

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE**

# **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Pavλίna Brettlová

Praha 2007

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra genetiky a mikrobiologie



# Strukturální a energetická charakteristika hydrofobního jádra hypertermofilních proteinů

Bakalářská práce

Pavλίna Brettlová

Školitel :

RNDr. Jiří Vondrášek, Csc.

Akademie věd české republiky

Ústav organické chemie a biochemie

Centrum biomolekul a komplexních molekulových systémů

Praha 2007

Charles University in Prague  
Faculty of Science  
Department of Genetics and Microbiology



# Structural and energetical characterization of hydrophobic core of hypertermophilic proteins

Bachelor thesis

Pavλίna Brettlová

Advisor:

RNDr. Jiří Vondrášek, Csc.

Academy of sciences of the Czech Republic  
Institute of Organic Chemistry and Biochemistry  
Center for Biomolecules and Complex Molecular Systems  
Prague 2007

Prohláшуji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a použila jsem jen prameny, které cituji a uvádím v seznamu literatury.

Pavλίna Brettlová

## **Poděkování:**

*Ráda bych poděkovala svému školiteli Dr. J. Vondráškovi čas, námahu, inspiraci k přemýšlení a trpělivost, kterou mi věnoval při vedení této bakalářské práce. Tato práce by nevznikla bez laskavé podpory prof. P. Hobzy a vstřícné pomoci ostatních členů Centra biomolekul a komplexních molekulových systémů.*

## Abstrakt

Hypertermofilní protein pocházejí z hypertermofilních organismů. Většina těchto organismů náleží do domény Archaea. Známe jen dva hypertermofilní bakteriální rody. Hypertermofilní organismy jsou adaptovány na život při teplotách nad 80°C. Mechanismy stabilisace proteinů při těchto teplotách jsou intenzivně studovány. Jednak s úmyslem cíleně ovlivnit stabilitu méně stabilních proteinů a jednak v souvislosti osvětlováním základních principů sbalování proteinů. Doposud není zodpovězena otázka jaká je fyzikálně-chemická příčina extrémní teplotní stability proteinů pocházejících z hypertermofilních organismů. Výpočetní studie na modelovém systému hypertermostabilního proteinu rubredoxinu ukazují, že existuje přímá korelace mezi zvýšenou teplotní stabilitou proteinu a energetickým obsahem stabilizace nesené interakcí aminokyselin v hydrofobním jádře. Tato strategie využívá jako měřítko termostability velikost interakční energie mezi aminokyselina hydrofobního jádra a může být v jisté aproximaci považována za charakteristickou vlastnost proteinu.

Klíčová slova: Gibbsova volná energie, hydrofobní jádro, hypertermofilní protein, interakční energie, Londonovy disperzní síly, rubredoxin, termodynamická stabilita, kinetická stabilita.

## **Abstract**

Hyperthermophilic proteins are those expressed in hyperthermophilic organisms. Most of hyperthermophilic organisms belong to the domain Archaea. Only two bacterial genera are known to be hyperthermophilic. Hyperthermophilic organisms are adapted to live in environments, where the temperature exceeds 80°C. Mechanisms of protein thermal stabilization are intensively studied. One proposed outcome is the ability to increase stability of less stable (e.g. mesophile) proteins. Second possible outcome is elucidation of the principles of protein folding. There has not yet been demonstrated physical reason for thermostability of hyperthermophilic proteins. However, computational studies done on the model of hyperthermophilic protein rubredoxin prove that there exist strong correlation between higher protein thermostability and amount of energetical stabilization provided by amino acids of the hydrophobic core. The measure of thermostability is amount of the interaction energy of the amino acids of the hydrophobic core. It can be considered as protein specific.

Key words:

Gibbs free energy, hydrophobic core, hyperthermophilic protein, interaction energy, London dispersion forces, rubredoxin, thermodynamic stability, kinetic stability.

# Obsah

Seznam tabulek	10
Seznam obrázků	10
Úvod	11
1. Proteiny	12
1.1. Úloha proteinů v buňce	13
1.2. Struktura proteinu	14
1.3. Rozdělení proteinů na základě architektury	14
1.4. Vliv fyzikálních a chemických vlastností prostředí na strukturu proteinu	15
2. Stabilita proteinů	16
3. Síly a interakce stabilizující proteiny	19
3.1. Kovalentní vazby	19
3.1.1. Disulfidická vazba	20
3.1.2. Koordinačně kovalentní vazba	20
3.2. Nekovalentní vazby	20
3.2.1. Elektrostatické interakce	20
3.2.2. Londonovy disperzní síly	24
3.2.3. Interakce s prostředím	24
4. Termostabilita a její význam	26
4.1. Příklady termostabilních proteinů a jejich uplatnění	27
5. Fyzikálně chemické příčiny hypertermostability	29
5.1. Kovalentní interakce	29



5.2. Nekovalentní interakce	29
5.2.1. Iontové vazby	29
5.2.2. Interakce dipól – dipól	30
5.2.3. Vodíkové můstky	31
5.2.4. Aromatická interakce	32
5.2.5. Hydrofobní interakce	32
5.3. Další strategie adaptace na vysoké teploty	32
5.3.1. Uspořádání sekundární struktury	32
5.3.2. Vnější faktory	33
5.3.3. Stabilizace substrátem	34
5.3.4. Vazba kovu	34
5.4. Shrnutí	34
6. Rubredoxin jako modelový systém hypertermostabilního proteinu	35
6.1. Strukturální charakteristika hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu	36
6.2. Strukturální a aenergetická charakteristika hydrofobního jádra mesofilního rubredoxinu	36
6.3. Energetická charakteristika hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu a jeho mutantů	37
Závěr	39
Použitá literatura	40

## Seznam tabulek

1. Příklady energií kovalentních vazeb	21
2. Závislost dielektrické konstanty vody na teplotě	22
3. Vazebná energie různých typů vodíkových můstků	24

## Seznam obrázků

1. Peptidová vazba a její parametry	13
2. Přehled typů struktur proteinu	14
3. Fylogenetický strom založený na sekvenci 16S rDNA	27
4. Model rubredoxinu z <i>Desulfovibrio vulgaris</i>	36
5. Schéma hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu a klastrů okolo F29 a F48	37

## Seznam grafů

1. Závislost tepelné kapacity rubredoxinů na teplotě
--

# Úvod

První hypertermofilní proteiny objevil počátkem 80. let 20. století Karl Stetter při studiu vulkanických vývěřů v mělkých mořích (ADAMS et al., 1996). Roku 1972 byly známy 2 hypertermofilní organismy. Teprve s nalezením nových kultivačních technik se podařilo charakterizovat další organismy. Do roku 1999 bylo známo přes 70 druhů hypertermofilních organismů. Z analýz 16S RNA a lipidů z prostředí termálních pramenů vyplývá, že tento počet je pouhým zlomkem skutečné diversity hypertermofilních a termofilních organismů (ZEIKUS et al., 2001). Samotný objev hypertermofilních organismů představoval změnu pohledu na optimální podmínky života na Zemi. Změnil se i náhled fylogenezi všech organismů. Bylo zavedeno taxonomické označení doména. Namísto klasického uspořádání organismů do dvou nadřísí Prokaryota a Eukaryota, je nyní uznávaným systémem tří domén : Archaea, Eubakteria a Eukaryota.

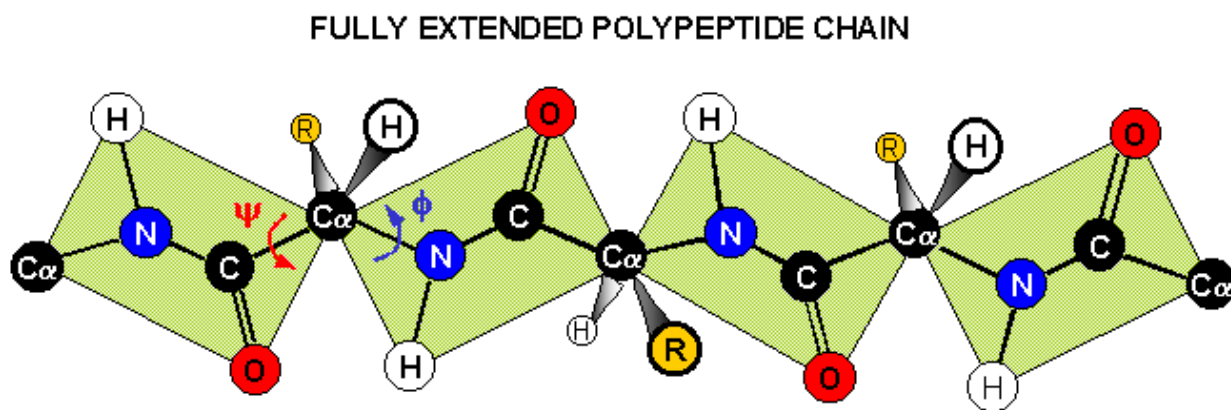
Množství informací o hypertermofilní organismech roste exponenciálně. Zvyšuje se počet známých genomových sekvencí, 3D struktur (REES, 2001) a současně s tím úroveň poznatků o funkci hypertermofilních proteinů. V databázi osekvenovaných genomů (1) je nyní 353 dokončených a 17 nedokončených bakteriálních genomů a 28 dokončených archeálních genomů.

V dnešní době je nejdůležitější aplikací hypertermofilních proteinů využití Taq polymerázy v PCR. Řada dalších hypertermofilních proteinů má však velký potenciál využití zejména v biotechnologiích.

Velké usilí je věnováno studiu příčin stability proteinů za vysokých teplot. Jednak s úmyslem cíleně ovlivnit stabilitu méně stabilních proteinů a jednak v souvislosti osvětlováním základních principů sbalování proteinů. Není doposud zodpovězena otázka, jaká je fyzikální příčina extrémní teplotní stability proteinů z těchto organismů. Tato práce je shrnutím fyzikálně-chemického pohledu na termostabilitu proteinů při vysokých teplotách a vytyčením strategie k objasnění tohoto fenoménu.

# 1. Proteiny

Pod pojmem protein rozumíme nevětvený polymer aminokyselin. Aminokyseliny jsou kovalentně propojené peptidovou vazbou, která vzniká reakcí aminové skupiny jedné aminokyseliny a karboxylové skupiny druhé aminokyseliny. Hlavní řetězec proteinu se skládá z atomů, které tvoří peptidickou vazbu (H,N,C,O) a atomu  $C_{\alpha}$ . Postranní řetězec se váže na atom  $C_{\alpha}$ . Typ a uspořádání atomů v postranním řetězci se liší u každého typu aminokyseliny. Atomy postranního řetězce se s výjimkou prolinu neúčastní peptidové vazby.



