

**Studium fázových přechodů vybraných
materiálů pro kultivaci a kryoprezervaci
buněk**

Bc. Vojtěch Hubka

Vedoucí: doc. Ing. Irena Kratochvílová, Ph.D.
Obor: Biomedicínské inženýrství a informatika
Studijní program: Biomedicínské inženýrství
Červen 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Student: Bc. Vojtěch Hubka

Studijní program: Biomedicínské inženýrství a informatika

Obor: Biomedicínské inženýrství

Název tématu: Studium fázových přechodů vybraných materiálů pro kultivaci a kryoprezervaci buněk

Pokyny pro vypracování:

Bc. Vojtěch Hubka bude studovat fázově přechody (kapalina /pevná fáze) látek, užívaných pro kryoprezervaci buněk a to standardními fyzikálními/biofyzikálními metodami: Ramanovou spektroskopíí, diferenciální skenovací kalorimetrií. Ramanovou spektroskopíí bude dále sledovat proces mražení buněk po aplikaci zkoumaných kryoprotектив. Výsledky budou konzultovány s odbornými pracovišti v dané oblasti (1. lékařská fakulta UK, ISCARE IVF a.s., Praha).

Seznam odborné literatury:

- [1] Prosser V.: Experimentální metody biofyziky. Vyd. 1. Praha : Academia, 1989
- [2] Winston R.: Embryonic Stem cell research. Nature Medicine, Vol. 7, No. 4, April 2001

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Irena Kratochvílová, Ph.D.

Platnost zadání: do konce letního semestru 2016/2017

L.S.

prof. Ing. Pavel Sovka, CSc.
vedoucí katedry

prof. Ing. Pavel Ripka, CSc.
děkan

Prohlášení autora práce

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje v souladu s Metodickým pokynem o dodržování etických principů při přípravě vysokoškolských závěrečných pracích.

V Praze dne

Podpis autora práce

Poděkování

Rád bych poděkoval paní doc. Ing. Ireně Kratochvílové, Ph.D. za odborné vedení, všeestrannou pomoc a podporu k dokončení této práce. Rovněž děkuji paní Ing. Silvii Sedlákové za pomoc při měření na Diferenční kompenzační kalorimetrii, panu Mgr. Danielovi Šimkovi, Ph.D. za měření na rentgenové krystalografii, panu Mgr. Janu Richterovi za měření viability buněk, paní Ing. Júlii Mičové, Ph.D. a panu Ing. Karlu Pomeislovi, Ph.D. za přípravu a výběr materiálů. Zvláštní poděkování patří panu Mgr. Martinovi Golanovi za měření na Ramanově spektroskopii a odbornou pomoc.

Název diplomové práce

Studium fázových přechodů vybraných materiálů pro kultivaci a kryoprezervaci buněk.

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá studiem fázových přechodů vybraných materiálů pro kryoprezervaci. Cílem diplomové práce bylo porovnání konvenčních kryoprotektantů (dimethylsulfoxid, trehalóza) s kryoprotektanty ve fázi výzkumu/testování (antifreeze protein Trx-ApAFP752 (AFP), tetrapeptid Pro-Ala-Gly-Tyr). Materiály byly studovány fyzikálními/biofyzikálními metodami: Ramanovou spektroskopii, diferenciální kompenzační kalorimetrií (DSC) a rentgenovou krystalografií (XRD). V Ramanovských spektrech byla sledována intenzita a pološířka pásu ledu (3100 cm^{-1}). Pomocí DSC byly měřeny fázové přechody (teploty tání/tuhnutí) vodních roztoků. Pomocí XRD byly změřeny velikosti a orientace krystalů vody. Viabilita buněk (cytotoxicita materiálů) po aplikaci kryoprotektiv byla určena průtokovou cytometrií. Stav jader mražených buněk byl monitorován konfokální fluorescenční mikroskopii. Provedeným výzkumem jsme zjistili, že dimethylsulfoxid je nejfektivnější kryoprotektant a XRD bylo zjištěno, že má nejmenší krystality. Trehalóza vytváří souhlasné klastry (XRD). AFP má největší termální hysterezi ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tetrapeptid Pro-Ala-Gly-Tyr byl nejméně známý a prostudovaný kryoprotektant. Ve zmraženém roztoku nedochází k významné změně velikosti krystalů ledu. PAGY posouvá teplotu mražení roztoku, bod tání je prakticky totožný se standardním ledem.

