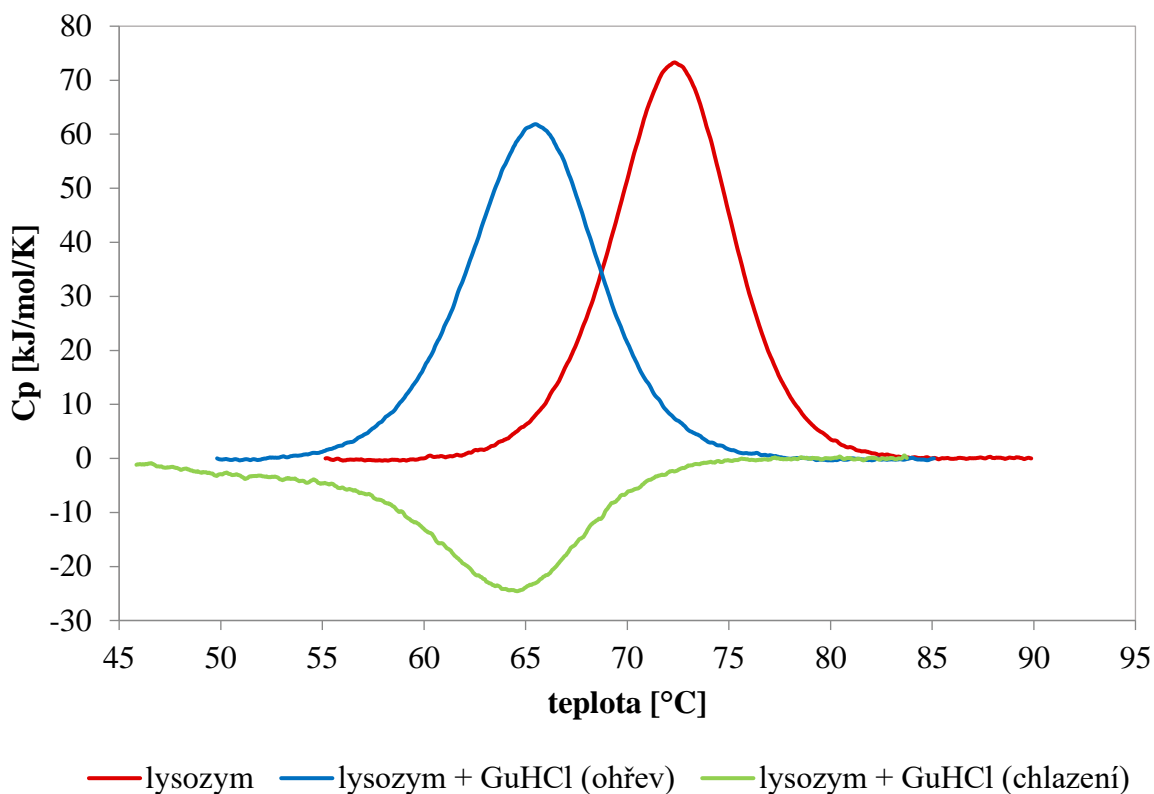


Obrázek 13: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci lysozymu a směsi lysozymu s 3HB

#### 6.4 Účinek guanidine hydrochloridu

Třetím chemickým chaperonem je guanidine hydrochlorid, který má opačný účinek na denaturační teplotu oproti ostatním použitým chaperonům, jelikož tuto teplotu posunuje směrem k nižším hodnotám. Na obrázku 14 je sestaven graf, ze kterého je patrný posun denaturační teploty z hodnoty 72,3  $^{\circ}\text{C}$ , kdy byl změřen pouze samostatný lysozym, na hodnotu 65,5  $^{\circ}\text{C}$ , která odpovídá směsi lysozymu a GuHCl. Zde je intenzita píku tepelné kapacity pro směs lysozymu s GuHCl nižší oproti píku čistého lysozymu, tudíž se jedná o opačný proces než v předchozím případě u 3HB.