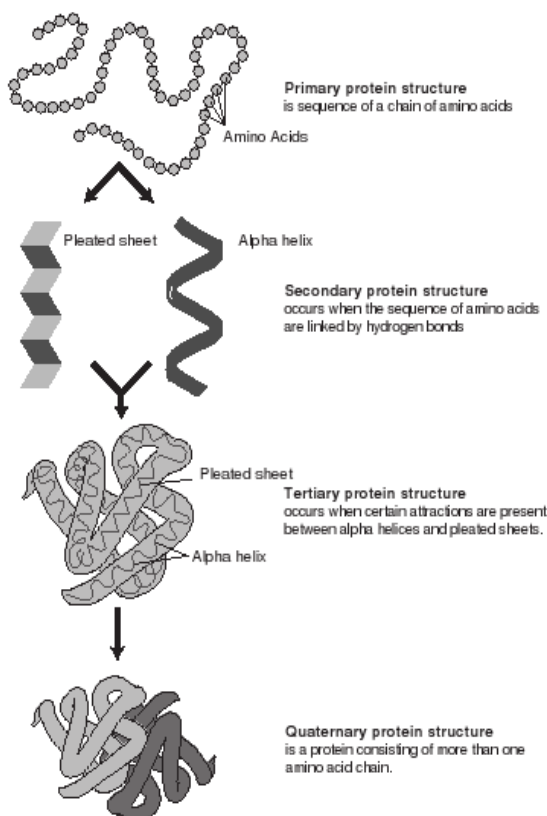
Obr.1 Peptidová vazba a její parametry (JAKUBOWSKI, 2006)

Peptidová vazba má povahu amidové vazby. Pro strukturu proteinů má zcela zásadní význam, že atomy svázané peptidovou vazbou se nemohou nacházet vůči sobě v libovolných úhlech. Tato prostorová bariéra omezuje konformační prostor proteinu významnou měrou. Proteiny se mohou skládat z jednoho či více polypeptidových řetězců. (GARETT, 2005).

Proteiny vznikají v prokaryotické a eukaryotické buňce translací mRNA na ribosomech. Pro tuto biosyntézu je využívána základní sada 20 L-aminokyselin. Podle typu postranního řetězce lze aminokyseliny dělit na hydrofobní, polární, bazické a kyselé.

DNA teoreticky kóduje  $4^3$  tj. 64 různých aminokyselin, ale až na tryptofan a methionin jsou všechny aminokyseliny kódovány 2 až 6 trojpísmennými kombinacemi ATCG. Genetický kód je tudíž degenerovaný. Počet kombinací kódujících jednu aminokyselinu určitým způsobem koreluje s procentuálním zastoupením dané aminokyseliny v proteinech. Nejrozšířenějším typem aminokyseliny je isoleucin (11,5%). Je kódován celkem 6 různými kombinacemi tripletů. Nejméně je zastoupen tryptofan (1,5%) a methionin (1,8%). Všechny aminokyseliny vyjma glycinu jsou chirální.

V proteinech rozlišujeme čtyři strukturní úrovně : primární, sekundární, terciární a kvarterní. Primární struktura je dána sledem aminokyselin v peptidové řetězci. Na úrovni sekundární struktury sledujeme interakci NH a CO skupin hlavního řetězce. Existují dva typy sekundární struktury:  $\alpha$  šroubovice a  $\beta$  skládaný list. Vlastnosti postranních řetězců určují tvar terciární struktury během balení proteinu do nativní konformace i v rovnovážném stavu. Jak bylo uvedeno výše, proteiny mohou mít i podobu několika asociovaných nezávislých podjednotek. Jejich uspořádání se označuje jako kvarterní struktura.



Obr.2: Přehled typů struktur proteinu (zdroj: <http://www.genome.gov/Education/>).

## 1.1. Úloha proteinů v buňce

Proteiny se podílejí na všech klíčových procesech v buňce a svou úlohu hrají také jako strukturální elementy. Proteiny fungující jako katalyzátory chemických reakcí nazýváme enzymy. Umožňují průběh reakcí, které by při fyziologických podmínkách pH, teploty a tlaku probíhali jen velmi pomalu nebo vůbec. Enzymy urychlují dosažení rovnováhy příslušné reakce a to snížením aktivační energie. Enzymy jsou velmi citlivě regulovatelné. Regulace se uskutečňuje pomocí konformačních změn

struktury proteinu, kterou navozuje například vazba ligandu nebo změna pH. Většina regulací je realizována nekovalentními vazbami mezi daným činidlem a proteinem.

Strukturální proteiny jsou součástí cytoskeletu (například tubulin či aktin) nebo se v eukaryotních organismech kromě jiného podílí na stavbě mezibuněčných prostor (například kolagen, elastin). Proteiny mají i signální funkci. Jsou umístěné v membráně na povrchu buňky a fungují jako receptory informací mezi extracelulárním a intracelulárním prostředím.

## **1.2 Struktura proteinu**

Podle Anfinsena (ANFINSEN, 1973) nese primární sekvence dostatečnou informaci pro to, aby protein za daných podmínek získal procesem balení svou nativní konformaci. Nativní konformace je z termodynamického hlediska nejstabilnější ze všech možných uspořádání. Podle Anfinsenova postulátu je konečný tvar výslednicí všech interakcí, které v proteinu mohou nastat a spektrum těchto interakcí nastavuje právě primární sekvence.

Protein se chová velmi dynamicky a citlivě reaguje na změnu vnějších podmínek. Tedy na změnu pH, iontové síly roztoku, koncentraci chaotropních činidel nebo allosterických aktivátorů či inhibitorů. Jako příklad závislosti struktury a funkce lze uvést tvar aktivního centra, který je klíčový pro substrátovou specifitu enzymu.

## **1.3 Rozdělení proteinů na základě architektury**

Z hlediska obecné stavby lze rozlišit tři kategorie proteinů: vláknité (neboli fibrilární), membránové a globulární. Liší se nejen svým tvarem, ale také rozpustností ve vodě.

Fibrilární proteiny mají většinou lineární tvar. Jsou málo rozpustné ve vodě nebo v roztocích s nízkými koncentracemi solí. Tyto proteiny jsou součástí struktur, které mají ochrannou, podpůrnou nebo pohybovou funkci (například vlákna mezibuněčné hmoty, svalová vlákna).

Membránové proteiny jsou svou strukturou přizpůsobena ukotvení v membráně, a proto postranní řetězce hydrofobních aminokyselin směřují zpravidla na povrch proteinu. Proto nejsou ve vodě rozpustné.

Globulární proteiny mají přibližně sférický tvar. Vnitřní část tvoří kompaktně sbalené hydrofobní aminokyseliny. Tato část proteinu se nazývá hydrofobní jádro. Povrchové aminokyseliny interagující s

vnějším prostředím jsou polární, tedy hydrofilní. Většina vnitrobuněčných enzymů je globulárních. Mezi globulární proteiny patří enzymy (například pepsin), signální molekuly (chemokiny) a transportní bílkoviny (například albumin či hemoglobin).

Existují také proteiny, které obsahují jen velmi málo strukturovaných úseků. Mohou být přirozeně nestrukturované (například enzym tyrosin hydroxyláza). Strukturu získávají ve chvíli, kdy interagují s jiným proteinem nebo ligandem. Většina těchto proteinů má signální funkci (GARETT, 2005).

#### **1.4 Vliv fyzikálních a chemických vlastností prostředí na strukturu proteinu**

Organismy žijící například v hlubokomořských geotermálních pramenech nebo solných jezerech se musí vyrovnat s extrémními hodnotami fyzikálních a chemických parametrů prostředí. Mezi ně patří tlak, teplota, pH a koncentrace solí a těžkých kovů. Poslední tři jmenované faktory se zpravidla neprojevují změnou vnitrobuněčných podmínek, protože buňky mají mechanismy, jak udržet stále vnitřní pH a koncentraci solí. Těžké kovy jsou v buňce neutralizovány a transportovány ven. Buňka má ale uvnitř zpravidla stejnou teplotu a stejný tlak jako okolní prostředí, a proto se těmto faktorům musí přizpůsobit (JAENICKE, 2003).

Podle teploty, na kterou jsou organismy a jejich proteiny adaptovány, rozeznáváme tyto kategorie: psychofilní, mesofilní, termofilní a hypertermofilní. Označení psychofilní protein znamená, že organismus, ze kterého pochází, je adaptován na teploty do 20°C. Mesofilní proteiny pocházejí z organismů, které žijí v prostředí o teplotě do 60°C. Termofilní organismy tolerují teploty do 80°C a hypertermofilní organismy jsou plně životaschopné i nad touto hranicí. Proteiny přizpůsobené vyšší teplotě mají vyšší teplotu tání, tedy bod, při kterém protein denaturuje. Uvedené teplotní hranice kategorií jsou přibližné a literatura zde není jednotná (FELLER, 2003). Jako hranice odlišující termofilní a hypertermofilní organismy se někdy uvádí jako 90°C. (ADAMS et al., 1996)

## 2. Stabilita proteinů

Stabilitou se rozumí schopnost proteinu udržovat si svou stabilní, nativní strukturu v určitém rozsahu fyzikálních podmínek prostředí. Se strukturou je totiž většinou spojena schopnost vykonávat určitou funkci, pro kterou protein v buňce vznikl. Míra stability se posuzuje z termodynamického a kinetického hlediska.

Termodynamická stabilita je určena množstvím Gibbsovy volné energie uvolněné při jednokrokovém přechodu proteinu z nativního stavu ( $N \leftrightarrow U$ ), kdy je sbalený (angl. folded), do denaturovaného stavu, kdy je rozbalený (angl. unfolded).



$$\Delta G_{stab} = G_{unfolded} - G_{native} \quad (2.2)$$

Gibbsova volná energie stabilizace proteinu je definována jako :

$$\Delta G_{stab} = \Delta H_{stab} - T \Delta S_{stab} , \quad (2.3)$$

kde  $\Delta S_{stab}$  a  $\Delta H_{stab}$  představují rozdíl mezi entropií a entalpií denaturovaného a nativního stavu. Protein tedy může být stabilizován entalpickou, entropickou nebo oběma složkami Gibbsovy energie. Hodnota  $\Delta G_{stab}$  se experimentálně stanovuje opačným způsobem: protein je teplotně nebo chemicky denaturován, tak aby nedocházelo k ireversibilním reakcím nebo shlukování proteinů. Změna entalpie je zjištěna přímo kalorimetricky jako  $H_{cal}$  nebo nepřímo z van't Hoffovy reakční isobary, která je v diferenciální tvaru definována jako:

$$\Delta H_r^\ominus = RT^2 \frac{d \ln K}{dT} , \quad (2.4)$$

kde  $\Delta H_r^\ominus$  je standardní reakční entalpie,  $R$  univerzální plynová konstanta,  $T$  termodynamická teplota a  $K$  rovnovážná konstanta odpovídající jednokrokové zvrtné reakci (11).

