

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

DENATURACE PROTEINŮ S VYUŽITÍM RŮZNÝCH METOD

DENATURACE OF PROTEINS STUDIED BY DIFFERENT METHODS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE AUTHOR Jana Fojtíková

VEDOUCÍ PRÁCE SUPERVISOR

Ing. Jitka Krouská, Ph.D.

BRNO 2022



Zadání bakalářské práce

Vedoucí práce:	Ing. Jitka Krouská, Ph.D.
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace
Studijní program:	Chemie a chemické technologie
Studentka:	Jana Fojtíková
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie
Číslo práce:	FCH-BAK1653/2021

Název bakalářské práce:

Denaturace proteinů s využitím různých metod

Zadání bakalářské práce:

1. Provést literární rešerši na zadané téma a na základě zjištěných poznatků zvolit vhodné metody a podmínky experimentů ke sledování denaturace proteinů.

2. Optimalizovat podmínky těchto experimentů a realizovat je s využitím modelového proteinu.

3. Vyhodnotit získané výsledky a provést jejich diskuzi včetně závěrů.

Termín odevzdání bakalářské práce: 27.5.2022:

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

_ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _ _

Jana Fojtíková studentka

vedoucí práce

Ing. Jitka Krouská, Ph.D. prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc. vedoucí ústavu

Akademický rok: 2021/22

V Brně dne 1.2.2022

prof. Ing. Michal Veselý, CSc. děkan

ABSTRAKT

V této bakalářské práci byl studován proces denaturace modelového proteinu s využitím dvou fyzikálně-chemických metod. Jako model byl zvolen hovězí sérový albumin a byla sledována především jeho tepelná denaturace a její ovlivnění pomocí pH. Kromě toho byl také studován vliv kationtového tenzidu DODAC a z něj připravených vezikul.

Hlavní část měření probíhala prostřednictvím metody diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), kterou byla měřena denaturační teplota proteinu při různých hodnotách pH a koncentracích tenzidu. Potvrdilo se, že pH prostředí významně ovlivňuje teplotu denaturace. Při studiu vlivu tenzidu se ukázalo, že přídavek přípravku DODAC nemá na teplotu denaturace vliv, ovšem samotný tenzid je poměrně silným denaturačním činidlem, navzdory tomu má ale přídavek vezikul tohoto tenzidu na protein slabé protektivní účinky.

Metoda infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR) byla využita pro pozorování úbytku uspořádaných struktur sekundární struktury a nárůstu náhodných struktur při postupném zahřívání proteinu.

KLÍČOVÁ SLOVA

protein, denaturace, diferenciální skenovací kalorimetrie, infračervená spektroskopie, kationický tenzid

ABSTRACT

In this bachelor thesis, the process of denaturation of a model protein was studied using two physico-chemical methods. Bovine serum albumin was chosen as a model and its thermal denaturation and its influence by pH were monitored. In addition, the effect of the cationic surfactant DODAC and its vesicles was also studied.

The main part of the measurement was performed using the differential scanning calorimetry (DSC), which measured the denaturation temperature of the protein at different pH values and surfactant concentrations. It was confirmed that the pH significantly affects the denaturation temperature. The study of the effect of the surfactant showed that the addition of DODAC did not affect the denaturation temperature, but the surfactant itself turned out to be a relatively strong denaturing agent, despite that the addition of vesicles of this surfactant had weak protective effect on the protein.

The Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) was used to observe the decrease of the amount of the elements of secondary structure and the increase of random coil structures during the gradual heating of the protein.

KEYWORDS

protein, denaturation, differential scanning calorimetry, infrared spectroscopy, cationic surfactant

FOJTÍKOVÁ, Jana. *Denaturace proteinů s využitím různých metod*. Brno, 2022. Dostupné také z: <u>https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/138924</u>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Jitka Krouská.

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

Na tomto místě bych ráda poděkovala své vedoucí Ing. Jitce Krouské, Ph.D. a konzultantovi Ing. Petru Sedláčkovi, Ph.D. za čas, který mi věnovali, za odborné vedení a za mnoho užitečných rad. Zvláštní díky patří mé rodině, především otci, za podporu při studiu.

OBSAH

1	١	ÚV(VOD		
2	r	TEC	DRE	TICKÁ ČÁST	9
	2.1	l	Prot	teiny	9
	/	2.1.	1	Struktura proteinů	9
	/	2.1.2	2	Denaturace	0
	/	2.1.3	3	Albumin1	1
	2.2	2	Ten	zidy 1	4
	/	2.2.	1	Rozdělení tenzidů1	4
	/	2.2.2	2	Micely1	5
	2.3	3	Met	ody1	7
	4	2.3.	1	Diferenční skenovací kalorimetrie 1	7
		2.3.2	2	Infračervená spektroskopie1	9
3		SOL	JČA	SNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY2	2
	3.1	1	Stuc	dium denaturace prostřednictvím metody DSC2	2
	3.2	2	Stuc	dium denaturace prostřednictvím metody FTIR2	3
	3.3	3	Vliv	v surfaktantů na BSA2	3
4	4 CÍL PRÁCE				5
5]	EXF	PERI	IMENTÁLNÍ ČÁST2	6
	5.1	1	Pou	žité chemikálie2	6
	5.2	2	Pou	žité přístroje a pomůcky2	6
	5.3	3	Příp	prava zásobních roztoků a vzorků2	6
	-	5.3.	1	Příprava pufru	6
	-	5.3.2	2	Příprava vzorku hovězího albuminu2	6
	5.4	1	Prác	ce s MicroCal PEAQ-DSC kalorimetrem2	8
	5.5	5	Prác	ce s Nicolet iS50 FT-IR2	9
6	•	VÝS	SLEI	DKY A DISKUZE	1
	6.1	l	Výs	ledky měření DSC	1

	6.1.1 Vliv rozpouštědla (rozdíl mezi vodou a fosfátovým pufrem)		31
6.1.2		Vliv pH na tepelnou denaturaci BSA	32
	6.1.3	Vliv tenzidu na tepelnou denaturaci BSA	34
(5.2 Vý	sledky měření FTIR	37
	6.2.1	Tepelná denaturace BSA	38
	6.2.2	Chemická denaturace BSA	39
7	ZÁVĚF	۲	41
8	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY42		
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ47		

1 ÚVOD

Proteiny jsou základními stavebními kameny všech živých organismů podílející se na většině biologických procesů. Bez proteinů by organismus nebyl života schopný, podílejí se totiž na jeho růstu a pohybu, umožňují komunikaci mezi buňkami a organismy, zajištují transport látek krevním řečištěm i přes membrány a řídí další biologické procesy. Kromě toho mají i funkci obranou, ať už jako protilátky imunitního systému nebo jako jedy a toxiny zvířat a rostlin. Není proto s podivem, že proteiny byly, jsou a pravděpodobně ještě velice dlouho budou předmětem vědeckého bádání.

Za specifické vlastnosti proteinů je odpovědná především jejich struktura. Proto, dojde-li ke změně struktury, protein ztratí svou biologickou funkci. Tento proces se nazývá denaturace a souvisí s rozplétáním terciální a sekundární struktury proteinu vlivem denaturačních agentů. Denaturace může být způsobena například mechanickým namáháním, teplotou, působením chemické látky nebo jen časem.

Denaturací proteinů se zabývalo velké množství vědců, a proto se jedná o poměrně podrobně prostudovaný obor, ve kterém na první pohled není již co zjišťovat. Ovšem opak je pravdou. Denaturace je složitý proces, především u větších proteinů se složitější konformací, a může být ovlivněna řadou faktorů. Proto je potřeba získat co největší množství dat z různých metod a za různých podmínek, která bude následně možné mezi sebou porovnat a spojit do ucelené informace.

Experimentální část této bakalářské práce se proto věnuje studiu denaturace nejčastěji používaného modelového proteinu, hovězího sérového albuminu, pomocí dvou metod, které jsou k tomuto účelu využívány asi nejvíce, diferenciální skenovací kalorimetrie a infračervené spektroskopie.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Proteiny

Proteiny jsou velice rozmanité biologické makromolekuly, které v organismu zastávají řadu funkcí a podílejí se téměř na každém biologickém procesu. Mohou se skládat z jednoho nebo více polypeptidových řetězců, což jsou lineární biopolymery sestávající z aminokyselin navzájem propojených peptidovou vazbou.

2.1.1 Struktura proteinů

Základem všech proteinů je dvacet proteinogenních aminokyselin. Aminokyseliny jsou spojeny peptidovou vazbou, která vzniká mezi α – aminoskupinou jedné aminokyseliny a α – karboxylovou skupinou druhé za odštěpení vody [1].

Primární struktura proteinu je dána pořadím aminokyselin v řetězci a polohou disulfidických můstků. Vzniká při biosyntéze proteinů na ribozomech a je charakteristická pro každý protein. Primární struktura zásadně ovlivňuje funkci proteinu i další strukturní stupně [2].

Sekundární struktura sestává z charakteristických pravidelně se opakujících konformací, jako je α – šroubovice nebo β – skládaný list, které jsou zpevňovány nekovalentními slabými interakcemi, především vodíkovými můstky, elektrostatickými interakcemi, hydrofobními interakcemi a Van der Waalsovými silami.

Sekundární a supersekundární struktura způsobují uspořádání proteinu do domén, 3D konformací závislých na nekovalentních interakcích postranních řetězců. Terciální struktura popisuje vzájemné vztahy těchto domén.

Bílkoviny sestávající z více polypeptidových řetězců nazýváme oligomery. Kvarterní struktura popisuje vzájemné uspořádání polypeptidových řetězců v rámci oligomeru.

Nativní konformace proteinu je prostorové uspořádání dané nekovalentními interakcemi, ve kterém má protein v daném prostředí nejnižší Gibbsovu energii a je schopen plnit svou biologickou funkci.