Klíčová slova:

Kryoprezervace, termální hystereze, dimethylsulfoxid, trehalóza, antifreeze protein, PAGY, krystalizace

Master's thesis title

Study of phase transitions of selected materials for cell cultivation and cryopreservation.

Annotation

The Master thesis deals with the treatment and study of phase transitions of selected materials for the cryopreservation. The goal of the thesis was the comparison of conventional cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, trehalose) with cryoprotectants in research stage (antifreeze protein Trx-ApAFP752, tetrapeptide Pro-Ala-Gly-Tyr). The materials were performed by the following methods: Raman spectroscopy, differential scanning calorimetry (DSC) and X-ray crystallography (XRD). A Raman peak at 3100 cm^{-1} with the intensity and full width at half maximum FWHM was observed in the Raman spectrum. Water solutions phase transitions were obtained by DSC. X-ray diffraction was used to quantify the magnitude and orientation of crystallites. After application of cryoprotectants the Viability of cells was determined by flow cytometry. In this work the most effective cryoprotectant is dimethyl sulfoxide with the smallest diameter of crystallites discovered by XRD. Trehalose forms clusters in water solutions (XRD). Antifreeze protein has the largest thermal hysteresis ($18\text{ }^{\circ}\text{C}$). Tetrapeptide Pro-Ala-Gly-Tyr is the most unknown material. It doesn't disturb crystallizing solution either the shift of the thaw temperature to lower values.

Key words:

Cryopreservation, thermal hysteresis, dimethyl sulfoxide, trehalose, antifreeze protein, PAGY, crystallization

Obsah

Seznam symbolů a zkratek	7
Úvod.....	9
1 Experimentální metody & materiály.....	12
1.1 Materiály	12
1.1.1 Deionizovaná Voda.....	12
1.1.2 Dimethylsulfoxid	15
1.1.3 Trehalóza	16
1.1.4 Trx-ApAFP752	17
1.1.5 Pro-Ala-Gly-Tyr	19
1.2 Metody	20
1.2.1 Průtoková cytometrie	20
1.2.2 Diferenční kompenzační kalorimetrie	21
1.2.3 Ramanova spektroskopie	22
1.2.4 Rentgenová krystalografie	23
1.2.5 Konfokální mikroskopie	24
2 Zkoumané materiály pro kryoprezervaci	25
2.1 Deionizovaná voda.....	25
2.1.1 Viabilita buněk.....	25
2.1.2 DSC.....	25
2.1.3 Ramanova spektroskopie	26
2.1.4 XRD	29
2.2 Dimethylsulfoxid.....	30
2.2.1 Viabilita buněk.....	30
2.2.2 DSC.....	31
2.2.3 Ramanova spektroskopie	33
2.2.4 XRD	37
2.3 Trehalóza	38
2.3.1 Viabilita buněk.....	38
2.3.2 DSC.....	39
2.3.3 Ramanova spektroskopie	40
2.3.4 XRD	44
2.4 Trx-ApAFP752	46

2.4.1	Viabilita buněk	46
2.4.2	DSC	46
2.4.3	Ramanova spektroskopie	48
2.4.4	XRD	50
2.5	Pro-Ala-Gly-Tyr	52
2.5.1	Viabilita buněk	53
2.5.2	DSC	54
2.5.3	Ramanova spektroskopie	55
2.5.4	XRD	56
2.6	Fluorescenční konfokální mikroskopie	58
3	Diskuze	59
	Závěr	64
	Bibliografie	65
	Přílohy	69
	Příloha 1	69

Seznam symbolů a zkratek

Zkratka	Význam	<i>Meaning</i>
AFP	Trx-ApAFP752	<i>Trx-ApAFP752</i>
DI	Deionizovaný	<i>Deionized</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DSC	Diferenční kompenzační kalorimetrie	<i>Differential scanning calorimetry</i>
FTS	Fetální telecí sérum	<i>Fetal bovine serum</i>
FWHM	Pološířka	<i>Full width at half maximum</i>
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	<i>High-performance liquid chromatography</i>
PAGY	Pro-Ala-Gly-Tyr	<i>Pro-Ala-Gly-Tyr</i>
PBS	Fosfátový pufr	<i>Phosphate buffered saline</i>
THA	Termální hystereze	<i>Thermal hysteresis activity</i>
w	Hmotnost	<i>Weight</i>
XRD	Rentgenová krystalografie	<i>X-ray crystallography</i>

Úvod

Zájem o efektivní bio-prezervační metody v medicínské společnosti roste společně s pokroky v transplantaci a transfuzní medicíně [1]. V reprodukční medicíně se stala kryoprezervovaná pre-implantační embrya nedílnou složkou celkové pacientské péče, zvláště s rostoucí úspěšností získávání oocytů [2]. Kryoprezervace oocytů se stává velmi důležitou v důsledku legálních restrikcí na tvorbu a transplantaci nadbytečných pre-implantačních embryí. Etické faktory kryoprezervace pre-implantačních embryí jsou také velmi významnou záležitostí [3].