Při procesu chlazení byl také pozorován reverzibilní denaturační proces, jehož pík má podstatně nižší intenzitu oproti píku ohřevu (endotermní křivka), ovšem u GuHCl je zmíněný exotermní pík (chlazení) o nejvyšší intenzitě ve srovnání s ostatními chaperony, u kterých probíhá zmíněný jev. Podle získaných výsledků je GuHCl společně s 3HB považován za nejúčinnější protektivní látku.

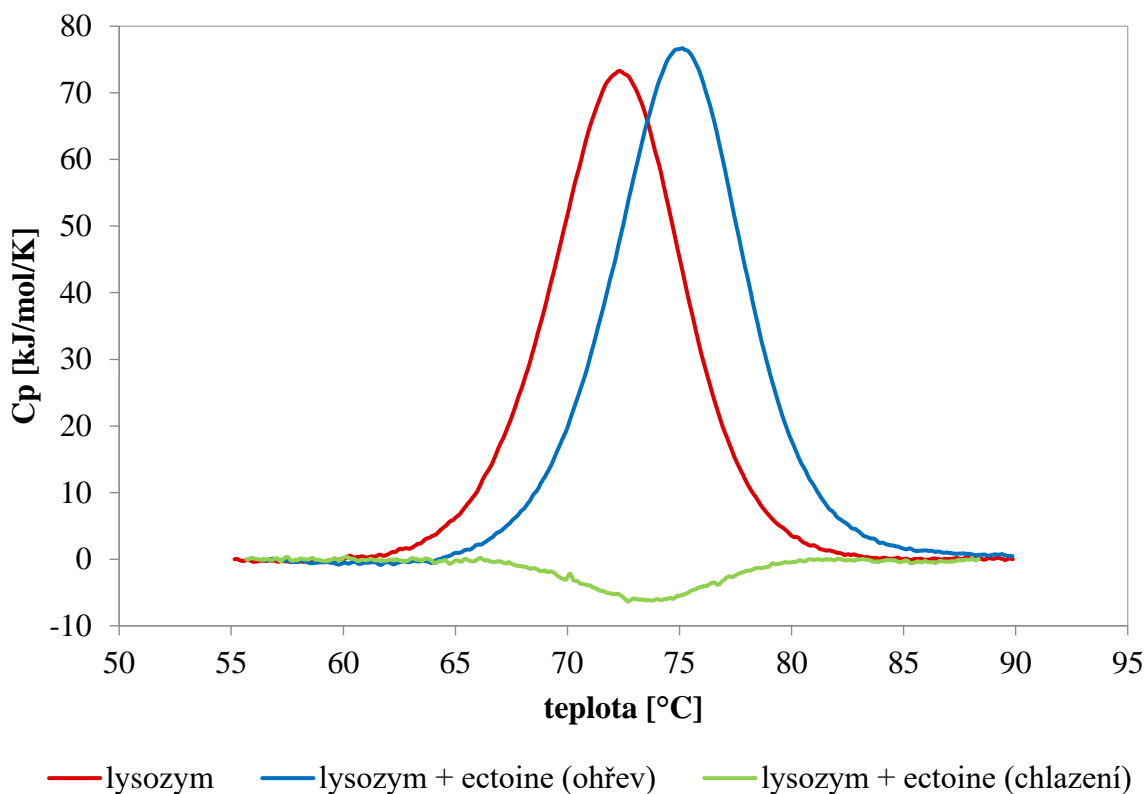


Obrázek 14: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci lysozymu a směsi lysozymu s GuHCl

## 6.5 Účinek hydroxyectonu

Čtvrtým použitým chaperonem je hydroxyectoine, který se také řadí mezi účinné stabilizátory. Podle naměřených výsledků, lze sílu hydroxyectonu srovnat s trehalózou, jelikož posun denaturační teploty vzrostl z původní hodnoty 72,3 °C na 75,2 °C, což je hodnota směsi lysozymu s hydroxyectoinem. Zde byl taktéž zpozorován nepatrný reverzibilní proces denaturace, ovšem byl nejnižší v porovnání s ostatními chaperony.