2.1.2 Denaturace

Bílkoviny mohou plnit svou funkci, pouze je-li zachována jejich terciální struktura. Narušením slabých vazebných interakcí, které udržují terciální strukturu pohromadě, dochází ke vzniku amorfního klubka, tedy ztrátě vlastností. Primární struktura proteinu ovšem zůstává zachována. Protein tak přechází z nativního do denaturovaného stavu, což je spojeno se změnou volné Gibbsovy energie. Tomuto procesu se říká denaturace.

K denaturaci může docházet vlivem fyzikálních či chemických faktorů, které narušují slabé vazebné interakce, a tím přispívají ke změně konformace proteinu.

Nejvýznamnějším fyzikálním faktorem je bezpochyby teplota. Zvyšováním teploty se snižuje počet vodíkových můstků a struktura se rozvolňuje. Tepelnou denaturaci popisujeme pomocí teploty tání (T_m), což je teplota, při které zdenaturovala polovina původního množství proteinu a také prostřednictvím entalpie denaturace (ΔH_m).

Jako chemická denaturační činidla působí kyseliny a báze, které mění pH prostředí a ovlivňují tak iontové interakce vedlejších řetězců aminokyselin, zatímco organická rozpouštědla a detergenty působí především na hydrofobní interakce.

Výsledná konformace proteinu se liší v závislosti na intenzitě a typu denaturačního faktoru. Protein zdenaturovaný organickým rozpouštědlem se tedy bude svou terciální strukturou lišit od proteinu, který zdenaturoval vlivem vysoké teploty.

Změna konformace ovšem nemusí být trvalá, za určitých podmínek je možný návrat do nativního stavu proteinu. Například přídavek velmi malého množství denaturačního činidla vede k rozpletení struktury a odhalení hydrofobních aminokyselinových zbytků, ale po odstranění denaturačního činidla se struktura proteinu obnoví. Dalším příkladem může být částečná denaturace proteinu vlivem tenzidu a jeho regenerace po překročení kritické micelární koncentrace, kdy vznikají micely s inkorporovaným proteinem [3]. Obdobně, je-li například albumin vystaven teplotě 60 °C (přičemž jeho struktura se začíná rozplétat při 40 °C) a následně ochlazen, jeho funkce se nijak nezmění [4]. Překročením dané teploty nebo koncentrace denaturačního činidla dochází k nevratným změnám a následné agregaci. Tímto způsobem lze denaturaci dělit na reverzibilní (vratnou), jako je například vysolování využívané při izolaci proteinu ze vzorku, a ireverzibilní (nevratnou).

2.1.3 Albumin

2.1.3.1 Úvod

Albumin patří mezi nejlépe prostudované proteiny a často se proto využívá jako modelový protein při různých studiích. Nachází se v krevním séru, kde je nejhojněji zastoupeným proteinem tvořícím 60 % celkové hmotnostní koncentrace sérových proteinů [5].

Protože má albumin složitou strukturu, nemůže být přijímán z potravy, ale je organismem syntetizován v jaterních buňkách jako preproalbumin. Odstraněním signálního peptidu a šesti zbytků propeptidů z N – konců vzniká proalbumin a následně albumin, který je vypuštěn do krevního oběhu, kde koluje přibližně 19 dní [6].

Slouží jako transportní protein pro přenos metabolitů, jako jsou mastné kyseliny, fosfolipidy nebo steroidní hormony, ale také léčiv [6],[7]. Dále významně přispívá k udržování pH a osmotické tlaku krve a v neposlední řadě poskytuje aminokyseliny pro syntézu jiných proteinů.

2.1.3.2 Struktura

Molekula albuminu, která svým tvarem připomíná srdce, je tvořena jedním polypeptidovým řetězcem tvořícím tři homologické domény, z nichž každá sestává ze dvou subdomén A a B. Domény jsou si podobné svou globulární 3D strukturou a jsou topologicky totožné. Sedmnáct cysteinových zbytků tvoří osm disulfidických můstků (a jednu volnou thiolovou skupinu), které dělí domény do devíti dvojitých helixů formujících v každé ze tří domén triplet velký-malývelký helix [5].

V molekule albuminu je celkem dvacet osm α -helixů, které jsou rovnoměrně rozmístěny v subdoménách (jednu subdoménu tvoří tři nebo čtyři α – helixy) a spojích mezi subdoménami [5]. V sekundární struktuře albuminu tedy převládají α – šroubovice (67 %) nad β – skládanými listy (10 %) a zbytek polypeptidového řetězce vytváří volné smyčky mezi subdoménami [5].



Obrázek 1: struktura BSA a jednotlivých domén [8]

Řetězec hovězího albuminu sestává z 583 aminokyselinových zbytků, přičemž převládají nabité polární zbytky směřující vně šroubovice oproti nepolárním, které se orientují do vnitřního prostoru helixu [5]. Díky velkému množství cysteinů dochází k tvorbě disulfidických můstků charakteristické pro extracelulární proteiny [5]. Disulfidické můstky významně přispívají k celkové stabilitě albuminu a jejich synklinální konformace je odpovědná za jeho stabilitu i při vysokých teplotách, navíc umožňují reverzibilní rozvinutí vlivem pH prostředí [5],[7].

Molekula albuminu je sbalená přibližně v rozmezí pH 4 – 8, je-li tato hranice překročena, molekula se začne rozbalovat vlivem odpudivých sil nově vzniklých nábojů a dojde ke změně konformace. V závislosti na pH jsou kromě nativní formy známy další čtyři isomery: E - forma (pH < 3), F - forma (pH 3 - 5), B - forma (pH 7 - 8,5) a A - forma (pH > 8,5) [5],[9].

2.1.3.3 Vlastnosti

Všechny albuminy mají globulární terciální strukturu, liší se ovšem počtem aminokyselin v polypeptidovém řetězci. Zatímco lidský albumin (HSA, human serum albumin) je tvořen 585 aminokyselinovými zbytky, v řetězci hovězího albuminu (BSA, bovine serum albumin) je pouze 583 aminokyselin. Vzhledem k menšímu počtu aminokyselinových zbytků je i molekulová hmotnost BSA nižší v porovnání s HSA, přibližně 66,7 kDa.

Polypeptidový řetězec albuminu obsahuje velké množství cysteinu a nabitých aminokyselin, naopak obsah tryptofanu, methioninu, glycinu a isoleucinu je nižší než u většiny proteinů [5]. Právě nabité aminokyseliny významně ovlivňují vlastnosti albuminu, tím že spolu s pH prostředí určují celkový náboj molekuly. V isoelektrickém bodě se BSA nachází při pH 4,7 a v isoionickém při pH 5,2. V neutrálním prostředí se v molekule nachází 185 ionizovaných skupin a molekula má záporný náboj, neboť počet kyselých skupin převažuje nad bazickými [5]. Albumin je stabilní přibližně v rozmezí pH 4–9, v tomto rozmezí může být zahříván až na teplotu 60 °C po dobu 10 hodin, aniž by denaturoval [6].

Absorbanci ovlivňují především aminokyseliny obsahující aromatické jádro, jako tyrosin, tryptofan a fenylalanin. Albumin neabsorbuje světlo ve viditelné oblasti spektra (400 – 700 nm), jeho absorpční maximum se nachází v ultrafialové oblasti v rozmezí 260 – 290 nm [5]. Při ještě nižších vlnových délkách okolo 235 nm lze měřit absorbanci peptidové vazby.

Hlavní funkcí albuminu je transport metabolitů organismu krevním řečištěm, je ale schopen vázat a přenášet i celou řadu ligandů, které nejsou tělu vlastní. Významná je jeho schopnost vázat hydrofobní látky do oblastí své struktury, které se podobají kapsám [10]. Tím se zvyšuje zdánlivá rozpustnost hydrofobních látek v krvi a je umožněn transport široké škály léčiv [11]. Kromě hydrofobních látek je albumin schopen vázat také nabité molekuly díky velkému množství nabitých aminokyselinových zbytků v řetězci.

2.1.3.4 Využití

Hovězí albumin slouží především jako modelový protein a standard pro různé studie, výzkumy a testy, kde nahrazuje lidský albumin. Využívá se také při imunologických testech [8].

V současné době se nejvíce využívá jako nosič léčiv pro svou schopnost vázat širokou škálu molekul a transportovat je v lidském organismu. Proto se mnoho studií zabývá zkoumáním toho, jakým způsobem se léčivo s albuminem váže a jak se touto interakcí změní vlastnosti léčiva. Jedním z nejvýznamnějších vlivů albuminu je zvýšení rozpustnosti hydrofobních látek, s čímž souvisí i vyšší účinnost léčiva [10]. Studují se také interakce albuminu s nanočásticemi a vezikulárními systémy, které také slouží jako nosičové systémy [11].

2.2 Tenzidy

Tenzidy, někdy též nazývané povrchově aktivní látky či surfaktanty, jsou organické molekuly obsahující alespoň jednu lyofilní a jednu lyofobní skupinu. Tato specifická struktura surfaktantů má za následek dva děje: adsorpci a agregaci [12].

Adsorpce je děj, kdy se molekuly surfaktantu hromadí na fázovém rozhraní a orientují se tak, aby minimalizovaly kontakt lyofobní skupiny s rozpouštědlem, tím se snižuje povrchové napětí. Druhým dějem, ke kterému může docházet v roztocích surfaktantů, je agregace. Molekuly tenzidu se shlukují do útvarů s lyofilními hlavičkami orientovanými vstříc rozpouštědlu a lyofobními řetězci směřujícími dovnitř agregátu. Těmto útvarům se říká micely a jejich tvar významně závisí na koncentraci surfaktantu [12].



Obrázek 2: Struktura tenzidu a micely

2.2.1 Rozdělení tenzidů

Tenzidy se nejčastěji dělí podle charakteru jejich lyofilní (polární) skupiny, přesněji podle její schopnosti disociovat ve vodě na ionty. Na základě tohoto kritéria se tenzidy dělí na iontové a neiontové, s tím že iontové se pak dále dělí na kationtové, aniontové a amfoterní [13].