Pokud odpovídá naměřená hodnota  $\Delta H_{cal}$  vypočítané hodnotě  $\Delta H_r^\ominus$ , pak se během denaturace proteinu nevyskytují žádné intermediáty. V opačném případě je poměr  $\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_r^\ominus} > 1$  . (PRIVALOV, 1979; JAENICKE 1991). Za předpokladu platnosti (1.1) a fyziologických podmínek (pH 7, 101 325 kPa, 298 K) platí následující rovnost:

$$\Delta G_{stab} = \Delta_r G^\ominus = -RT \ln K \quad (2.5)$$



Hodnota rovnovážné konstanty závisí na denaturačních podmínkách. V některých případech velmi stabilních proteinů však nestačí jeden denaturační faktor (např. teplota) a teprve jejich kombinace vede k denuraci (např. teplota a nízké pH nebo vysoká koncentrace chaotropních činidel močoviny či guanidinium chloridu). Hodnota  $\Delta G_{stab}$  zjištěná za nefysiologických podmínek musí být převedena extrapolací na  $\Delta G_r^\theta$  při nulové koncentraci denaturačního činidla. Jen hodnoty  $\Delta G_r^\theta$  různých proteinů můžeme srovnávat. Tato hodnota je ale často experimentálně nedostupná, protože proces denurace není plně reversibilní. Pro takové případy se stabilita definuje jiným způsobem. Jinou možností, jak alespoň kvalitativně odhadnout stabilitu, je hodnota  $T_{1/2}$ , která udává teplotu, při které je právě polovina molekul proteinu denurována. Obdobně se definuje i  $c_{1/2,močovina}$  nebo  $c_{1/2,GdmCl}$ . Doposud je to jediná možnost, jak porovnávat stabilitu proteinů složených z několika podjednotek nebo domén.

Kinetická stabilita se posuzuje na základě tvaru reakční koordináty denurace tj. na velikosti aktivační energie  $E_A$  a podle rychlosti, jakou denurace probíhá. Definice kinetické stability souvisí s termodynamickou definicí, vztahem pro rovnovážnou konstantu:

$$K = \frac{k_U}{k_F}, \quad (2.6)$$

kde  $k_U$  je rychlostní konstanta denurace („*unfolding*“) a  $k_F$  je rychlostní konstanta reakce opačné tj. balení proteinu („*folding*“). Zvýšení  $\Delta G_{stab}$  tedy znamená, že se snížila rychlost denurace nebo zvýšila rychlost balení. Rychlostní konstanta souvisí s aktivační energií Arrheniovým vztahem:

$$k = A e^{-\frac{E_A}{RT}}, \quad (2.7)$$

kde  $A$  je předexponenciální faktor charakteristický pro danou reakci a  $E_A$  je aktivační energie. Zvýšením aktivační energie denaturační reakce tedy dojde k jejímu zpomalení, zatímco rychlost balení zůstává stejná (JAENICKE, 2001). Kinetickou stabilitu proteinu při dané teplotě vyjadřuje také poločas denurace  $t_{1/2}$  (ZEIKUS et al., 2001).

Za nativní konformaci je považována ta, která je za fyziologických podmínek nejstabilnější. Z termodynamických měření vyplývá, že  $\Delta G_{stab}$  připadající na 1 aminokyselinu odpovídá přibližně 0,4 kJ/mol. Pro protein o 100 aminokyselinách je tedy  $\Delta G_{stab}$  rovna přibližně 40 kJ/mol. Přitom energie nutná pro přerušení vodíkové vazby je přibližně 20 kJ/mol. Energie všech nekovalentních vazeb, které se v proteinu vyskytuje dosahuje řádově 1000 kJ/mol (VOET, 2004).

Je tedy vidět, že struktura proteinu je výsledkem velmi vratké rovnováhy mezi přitažlivými a

odpudivými silami a změna jakékoliv vnitřní komponenty nebo vnějšího prostředí má zásadní vliv. Dalším důležitým závěrem je, že stabilitu proteinu má tedy smysl uvažovat jen v kontextu daných vnějších podmínek, tj. teploty, iontové síly a pH.

### 3. Síly a interakce stabilizující proteiny

Síly a interakce, které působí mezi jednotlivými stavebními prvky proteinu, rozdělujeme do dvou hlavních kategorií: kovalentní a nekovalentní. Specifickou interakcí spadající mezi nekovalentní vazby je interakce proteinu s prostředím. Na vzniku sekundárních, terciárních a kvarterních struktur proteinu se podílejí následující síly a interakce:

#### 3.1. Kovalentní vazby

##### 3.1.1. Disulfidická vazba

##### 3.1.2. Koordinačně kovalentní vazba

#### 3.2. Nekovalentní vazby

##### 3.2.1 Elektrostatické interakce

- Iontové můstky
- Permanentní dipól – permanentní dipól
- Permanentní dipól – indukovaný dipól
- Vodíkové můstky

##### 3.2.2. Londonovy disperzní síly

##### 3.2.3 Interakce s prostředím

- Hydrofobní interakce

### 3.1. Kovalentní vazby

Kovalentní vazba vzniká překryvem elektronových oblaků. Výsledná molekula má jiné chemické, fyzikální vlastnosti než výchozí částice. Ačkoliv neexistuje ostrý přechod mezi vazebnými a nevazebnými interakcemi, byla stanovena arbitrární hodnota vazebné energie 60 kJ/mol a vazebné délky 200 pm. Silnější a kratší vazby jsou považovány za kovalentní, slabší a delší za nekovalentní. (HOBZA, 1988). Tab.1 uvádí příklady kovalentních vazeb, vyskytujících se proteinech a jejich vazebné energie.

Vazba mezi atomy	Vazebná energie v kJ/mol
C = O	737
O - H	463
C - H	413
N - H	391
C - C	346

Tab.1 Příklady energií kovalentních vazeb (FRIEDEL, 2006).

### 3.1.1. Disulfidická vazba

Vzniká oxidací dvou vhodně orientovaných postranních řetězců cysteinu, kdy z dvou thiolových skupin vzniká disulfid označovaný také jako cystin. Tato reakce probíhá samovolně v oxidativním prostředí, ale v organismech je regulována enzymaticky. Disulfidická vazba hraje klíčovou roli při stabilisaci terciární struktury proteinů. Spojuje totiž sekvenčně odlehlé úseky proteinu. Klasickým příkladem úlohy disulfidické vazby je peptidový hormon insulin. Disulfidická vazba stabilisuje protein jak entalpicky tak entropicky. Denaturovaný protein obsahující disulfidickou vazbu má nižší entropii než protein bez disulfidické vazby. Proto má bílkovina větší tendenci zůstat ve sbaleném stavu. Pokles entropie roste logaritmičticky s narůstající délkou řetězce, který odděluje příslušné dva cysteiny (ZEIKUS et al., 2001).

### 3.1.2 Koordinačně-kovalentní vazba

Vzniká mezi donorem a akceptorem volného elektronového páru. V proteinech má význam při interakci kovu s nabitými nebo polárními aminokyselinami. Vyskytuje se zejména v enzimech (oxidoreduktázách). Příkladem jsou FeS proteiny, kde je atom železa koordinován cysteinovými residui.

## 3.2 Nekovalentní vazby

Nekovalentní vazby jsou charakterizovány tím, že v nich nedochází k překryvu elektronových oblaků interagujících částic. Zdrojem přitažlivé síly mezi atomy či molekulami jsou jejich elektromagnetické a kvantové vlastnosti.

### 3.2.1. Elektrostatické interakce

Pokud jsou interagující systémy (atomy, molekuly) nabité, mají formu kationtu nebo aniontu.

Pokud jsou elektricky neutrální, obsahují stejný počet protonů a elektronů. Elektricky neutrální systémy však mají charakter elektrických dipólů, kvadrupólů až multipólů, a proto mezi nimi působí elektrostatické interakce.

### Iontové vazby

Vznikají vazbou mezi silně elektropozitivním atomem (s nízkým ionizačním potenciálem) a silně elektronegativním atomem (s vysokou elektronovou afinitou). Takové atomy mají kladný respektive záporný náboj, a proto dominantní složkou jejich interakce jsou coulombovské síly. Iontové vazby v proteinech vznikají interakcí postranních řetězců záporně nabitých aminokyselin typu kyselina asparagová, kyselina glutamová a kladně nabitých aminokyselin jako jsou lysin, arginin apod.

Coulombův zákon říká, že dvě sféricky symetrické částice v homogenním poli o určité dielektrické konstantě, které jsou od sebe vzdálené  $r$ , se přitahují či odpuzují silou danou vztahem :

$$U = k \frac{-q_1 q_2}{Dr} + be^{-r/a} \quad (3.1)$$

kde  $k = 4\pi\epsilon_0$ ,  $Q$  je velikost náboje,  $D$  je dielektrická konstanta prostředí,  $a$  a  $b$  konstanty.

Druhý člen výrazu popisuje odpuzování, ke kterému dochází po přiblížení částic na takovou mez, že se překrývají jejich elektronové obaly.

Dielektrická konstanta vakua je 1, protože v něm nejsou přítomny částice, které by náboje odstiňovaly. Pro prostředí odpovídající proteinu se pohybuje mezi 3 až 5. Pro vodné prostředí je však  $D \sim 80$ . Se zvyšující se teplotou se dielektrická konstanta snižuje viz Tab.2.

teplota	dielektrická konstanta
-25°C	102
+25°C	79
+100°C	65

Tab.2.: Závislost dielektrické konstanty vody na teplotě

Coulombův zákon jinými slovy určuje množství práce nutné k rozdělení dvou iontů. Poskytuje však pouze odhad této práce, neboť prostředí proteinu není stejnorodé a navíc se proteiny vyskytují v poli okolních iontů jako například  $\text{Na}^+$  či  $\text{Cl}^-$ . Energie iontové vazby *in vacuo* je 100 kJ/mol. (VOET, 2005, MOORE 1979, ZEIKUS et al., 2001).

## Dipólové interakce

Dipól je dle definice dvojice stejně velkých nábojů  $q$  opačného znaménka, mezi nimiž je vzdálenost  $r$ . Dipól je charakterizován dipólovým momentem  $\mu$ . Je to vektor o velikosti  $qr$ , jehož směr je dán spojnicí obou nábojů a konvencí směřuje od kladného k zápornému náboji. Za nerovnoměrným rozložením náboje stojí rozdílná elektronegativita spojených částic. Vazba mezi nimi představuje elektrický dipól. Všechny dipólové momenty molekuly se vektorově sčítají ve výsledný multipólový moment molekuly. Síly působící mezi elektrickými multipóly se označují jako elektrostatické interakce ( $E^{ES}$ ). Hodnota celkové elektrostatické interakční energie je dána součtem interakcí všech multipólů z polynomického rozvoje elektrostatické interakce:

$$E^{ES} = \frac{q_R q_T}{r} + \frac{q_R \mu_T}{r^2} + \dots + \frac{\mu_R \mu_T}{r^3} + \dots + \frac{Q_R Q_T}{r^5} + \dots, \quad (3.2)$$

kde  $q$  je náboj,  $\mu$  dipólový a  $Q$  kvadrupólový moment systémů R a T.  $\mu$  představuje vektor a  $Q$  tensor. Ze vztahu (2.3) vyplývá, že příspěvek multipólů vyššího řádu velmi rychle ubývá se vzrůstající vzdáleností. Proto je možné výsledný multipólový moment molekuly obstojně popsat vztahem pro interakci elektrických dipólů:

$$E^{ES} = \frac{\mu_R \mu_T}{r^3} \quad (3.3)$$

Energie této vazby se pohybuje mezi 1,2 a 12 kJ/mol.