Na druhou stranu, protektivní účinek souvisí s chemickou strukturou a zvyšuje se s přítomností karboxylové skupiny, kterou hydroxyectoine obsahuje [24, 26].



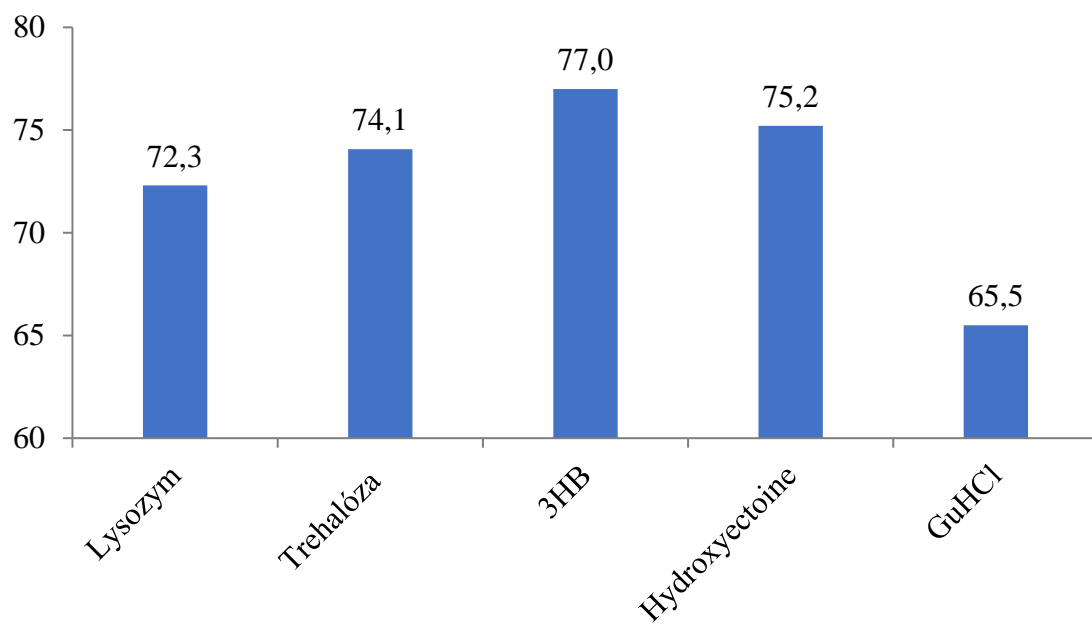
Obrázek 15: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci lysozymu a směsi lysozymu s hydroxyectoinem

## 6.6 Srovnání jednotlivých chaperonů

Z experimentálně získaných hodnot byla denaturační teplota zpočátku rovna 72,3  $^{\circ}\text{C}$  (bez přítomnosti ochranných látek) a s touto teplotou byly dále srovnávány protektivní účinky zkoumaných chaperonů.

Podle výsledků, které jsou zobrazeny na obrázku 16, se jako nejsilnější protektivní látka projevil 3HB. Z původní hodnoty čistého lysozymu (72,3  $^{\circ}\text{C}$ ) posunul teplotu denaturace lysozymu k nejvyšší hodnotě (77,0  $^{\circ}\text{C}$ ). Ovšem GuHCl, který způsobil ještě vyšší teplotní rozdíl, naopak změnil denaturační teplotu k hodnotám nižším (65,5  $^{\circ}\text{C}$ ). Hydroxyectoine je v pořadí další, který se řadí účinností za 3HB, posunul hodnotu denaturační teploty na hodnotu 75,2  $^{\circ}\text{C}$ . Nakonec trehalóza, která pomocí získaných výsledků vykazovala nejnižší protektivitu, Denaturační teplota s přidavkem trehalózy vystoupala na 74,1  $^{\circ}\text{C}$ .