Aniontové povrchově aktivní látky ve vodě disociují za vzniku aniontu. Patří mezi ně soli karboxylových kyselin, sulfonové kyseliny, alkylsulfáty nebo estery kyseliny fosforečné [12]. Jsou nejčastěji využívanou skupinou tenzidů pro čištění povrchů. Nejdéle známým aniontovým tenzidem je mýdlo (sodná sůl karboxylové kyseliny). Nad kritickou micelární koncentrací vytvářejí všechny aniontové povrchově aktivní látky pěnu, což přispívá k jejich čistícímu účinku, ale může být nežádoucí v jiných aplikacích [12].

Kationtové tenzidy disociují za vzniku kationtu. Nejčastěji se jedná o kvarterní amoniové soli. Představují mnohem menší skupinu v porovnání s aniontovými nebo neiontovými povrchově aktivními látkami, přesto jsou hojně využívány díky svým specifickým vlastnostem. Za zmínku stojí jejich antimikrobiální vlastnosti, díky kladnému náboji jsou přitahovány k záporně nabité membráně prokaryot [13]. Využívají se proto jako dezinfekční a antiseptická činidla. Využití našly i v textilním průmyslu jako změkčovadla.

Náboj amfoterních tenzidů závisí na pH prostředí, mohou být kationty, anionty, nebo mohou být disociovány obě skupiny a navzájem svůj náboj vyrovnávat. Nejčastěji se využívají v kombinaci s jinými surfaktanty, aby upravovaly jejich vlastností, jako je velikost micel, solubilita, stabilita pěny nebo viskozita [12].

Neiontové surfaktanty ve vodě nedisociují. Nejčastěji jsou tvořeny uhlíkovým řetězcem zakončeným hydroxylovou skupinou.

2.2.2 Micely

Při nízké koncentraci vytvářejí tenzidy pravé roztoky, zvyšováním koncentrace dochází k hromadění amfifilních molekul na fázovém rozhraní a snížení povrchového napětí a po překročení kritické micelární koncentrace dochází ke vzniku struktur koloidních rozměrů, které se nazývají micely.

2.2.2.1 Kritická micelární koncentrace a teplota

U roztoků tenzidů dochází při určité koncentraci k agregaci molekul do útvarů koloidních rozměrů. Tyto útvary se nazývají micely a mají průměr od 5 nm do 10 nm. Koncentrace při které začínají vznikat micely se označuje jako kritická micelární koncentrace (CMC) a je charakteristická změnou vlastností roztoku. Kritická micelární koncentrace nebývá příliš vysoká, obvykle se pohybuje mezi $10^{-3} - 10^{-2}$ mol/dm³ pro aniontové tenzidy, $10^{-3} - 10^{-1}$ mol/dm³ pro kationtové a amfoterní tenzidy a $10^{-5} - 10^{-4}$ mol/dm³ pro neiontové tenzidy [12].

Jednou z vlastností významně ovlivněnou CMC je povrchové napětí. Povrchové napětí roste s koncentrací tenzidu, po překročení CMC se ale už jeho hodnota příliš nemění [12]. Další dobře pozorovatelnou změnou je výrazný pokles molární vodivosti po překonání CMC.

Na křivce rozpustnosti tenzidu se Krafftův bod rovná teplotě, při které je dosaženo kritické micelární koncentrace. Při nízkých teplotách je rozpustnost (koncentrace nasyceného roztoku) menší než CMC a nemůže docházet ke vzniku micel. Při dosažení Krafftovy teploty se rozpustnost tenzidu rovná CMC. Tvorba micel je tedy ovlivněna nejen koncentrací tenzidu, ale také teplotou.

2.2.2.2 Solubilizace

Solubilizace je jednou z nejvýznamnějších vlastností micel. Jedná se o proces, kdy jsou molekuly látky, v daném rozpouštědle jinak nerozpustné, začleňovány do struktury micel, a tak převáděny do roztoku. Nepolární látky se začleňují dovnitř micely, zatímco polární jsou solubilizovány při povrchu micely. Látky s polární i nepolární skupinou se do struktury micely začleňují obdobně jako samotný surfaktant, polární částí řetězce ven a nepolární dovnitř.



Obrázek 3: Solubilizace

Solubilizací vzniká koloidní disperze a nikoliv pravý roztok. Z toho vyplývá, že se jedná o děj probíhající pouze nad kritickou micelární koncentrací tenzidu, kdy jsou molekuly solubilizované látky začleněny do struktury micel a nenacházejí se volně v disperzním prostředí [14]. V důsledku solubilizace dochází ke zvětšení hmotnosti micel, a to nejen kvůli přítomnosti molekul solubilizované látky, ale také proto, že na zformování micely je potřeba více molekul tenzidu [14].

Solubilizace se využívá při čištění povrchů (detergenty), v chemických a farmaceutických výrobách (micelární katalýza) a v mnoha dalších průmyslových odvětvích.

2.3 Metody

2.3.1 Diferenční skenovací kalorimetrie

Všechny chemické, biologické i fyzikální procesy vedou k uvolnění nebo spotřebě tepla, proto se kalorimetrické metody zabývají měřením tepla během těchto procesů. Jednotlivé metody mohou být rozděleny na základě principu měření, konstrukce nebo způsobu provozu (titrační, průtokové, skenovací, statické) [15].

Diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), nebo také diferenční kompenzační kalorimetrie, je nejvyužívanější metodou termické analýzy, při níž se zkoumají přechody či procesy indukované ve vzorku změnou teploty. Tato metoda se využívá ke stanovení fázových přechodů biologických molekul [16]. V případě proteinů lze pomocí DSC zjistit teplotu denaturace, která vyjadřuje termodynamickou stabilitu proteinu. Při přechodu z nativního do denaturovaného stavu dochází ke zvýšení tepelné kapacity. Změna tepelné kapacity je způsobena tím, že během rozvolňování struktury jsou boční řetězce, které v nativním stavu nebyly v kontaktu s rozpouštědlem, vystaveny rozpouštědlu a hydratovány.

2.3.1.1 Princip měření DSC kalorimetrem

Princip měření spočívá v konstantním ohřívání/chlazení dvou měřících cel, z nichž jedna obsahuje rozpouštědlo a označuje se jako referenční, a druhá obsahující vzorek v daném rozpouštědle se označuje jako vzorková.

Kalorimetr pomocí několika senzorů měří teplotní rozdíl mezi referenční a vzorkovou celou, které jsou během měření zahřívány/ochlazovány konstantní rychlostí. Výměně tepla s okolím brání izolační plášť, který uvnitř udržuje pro obě cely stejné podmínky a brání vlivu vnějšího prostředí. Ve vzorkové cele dochází k procesu indukovanému změnou teploty, a tudíž k absorpci (endotermní proces), nebo emisi (exotermní proces) tepla, tím vzniká teplotní rozdíl mezi celami. Přístroj se pomocí ohřívačů snaží tento rozdíl okamžitě kompenzovat a teploty cel vyrovnat. Při denaturaci dochází k absorpci tepla a jedná se tudíž o endotermní proces.



Obrázek 4: Schéma DSC kalorimetru: 1) plnící kapiláry; 2) Peltierovo zařízení; 3) Vzorková cela; 4) Referenční cela; 5) Ohřívače; 6) základna; 7) Dráty tepelných senzorů; 8) Adiabatický ochranný obal [17]

Výsledkem měření je křivka závislosti tepelné kapacity (Cp) na teplotě (T) znázorňující pík absorpce tepla, který se následně integruje, aby poskytl hodnoty entalpie (ΔH) a teploty tání (denaturace) (T_m), je možné ji také obecně označit jako střední teplotu přechodu. Výsledná závislost a obě veličiny jsou znázorněny na Obrázek 5.



Obrázek 5: Výsledek měření na DSC

Teplotou denaturace (T_m) se rozumí teplota, při které zdenaturovalo právě 50 % proteinu přítomného ve vzorku. V grafu je to teplota odpovídající středu vrcholu píku. Paty píku odpovídají teplotě, kdy se protein začal rozvíjet a teplotě, kdy je zdenaturovaný již veškerý protein ve vzorku. Teplota denaturace popisuje stabilitu proteinu, čím je vyšší, tím je protein stabilnější [18].

Entalpie denaturace (ΔH) je termodynamická veličina popisující množství tepla, které si soustava (vzorek) vymění s okolím během daného procesu, v tomto případě se jedné o denaturaci. Její hodnotu lze zjistit z plochy pod křivkou denaturačního píku [18].

V této práci byl využit kalorimetr PEAQ-DSC (Malvern, USA), jehož měřící cely mají tvar stočených kapilár a umožňují tudíž pouze měření kapalných vzorků s viskozitou blízkou vodě. U viskóznějších vzorků by docházelo ke komplikacím při dávkování.

2.3.2 Infračervená spektroskopie

Spektroskopické metody studují interakce látek s elektromagnetickým zářením. Jejich prostřednictvím lze z množství emitovaného nebo absorbovaného záření popsat strukturu studované látky. Spolu s UV-VIS spektroskopií patří IR spektroskopie mezi metody optické spektroskopie, na rozdíl od UV-VIS se ale nezabývá energetickými přechody elektronů, nýbrž vibračními a rotačními stavy molekuly. Mezi vibrační metody patří kromě IR spektroskopie také Ramanova spektroskopie. IR a Ramanova spektroskopie jsou komplementární metody, neboť vibrace viditelné v IR spektrech nejsou viditelné v Ramanových spektrech a naopak [19].

Princip infračervené spektroskopie spočívá v interakci infračerveného záření se studovanou látkou. Každý atom či skupina atomů v molekule vibruje kolem své rovnovážné pozice a absorpcí infračerveného záření dochází ke změně vibračního či rotačního stavu, což se projeví na délce vazby mezi atomy.