Přiblíží-li se atomy na určitou vzdálenost začnou se velmi silně odpuzovat. Pro případ dvou permanentních dipólů se celková energie  $E^C$  vyjadřuje Lennard Jonesovým potenciálem

$$E^C = -4 * E^M * \left[ (r_0/r)^{12} - (r_0/r)^6 \right] \quad (3.4)$$

$E^M$  je maximální odpudivá energie,  $r$  je vzdálenost mezi molekulami tvořícími dipóly.  $r_0$  je tzv. van der Waalsova vzdálenost, kde jsou přitažlivé a odpudivé síly v rovnováze.

## Permanentní multipól – indukovaný multipól

Permanentní multipól vyvolává ve svém okolí elektrické pole, a proto v okolních molekulách vzniká také elektrický multipól. Míra toho jak snadno v dané molekule vzniká multipól udává polarizabilita. Síla působící mezi původním a nově vzniklým multipólem je vždy přitažlivá, ale s rostoucí vzdáleností ubývá rychleji (se šestou mocninou) než síla působící mezi nábojem a

indukovaným multipólem. Indukční energie ( $E^I$ ) je definována vztahem :

$$E^I = -\frac{1}{2} \alpha_R \left[ \frac{q_T^2}{r^4} + \mu_T^2 \frac{(3\cos^2 \Theta_T + 1)}{r^6} + \dots \right] - \frac{1}{2} \alpha_T \left[ \frac{q_R^2}{r^4} + \mu_R^2 \frac{(3\cos^2 \Theta_R + 1)}{r^6} + \dots \right], \quad (3.5)$$

kde  $\alpha$  značí polarizabilitu,  $q$  náboj, dipólový moment dvou objektů  $R$  a  $T$ . Úhel mezi spojnicí těžišť a osou jednoho z objektů je  $\Theta$ . Energie této vazby je menší než u interakce dvou permanentních dipólů. Dosahuje jen přibližně 0,8 kJ/mol.

### Vodíkové můstky

Jako vodíkové můstky označujeme vazby, kdy je donor vodíkového atomu vzdálen od akceptoru vodíkového atomu více než 2,7 Å a méně než 3,8 Å. Délka vodíkového můstku je přibližně 1 Å. Základem této interakce jsou elektrostatické síly, ale uvádí se, že vodíkové můstky mají z 10% kovalentní charakter. Donor má vlastnosti velmi slabé kyseliny a akceptor má volný elektronový pár. V biologických systémech se jako donor vyskytuje O, N, C $_{\alpha}$  (interakce atomů peptidové vazby v alfa šroubovici a beta skládaném listu), méně pak S. Jako akceptor pak opět atomy O, N a  $\pi$  elektrony aromatických kruhů. Meze, ve kterých se pohybuje interakční energie vodíkových vazeb uvádí Tab.3. Je to řádově méně než u kovalentních vazeb,

Typ vodíkové vazby	Vazebná energie
D – H ... A	-12 až -40 kJ/mol
D – H ... $\pi$ elektrony	- 8 až -16 kJ/mol
C – H ... A	- 8 až -16 kJ/mol
C – H ... $\pi$ elektrony	- 2 až - 4 kJ/mol

Tab.3 Vazebná energie různých typů vodíkových můstků

Další podmínkou je, že úhel mezi akceptorem a donorem musí být menší než 90°. Právý úhel se vyskytuje ve vazbách s aromatickými molekulami. Vodíkové můstky jsou povětšinou lineární, ale existují výjimky jako například v paralelním  $\beta$  skládaném listu. V proteinech se vyskytují sítě, ve kterých je každý donor a akceptor součástí dvou vazeb (ZEIKUS et al., 2001; VOET, 2004).

### 3.2.2. Londonovy disperzní síly

Výše uvedené interakce (coulombické síly, elektrostatické síly a indukce) nedokáží zdůvodnit a popsat přitažlivou sílu mezi dvěma alifatickými či aromatickými sloučeninami. Jsou to částice nenabitě a nepolární. Teorii, která vysvětluje přitažlivé síly mezi těmito částicemi, vypracoval v roce 1930 Fritz London na základě kvantové mechaniky.

Na rychlý pohyb nukleonů v jádře reagují i elektrony v obale a jejich rychlou fluktuací vznikají na krátký okamžik multipóly a v jejich okolí indukované multipóly. Proto jsou i tyto síly vždy přitažlivé, jak vyplývá z jejich definice disperzní energie ( $E^D$ ):

$$E^D = - \frac{C_6}{r^6} - \frac{C_8}{r^8} - \frac{C_{10}}{r^{10}} - \dots , \quad (3.6)$$

kde  $C$  je Londonova konstanta zahrnující polarizabilitu molekul, permitivitu vakua, charakteristickou frekvenci oscilace nábojů a Planckovu konstantu. Disperzní energie se označuje také jako korelační energie elektronů. Korelace elektronů znamená, že elektronové oblaky se v určité vzájemné vzdálenosti přizpůsobují. Disperzní síly mají malou energii a působí na menší vzdálenost než coulombické interakce a indukce, ale přesto jsou důležitou složkou celkové interakční energie makromolekul (například molekul DNA nebo globulárních proteinů). Energie této vazby je 0,1 kJ/mol (2).

### 3.2.3. Interakce s prostředím

Původ některých stabilizujících interakcí je nutné hledat ve vlastnostech prostředí, ve kterém je makromolekula je rozpuštěna. V buňce je hlavním rozpouštědlem voda. Nepolární a nenabitě částice, které s ní nedokáží vytvářet vodíkové můstky se mají tendenci shlukovat. Hnací silou takového procesu je kladná změna entropie molekul vody. Molekuly vody jsou totiž okolo hydrofobní látky uspořádány více než v čisté vodě. Změna entalpie během shlukování je buď kladná, nulová nebo jen mírně záporná.

#### 3.4.1 Hydrofobní interakce

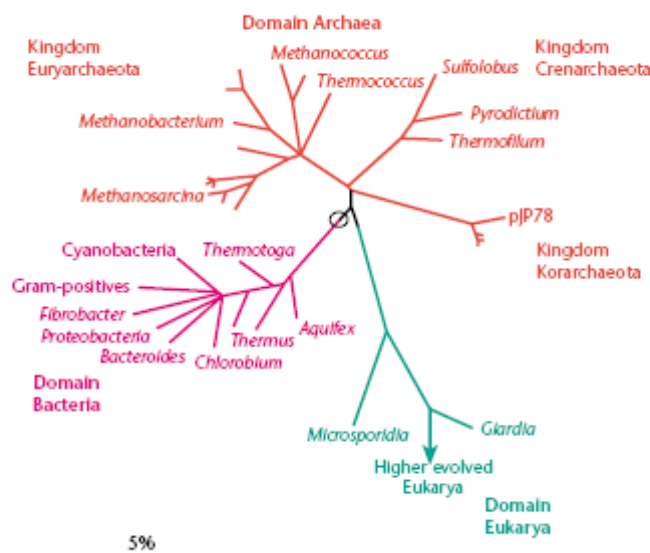
Velikost hydrofobní interakce ( $\Delta G^\circ$ ) se při 298 K mezi dvěma postranními řetězci proteinu pohybuje mezi -0,8 to -6,0 kJ/mol. Přičemž entalpická složka ( $\Delta H^\circ$ ) odpovídá 1,2 až 7,5 kJ/mol, entropická ( $\Delta S^\circ$ ) 7,0 až 45 kJ/molK. Velikost této interakce ubývá s  $r^{-3}$ . hydrofobní interakce mají také repulsivní složku. Jsou-li okolo dvou nepolárních molekul uspořádány molekuly solventu,



indukují v nich elektrický dipól, který je orientován tak, že se nepolární molekuly odpuzují (HOBZA, 1988). Uvádí se, že průměrný stabilizující příspěvek jedné methylové skupiny internalizované v proteinu je  $5,4 \text{ kJ/mol} \pm 1,3 \text{ kJ/mol}$ . (ZEIKUS et al., 2001)

## 4. Termostabilita a její význam

V souvislosti s konstrukcí fylogenetického systému na základě 16 rDNA, se ukázalo, že organismy na bázi tohoto stromu jsou termofilní (viz. Obr.3)



Obr 3: Fylogenetický strom založený na sekvenci 16S rDNA (STACKEBRANDT, 2001).

Vznik života klademe do období před přibližně 3,85 mld let do prostředí podobného dnešním geotermálním pramenům, podmořských vývěřům. První organismy byly tedy adaptovány na teploty, při kterých většina eukaryot nedokáže přežít, tím méně se rozmnožovat. Horní hranice přežití organismu je teplota denaturace proteinů. Spodní hranicí je teplota, kdy cytoplasmatická membrána přestává být fluidní, zastavují se membránové transportní děje (JAENICKE, 1990).

Organismy žijící při teplotách blížících se bodu varu se musí vyrovnat s nízkou rozpustností plynů a tedy nedostatkem kyslíku i oxidu uhličitého. Tyto teploty jsou při tlaku 1 atm vysoko nad hranicí denaturační teploty DNA, proteinů. Chlorofyl se rozkládá při 75°C a fotosyntéza tak již není možná a s tím také souvisí metabolické strategie, které organismy v takových to prostředích využívají.

Všechny známé organismy tolerující nejvyšší teploty patří do skupiny Prokaryota. Většina pak do domény Archaea. Jsou známy jen dva bakteriální rody *Thermotoga* a *Aquifex* (ADAMS et al., 1996). V nejvyšších teplotách žijí zástupci říše Crenarcheota a Korarcheota, domény Archaea (STACKEBRANDT, 2001). Například *Pyrolobus fumarii* (Crenarcheota) je chemolitotrof žijící při teplotách dosahujících 113°C. Pro srovnání je dobré si uvědomit, že horní hranicí pro eukaryota je přibližně 60°C a pro většinu těchto organismů leží ještě níže (ryby mají maximum v 40°C)

(ROTSCHILD, 2001). Termofilní organismy charakterizuje schopnost existovat v teplotách nad 60 °C. Pro hypertermofilní organismy leží optimální teplota růstu nad hranicí 80°C (ADAMS et al., 1996).