Získané výsledky souhlasí s literaturou, ze které bylo čerpáno. Výchozím článkem pro tuto práci byl článek [24], kterému naměřené výsledky odpovídají.



Obrázek 16: Srovnání denaturačních teplot lysozemu a jednotlivých vzorků

## 7 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na studium chemických chaperonů, jakožto ochranným látkám před denaturačními procesy, a jejich účinku na modelový protein lysozym.

Teoretická část je věnována všeobecné charakteristice proteinů, dále látkám, které vykazují protektivní účinky a označují se jako chemické chaperony. V této části je obecně popsána metoda mikrokolorimetrie, pomocí které byly experimenty prováděny.

V experimentální část byly popsány jednotlivé přípravy vzorků, zahrnující pufr, roztoky lysozymu a roztoky chemických chaperonů. Jako rozpouštědlo byl použit fosfátový pufr, který zajistil optimální podmínky pro stanovovanou látku (lysozym).

Praktická část byla zaměřena na optimalizaci podmínek měření na DSC kalorimetru. V první řadě se jednalo o zjištění vhodné koncentrace vzorků, aby byl viditelný krásný denurační pík, který vzniká při rozpletení struktury proteinu. Díky porušení stabilní struktury je denaturace endotermickým dějem.

Při stanovování vhodné koncentrace byly použity tři různé koncentrace (0,5 g/l, 1 g/l, 2 g/l). Po změření bylo patrné, že dostačující koncentrací je 1 g/l. Další část byla zaměřena na posun denurační teploty s přidávkou různých chaperonů, konkrétně trehalóza, 3HB, guanidine hydrochlorid a hydroxyectoine. Vliv každé látky na lysozym byl zaznamenán u každého chaperonu. Nejsilnější účinek prokázal 3HB, který denurační teplotu posunul o 4,7 °C k vyšší hodnotě. Srovnatelně silný účinek má guanidine hydrochlorid, který teplotu změnil dokonce o 6,8 °C, nikoli však k vyšší teplotě, ale k teplotě nižší. Další dvě látky, trehalóza a hydroxyectoine, mají také srovnatelný protektivní účinek. Posunuly hodnotu denurační teploty směrem k vyšším teplotám, ovšem s menším teplotním rozdílem. Protektivní účinky použitých chaperonů odpovídají literatuře, že které se vycházelo.

Při některých experimentech byl dokonce pozorován i reverzibilní denurační proces, což je v souladu s poznatky z literatury. Tento jev je v grafech znázorněn křivkami směřujícími pod osu x a tato křivka odpovídá chlazení. Naopak křivka směřující nad osu x odpovídá ohřevu. Reverzibilní proces denaturace lze pozorovat u vzorků s 3HB, GuHCl a hydroxyectoinem, kdy největší intenzita píku byla pozorována u GuHCl. Ve směsi lysozymu a trehalózy nebyl jev reverzibility zjištěn, proto není uveden v grafu.

V původním plánovaném měření mělo proběhnout také studium lipázy, ovšem vzhledem k časové náročnosti měření a mnoha nevydařených měření, bylo v průběhu práce rozhodnuto, soustředit se pouze na jeden modelový protein (lysozym) a získat tak výsledky pouze pro jeden protein s přidávkou více různých chemických chaperonů. Výsledky bakalářské práce poskytly užitečné informace pro navazující experimenty, kdy by bylo možné rozšířit spektrum studovaných proteinů a také srovnat denurační chování vzorků i při různých koncentracích chaperonů. Další variabilita experimentů je možná také v nastavení různých rychlostí ohřevu, což přístroj PEAQ-DSC bez problémů umožňuje.