Infračervené záření spadá do oblasti $14000 - 20 \text{ cm}^{-1}$ a podle energie se dělí na tři oblasti: blízkou (14000 – 4000 cm⁻¹), střední (4000 – 400 cm⁻¹) a vzdálenou (400 – 20 cm⁻¹), přičemž pro měření spekter se využívá střední oblast [20]. Tuto oblast je ještě možné rozdělit na dvě podle typu vibrací. Oblast valenčních vibrací (4000 – 1500 cm⁻¹) obsahuje pásy charakterizující funkční skupiny či typy vazeb. Oblast v rozmezí přibližně 1500 – 500 cm⁻¹ se označuje jako oblast otisku prstu, v této oblasti nejsou spektra žádných dvou látek identická a využívá se proto k identifikaci látek [20].

Při studiu proteinů je nejvýznamnějším pásem Amid I ($1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$), který odpovídá vibraci C=O skupiny v peptidové vazbě [21]. Po derivaci tohoto píku je možné zjistit zastoupení jednotlivých prvků sekundární struktury.

2.3.2.1 Princip měření IR spektrometrem s Fourierovou transformací

FTIR spektrometry jsou v současné době nejpoužívanější, protože umožňují měřit s lepším rozlišením a za kratší čas. Jejich největší výhodou oproti jiným IR spektrometrům je, že nevyužívají monochromatické záření, ale signál dopadající na detektor je součtem všech možných interferencí při všech frekvencích [22]. Každý zaznamenaný interferogram tak obsahuje veškeré spektrální informace.



Obrázek 6: Obecné schéma FTIR spektrofotometru a interferometru

Klasický monochromátor je v tomto případě nahrazen Michelsonovým interferometrem, jehož hlavními součástmi jsou dělič paprsků a dvě zrcadla, z nichž jedno je pevné a druhé pohyblivé [22]. Zdroj emituje spojité IR záření, které v interferometru dopadá na dělič paprsků a je rozděleno na dva identické paprsky. Každý paprsek dopadá na jedno ze zrcadel a je odražen zpět na dělič paprsků, kde se opět spojí dohromady, čímž vznikají interference vlnění. Tyto interference jsou ovlivňovány polohou pohyblivého zrcadla. Paprsek vycházející z interferometru je pak odražen do vzorkovacího prostoru, kde interaguje se vzorkem a dopadá na detektor. Signál detektoru je v počítači dáván do souvislosti s polohou pohyblivého zrcadla kontrolovanou pomocí laseru.

Výsledný interferogram je následně pomocí Fourierovy transformace převeden na spektrum, které může mít na ose y vynesenou transmitanci (T), absorbanci (A) nebo reflektanci (R) a na ose x vlnočet či vlnovou délku. Transmitance je definována jako poměr intenzity záření prošlého vzorkem (I) ku intenzitě záření vycházejícího ze zdroje (I₀) a vyjadřuje tedy množství záření prošlého vzorkem. Absorbance vyjadřuje množství záření pohlceného vzorkem a definuje se jako dekadický logaritmus převrácené hodnoty transmitance. Reflektance popisuje množství záření odraženého vzorkem. Jelikož je závislost energie na vlnové délce (λ) logaritmická, využívá se častěji vlnočet (v), což je převrácená hodnota vlnové délky.



Obrázek 7: Spektrum BSA ve střední oblasti IR [23]

Podle typu vzorku a nároků na informace získané ze spektra je možné pro měření zvolit různé měřící techniky, z nichž následující čtyři jsou nejčastější: transmisní techniky (vhodné pro všechna skupenství), ATR (vhodná pro pevné a kapalné vzorky), spekulární reflektance (pro tenké filmy) a difuzní reflektance (pro práškové materiály) [24]. Při měřeních metodou FTIR obecně bývá problém s vodnými roztoky, neboť voda silně absorbuje IR záření [25].

Při měření byla v této práci využita technika zeslabené úplné reflektance (ATR). Při této technice paprsek prochází skrze krystal s vysokým indexem lomu a dopadá na vzorek s nízkým indexem lomu, při určitém úhlu dopadu je pak v podstatě veškeré záření odraženo zpět a za těchto podmínek proniká část energie několik mikrometrů pod povrch vzorku ve formě evanescentních vln [26],[27]. Vznikem evanescentních vln dochází k zeslabení intenzity záření.

3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Jak již bylo zmíněno, albumin je velmi dobře prozkoumaný protein právě proto, že se používá jako model při nezměrné spoustě studií. Je známo nejen pořadí aminokyselin v jeho řetězci, molekulová hmotnost či struktura, ale také jeho chování a konformace v nejrůznějších prostředích a to, jak se mění vlivem fyzikálních či chemických faktorů. Studuje se jeho schopnost vázat a transportovat různé typy léčiv či tvořit vezikulární systémy obsahující léčivo. Probíhají i studie imunologických vlastností albuminu [8]. V této široké škále studií není s podivem, že i průběh denaturace albuminu je velmi podrobně prozkoumanou oblastí.

3.1 Studium denaturace prostřednictvím metody DSC

V roce 1984 se skupina ruských vědců kolem z Leningradské státní univerzity zabývala vratnou a nevratnou tepelnou denaturací RNAázy, katalázy a BSA. Dokázali, že teplota denaturace závisí na rychlosti ohřevu a roste s vyšší koncentrací proteinu. Dále zjistili, že na ni bude mít vliv i pH a iontová síla [28].

Hlavním zdrojem pro tuto práci v oblasti kalorimetrie byl článek italských vědců z roku 1997, kteří se zabývali vlivem pH, iontové síly a koncentrace SDS na tepelnou denaturaci BSA. V rámci své studie dokázali, že denaturace albuminu probíhá ve dvou krocích. Experiment probíhal v rozsahu pH 6 – 8, v tomto rozmezí byl dokázán nárůst teploty denaturace s rostoucí teplotou. Obdobně teplota denaturace rostla i s rostoucí iontovou silou a koncentrací SDS [29].

Z páce A. Michnika z roku 2004 vyplývá, že tvar kalorimetrické křivky významně ovlivňuje přítomnost mastných kyselin. V jejich přítomnosti je patrný pouze jeden pík při teplotě přibližně 69 °C. Oproti tomu u čistého albuminu jsou píky dva přibližně v okolí teplot 56 °C a 69 °C [30]. Významným poznatkem je především skutečnost, že tyto dva píky neznamenají dvoukrokový mechanismus denaturace, ale spíše vzájemně nezávislou denaturaci subdomén, které se tedy pravděpodobně chovají jako dvě nezávislé strukturní jednotky [30].

V současné době se metoda DSC využívá ke studiu schopnosti albuminu vázat léčiva a ke kvantifikaci této interakce [31].

3.2 Studium denaturace prostřednictvím metody FTIR

Tým italských vědců se zabýval studiem agregace hovězího albuminu vlivem teploty při rozdílných hodnotách pD (vzorek byl připraven v D₂O) s využitím metody FTIR a metod rozptylu světla. Vzorky zahřáté na teplotu 58 °C vykazovaly tendenci tvořit malé agregáty při extrémních hodnotách pD a větší různorodé agregáty při hodnotách blízkých izoelektrickému bodu. Zahříváním dochází k úbytku struktur α – šroubovic, naopak se objevuje více struktur β – listů, které iniciují intermolekulární interakce, čímž vznikají agregáty. Při rozdílných hodnotách pD se liší počáteční stav proteinu [32].

Japonské vědkyně studovaly pomocí metody FTIR změny v sekundární struktuře hovězího albuminu způsobené zahříváním v rozmezí 25 - 90 °C při pD 5,4. Zjistily, že zahříváním nad 70 °C dochází ke vzniku intermolekulárních β -listů a tím ireverzibilní denaturaci. Ovšem ještě při teplotě přibližně o 17 °C nižší dochází k denaturaci krátkých úseků spojujících domény [33].

V práci z roku 2019 se vědci zabývali vlivem různých faktorů na denaturaci lidského albuminu. Z práce vyplývá, že v alkalickém prostředí je denaturace intenzivnější, oproti neutrálnímu či kyselému prostředí je ve výsledné struktuře více náhodných struktur. V kyselém a neutrálním prostředí převažují po denaturaci ve struktuře intermolekulární β – listy. Společným znakem pro všechna prostředí je úbytek α – helixů, který je ale nejintenzivnější v alkalickém prostředí. V neutrálním prostředí klesne zahřátím na 90 °C množství α – helixů přibližně o polovinu [34].

3.3 Vliv surfaktantů na BSA

V článku zveřejněném v roce 2010 autoři popisují vliv koncentrace kladně nabitého CTAB na lidský sérový albumin při různých hodnotách pH [35]. Podobnou náplň experimentu měli i autoři článku z roku 2020 s tím rozdílem, že použili záporně nabitý SDS [3]. Z obou článků vyplývá, že pH má na interakci proteinu se surfaktanty významný vliv, především proto, že v závislosti na pH se mění náboj proteinu. Mají-li protein a surfaktant opačný náboj, projeví se větší měrou elektrostatické interakce a denaturace je intenzivnější [3],[35]. Zvyšováním koncentrace surfaktantu dochází k postupnému rozvolňování struktury proteinu, především vlivem hydrofobních a elektrostatických interakcí, až po dosažení kritické micelární koncentrace, kdy bylo pozorováno částečné opětovné sbalení proteinu [3],[35]. Přídavkem 4 mM CTAB bylo dosaženo nejvyššího stupně denaturace a vyšší koncentrace již na protein neměly vliv [35].

Byl studován také rozdíl vlivu surfaktantů s jedním a se dvěma řetězci. Studie prokázaly, že takzvané gemini surfaktanty způsobují mnohem intenzivnější denaturaci než surfaktanty s jedním řetězcem. Mají nižší kritické micelární koncentrace a zároveň vyšší vazebné konstanty vůči BSA než má například DTAB [36],[37]. Z výsledků vyplývá, že k vyšší intenzitě denaturace přispívá i délka řetězce a vyšší počet hydroxylových skupin [36],[37].