Kryoprezervace je moderní a efektivní metoda uchování genetických zdrojů po prakticky neomezenou dobu. Podmínkou použití této metody je úspěšný převod materiálu z kultivačních podmínek do tekutého dusíku a zpět bez výrazného poškození.

Úspěšnost přežití cyklu mražení/tání embrií se pohybuje na hranici 75% [2]. Tato vysoká úspěšnost byla dosažena celou řadou kryoprezervačních metod využívající ověřené kryoprotektanty. Příkladem problému by mohli být oocyty (neoplodněná vajíčka), která cyklus mražení/tání úspěšně přežívají, ale jejich následné oplodnění se nedáří. Cílem je nalézt nové kryoprotektanty, které ochrání buňku, aby přežily cyklus mražení/tání s maximální úspěšností a porovnat je s konvenčními kryoprotektanty.

Kryoprotekce působí dvěma způsoby. Buď má vliv na fázový přechod roztoku, nebo obalí membránu buňky a chrání ji před mechanickým poškozením krystaly z extracelulárního prostoru. Z hlediska vlivu na fázový přechod, resp. vznik krystalické fáze roztoku můžeme kryoprezervační materiály rozdělit do dvou tříd látek. V první třídě je například dimethylsulfoxid (DMSO), trehalóza, či sacharóza, které upravují termodynamiku procesu mražení. Materiály z druhé třídy, jako jsou například antifreeze proteiny (AFP), mají jiný účinek. Dokáží se navázat na rostoucí krystal ledu a zamezit dalšímu růstu.

Tato práce má za cíl vyzkoumat vybrané kryoprotektanty, vypsané v tab. 1, tetrapeptid Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY), antifreeze protein Trx-ApAFP752 (AFP) a porovnat je s konvenčními materiály - dimethyl sulfoxidem (DMSO) a trehalózou.

DMSO, a trehalóza jsou obecně známé a popsané látky s kryoprotekčními vlastnostmi. Při použití tetrapeptidu PAGY izolovaného z kůže jesetera amurského, bylo hlavní motivací uchování přirozených vlastností rybího masa, po jeho zamrazení a následném rozmrazení,

již bylo popsáno v [4]. PAGY bylo studováno zejména jako materiál s antioxidačními vlastnostmi a kryoprotektivní účinky, které byly prokázány.

Antifreeze protein AFP 752 byl izolován z pouštního brouka *Anatolica polita*. U tohoto proteinu je popsána velká termální hystereze a zajímavé kryoprotektivní vlastnosti [22,23]. Podrobnější popis materiálů naleznete v kapitole *Experimentální metody & materiály*.

Tab. 1 Vybrané kryoprotektivní látky

Kryoprotektivum
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Disacharid trehalóza
Antifreeze protein Trx-ApAPF752 (AFP)
Tetrapeptid Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY)

Biologické účinky mražení závisí na krystalizaci vody, která má za následek změny koncentrací látek rozpuštěných v cytoplazmě. Se snižující se teplotou rostou krystaly ledu a koncentrace rozpuštěných látek stoupá. Zvýšená koncentrace může být pro buňky zhoubná. Proto bylo nejprve nutné nové kryoprotectoranty a směsi kryoprotectorantů podrobit cytotoxicckým testům. V této práci je popsána viabilita buněk vybraných materiálů po otestování.

Primárním důsledkem poškození buněk jsou krystaly vody, které propichnou či jiným způsobem poničí buňku přímým mechanickým poškozením. V této práci je popsán vliv vybraných materiálů na stavbu ledu. Zvláště byly studovány termodynamické vlastnosti kryoprotectorantů. Ty jsou vysvětleny jak teoreticky, tak prakticky použitím diferenční skenovací kalorimetrie (DSC). DSC, byly studovány fázové přechody materiálů prvního řádu, mražené rychlostí $-1\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Sledovány byly zejména významné pásy krystalizace/tání vody.