Nutno zdůraznit, že obě teploty se nevztahují k prostému přežívání pro eukaryotní organismy smrtících podmínek, ba naopak tyto organismy „extrémní“ hodnoty pro svůj život vyžadují. Existují organismy, které žijí v blízkosti hlubokomořských hydrotermálních pramenů (např. černých kuřáků), kde panují obrovské tlaky a teploty. Teplota vyvěrající (kapalné) vody dosahuje 400°C a tlak v řadu řádu stovek atmosfér.

Proteiny hypertermofilních organismů představují pro lidstvo velice zajímavý objekt zkoumání. Zaměřují se na ně studie biologické, chemické i fyzikální. Zástupci hypertermofilních organismů jsou dobrým modelovým systémem při studiu evoluce života na zemi, evoluce enzymatického aparátu buněk, termostability nebo principu balení proteinů. Tomu odpovídá i exponenciální nárůst článků týkajících se termofilních a hypertermofilních organismů nebo jejich komponent. Stejným tempem roste počet známých 3D struktur bakteriálních a archeálních proteinů v databázi PDB (3).

Hypertermofilní proteiny mají vysoký potenciál uplatnění v průmyslu. Předpokládá se, že pokud se objasní příčiny termostability, budeme mít v rukou návod, jak ovlivnit mesofilní proteiny tak, aby při zachování své funkce, odolávaly extrémním teplotám. Nástrojem, jak takové proteiny připravit, pak budou metody genového inženýrství (například cílená mutageneze). Mohli by být připraveny enzymy s posunutou rovnovážnou konstantou, s rozdílnou specificitou vůči substrátu nebo i enzymy, které syntetizují zcela nové chemické sloučeniny.

Hypertermofilní proteiny se již uplatňují v metodách molekulární biologie nebo v chemické syntéze. Zkoumá se jejich využití při bioremediacích životního prostředí a v biotechnologiích. Například při výrobě lysinu, kyseliny citrónové, ethanolu nebo nových detergentů. Hlavní technologickou výhodou enzymatických procesů probíhajících při vysokých teplotách, je jejich vyšší výtěžek. Při vyšší teplotě má substrát zpravidla nižší viskozitu a jeho výchozí koncentrace může být vyšší (ZEIKUS et al., 2001).

#### **4.1. Příklady termostabilních proteinů a jejich uplatnění**

##### **DNA polymerázy**

Klonování Taq polymerázy z *Thermophilus aquaticus* a její exprese v *E. coli* stála na počátku rozvoje širokého spektra technik PCR. Zkratka PCR znamená *Polymerase Chain Reaction* a naznačuje, že smysl této metody tkví několika násobné syntéze templátové DNA pomocí

termostabilních DNA či RNA dependentních DNA polymeráz. V současné době se v PCR využívají hypertermofilní polymerázy s 3'→5' opravnou aktivitou jako například Vent a Deep Vent polymeráza z *Thermococcus litoralis* a *Pyrococcus furiosus*. Obě mají optimum aktivity při 75°C, poločas denaturace Deep Vent polymerázy při 95°C je 23 hodin.

### **Ostatní enzymy**

DNA ligázy -tyto enzymy jsou využívány hlavně při PCR. Optimum jejich aktivity leží mezi 45°C a 80°C.

Proteázy – jsou využívány k digesci obtížně štěpitelných, zejména hypertermofilních, proteinů. Pro jejich degradaci jsou nutné teploty nad 70°C. PreTaq proteáza se používá k přečištění vzorků DNA a RNA, protože po inaktivaci neovlivňuje enzymy PCR reakcí. Proteáza S (*P. furiosus*) se používá k naštěpení proteinů před sekvenací peptidů. Z *Pyrococcus furiosus* pochází i aminopeptidázy štěpící methionin nebo L-pyroglutamát. Jsou aktivní v rozmezí pH 7-8 a 6-9, optimální teplotní interval je 85°C-95°C a 95°C-100°C. Z *Sulfolobus solfataricus* byla izolována karboxypeptidáza štěpící zásadité, kyselé a aromatické aminokyseliny při teplotě 40°C. Hledají se hypertermofilní enzymy využitelné pro imunoeseje za laboratorních podmínek.

### **Chemická syntéza**

Příkladem je syntéza aspartamu. Aspartam je methylester L-aspartyl-L-fenylalaninu. Pro jeho průmyslovou výrobu se používá termofilní enzym termolysin. Zkoumá se využití hypertermofilních proteáz, zejména tam, kde se vzrůstající teplotou klesá viskozita solventu a zvyšuje se účinnost daného procesu. Potenciál pro chemickou syntézu mají hydantoináza, cytochrom P450, glykosyl hydrolázy (ZEIKUS et al., 2001).

## 5. Fyzikálně chemické příčiny hypertermostability

Při vyrovnávání se s vysokou teplotou uplatňují organismy dvě strategie. První strategií je změna primární sekvence proteinu a druhou změna buněčného prostředí. Změnou aminokyselinového složení se změní i příspěvek jednotlivých typů interakcí ke stabilitě proteinu. Byla provedena velká řada studií pro srovnání množství a typu interakcí v homologních proteinech z mesofilních a hypertermofilních organismů. Vyplývá z nich, že zvýšené termostabilitě odpovídá zvýšený výskyt určitého typu interakce. Studie se ale obecně neshodují na jednotném druhu interakce, která by převládala u všech termostabilních a hypertermostabilních proteinů. Proto je nutné analyzovat příspěvek jednotlivých typů interakcí ke stabilizaci hypertermofilních proteinů detailněji.

### 5.1. Kovalentní interakce

Z kovalentních interakcí se na prostorovém uspořádání terciární struktury podílí jen disulfidické vazby. Jejich počet v proteinu zpravidla není vysoký. Ze závěrů studií z předchozích let vyplývalo, že disulfidická vazba je při podmínkách nad 100°C nestabilní (VOLKIN, 1987). Studované proteiny ale pocházely z mesofilních organismů, a proto byly při této teplotě denaturované. V hypertermofilních proteinech, které se nacházejí v nativním stavu, je tato vazba stabilní (CACCIAPUOTI, 1994). Míru stabilisace, kterou proteinu tyto vazby udílí, určuje jejich poloha v proteinu. Vazby, které neinteragují s okolním prostředím a nejsou tedy v kontaktu s látkami s nižším redoxním potenciálem, jsou velmi stabilní. Dokazuje to studie provedená na serinové proteáze z *Aquifex pyrophilus* (CHOI, 1999). Ta byla vystavena působení dithiothreitolu a její  $T_{1/2}$  při 85°C klesla z 90 hodin pod 2 hodiny. Hodnota  $T_{1/2}$  při 105°C a pH 9 byla rovna 6 hodinám. Teoretická hodnota  $T_{1/2}$  vypočítaná pro rozbalené proteiny při pH 8 byla 1 hodina.

### 5.2. Nekovalentní interakce

Přesto, že energie nekovalentních vazeb (vyjma iontové) je řádově menší než energie kovalentních vazeb. Mají na prostorové uspořádání proteinu větší vliv.

#### 5.2.1. Iontové vazby

Přesto, že iontové vazby jsou velmi silné a energeticky bohaté, přispívají ke stabilizaci proteinu malou měrou. Ve vodném prostředí jsou ionty solvatovány několika vrstvami molekul vody a pro vznik iontové vazby je nutné jednak tyto interakce přerušit a jednak molekuly vody přeskupit. (DILL,

1990). Iontové vazby se vyskytují převážně na povrchu proteinu, ale mohou také propojovat podjednotky proteinů. Při porovnání homologních proteinů zpravidla nejsou konzervovány.

S rostoucí teplotou klesá dielektrická konstanta, protože molekuly vody jsou v průměru dále od nábojů, které odstiňují. Současně s teplotou tedy vzrůstá i entalpický příspěvek iontové vazby a převažuje zápornou změnu entropie. Iontové vazby jsou vůči sobě lépe orientované a jsou stabilizujícím prvkem například glutamát dehydrogenázy nacházející se v hypertermofilním organismu *Pyrococcus furiosus*. Iontové můstky vytvářejí v hypertermofilním proteinu rozsáhlé sítě. Největší z nich zahrnuje 24 residuí propojených 18 vazbami. Z energetického hlediska je vznik sítí výhodnější, protože se méně platí za desolvataci. Přidáním jednoho residua do existující sítě vzniká nová iontová vazba, ale energie potřebná k desolvataci je poloviční oproti vzniku izolované iontové vazby.

Na základě analýzy genetické informace bylo zjištěno, že některé hypertermofilní enzymy obsahují oproti mesofilním proteinům vyšší procento nabitých aminokyselin a to zejména na úkor aminokyselin nenabitých. Zajímavý pokus provedli Lebbink *et al.* Přidali cílenou mutací původní struktury nabitou aminokyselinu do sítě v enzymu glutamát dehydrogenáza pocházející z bakterie *Thermotoga maritima*. Výsledný efekt však nebyl stabilizující, ale destabilizující. (TOMSCHY, 1994; JAENICKE, 2001, PETSKO, 2001)

Vliv iontových můstků na stabilitu proteinové struktury velmi silně závisí na dielektrické konstantě prostředí, ve kterém se nachází. Iontové můstky uvnitř proteinu mají větší energii než na povrchu proteinu. U většiny hypertermofilních proteinů byl pozorován větší počet iontových můstků než u jejich mesofilních homologů. Zvětšením počtu iontových můstků v mesofilním proteinu, ale nemusí nutně vést k jeho větší stabilitě.

### 5.2.2 Interakce dipól -dipól

Dva permanentní dipóly orientované tak, aby se přitahovaly, poskytují stabilizační energii řádově desetkrát menší než vazba iontová a tato energie, jak bylo uvedeno výše, ubývá s  $r^{-3}$ . Počet dipólů v molekule proteinů je ale velmi vysoký a významně přispívá ke stabilitě proteinu.

Například ve struktuře  $\alpha$  šroubovice se dipólové momenty amidové a karbonylové skupiny skládají tak, že na N konci je kladný a na C konci záporný dipólový moment. Tento jev má velký význam pro výsledné prostorové uspořádání proteinu. Tyto dipólové momenty jsou stabilizovány přítomností čepičky - aminokyseliny s opačným nábojem. V blízkosti N konce se nachází kyselina

glutamová nebo asparagová, C konec stabilizuje kladně nabitě residuum. Mesofilní proteiny obsahují v průměru menší počet  $\alpha$ -helixových čepiček než hypertermofilní proteiny. Vyplývá to ze srovnání struktur fosfoglycerol kináz z mesofilních organismů *Saccharomyces cerevisiae* a *Sus scrofa* a hypertermofilních organismů *Thermotoga maritima* a *Bacillus stearothermophilus*. Uvádí se, že stabilizace N konce přispívá k  $G_{stab}$  hodnotou -3,4 kJ/mol. Význam této stabilizace tedy není zásadní, ale přispívá k celkové stabilizaci hypertermofilních proteinů (ZEIKUS et al., 2001).