Na institutu v Aténách se zabývali interakcemi BSA s kladně nabitými vezikuly modifikovanými hyaluronanem sodným. Navázáním hyaluronanu došlo ke změně náboje na povrchu dvojvrstvy, ovšem i přesto interagoval albumin mnohem silněji s modifikovanými vezikuly než s kladně nabitími vezikuly DDAB [38].

Esenciální pro porozumění vlivu surfaktantů na strukturu proteinu je článek z loňského roku popisující struktury vzniklé interakcemi mezi BSA a směsí kladně a záporně nabitých surfaktantů. Je-li jedna ze složek směsi ve významném přebytku, protein se vlivem surfaktantů rozplétá a vzniká struktura připomínající perlový náhrdelník, kdy jsou micely navázány na rozpletený polypeptidový řetězec [39]. Při hodnotě molárního zlomku jedné ze složek přibližně X = 0,3 tvoří molekuly surfaktantu válcovité útvary, kolem kterých se omotává vlákno proteinu [39]. V ekvimolární směsi vznikají vezikuly, do jejichž dvojvrstvy je zakomponován řetězec albuminu [39]. V nepřítomnosti albuminu vznikají zvyšováním koncentrace nejdříve elipsoidní micely, potom válcovité micely následované vezikuly a v ekvimolární směsi vznikají multilamelární vezikuly, které v přítomnosti albuminu nebyly pozorovány [39].

4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce bylo prostudovat proces denaturace modelového proteinu za různých podmínek s využitím několika k tomu vhodných metod, porozumět principu těchto metod a způsobu vyhodnocování získaných dat a naučit se zacházet s některými přístroji využívanými při těchto metodách měření. Pro splnění tohoto cíle bylo nutné nejdříve provést literární rešerši, na jejímž základě byly zvoleny metody a modelový protein a navrženy podmínky experimentů.

Jako modelový protein byl zvolen hovězí albumin (BSA), který by díky své struktuře měl během denaturace umožnit pozorování dvou přechodů. Z literární rešerše vyplynulo, že při studiu denaturace se nejčastěji používají kalorimetrické a spektroskopické metody, popřípadě metody rozptylu světla. Kalorimetrické metody se využívají ke stanovení stability proteinu, pomocí spektrofotometrických metod lze studovat změny struktury a díky rozptylu světla lze zjistit velikost agregátů zdenaturovaného proteinu. Jako zástupce kalorimetrických metod byla zvolena diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC), ze spektroskopických metod byla vybrána infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR).

Práce by měla poskytnout soubor dat z různých metod popisující chování BSA během tepelné denaturace v různém prostředí, a to přehledně na jednom místě. Práce by tak měla shrnovat v současnosti známé informace o tepelné denaturaci albuminu.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité chemikálie

- Hovězí sérový albumin, čistota \geq 98 %, Sigma-Aldrich
- Deionizovaná voda
- Oxid deuteria (těžká voda), Sigma-Aldrich
- Kyselina citrónová bezvodá, Mr = 210,14
- Dodekahydrát hydrogenfosforečnanu disodného, Mr = 177,989
- Dimethyldioktadecylammonium chlorid (DODAC), Mr = 582,5

5.2 Použité přístroje a pomůcky

- pH metr
- MicroCal PEAQ-DSC kalorimetr, MALVERN
- Nicolet iS50 FT-IR spektrometr, THERMOFISHER

5.3 Příprava zásobních roztoků a vzorků

5.3.1 Příprava pufru

Nejdříve byly připraveny zásobní roztoky 0,2 M (mol/dm³) fosforečnanu disodného a 0,1 M kyseliny citrónové. Vypočtené navážky obou látek byly v podobě krystalků naváženy na analytických vahách, následně převedeny do odměrné baňky a doplněny po rysku deionizovanou vodou. Roztoky byly umístěny na magnetickou míchačku a míchány do úplného rozpuštění pevné složky.

Pomocí pipety byly roztoky smíchány v takových poměrech, aby bylo docíleno pH 3,6; 4,6; 5,6; 7 a 8 [40]. Připravené pufry byly proměřeny pH metrem a v případě potřeby bylo pH upraveno přídavkem fosforečnanu disodného nebo kyseliny citrónové. Iontová síla pufrů nebyla nijak upravována.

5.3.2 Příprava vzorku hovězího albuminu

Navážka krystalického BSA byla navážena na analytických vahách s přesností na čtyři desetinná místa přímo do odměrné baňky a doplněna po rysku deionizovanou vodou, pufrem nebo těžkou vodou. Vzorek byl následně míchán na magnetické míchačce do úplného rozpuštění pevné složky. Mezi měřeními byly vzorky uchovávány v lednici.

Zásobní roztoky DODAC o různé koncentraci byly připraveny rozpuštěním navážky pro nejvyšší koncentraci v deionizované vodě. Všechny ostatní koncentrace byly připraveny ředěním tohoto roztoku. Připravené roztoky o různých koncentracích byly nakonec smíchány s roztokem BSA o koncentraci 2 g/l v poměru 1:1.

Vzorek BSA s vezikulami dvouřetězcového kationtového tenzidu DODAC byl připraven smícháním roztoku BSA o koncentraci 2 g/l s 1 mM roztokem vezikul (jednalo se o modelový roztok, který nebyl připraven autorkou práce).

Vzorky BSA v těžké vodě pro měření FTIR byly zahřívány v předehřáté vodní lázni na magnetické míchačce s ohřevem v rozmezí teplot 45 – 80 °C po dobu 20 minut. Po ohřátí byly vzorky zchlazeny proudem studené vody, aby byla zastavena denaturace, ale především proto, aby nedošlo k poškození krystalu při měření.

Připravené vzorky:

- BSA 1 g/l v pufru o pH = 3,6; 4,6; 5,6; 7 a 8
- BSA 1 g/l v deionizované vodě
- BSA 1 g/l v těžké vodě
- BSA 1 g/l v roztoku DODAC v molárním poměru: 1:100; 50; 25; 12,5; 10; 5; 2,5 a 1,25
- BSA 1 g/l v roztoku vezikul (DODAC) 0,5 mM
- BSA 100 g/l v těžké vodě (D₂O)

5.4 Práce s MicroCal PEAQ-DSC kalorimetrem

Měření denaturační teploty probíhalo na přístroji MicroCal PEAQ-DSC. Přístroj je vybaven celami ve tvaru stočených kapilár a je tudíž vhodný pro měření entalpie (ΔH) a teploty (T_m) tepelně indukovaných strukturních přechodů molekul proteinů a dalších biopolymerů v roztocích s viskozitou blízkou vodě.



Obrázek 8: Popis součástí kalorimetru MicroCal PEAQ-DSC: 1) Odsávač; 2) Odpadní lahev; 3) Filtr; 4) Pipeta na 250 µl; 5) Tělo přístroje obsahující měřící cely; 6) Koncovka vakuového odsávače; 7) Závitová násadka kryjící dávkovací otvory; 8) Nástavec pro čištění; 9) Uzavírací kohout [17]

Měření bylo prováděno v rozsahu teplot 25–90 °C, s rychlostí ohřevu 90 °C/hod a chlazení 60 °C/hod. Vždy byly měřeny 3 cykly ohřev–chlazení s pufrem či vodou v obou celách, a poté byl pufr ve vzorkové cele nahrazen vzorkem, který byl měřen za stejných podmínek. Referenční cela byla naplněna pufrem o vybraném pH a vzorková roztokem BSA o koncentraci 1 g/l v daném pufru. První 3 cykly, kdy je měřen pufr proti pufru, poskytují baseline, která je při následných úpravách odečtena od signálu vzorku. Křivky těchto měření by se v ideálním případě měly překrývat a neměly by na nich být žádné výraznější píky, menší výkyvy mohou být způsobeny vznikem bublin a jsou pro měření nežádoucí. Většinou se při vyhodnocení jako baseline volí signál posledního cyklu.

Surová data z měření jsou ve formátu závislosti tepelného toku na teplotě, případně tepelné kapacity na teplotě (po zadání koncentrace vzorku). Při vyhodnocování se pomocí vyhodnocovacího programu odečte signál pufru od měřeného vzorku a tímto způsobem se získá denaturační pík. Signál pufru je zvolen jako baseline a jeho počáteční tepelné kapacitě se přiřadí hodnota nula, je tak docíleno lepšího rozlišení. Vyhodnocení píku spočívá především v určení střední teploty (T_m) (střed vrcholu píku), která odpovídá teplotě, při které zdenaturovala polovina měřeného vzorku, a plochy píku, což je hodnota entalpie (ΔH) spojená s měřeným přechodem. Pro účely této práce byla vyhodnocena pouze teplota denaturace.

Čištění kalorimetru probíhalo před a po každém měření promytím přibližně 200 ml deionizované vody.

5.5 Práce s Nicolet iS50 FT-IR

Měření infračervených spekter probíhalo na spektrometru Nicolet iS50 FT-IR metodou ATR s krystalem diamantu. Tento přístroj umožňuje rychlé a jednoduché měření spektra od vzdálené infračervené oblasti po viditelné světlo. Podmínkou pro úspěšné měření je, že vzorek musí být v neustálém kontaktu s krystalem, proto je metoda vhodná pro pevné a kapalné vzorky.



Obrázek 9: Spektrometr Nicolet iS50 FT-IR

Měření probíhá tak, že se na krystal nanese drobné množství vzorku, například kapka roztoku, tak aby byl po celou dobu v kontaktu s krystalem a měření neovlivňovaly třeba bublinky vzduchu. Pro zpřesnění měření je nutné nejdříve provést měření pozadí, kterým je normálně vzduch nebo těžká voda. Odečtením signálu pozadí od zkoumaného vzorku se získá výsledné spektrum.