## 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] VOET, Donald a Judith G VOET. *Biochemie*. Praha: Victoria Publishing, 1995. ISBN 80-856-0544-9.
- [2] AMINO ACIDS AND NUCLEIC ACIDS. *Dummies* [online]. [cit. 2019-03-29]. Dostupné z: <https://www.dummies.com/education/science/biology/amino-acids-and-nucleic-acids/>
- [3] KARPLUS, Martin, Christopher M DOBSON a S ANDREJ. A knowledge of the potential energy surface that determines the dynamics of a polypeptide chain is as important for understanding protein folding as is the potential surface for Protein Folding : A Perspective from Theory and Experiment. 1998.
- [4] HARTL, F Ulrich, Andreas BRACHER a Manajit HAYER-HARTL. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature*. 2011, roč. 475, s. 324-332.
- [5] ALBERTS, B, A JOHNSON a J LEWIS. *Molecular biology of the cell*. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. ISBN 0-8153-3218-1.
- [6] ULRICH, F. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*. 1996, roč. 381, s. 571–580.
- [7] FENTON, Wayne A a Arthur L HORWICH. Chaperonin-mediated protein folding : fate of substrate polypeptide. 2003, roč. 2, s. 229–256.
- [8] MAYER, M P a B BUKAU. Cellular and Molecular Life Sciences Hsp70 chaperones : Cellular functions and molecular mechanism. 2005, roč. 62, s. 670–684.
- [9] ALI, Maruf M U, S Mark ROE, Cara K VAUGHAN, Phillipe MEYER, Barry PANARETOU, Peter W PIPER, Chrisostomos PRODROMOU a Laurence H PEARL. Crystal structure of an Hsp90 – nucleotide – p23 / Sba1 closed chaperone complex. 2006, roč. 440, č. April, s. 1013–1018.
- [10] VAUGHAN, Cara K, Ulrich GOHLKE, Frank SOBOTT, Valerie M GOOD, Maruf M U ALI, Chrisostomos PRODROMOU, Carol V ROBINSON, Helen R SAIBIL a Laurence H PEARL. Structure of an Hsp90-Cdc37-Cdk4 Complex. *Molecular Cell*. 2006, roč. 23, č. 5, s. 697–707. ISSN 1097-2765.
- [11] AGARWAL, Manu, Surekha KATIYAR-AGARWAL a Anil GRO. Plant Hsp100 proteins : structure , function and regulation. 2002, roč. 163.
- [12] CARRA, O, Febs LETT, Melvin SCHINDLER, Yehudah ASSAF, Nathan SHARON a David M CHIPMAN. Mechanism of Lysozyme Catalysis : Role of Ground-State Strain in Subsite D in Hen Egg-White and Human Lysozymes- ' ". 1976, roč. 16, č. 3, s. 423–431.
- [13] TIWARI, Brijesh K, Vasilis P VALDRAMIDIS, Colm P O' DONNELL, Kasiviswanathan MUTHUKUMARAPPAN, Paula BOURKE a P J CULLEN. Application of Natural Antimicrobials for Food Preservation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009, roč. 57, č. 14, s. 5987–6000. ISSN 0021-8561.
- [14] *The crystal structure of a bacterial lysozyme at atomic resolution* [online], 1974. Saalfeld [cit. 2019-02-13]. Dostupné z: [https://www.db-thueringen.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dbt\\_derivate\\_00006616/rau\\_diss\\_2005.pdf](https://www.db-thueringen.de/servlets/MCRFileNodeServlet/dbt_derivate_00006616/rau_diss_2005.pdf). Dissertation. Vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät der



Friedrich-Schiller-Universität Jena.