### 5.2.3. Vodíkové můstky

Nativní struktura proteinu je uspořádána tak, aby v ní existovalo maximum možných vodíkových můstků. Vodíkové můstky vznikají interakcí mezi atomy hlavního řetězce, mezi atomy hlavního a postranních řetězců a mezi atomy postranních řetězců. Vznikem sekundárních struktur jsou využity možnosti hlavního řetězce. Rozbalený protein vytváří většinu vodíkových vazeb s vodou. Uvádí se, že voda je v tomto případě více uspořádána, než když protein vytváří intramolekulární vodíkové vazby, a proto je jejich vznik z entropického hlediska výhodný. I entalpická složka nahrává vzniku vodíkových můstků. Vnitřní prostředí proteinu má mnohem menší dielektrickou konstantu než cytosol, tedy vnitřní prostředí buňky. Proto jsou tu vodíkové vazby silnější než ve vodě. Přibližně 70 % všech vodíkových můstků vytváří atomy hlavního řetězce a z toho 95 % můstků se podílí na stavbě sekundárních struktur ( 33 % na  $\beta$  skládaném listu, 66 % na různých typech  $\alpha$  šroubovic). Proto se podíl vodíkových můstků na stabilizaci proteinu často označuje jako *konformační energie*. V  $\alpha$  šroubovicích jsou interagující atomy součástí residuů, které jsou od sebe v primární sekvenci vzdáleny o 3 až 4 aminokyseliny. Jinak vznikají vodíkové můstky jen mezi postranním řetězcem vzdálenými maximálně 5 aminokyselin. Při porovnávání proteinů z hypertermofilních a mesofilních proteinů je nutné znát jejich struktury s velkou přesností. Jinak je do odhadu jejich počtu zanesena velké chyba.

Zvláštní význam je přisuzován vodíkovému můstku mezi nabitým a neutrálním atomem. Vzniká mezi nabitým atomem postranního řetězce a jakýmkoliv neutrálním atomem hlavního nebo postranního řetězce. Tento typ vazby může být více stabilizující než iontová vazba, protože je méně solvatována, entalpická složka je vyšší než u vodíkové vazby mezi neutrálními atomy a to díky interakci náboj – indukovaný dipól, která byla popsána výše. Existují proteiny, u kterých byla prokázána dominantní úloha vodíkových můstků při stabilizaci proteinu. příkladem je feredoxin z *Thermotoga maritima* nebo glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza z *Thermus aquaticus*. Z porovnání jiných proteinů, ale vyplývá, že počet vodíkových můstků je přibližně stejný. Jako v případě 3-isopropylmalát dehydrogenázy z *Thermus thermophilus* a *Escherichia coli* a *Salmonella*

*typhymurium*. glutamová nebo asparagová, C konec stabilizuje kladně nabitě residuum. Mesofilní proteiny obsahují v průměru menší počet  $\alpha$ -helixových čepiček než hypertermofilní proteiny. Vyplývá to ze srovnání struktur fosfoglycerol kináz z mesofilních organismů *Saccharomyces cerevisiae* a *Sus scrofa* a hypertermofilních organismů *Thermotoga maritima* a *Bacillus stearothermophilus*. Uvádí se, že stabilizace N konce přispívá k  $G_{stab}$  hodnotou -3,4 kJ/mol. Význam této stabilizace tedy není zásadní, ale přispívá k celkové stabilizaci hypertermofilních proteinů (ZEIKUS et al., 2001).

### 5.2.3. Vodíkové můstky

Nativní struktura proteinu je uspořádána tak, aby v ní existovalo maximum možných vodíkových můstků. Vodíkové můstky vznikají interakcí mezi atomy hlavního řetězce, mezi atomy hlavního a postranních řetězců a mezi atomy postranních řetězců. Vznikem sekundárních struktur jsou využity možnosti hlavního řetězce. Rozbalený protein vytváří většinu vodíkových vazeb s vodou. Uvádí se, že voda je v tomto případě více uspořádána, než když protein vytváří intramolekulární vodíkové vazby, a proto je jejich vznik z entropického hlediska výhodný. I entalpická složka nahrává vzniku vodíkových můstků. Vnitřní prostředí proteinu má mnohem menší dielektrickou konstantu než cytosol, tedy vnitřní prostředí buňky. Proto jsou tu vodíkové vazby silnější než ve vodě. Přibližně 70 % všech vodíkových můstků vytváří atomy hlavního řetězce a z toho 95 % můstků se podílí na stavbě sekundárních struktur (33 % na  $\beta$  skládaném listu, 66 % na různých typech  $\alpha$  šroubovic). Proto se podíl vodíkových můstků na stabilizaci proteinu často označuje jako *konformační energie*. V  $\alpha$  šroubovicích jsou interagující atomy součástí residuí, které jsou od sebe v primární sekvenci vzdáleny o 3 až 4 aminokyseliny. Jinak vznikají vodíkové můstky jen mezi postranním řetězcem vzdálenými maximálně 5 aminokyselin. Při porovnávání proteinů z hypertermofilních a mesofilních proteinů je nutné znát jejich struktury s velkou přesností. Jinak je do odhadu jejich počtu zanesena velké chyby.

Zvláštní význam je přisuzován vodíkovému můstku mezi nabitým a neutrálním atomem. Vzniká mezi nabitým atomem postranního řetězce a jakýmkoliv neutrálním atomem hlavního nebo postranního řetězce. Tento typ vazby může být více stabilizující než iontová vazba, protože je méně solvatována, entalpická složka je vyšší než u vodíkové vazby mezi neutrálními atomy a to díky interakci náboj – indukovaný dipól, která byla popsána výše. Existují proteiny, u kterých byla prokázána dominantní úloha vodíkových můstků při stabilizaci proteinu. příkladem je feredoxin z *Thermotoga maritima* nebo glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenáza z *Thermus aquaticus*. Z porovnání jiných proteinů, ale vyplývá, že počet vodíkových můstků je přibližně stejný. Jako v případě 3-



isopropylmalát dehydrogenázy z *Thermus thermophilus* a *Escherichia coli* a *Salmonella typhimurium*. Nekovalentní interakce hrají klíčovou úlohu ve struktuře a funkci proteinu. Zvýšením jejich počtu v hypertermostabilních proteinech dovoluje zachovat dynamičnost a tedy funkčnost proteinu. (PESKO, 2001; VOET, 2004; ZEIKUS et al., 2001; JAENICKE, 2003).

#### **5.2.4. Aromatická interakce**

Za aromatickou interakci se považuje přiblížení středů symetrie fenylových kruhů na vzdálenost menší než 7 Å. Orientace těchto kruhů je paralelní nebo svírají pravý úhel. Základem této interakce jsou Londonovy disperzní síly. Na základě vyhodnocení 272 aromatických párů ze 34 různých proteinů vyplynulo, že energie 80% aromatických interakcí se pohybuje v intervalu 0 –8,4 kJ/mol (ZEIKUS et al., 2001). Aromatické interakce tvoří také rozsáhlé sítě interakcí a dokáží propojovat vzdálené prvky sekundární struktury. Většina aromatických aminokyselin, propojených aromatickou interakcí, se vyskytuje uvnitř proteinu a podílí se na tvorbě hydrofóbního jádra proteinu nebo je do něj alespoň částečně zanořena (VOET, 2004).

#### **5.2.5. Hydrofobní interakce**

U mnoha hypertermostabilních proteinů byl pozorován větší počet hydrofobních residuí. Vyskytují se jednak v jádru globulárních proteinů a jednak v místě spojů mezi proteinovými podjednotkami. Příkladem je laktát dehydrogenáza z *Thermotoga maritima* nebo superoxid dismutáza ze *Sulfolobus acidocaldarius* (. Přesné kvantitativní zhodnocení příspěvku hydrofóbních interakcí teprve čeká na provedení.

### **5.3. Další strategie adaptace na vysoké teploty**

#### **5.3.1. Uspořádání sekundární a terciární struktury proteinu**

Tvrdí, že v hypertermofilních proteinech se vyskytuje větší procento aminokyselin, které jsou zapojené do sekundární struktury. U některých proteinů bylo Warrenem a Petskem zjištěno větší procento aminokyselin, které stabilizují vznik  $\alpha$  šroubovice, jako například glycin.

Bylo pozorováno, že v termostabilních proteinech jsou oproti mesofilním homologům zkráceny úseky propojující  $\alpha$  šroubovice či  $\beta$  skládané listy. Možným vysvětlením je také to, že se pak snižuje flexibilita proteinu při vyšších teplotách. Podobné nebezpečí jako neuspořádané úseky představují při vysokých teplotách i volné C a N konce hlavního řetězce.

Kuriózně ovšem působí zjištění, že v některých termostabilních proteinech jsou úseky bez

sekundární struktury prodlouženy. V těchto úsecích se však vyskytují aminokyseliny, které zprostředkovávají oligomerizaci původně monomerního proteinu. Jsou to zejména aminokyseliny s nabitým nebo hydrofobním postranním řetězcem.

Oligomerizace hraje důležitou stabilizační úlohu proteinu. Zároveň zvyšuje efektivnost buněčných procesů probíhajících v blízkosti bodu varu. V takových podmínkách je velmi důležitá buněčná kompartmentalizace, tedy prostorové oddělení určitých chemických reakcí. Stabilizační role oligomerizace byla potvrzena u dimerní formy fosforibosylanthranilát izomerázy z *Thermotoga maritima*.

V některých hypertermofilních proteinech, například u methionin aminopeptidázy z *Pyrococcus furiosus* nebo 3-isopropylmalát dehydrogenázy z *Thermus thermophilus* byl pozorován vyšší výskyt prolinových residuí. O prolinu je známo, že omezuje konformační možnosti sekundární struktury. Jinými slovy činí strukturu proteinu více rigidní. To má pravděpodobně význam v zachování funkce v extrémních teplotách. Uvádí se, že stabilní proteiny vykazují menší počet velkých fluktuací a při mesofilních podmínkách mají menší flexibilitu.

Dalším fenoménem pozorovaným například u laktát a glutamát dehydrogenázy z *Thermotoga maritima* a *Thermococcus litoralis* je zmenšení poměru povrchu ku objemu. Jinými slovy hypertermofilní proteiny jsou kompaktnější. V jádrech globulárních proteinů se vyskytuje méně volného prostoru. Pokusy zaměřené na vyplnění těchto prostorů u mesofilních proteinů, ale vedly k tomu, že protein destabilizovaly (ZEIKUS, 2001, PETSKO, 2001)..