Během pár vteřin je možné získat infračervené spektrum vzorku, v tomto spektru je nutné vybrat vhodné píky. Pro studium denaturace proteinů by takovými vhodnými píky byly Amid I odpovídající vibraci C=O skupiny a Amid II odpovídající vibraci vazby N – H, které jsou obě přítomné v peptidové vazbě. Obecně se ale využívá pouze Amid I. K tomuto píku ve skutečnosti přispívá větší množství píků zastupujících jednotlivé formy sekundární struktury. Dekonvolucí Amidu I je tedy možné stanovit zastoupení jednotlivých forem sekundární struktury ve vzorku.



Obrázek 10: Dekonvoluce Amidu I [41]

Vzorky albuminu byly měřeny ve formě roztoku v D_2O , poté, co byly 20 min zahřívány ve vodní lázni předehřáté na zvolenou teplotu. Těžká voda byla použita, aby se zabránilo zastínění píku Amidu I píkem vody, která ve stejné oblasti silně absorbuje, zatímco u těžké vody je tento pík mírně posunutý.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

6.1 Výsledky měření DSC

Pro studium denaturace albuminu se jako první metoda nabízí DSC, neboť je to metoda široce využívaná při zkoumání stability proteinů. Ovšem v současné době se většina studií věnuje spíše zkoumání stability albuminu po interakci s léčivem či jinou látkou, a následně stanovují jeho vazebnou konstantu vůči dané látce. Větší procento studií zabývajících se albuminem se zaměřuje spíše na lidský albumin než na hovězí. Je nutno podoktnout, že denaturační chování se u albuminů od různých druhů živočichů liší.

DSC umožňuje stanovit T_m všech naměřených přechodů, což je výhodou oproti většině alternativních metod, které dokáží stanovit pouze první, nebo nejvýraznější přechod. V případě této práce, kdy je předmětem studia BSA s dvěma přechody, je tedy DSC ideální volbou.

6.1.1 Vliv rozpouštědla (rozdíl mezi vodou a fosfátovým pufrem)

Nejdříve bylo provedeno měření BSA (1 g/l) v deionizované vodě. Vzhled k tomu, že u prvních dvou měření byly výsledky ovlivněny přítomností bublin, bylo třetí měření provedeno se vzorkem po odplynění. Odplynění bylo dosaženo vložením vzorku na 5 min do centrifugačního přístroje Minispin při 5000 rpm. Odplynění ovšem mělo na vzorek negativní vliv a pro další měření se od něj upustilo.



Obrázek 11: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci BSA v různých rozpouštědlech

Protože v mnohých případech není voda ideálním prostředím, bylo pro porovnání provedeno i měření BSA (1 g/l) v pufru o pH 7 a v D₂O. Endotermy BSA ve vodě a v pufru se překvapivě nepřekrývají, ale jsou v podstatě zrcadlově obrácené. I když je v obou případech T_m dominantního přechodu v okolí 65 °C, u vzorku ve vodě se jedná o druhý, zatímco u vzorku v pufru o první přechod, jak je vidět na Obrázek 11.

Již v dřívějších studiích bylo zjištěno, že s rostoucí iontovou silou se T_m posouvá doprava k vyšším teplotám a píky vzorků s vyšší iontovou silou bývají vyšší a užší. I při tomto experimentu vyšel pík vzorku v pufru užší a mírně vyšší proti píku vzorku v deionizované vodě.

Pík albuminu v těžké vodě se tvarem podobá píku v deionizované vodě. Dominantní přechod se denaturační teplotou shoduje se vzorkem ve vodě, jen první méně intenzivní přechod je posunut mírně doleva k nižším teplotám.

6.1.2 Vliv pH na tepelnou denaturaci BSA

Po experimentech s vodou byly připraveny vzorky BSA v pufrech různých hodnotách pH a byl sledován posun hodnot T_m . Měření probíhalo v rozmezí pH 3,6 – 8 se stejnou koncentrací BSA jako při předchozím měření. Výsledky měření při všech zvolených pH a vodě jsou znázorněny na Obrázek 12.



Obrázek 12: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci BSA při různém pH

S výjimkou měření při pH 3,6 jsou u všech endotermů patrné dva přechody. Lze předpokládat, že při tomto pH byl protein již do značné míry rozbalený vlivem odpudivých sil kladného náboje. S rostoucím pH se zvyšuje i stabilita proteinu, při pH 5,6 se protein nachází ve formě N – isomeru a je termodynamicky nejstabilnější, což dokazuje i nejvyšší hodnota T_m při tomto pH (viz. Obrázek 13). Dalším zvyšováním pH postupně přechází do B – formy a hodnoty T_m opět mírně klesají.



Obrázek 13: Střední teploty denaturace BSA při různém pH

V grafu výše jsou uvedeny zprůměrované denaturační teploty ze všech měření, vždy byla provedena alespoň dvě. Nejvýraznější rozdíly mezi jednotlivými pH jsou patrné u T_{m1} . U T_{m2} již nejsou rozdíly tak markantní. Nejvyšší teploty denaturace bylo dosaženo při pH 5,6 a nejnižší při pH 3,6. Nejmenší rozdíl mezi teplotou prvního a druhého přechodu je opět u pH 5,6 a největší je u vody (přibližně pH 7).

6.1.3 Vliv tenzidu na tepelnou denaturaci BSA

Z rešerše vyplývá, že dvouřetězcový kationtový tenzid by měl mít na záporně nabitý protein silné denaturalizační účinky, a to především kvůli působení hydrofobních a elektrostatických sil.

Vliv tenzidu na BSA byl studován dvěma způsoby. Pozornost byla nejprve zaměřena na vliv vezikul připravených z tenzidu DODAC a následně na vliv samotné koncentrace tohoto tenzidu. Výsledky obou měření jsou diskutovány v následujících kapitolách.

6.1.3.1 Interakce BSA s roztokem vezikul

Měřený vzorek byl připraven smícháním zásobního roztoku BSA a roztoku vezikul v poměru 1:1, tak že výsledná koncentrace BSA byla 1 g/l a vezikul 0,5 mM. Přestože oba roztoky byly původně čiré, jejich smícháním došlo ke vzniku mléčného zabarvení vzorku. Jako reference sloužila deionizovaná voda.



Obrázek 14: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci BSA v přítomnosti vezikul tenzidu DODAC

Již prvním významným poznatkem je, že BSA v přítomnosti vezikul nedenaturuje, což plyne z toho, že bylo možné naměřit denaturační pík. Z grafu je dále patrné, že přidáním albuminu do roztoku vezikul dochází k mírnému zvýšení jeho stability. Denaturační teplota se zvýší průměrně o 4 °C, nejedná se tedy o nijak zásadní posun oproti vodnému roztoku.

Bohužel z kalorimetrického měření není možné stanovit, jakým způsobem spolu protein a vezikuly interagují. Ovšem vzhledem k tomu, že se denaturační teplota příliš nezměnila, lze předpokládat, že albumin se nachází při povrchu vezikul a ne uvnitř.

6.1.3.2 Vliv koncentrace tenzidu

Kromě vlivu vezikul byl zkoumán i vliv zvyšující se koncentrace tenzidu. V přítomnosti jednořetězcových tenzidů jako SDS nebo CTAB je albumin plně zdenaturovaný při dosažení koncentrace 4 mM, u DODAC lze předpokládat denaturaci již při nižších koncentracích.

Byla připravena řada vzorků v molárním poměru k BSA v rozmezí 1,25:1 – 100:1. Vzorky s nejnižším molárním poměrem zůstaly čiré, se zvyšováním koncentrace začal být ve vzorcích pozorovatelný mléčný zákal a u vzorků v molárních poměrech 1:10, 1:12,5 a 1:25 došlo ke vzniku sraženiny.



Obrázek 15: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci BSA v přítomnosti tenzidu DODAC o nízkých koncentracích

V grafu jsou znázorněny nižší z měřených koncentrací tenzidu (Obrázek 15). U vyšších koncentrací již není možné určit denaturační pík BSA, zato se objevují píky fázových přechodů tenzidu (Obrázek 16). Při nízkých koncentracích surfaktantu je nejdominantnější denaturační pík albuminu, jeho plocha se ovšem s rostoucí koncentrací zmenšuje, až jej nejde v porovnání s píky fázových přechodů rozeznat. Z tohoto trendu vybočuje vzorek v molárním poměru 1:10, tedy 0,15 mM DODAC, který má největší plochu a byly u něj vyhodnoceny dvě denaturační teploty, první při 60 °C a druhá při 76 °C. Mohlo by se jednat o CMC tenzidu v přítomnosti BSA, vycházíme-li z předpokladu, že při dosažení CMC dojde k částečné renaturaci, jak ve své práci zmiňují Srivastava a Alam [3].

Molární poměr 1:12,5 je nejvyšší, u kterého ještě lze stanovit denaturační píky albuminu a připadají jim denaturační teploty 67 °C a 74 °C. Teplota denaturace BSA ve vzorcích s nižší koncentrací se pohybuje kolem 64 °C, což přibližně odpovídá denaturační teplotě albuminu ve vodě a v pufru o pH 7. Nelze tedy mluvit o žádném výrazném vlivu na tepelnou stabilitu proteinu.



Obrázek 16: Závislost tepelné kapacity na teplotě při denaturaci BSA v přítomnosti tenzidu DODAC o vysokých koncentracích

molární poměr	Koncentrace[mM]	Zákal	Agregace	pík BSA	Tm BS	A [°C]
1,25	0,019	ne	ne	ano	63,65	
2,5	0,038	ne	ne	ano	64	,45
5	0,075	ano	ne	ano	64	,01
10	0,150	ano	ano	ano	60,61	75,87
12,5	0,188	ano	ano	ano	67,24	74,07
25	0,375	ano	ano	ne	-	-
50	0,750	ano	ne	ne	-	
100	1,500	ano	ne	ne	-	-

Tabulka 1: Tabulka denaturačních teplot BSA v roztoku tenzidu DODAC a pozorování chování roztoku po smíchání obou složek

6.2 Výsledky měření FTIR

Metoda FTIR je ideální volbou pro studium struktury molekul. Často se využívá například při kontrole kvality léčiv, nebo ve výzkumu, neboť je velice rychlá, přesná a umožňuje měření vzorků bez předchozí úpravy a ve všech skupenstvích. Během pár vteřin poskytuje IR spektrum, které v sobě skrývá podrobné informace o typu vazeb v dané látce, navíc je charakteristické pro každou molekulu a umožňuje tak identifikaci neznámých látek. Pro lepší rozlišení spektra je vhodné od něj v programu odečíst pozadí (voda, vzduch aj.).