- [15] VODRÁŽKA, Zdeněk, Pavel RAUCH a Jan KÁŠ. *Enzymologie*. Vyd. 3. př. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1998. ISBN 80-708-0330-4.
- [16] FRARE, Erica, Patrizia Polverino De LAURETO, Christopher M DOBSON a Angelo FONTANA. A Highly Amyloidogenic Region of Hen Lysozyme. 2004, s. 1153–1165.
- [17] REETZ, Manfred T. Lipases as practical biocatalysts. 2002, roč. 6, č. 2, s. 145–150. ISSN 13675931.
- [18] JAIN, Nishant Kumar a Ipsita ROY. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Science*. 2008, s. NA-NA. ISSN 09618368.
- [19] *Plantas y Hongos* [online], [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: <http://www.plantasyhongos.es/glosario/disacarido.htm>
- [20] OLSSON, Christoffer, Helén JANSSON a Jan SWENSON. The Role of Trehalose for the Stabilization of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*. nedatováno, roč. 120, č. 20, s. 4723–4731. ISSN 1520-6106.
- [21] HAGIHARA, Yoshihisa, Saburo AIMOTO, Anthony L FINK a Yuji GOTO. Guanidine Hydrochloride-induced Folding of Proteins. *Journal of Molecular Biology*. 1993, roč. 231, č. 2, s. 180–184. ISSN 0022-2836.
- [22] KRENZLIN, Stefanie, Laurent PACCOU, Yannick GUINET, Marie-pierre FLAMENT a Juergen SIEPMANN. Influence of urea and guanidine hydrochloride on lysozyme stability and thermal denaturation ; a correlation between activity , protein dynamics and conformational changes. 2010, s. 13189–13196.
- [23] Guanidinium chloride, *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: [https://en.wikipedia.org/wiki/Guanidinium\\_chloride#/media/File:Guanidinium\\_chloride\\_V.2.svg](https://en.wikipedia.org/wiki/Guanidinium_chloride#/media/File:Guanidinium_chloride_V.2.svg)
- [24] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, Ota SAMEK a Ivana MAROVA. Evaluation of 3-hydroxybutyrate as an enzyme-protective agent against heating and oxidative damage and its potential role in stress response of poly ( 3-hydroxybutyrate ) accumulating cells. 2016, s. 1365–1376.
- [25] D,L-3-HYDROXYBUTYRÁT SODNÝ, P - LAB [online]. Praha [cit. 2019-05-10]. Dostupné z: [https://www.p-lab.cz/katalog/d-l-3-hydroxybutyrat-sodny\\_10979p](https://www.p-lab.cz/katalog/d-l-3-hydroxybutyrat-sodny_10979p)
- [26] HÖPPNER, Astrid, Nils WIDDERICH, Michael LENDERS, Erhard BREMER a Sander H J SMITS. Crystal Structure of the Ectoine Hydroxylase, a Snapshot of the Active Site. *Journal of Biological Chemistry*. 2014, roč. 289, č. 43, s. 29570–29583. ISSN 0021-9258.
- [27] PASTOR, José M, Manuel SALVADOR, Montserrat ARGANDOÑA, Vicente BERNAL, Mercedes REINA-BUENO, Laszlo N CSONKA, José L IBORRA, Carmen VARGAS, Joaquín J NIETO a Manuel CÁNOVAS. Ectoines in cell stress protection. *Biotechnology Advances*. 2010, roč. 28, č. 6, s. 782–801. ISSN 07349750.
- [28] KNAPP, Stefan, Rudolf LADENSTEIN a A. Galinski ERWIN. Extrinsic protein stabilization by the naturally occurring osmolytes  $\beta$ -hydroxyectoine and betaine. *Extremophiles*. 1999, roč. 3, č. 3, s. 191–198. ISSN 14310651.
- [29] Hydroxyectoine, *SIGMA-ALDRICH* [online]. [cit. 2019-05-10]. Dostupné z:

- <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/70709?lang=en&region=CZ>
- [30] HAINES, P J. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002. ISBN 0854046100.
- [31] RUSSEL, Mohammad, Jun YAO, Huilun CHEN, Fei WANG, Yong ZHOU, Martin M F CHOI a Gyula ZARAY. Different Technique of Microcalorimetry and Their Applications to Environmental Sciences : A Review. 2009, roč. 5, č. 4, s. 194–208.
- [32] HÖHNE, G. W. H., W. HEMMINGER, H.-J. FLAMMERSHEIM, Erhard BREMER a Sander H. J. SMITS, 2014. Differential Scanning Calorimetry. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, roč. 289, č. 43, s. 29570-29583. ISSN 0021-9258.
- [33] HUDSON, John. Lavoisier and the Birth of Modern Chemistry. In: *The History of Chemistry*. Boston, MA: Springer US, 1992, s. 61–76. ISBN 978-1-4684-6441-2.
- [34] JOHNSON, Christopher M. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2013, roč. 531, č. 1–2, s. 100–109. ISSN 0003-9861.
- [35] SPINK, Charles H. Differential Scanning Calorimetry. *Biophysical Tools for Biologists, Volume One: In Vitro Techniques*. 2008, s. 115–141.
- [36] ANALYSIS, Label-free Binding a Label-free Binding ANALYSIS. MICROCAL PEAQ-DSC BASIC GUIDE. 2017.
- [37] HE, A, J-f WILLART, R IONOV, F AFFOUARD, Y GUINET, L PACCOU a A LERBRET. Analysis of Sugar Bioprotective Mechanisms on the Thermal Denaturation of Lysozyme from Raman Scattering and Differential Scanning Calorimetry Investigations. 2006, s. 22886–22893.
- [38] VAN-THUOC, Doan, Suhaila O HASHIM, Rajni HATTI-KAUL a Gashaw MAMO. Ectoine-mediated protection of enzyme from the effect of pH and temperature stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, roč. 97, č. 14, s. 6271–6278. ISSN 0175-7598.
- [39] ALBANÈSE, Véronique, Stefanie REISSMANN a Judith FRYDMAN. A ribosome-anchored chaperone network that facilitates eukaryotic ribosome biogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 2010, roč. 189, č. 1, s. 69–81. ISSN 0021-9525.
- [40] MARCHENKOV, V. V., T. N. MELNIK a N. Yu. MARCHENKO. THE MOLECULAR CHAPERONE GroEL IN COMPLEX WITH DENATURED PROTEINS : INCREASING STABILITY. 2016, roč. 3, č. 61, s. 365-371. ISSN 1024-8579.
- [41] NAICKER, Mahendran Chinnamara, Yang-Hee KIM, Kyunghee LEE a Hana IM. Yeast Cyclophilins Prevent Cold Denaturation of Proteins. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2016, roč. 37, č. 3, s. 366–371. ISSN 12295949.
- [42] HUANG, Fan, Liangliang SHEN, Jianzu WANG, Aoting QU, Huiru YANG, Zhenkun ZHANG, Yingli AN a Linqi SHI. Effect of the Surface Charge of Artificial Chaperones on the Refolding of Thermally Denatured Lysozymes. 2016, roč. 8, č. 6, s. 3669–3678. ISSN 1944-8244.
- [43] MA, Fei-He, Yingli AN, Jianzu WANG, Yiqing SONG, Yang LIU a Linqi SHI. Synthetic Nanochaperones Facilitate Refolding of Denatured Proteins. *ACS Nano*. 2017, roč. 11, č. 10, s. 10549–10557. ISSN 1936-0851.

## 9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

Hsp	protein tepelného šoku, u angl. heat shock protein
DnaJ	chaperon Hsp40
CLIPS	chaperony spojené se syntézou proteinu
GuHCl	Guanidine hydroxychlorid
PHB	Poly(3-hydroxybutyrát)
3HB	3-hydroxybutyrát
PBS	fosfátový pufr, z angl. phosphate buffer saline
DSC	diferenční kompenzační kalorimetrie, z angl. differential scanning calorimetry
$\Delta H$	entalpie
$T_m$	denaturační teplota
$T_g$	teplota skelného přechodu