### 5.3.2. Vnější faktory

Proteiny mohou být stabilizovány i pomocí vnějších faktorů. Mezi ně patří zvýšení koncentrace tzv. kompatibilních solutů uvnitř buňky. Jsou to produkty jejího metabolismu. Kompatibilními soluty jsou například sacharidy (sacharóza, trehalóza), polyalkoholy (glycerol, sorbitol, manitol), aminokyseliny (prolin, glycin), methylaminy (trimethylamin-N-oxid, sarkosin) nebo některé ionty ( $K^+$ ,  $NH_4^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $HPO_4^{2-}$  tj. ionty z levé části Hoffmeisterovy řady). Jejich důležitou vlastností je, že neovlivňují nežádoucím způsobem buněčné procesy (jsou s nimi kompatibilní). Role těchto solutů spočívá v tom, že proteiny k nim mají menší afinitu než k vodě, a proto se jejich povrch hydratuje. Hydratace povrchu bílkoviny stabilizuje její nativní konformaci.

Zajímavým příkladem účinku solí na strukturu proteinu představuje formylmethanofuran—tetrahydromethanopterin *N*-formyltransferáza z *Methanopyrus kandleri*. Tento enzym je

v monomerním stavu neaktivní a do formy dimeru či tetrameru přechází teprve po přidání NaCl či  $K_3PO_4$ . Přidání solí pravděpodobně zesiluje interakci mezi hydrofobními aminokyselinami na rozhraní podjednotek. Organismy, které žijí v prostředí o nízké iontové síle, kompatibilní soluty ve zvýšené míře nesyntetizují. Byla vyslovena hypotéza, že u mírně halofilních organismů jsou kompatibilní soluty produkovány ve chvíli, kdy na buňku působí zároveň teplotní a osmotický stres. (ZEIKUS et al. 2001, PETSKO 2001).

### 5.3.3. Stabilisace substrátem

Substrát přispívá k zachování tvaru aktivního centra a ke kinetické stabilitě enzymu. Příkladem je dihydrofolát reduktáza z *Thermotoga maritima*. Jejím substrátem je NADPH. Stabilizace je oboustranná. Pro hypertermofilní organismy je jedním z limitujících faktorů růstu při vysokých teplotách rozklad přenašečů energie, tedy ATP a NADPH. (JAENICKE 2001, ZEIKUS et al., 2001).

### 5.3.4. Vazba kovu

Kovy hrají v enzymech důležitou roli jako kofaktory. V některých případech mají i strukturální úlohu. Mohou stabilizovat povrchové karboxylové skupiny jako iont  $Ca^{2+}$  u *Bacillus Ak1* proteázy. Ve ferredoxinu ze *Sulfolobus* sp. propojuje  $Zn^{2+}$  N terminální doménu s jádrem proteinu. Je koordinován třemi histidinovými residui z této domény a jedním asparaginem, který je součástí jádra. Tato struktura není homologní u mesofilního proteinu. Vzhledem k tomu, že nemá vliv na funkci proteinu, uvažuje se o její stabilizační funkci (ZEIKUS et al., 2001).

## 5.4. Shrnutí

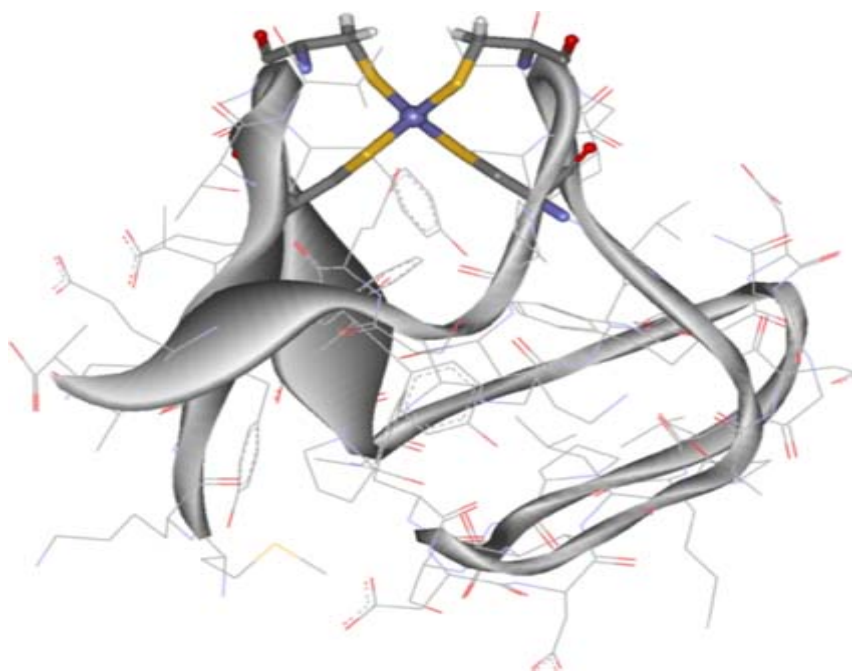
Hodnota  $\Delta G_{stab}$  celého proteinu se pohybuje mezi 30 a 80 kJ/mol. Je tudíž docela malá a znamená to, že rovnováha mezi přitažlivými a odpudivými silami je vratká. Odpovídá kompromisu mezi rigiditou a flexibilitou proteinu. Rigidita proteinu má totiž svou mez a tou je dostatečná katalytický schopnost, pro kterou byl daný enzym v průběhu evoluce vyselektován.

Nejčastější strategií se zdá být nárůst počtu iontových můstků a to povrchových, intermolekulárních nebo na rozhraní podjednotek, a také větší kompaktnost. Větší kompaktnost proteinu souvisí s množstvím Londonových disperzní interakcí a hydrofobních interakcí. Jsou-li hydrofobní aminokyselinová residua blíže sebe, zvyšuje se právě tento stabilizační příspěvek. Naším cílem je nalézt korelaci mezi stabilizujícími příspěvky pocházející z disperzních interakcí a vysokou termostabilitou některých typických proteinů. Jako modelový systém je nejvhodnější nejdéle známý hypertermofilní protein rubredoxin.

## 6. Rubredoxin jako modelový systém hypertermostabilního proteinu

Rubredoxin byl prvním známým hypertermofilním proteinem. Je to protein s doposud nejvyšší známou teplotou tání. Je rovna přibližně 200°C. Rubredoxin je malý globulární jednodoménový protein o délce 53 aminokyselin. To odpovídá molekulové hmotnosti přibližně 6 kDa. Jako všechny ostatní globulární ve vodě rozpustné proteiny obsahuje hydrofobní jádro.

Rubredoxin patří do rodiny rubredoxinům podobných proteinů, jejichž charakteristickým prvkem je evolučně konzervovaný motiv  $C_{xx}C_{x_n}CPxC$ , kde C značí cystein, P prolin, x jakoukoli aminokyselinu a  $n = 22 - 29$ . Cysteiny koordinují atom Fe, který je pravděpodobně klíčový pro funkci proteinu, nikoli pro jeho strukturu (STROP, 1999). Navzdory tomu, že je rubredoxin jeden z nejlépe charakterizovaných proteinů z hlediska struktury, jeho fyziologická role je dosud nejasná. Je pravděpodobně součástí komplexu proteinů odpovídajících na oxidativní stres (JENNEY, 2001).

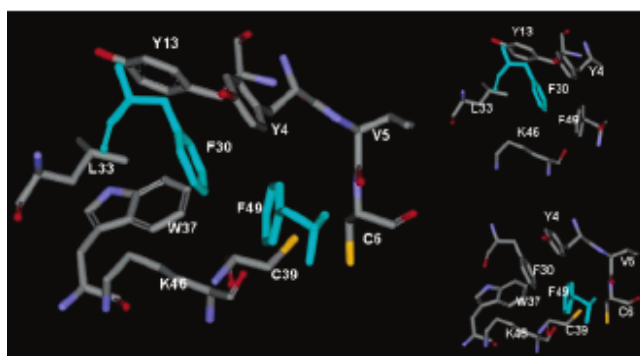


Obr. 4 Model rubredoxinu z *Desulfovibrio vulgaris*. zdroj: (6)

### 6.1. Strukturální charakteristika hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu

Vedle cysteinového motivu je evolučně velmi konzervované také hydrofobní jádro, které se nachází uvnitř proteinu. Je to systém vzájemně interagujících aromatických a alifatických aminokyselin, jehož vznik hydrofobního jádra je spojen s existencí hydrofobních interakcí. Tyto interakce mají svůj původ ve změně entropie vody při procesu balení proteinu. Předpokládá se, že hydrofobní jádro je příčinou hypertermostability rubredoxinu. V jádře se nevyskytují žádné molekuly vody.

Hydrofobní jádro hypertermofilního rubredoxinu se skládá z těchto aminokyselin: W3, V4, Y12, F29, L32, W36, K 45, F48. Tyto aminokyseliny hydrofobního jádra byly vytypovány na základě bioinformatické analýzy Sting (4). Za hydrofobní interakci je považován kontakt aminokyselin, jejichž vzdálenost je menší než 4Å. Z této studie vyplynula stěžejní úloha 2 fenylalaninových residuů F29 a F48, okolo kterých jsou rozmístěny ostatní aminokyseliny hydrofobního jádra. Obě residua interagují se stejným počtem aminokyselin, celkem s pěti. Pro F48 jsou to K 45, L32, Y12 a W3. a pro F 29 jsou to K 45, V4, W36 a W3 (VONDRÁŠEK et al, 2005 ).



Obr.5: Schéma hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu a klastrů okolo F29 a F48 (VONDRÁŠEK et al, 2005).

## 6.2. Strukturální a energetická charakteristika hydrofobního jádra mesofilního rubredoxinu

Mesofilní homolog rubredoxinu pochází z organismu *Desulfovibrio vulgaris*. Stavba jeho hydrofobního jádra je velmi podobná jako u hypertermofilního proteinu. Liší se však v tom, že v pozici 3, kterou v hypertermofilním proteinu zaujímá tryptofan, se nachází tyrosin. Dalším podstatným rozdílem mezi mesofilním a hypertermofilním proteinem je vzdálenost mezi atomy postranních řetězců aminokyselin, které tvoří hydrofobní jádro. Průměrná vzdálenost atomů

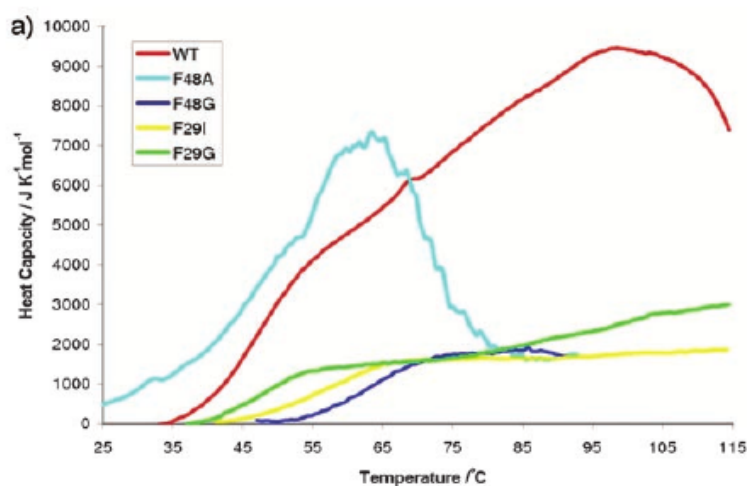
hypertermofilního hydrofobního jádra je menší než u mesofilního hydrofobního jádra. Znamená to, že disperzní interakce v jádře hypertermofilního proteinu je silnější.