Pro měření metodou FTIR-ATR bylo připraveno celkem devět vzorků, osm zahříváním ve vodní lázni v rozmezí teplot 45 – 80 °C a jeden přidáním kapky koncentrované HCl, pro porovnání tepelné a chemické denaturace. Jako pozadí byla použita těžká voda a roztok těžké vody s HCl.

Už od pohledu byl patrný nárůst denaturace se zvyšující se teplotou, čím více byl vzorek zahříván, tím vyšší měl viskozitu. Do 65 °C byly vzorky tekuté, ale po překročení této teploty byly stále viskóznější a při teplotě 80 °C měl vzorek charakter netekoucího gelu. Toto pozorování odpovídá výsledkům měření DSC, kde byla denaturační teplota BSA ve vodě stanovena v blízkosti 65 °C.

Obdobně vzorek zdenaturovaný přídavkem HCl měl mnohem vyšší viskozitu než před denaturací, ovšem v tomto případě došlo vlivem denaturace i ke vzniku sraženiny. Vzhled vzorků je možné porovnat na Obrázek 17.



Obrázek 17: Vzorky BSA po denaturaci

6.2.1 Tepelná denaturace BSA

Na Obrázek 18 jsou znázorněna spektra všech vzorků po zahřátí, barevně jsou zvýrazněna spektra vzorků zahřátých na nejnižší a nejvyšší teplotu. Můžeme pozorovat několik větších píků, ovšem zaměříme se pouze na Amid I v oblasti $1700 - 1600 \text{ cm}^{-1}$ a píky vody v oblasti $3600 - 3300 \text{ cm}^{-1}$ a pod hodnotou 1000 cm^{-1} .



Obrázek 18: Výsledná spektra ATR-FTIR analýzy při zahřívání roztoku BSA v těžké vodě v rozmezí teplot 45 °C (zelené spektrum) až 80 °C (červené spektrum) s krokem 5 °C.

U píků vody nejdříve intenzita odpovědi klesá, což souvisí s úbytkem vody vlivem odpařované během zahřívání. Nejnižší absorbance je dosaženo při zahřátí na 65 °C. Při zahřívání na vyšší teploty absorbance opět roste, což bude souviset i s vyšší viskozitou těchto vzorků. Jak vzorek přechází do podoby gelu, váže do své struktury molekuly vody.

Na Obrázek 19 je detail Amidu I, opět jsou zvýrazněna především spektra maximální a minimální teploty, ovšem barevně jsou odlišena spektra všech vzorků. Vzhledem k tomu, že změny ve struktuře BSA je možné přehledně vyčíst již z tvaru píku Amidu I, nebyla provedena dekonvoluce píku.



Obrázek 19: Detail píku Amidu I

Pík Amidu I je ve skutečnosti složený z většího množství drobnějších píků reprezentujících jednotlivé struktury. Přesné zastoupení jednotlivých struktur v molekule pak lze zjistit dekonvolucí, pro splnění účelu této práce ovšem postačí zhodnotit celkový tvar píku.

Na Obrázek 19 můžeme zřetelně pozorovat úbytek α -šroubovic (1660 – 1650 cm⁻¹) a přírůstek intermolekulárních β – skládaných listů (1620 – 1610 cm⁻¹). Dále vidíme mírný nárůst v oblasti 1690 – 1680 cm⁻¹, který by měl značit nárůst částečně rozvolněných ohybů. Nárůst množství neuspořádaných struktur není možné pozorovat, protože tento pík se nachází přibližně v oblasti 1650 – 1640 cm⁻¹ a změny v jeho intenzitě by bylo možné pozorovat až po dekonvoluci.

6.2.2 Chemická denaturace BSA

Pro pozorování chemické denaturace byla ke vzorku přidána kapka koncentrované HCl. Došlo k okamžité denaturaci a v místě kontaktu se vytvořila sraženina. Bylo změřeno spektrum jak sraženiny, tak zbylého roztoku.

Spektrum sraženiny oproti spektru roztoku postrádá píky vody a dává intenzivnější odpověď v oblasti Amidu I, jak je vidět na Obrázek 20.



Obrázek 20: Výsledná spektra ATR-FTIR analýzy po přidání koncentrované HCl



Obrázek 21: Detail píku Amidu I a Amidu II

Na Obrázek 21 můžeme porovnat rozdíly mezi tepelnou a chemickou denaturací BSA. Už na první pohled je patrné, že tvary píků se liší, a tudíž že i průběh denaturace a výsledné zastoupení jednotlivých struktur budou odlišné.

Asi nejvýraznějším rozdílem je chybějící pík Amidu II v případě chemické denaturace, jedná se nejspíše o důsledek protonizace. Opět pozorujeme úbytek α – šroubovic (1660 – 1650 cm⁻¹), ale z tvaru můžeme usuzovat na větší zastoupení neuspořádaných struktur (1650 – 1640 cm⁻¹) a β – listů, než jaké bylo u vzorků zdenaturovaných vysokou teplotou.

7 ZÁVĚR

Tato práce byla zaměřena na studium denaturace hovězího sérového albuminu (BSA) vlivem teploty, pH a kationtového tenzidu (DODAC). Součástí bylo také zkoumání vlivu různých rozpouštědel o blízkém pH a studium interakce BSA s kladně nabitými vezikuly.

Hlavní část měření byla změřena za využití metody diferenční skenovací kalorimetrie (DSC), kterou byla měřena denaturační teplota proteinu při různých hodnotách pH a koncentracích tenzidu. Největší odolnost vůči tepelné denaturaci vykazoval hovězí sérový albumin při pH 5,6, naopak při nejnižších teplotách denaturoval v silně kyselém pH. Při studiu vlivu tenzidu se ukázalo, že přídavek přípravku DODAC nemá na teplotu denaturace vliv, ovšem samotný tenzid je denaturačním činidlem a při koncentraci 0,375 mM je již protein natolik zdenaturován, že jeho teplotu denaturace nelze pomocí DSC změřit. Navzdory tomu má ale přídavek vezikul tohoto tenzidu o koncentraci 0,5 mM na protein slabé protektivní účinky.

Pro studium změn sekundární struktury byla použita metoda ATR-FTIR. Nejdříve byla měřena spektra vzorků vystavených zvyšující se teplotě, která měla doplnit výsledky měření metodou DSC. Ze spekter vyplývá, že mezi teplotami 65 °C a 70 °C dochází v molekule BSA k významné strukturní změně, způsobující zvýšení viskozity a množství navázané vody. Tyto závěry souhlasí s výsledky DSC, neboť střední denaturační teplota albuminu stanovená touto metodou také spadá do tohoto rozmezí teplot. Po překročení teploty 65 °C také dochází k největšímu nárůstu množství β -listů. Obecně platí, že se zvyšováním teploty klesá množství α – šroubovic a naopak přibývá intermolekulárních β – listů, které napomáhají vzniku gelové struktury.

Dále byla studována chemická denaturace albuminu po přidání kapky HCl. Obdobně jako při denaturaci teplotou došlo k ubytku α -šroubovic a nárůstu množství β – listů. Kromě toho došlo ale ještě k vymizení celého píku Amidu II. Celkově lze tedy kyselinu považovat za silnější denaturační činidlo než vysokou teplotu.

V případě dalšího zkoumání by bylo vhodné zaměřit se na studium interakcí tenzidu DODAC s BSA, například metodou titrační kalorimetrie nebo prostřednictvím metod rozptylu světla. Při studiu chemické denaturace metodou ATR-FTIR by bylo žádoucí provést měření i s využitím nižších koncentrací HCl.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] MURRAY, Robert K., 2002. *Harperova Biochemie*. 4. české vydání. Jinočany: Nakladatelství H+H. Lange medical book. ISBN 80-7319-013-3.

[2] KODÍČEK, Milan, Olga VALENTOVÁ a Radovan HYNEK, 2018. *Biochemie: chemický pohled na biologický svět.* 2. přepracované vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7592-013-3.

[3] SRIVASTAVA, Rachana a Md. Sayem ALAM, 2020. Influence of micelles on protein's denaturation. *International Journal of Biological Macromolecules*. **145**, 252-261. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.12.154

[4] PICÓ, Guillermo A., 1997. Thermodynamic features of the thermal unfolding of human serum albumin. *International Journal of Biological Macromolecules*. 20(1), 63-73. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(96)01153-1

[5] PETERS, Theodore, 1996. *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications*. San Diego: Academic Press. ISBN 01-255-2110-3.

[6] KRATZ, Felix, 2008. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 132(3), 171-183. ISSN 01683659. Dostupné z: doi:10.1016/j.jconrel.2008.05.010

[7] AZIMZADECH, Omid, 2008. *An experimental approach to probe conformational changes in proteinstructure using a biotin derivative followed by mass spectrometr.* Dizertační práce. Philipps-Universität Marburg. Vedoucí práce Lingelbach, Klaus (Prof. Dr.).

[8] MAJOREK, Karolina A., Przemyslaw J. POREBSKI, Arjun DAYAL, Matthew D. ZIMMERMAN, Kamila JABLONSKA, Alan J. STEWART, Maksymilian CHRUSZCZ a Wladek MINOR, 2012. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Molecular Immunology*. **52**(3-4), 174-182. ISSN 01615890. Dostupné z: doi:10.1016/j.molimm.2012.05.011

[9] BHATTACHARYA, Mily, Neha JAIN, Karishma BHASNE, Vandna KUMARI a Samrat MUKHOPADHYAY, 2011. PH-induced Conformational Isomerization of Bovine Serum Albumin Studied by Extrinsic and Intrinsic Protein Fluorescence. *Journal of Fluorescence*. **21**(3), 1083-1090. ISSN 1053-0509. Dostupné z: doi:10.1007/s10895-010-0781-*3*

[10] YAMASAKI, Keishi, Victor Tuan Giam CHUANG, Toru MARUYAMA a Masaki OTAGIRI, 2013. Albumin–drug interaction and its clinical implication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1830**(12), 5435-5443. ISSN 03044165. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbagen.2013.05.005

[11] NAVEENRAJ, Selvaraj a Sambandam ANANDAN, 2013. Binding of serum albumins with bioactive substances – Nanoparticles to drugs. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews.* **14**, 53-71. ISSN 13895567. Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochemrev.2012.09.001

[12] FARN, Richard J., 2006. *Chemistry and technology of surfactants*. Oxford: Blackwell Publishing. ISBN 14-051-2696-5.

[13] BARTOVSKÁ, Lidmila a Marie ŠIŠKOVÁ, 2002. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*. Vyd. 4. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 80-708-0475-0.

[14] MYERS, Drew, 2006. *Surfactant science and technology*. 3rd ed. Hoboken: Wiley.ISBN 978-0-471-68024-6.

[15] HAINES, Peter J., 2002. *Principles of thermal analysis and calorimetry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 236 s. ISBN 1-84755-176-9.

[16] JOHNSON, Christopher M., 2013. Differential scanning calorimetry as a tool for protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 531(1-2), 100-109.
ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2012.09.008

[17] MICROCAL PEAQ-DSC BASIC GUIDE, 2017. United Kingdom: Malvern Instruments.

[18] *MICROCAL PEAQ-DSC USER MANUAL*, 2017. United Kingdom: Malvern Instruments.

[19] LÖDER, Martin G. J. a Gunnar GERDTS, 2015. Methodology Used for the Detection and Identification of Microplastics—A Critical Appraisal. *Marine Anthropogenic Litter*. Cham: Springer International Publishing, 2015-6-2, 201-227. ISBN 978-3-319-16509-7. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-16510-3_8

[20] PETTINARI, Claudio a Carlo SANTINI, 2017. IR and Raman Spectroscopies of Inorganic, Coordination and Organometallic Compounds. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier, 2017, 347-358. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00338-1

[21] BYLER, D. Michael a Heino SUSI, 1986. Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra: Second derivative spectra. *Biopolymers*. 25(3), 469-487. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.360250307

[22] NOVOTNÁ, Radka, Tomáš ŠILHA a Zdeněk TRÁVNÍČEK, 2011. *Spektrální metody studia chemických látek: Učební text k praktickému cvičení Metody studia anorganických látek a pro studenty chemických přírodovědných oborů* [online]. In: . Olomouc: Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, s. 1-106 [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: <u>https://www.prf.upol.cz/fileadmin/userdata/PrF/katedry/afc/Studijni materialy/Spektralni metody.pdf</u>

[23] ABROSIMOVA, K V, O V SHULENINA a S V PASTON, 2016. FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin. *Journal of Physics: Conference Series.* **769**. ISSN 1742-6588. Dostupné z: doi:10.1088/1742-6596/769/1/012016

[24] FTIR Basics, 2022. *Thermo Fischer Scientific* [online]. USA: Thermo Fischer Scientific [cit. 2022-05-08]. Dostupné z:

https://www.thermofisher.com/cz/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotopeanalysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopyinformation/ftir-information/ftir-basics.html

[25] TRANTER, G.E., 2017. FTIR Spectroscopy of Aqueous Solutions. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier, 2017, 762-769. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.12157-2

[26] SUBRAMANIAN, Anand a Luis RODRIGUEZ-SAONA, 2009. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. *Infrared Spectroscopy for Food Quality Analysis and Control*. Spojené státy americké: Academic Press, s. 145-178. Agricultural, Biological, and Food Sciences 2009. ISBN 978-0-12-374136-3. [27] FRINGELI, U.P., 2017. ATR and Reflectance IR Spectroscopy,
Applications. *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*. Elsevier, 2017, 115-129. ISBN 9780128032244. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-803224-4.00104-7

[28] SOCHAVA, I.V., T.V. BELOPOLSKAYA a O.I. SMIRNOVA, 1985. DSC study of reversible and irreversible thermal denaturation of concertrated globular protein solutions. *Biophysical Chemistry*. **22**(4), 323-336. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/0301-4622(85)80056-9

[29] GIANCOLA, Concetta, Cira DE SENA, Dimitrios FESSAS, Giuseppe GRAZIANO a Guido BARONE, 1997. DSC studies on bovine serum albumin denaturation Effects of ionic strength and SDS concentration. *International Journal of Biological Macromolecules*. **20**(3), 193-204. ISSN 01418130. Dostupné z: doi:10.1016/S0141-8130(97)01159-8

[30] MICHNIK, A., 2003. Thermal stability of bovine serum albumin DSC study. *Journal* of Thermal Analysis and Calorimetry. **71**(2), 509-519. ISSN 14182874. Dostupné z: doi:10.1023/A:1022851809481

[31] KHAIBRAKHMANOVA, Diliara, Alena NIKIFOROVA a Igor SEDOV, 2021.
Binding constants of drug-albumin complexes from DSC measurements. *Thermochimica Acta*. 699. ISSN 00406031. Dostupné z: doi:10.1016/j.tca.2021.178930

[32] MILITELLO, Valeria, Carlo CASARINO, Antonio EMANUELE, Antonella GIOSTRA, Filippo PULLARA a Maurizio LEONE, 2004. Aggregation kinetics of bovine serum albumin studied by FTIR spectroscopy and light scattering. *Biophysical Chemistry*. **107**(2), 175-187. ISSN 03014622. Dostupné z: doi:10.1016/j.bpc.2003.09.004

[33] MURAYAMA, Koichi a Mihoko TOMIDA, 2004. Heat-Induced Secondary Structure and Conformation Change of Bovine Serum Albumin Investigated by Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Biochemistry*. **43**(36), 11526-11532. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi0489154

[34] USOLTSEV, SITNIKOVA, KAJAVA a USPENSKAYA, 2019. Systematic FTIR Spectroscopy Study of the Secondary Structure Changes in Human Serum Albumin under Various Denaturation Conditions. *Biomolecules*. **9**(8). ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom9080359

 [35] VLASOVA, Irina M., Alexander A. VLASOV a Alexander M. SALETSKY, 2010.
Interaction of ionic detergent cethyltrimethylammonium bromide with human serum albumin at various values of pH: Spectroscopic study. *Journal of Molecular Structure*. **984**(1-3), 332-338. ISSN 00222860. Dostupné z: doi:10.1016/j.molstruc.2010.09.051

[36] SINHA, Srishti, Deepti TIKARIHA, Jyotsna LAKRA, Toshikee YADAV, Sunita KUMARI, Subit K. SAHA a Kallol K. GHOSH, 2016. Interaction of bovine serum albumin with cationic monomeric and dimeric surfactants: A comparative study. *Journal of Molecular Liquids*. **218**, 421-428. ISSN 01677322. Dostupné z: doi:10.1016/j.molliq.2016.02.052

[37] LI, Yajuan, Xiaoyong WANG a Yilin WANG, 2006. Comparative Studies on Interactions of Bovine Serum Albumin with Cationic Gemini and Single-Chain Surfactants. *The Journal of Physical Chemistry B.* **110**(16), 8499-8505. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp060532n

[38] PAPAGIANNOPOULOS, Aristeidis, 2018. Bovine serum albumin interactions with cationic surfactant vesicles decorated by a low-molar-mass polysaccharide. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. **537**, 495-501. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2017.10.058

[39] SAHA, Debasish, Debes RAY, Sugam KUMAR, Joachim KOHLBRECHER a Vinod K. ASWAL, 2021. Interaction of a bovine serum albumin (BSA) protein with mixed anionic–cationic surfactants and the resultant structure. *Soft Matter.* **17**(29), 6972-6984. ISSN 1744-683X. Dostupné z: doi:10.1039/D1SM00264C

[40] FOGL, Jaroslav a Karel VOLKA, 2000. *Analytické tabulky*. 7. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 70-7080-371-1.

[41] SUKUMARAN, Suja, 2017. Protein secondary structure elucidation using FTIR spectroscopy. In: *Thermo Fischer Scientific* [online]. USA [cit. 2022-05-18]. Dostupné z: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/MSD/Application-Notes/AN52985-protein-secondary-structure-elucidation-using-ftir-spectroscopy.pdf

А	Absorbance
ATR	Zeslabená úplná reflektance
BSA	Hovězí sérový albumin
CMC	Kritická micelární koncentrace
Ср	Tepelná kapacita
CTAB	Cetyltrimethylammonium bromid
D ₂ O	Těžká voda
DDAB	Didecyldimethylammonium bromid
DODAC	Dioleyldimethylammonium chlorid
DSC	Diferenciální skenovací kalorimetrie
DTAB	Dodecyltrimethylammonium bromid
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
H ₂ O	Voda
HCl	Kyselina chlorovodíková
HSA	Lidský sérový albumin
Ι	Intenzita záření
IR	Infračervený/á/é
pD	Záporný dekadický logaritmus koncentrace iontů deuteria
pН	Záporný dekadický logaritmus koncentrace iontů vodíku
R	Reflektance
SDS	Dodecylsulfát sodný
Т	Transmitance
Tm	Střední teplota denaturace
UV-VIS	Ultrafialová a viditelná oblast záření
ΔH	Entalpie
λ	Vlnová délka
ν	Vlnočet

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