Jádro mesofilního rubredoxinu bylo studováno metodami výpočetní chemie s cílem určit stabilizační energii, kterou přináší interakce aromatických a alifatických aminokyselin. Hodnota stabilizační energie pro dva subsystémy kolem klíčových fenylalaninů představovala enormní hodnotu zhruba 50 kcal/mol určenou pro interakci systémů v plynné fázi. (VONDRÁŠEK et al, 2005). I při zahrnutí vlivu okolního prostředí na velikost stabilizační energie je hodnota stabilizace vysoká a představuje zhruba 60% hodnoty interakční energie v plynné fázi (RILEY, 2006). Je na snadě domnívat se, že energetický obsah stabilizační energie hydrofobního jádra hypertermofilního proteinu musí být vyšší než u jeho mesofilního homologu.

### 6.3. Energetická charakteristika hydrofobního jádra hypertermofilního rubredoxinu a jeho mutantů

Dominujícím stabilizačním prvkem hydrofobního jádra jsou Londonovy disperzní síly. Změna v aminokyselinovém složení hydrofobního jádra vede k poklesu interakční energie a tedy i stability při vysokých teplotách. Projeví se to poklesem množství Gibbsovy volné energie, kterou je nutno proteinu dodat, aby zdenaturoval. S tím souvisí i pokles teploty tání. Byly připraveny bodové mutanty hypertermofilního rubredoxinu (F29I, F29G, F48A a F48G) a byla u nich experimentálně zjištěna teplota tání. Viz

Graf 1.



Graf 1.: Závislost tepelné kapacity rubredoxinu na teplotě (VONDRÁŠEK et al., 2007)

Graf ukazuje závislost tepelné kapacity na vzrůstající teplotě. Všechny mutanty rubredoxinu,

vyjma F48A, vykázaly pouze změnu tepelné kapacity. Teploty tání jsou 55.5°C (F29I), 47.5 °C (F29G), 63°C (F48 A) and 62.5 8°C (F48G). Naproti tomu wt forma rubredoxinu zůstala stabilní i nad teplotou 100°C. Vliv bodových mutací na stabilitu hypertermofilního jádra je veliký. F29G vykázal nejnižší teplotu tání a tedy největší pokles stability proteinu. Nejmenší změna nastala v případě záměny F48 za glycin či alanin.

## Závěr

Vše, co se týká struktury a funkce proteinu, vychází z fyzikální podstaty jeho stavebních prvků a interakcí mezi nimi, popřípadě interakcí těchto prvků s okolním prostředím. Na základě tohoto principu bychom měli být schopni určit z počtu, charakteru a síly vazeb rozdíl v termální stabilitě mesofilních a hypertermofilních proteinů.

Z dosud publikovaných studií ale vyplývá, že nelze určit jeden druh interakcí, který by exkluzivně způsoboval termostabilitu. Neexistuje typ interakce, na základě kterého by se dalo rozhodnout, zda je protein hypertermofilní nebo mesofilní. Všechny typy interakcí jsou společné psychrofilním, mesofilním, termofilním i hypertermofilním proteinům.

Žádná z dosud popsaných stabilizačních strategií není univerzální pro všechny proteiny. Každý protein využívá všech, pro tento protein možných strategií. Ty se na jeho stabilizaci podílejí v různé míře, jak prokázaly mutační studie.

Na druhou stranu destabilizace, která je u jednoho proteinu způsobená vystřížením nabitě aminokyseliny, je u jiného proteinu dosažena zvýšením počtu iontových interakcí. (PAPPENBERGER, 1997; ZEIKUS et al. 2001; PETSKO, 2001). Chování proteinů je tedy z hlediska přizpůsobení se vysokým teplotám individuální.

Jak ale ukazují výpočetní studie na modelovém systému rubredoxinu existuje přímá korelace mezi zvýšenou teplotní stabilitou proteinu a energetickým obsahem stabilizace nesenou interakcí aminokyselin v hydrofobním jádře. Tato strategie využívá jako měřítko termostability velikost interakční energie mezi aminokyselina hydrofobního jádra a může být v jisté aproximaci považována za charakteristickou vlastnost proteinu.

Naším dalším cílem je ověřit, že tato strategie a chování jsou univerzální pro širší spektrum proteinů. Toto zjištění by v konečném důsledku mohlo znamenat, že budeme schopni cílenou mutagenezí modulovat jejich teplotní stabilitu.



## Použitá literatura

### a) články:

- ANFINSEN, C. B. (1973): Principles That Govern Folding of Protein Chains. *Science*. 181, 4096, s. 223– 230.
- ADAMS M. W. W. (1996): Enzymes and Proteins from hyperthermophilic microorganisms. *Advances in protein chemistry*. Academic Press
- BROWN S. H., KELLY R. M. (1993): Characterization of amylolytic enzymes, having both -1,4 and -1,6 hydrolytic activity, from the thermophilic archaea *Pyrococcus furiosus* and *Thermococcus litoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2614–2621
- CACCIAPUOTI G., PORCELLI M., BERTOLDO C., DE ROSA, M., ZAPPIA V. (1994): Purification and characterization of extremely thermophilic and thermostable 5 -methylthioadenosine phosphorylase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. Purine nucleoside phosphorylase activity and evidence for intersubunit disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 269:24762–24769.
- DAMS T., OSTENDORP R., OTT M., RUTKAT K., JAENICKE R. (1996): Tetrameric and octameric lactate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* Structure and stability of the two active forms. *Eur. J. Biochem.* 240: 274 - 279.
- FELLER G., GERDAY CH. (2003): Psychrophilic enzymes: hot topic in cold adaptation. *Nature reviews Microbiology* 1 (3): 200-208.
- CHOI I.-G., BANG W.-G., KIM S.-H, YU Y. G.(1999): Extremely thermostable serine-type protease from *Aquifex pyrophilus*. Molecular cloning, expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* 274:881–888
- DILL, K.A. (1990): Dominant forces in protein folding. *Biochemistry* 29. 7133-7155.
- JAENICKE R., BOHM, G. (2001): Thermostability of proteins from *Thermotoga maritima*. *Methods in Enzymology*. 334: 33
- JAENICKE, R. (1990): Protein structure and function at low temperatures. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* B 326: 535-553.
- JAENICKE, R. (1991): Protein stability and molecular adaptation to extreme condition. *Eur. J. Biochem.* 202. 715-728.

- JAENICKE R., STERNER R. (2003): Life at high temperatures. The Prokaryotes 3<sup>rd</sup> electronic Edition. Springer Verlag
- JENNEY F.E. Jr., ADAMS, M.W.W. (2001): Rubredoxin from *Pyrococcus furiosus*. *Methods in Enzymology*. 334: 45-55.
- PAPPENBERGER G.,SCHURIG H., JAENICKE R., (1997): Disruption of an ionic network leads to accelerated thermal denaturation of D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *J. Mol. Biol.* 274, 676-683.
- PETSKO, G. (2001): Structural basis of thermostability in hyperthermophilic proteins, or „There's more than one way to skin a cat“. *Methods in Enzymology* 334. 34
- PRIVALOV, P.L. (1979): Stability of proteins. *Adv. Protein Chem.* 33. 167-241.
- REES D., (2001): Crystallographic analyses of hyperthermophilic proteins. *Methods in Enzymology* 334, 32.
- RILEY K., Merz K. M. Jr. (2006): Role of solvation in the energy stabilization inside the hydrophobic core of the protein rubredoxin. *J. Phys. Chem.* 110 (32): 15650-15653.
- ROTSCHILD L.J, MANCINELLI R. L. (2001): Life in extreme environments. *Nature* 409: 1092-1100. Review
- STROP P., MAYO SI, (1999): Rubredoxin variant folds without iron. *J. Am.Chem. Soc.* 121 (11): 2341-2345
- TOMSCHY A., BOHM G., JAENICKE R. (1994): The effect of ion pairs on the thermal stability of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Protein Engineering* 7:1471-1478.
- VOLKIN D. B., KLIBANOV A. M. (1987): Thermal destruction processes in proteins involving cystine residues. *J. Biol. Chem.* 262:2945–2950.
- VONDRÁŠEK J., BENDO VÁ L., KLUSÁK V., HOBZA P. (2005): Unexpectedly strong energy stabilization inside the hydrophobic core of small rubredoxin mediated by aromatic residues: correlated Ab initio quantum chemical calculations. *J. Am. Chem. Soc.* 127: 2615-2619.
- VONDRÁŠEK J., KUBAŘ T., JENNEY F. Jr., ADAMS M.W.W., KOŽÍŠEK M., ČERNÝ J., SKLENÁŘ V., HOBZA P. (2007): Disperzion interactions govern the strong thermal stability of protein. *Chem. Eur. J.*

ZEIKUS G., VIEILLE C. (2001): Hyperthermophilic Enzymes: Sources, Uses, and Molecular Mechanisms for Thermostability. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65. p. 1–43.

**b) biografie:**

GARRET, R. , GRISHAM Ch. (2005) : Biochemistry 3<sup>rd</sup> edition. Brooks/Cole Thomson Learning

HOBZA, P. , ZAHRADNÍK R. (1988) : Intermolecular complexes. Academia.

VOET, D.VOET, J. (2004): Biochemistry 3<sup>rd</sup> Edition. John Wiley and sons.

**c) internetové zdroje:**

(1) <http://cmr.tigr.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>

(2) [www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20061005/3-vlaknotvorne\\_polymery.pdf](http://www.ft.vslib.cz/depart/ktm/files/20061005/3-vlaknotvorne_polymery.pdf)

(3) <http://www.rcsb.org/>

(4) <http://www.cbi.cnptia.embrapa.br>

(5) Friedel, Z. (2006): Organická chemie I.:

[http://www.fch.vutbr.cz/ictep/studijni\\_materialy/Organicka\\_chemie\\_1\\_pr/01\\_pojmy.pdf](http://www.fch.vutbr.cz/ictep/studijni_materialy/Organicka_chemie_1_pr/01_pojmy.pdf) Zakladni

(6) Stanford Synchrotron Radiation Laboratory: [http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/electransfer\\_summary.html](http://www-ssrl.slac.stanford.edu/research/electransfer_summary.html)

(7) STACKEBRANDT, Erko: Phylogeny Based on 16S rRNA/DNA. Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group. [www.els.net](http://www.els.net)

JAKUBOWSKI, (2006) : Biochemistry: Chapter 2 Protein structure.

<http://employees.csbsju.edu/hjakubowski/classes/ch331/protstructure/olunderstandconfo.html>