Změny na molekulární úrovni na pomezí fázových přechodů byly měřeny Ramanovou spektroskopii. Spektra látek obtížně měřitelná na Ramanově spektroskopii, kvůli vysoké luminiscenci byla změřena na infračervené spektroskopii, což je metoda měření komplementární s Ramanovou spektroskopii. Metody vibrační spektroskopie umožňují studovat biologické látky v jejich přirozeném prostředí, tedy ve vodných roztocích. Sledovat můžeme změny struktury vyvolané změnou fyzikálně-chemických parametrů například dynamiku strukturních přechodů a to jak při pokojové teplotě, tak při teplotě kapalného dusíku. Rychlosť mražení byla stanovena na $-2\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Látky byly měřeny v základním

stavu, a následně v různě koncentrovaných roztocích, respektujících cytotoxicitu. Ramanovou spektroskopí byly sledovány zejména pásy OH, tedy pásy vody 3222, 3433, 3617 cm^{-1} a pásy ledu 3102, 3225, 3005, 3338, 3414 cm^{-1} při -170°C .

Jako nejlepší metoda studia kryoprotektantů v buňkách se ukázala fluorescenční mikroskopie a nikoli Ramanova spektroskopie. Výsledky fluorescenční mikroskopie na kryoprezervovaných buňkách byly získány v Biofyzikálním ústavu AV ČR (Dr. M. Falk) a jsou použity v práci. Ramanovou spektroskopí byly sledovány pouze fyzikální vlastnosti kryoprotekčních materiálů.

Metodou rentgenové krystalografie (XRD) byla popsána struktura a rozložení kryoprotektantů v roztoku. Výsledky z XRD byly doplněny o výsledky z Ramanovy spektroskopie, DSC a přehledně porovnány.

Práce byla realizována ve Fyzikálním ústavu AV ČR v.v.i.

Tato práce je organizována v následujícím pořadí:

V Kapitole 1 *Experimentální metody & materiály* jsou uvedeny základní metody a zařízení použité během experimentu, základní vlastnosti nových materiálů a jejich syntéza.

V Kapitole 2 *Zkoumané materiály pro kryoprezervaci* jsou výsledky měření všech metod a materiálů.

Kapitola 3 je věnována *diskuzi*.

Závěr shrnuje výsledky této práce porovnání materiálů a budoucnost.

1 Experimentální metody & materiály

1.1 Materiály

1.1.1 Deionizovaná Voda

Tab. 2 Vlastnosti vody

Systematický název	Oxidan
Triviální název	Voda
Zkrácený název	
Funkční vzorec	H_2O
Sumární vzorec	H_2O
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost ($g \cdot mol^{-1}$)	18,02
Hustota ($g \cdot cm^{-3}$)	0,998
Teplota tání ($^{\circ}C$)	0
Teplota varu ($^{\circ}C$)	100
Rozpustnost ve vodě	Mísitelný
Skupenství ($21^{\circ}C$, 101 kPa)	Kapalina
Vzhled	Bezbarvá kapalina

Deionizovaná (DI) voda byla přečištěná Milli-Q Plus systémem (Millipore) o rezistivitě 18.2 MΩ·cm ($25^{\circ}C$).

1.1.1.1 Krystalizace vody

Voda je nejrozšířenější sloučeninou nezbytnou pro veškerý život na Zemi. Za standardních podmínek je bezbarvou kapalinou bez zápachu s teplotou tuhnutí $0^{\circ}C$. Voda je natolik spjata s naším životem, že bývá považována za typickou kapalinu. Ve skutečnosti je ale tak málo typická, jak jen si lze představit. Její specifické vlastnosti jsou dány vodíkovými vazbami mezi jednotlivými molekulami. Voda má vysokou měrnou tepelnou kapacitu, velké povrchové napětí. Nejznámější podivností je však anomálie vody - voda má maximální hustotu při teplotě $4^{\circ}C$ a hustota kapalné vody je vyšší nežli hustota ledu. Při teplotě $4^{\circ}C$ se voda rozpíná, ať už ji zahříváme (což je obvyklé), nebo ochlazujeme (což je neobvyklé, anomální). Ke krystalizaci vody ovšem dochází na různých defektech, jako jsou například

prachové částice. Mimořádně čistou vodu můžeme proto ochladit i na nižší teploty: ani za amatérských podmínek není těžké destilovanou vodu zchladit přibližně na -15°C . Voda se nachází ve stavu podchlazené kapaliny a malý podnět pak vede k rychlé krystalizaci. Podchlazenou kapalinu o teplotě nižší než -38°C se nám z vody (za normálního tlaku) připravit nepodaří. Pod touto teplotou (teplotou homogenní nukleace) vytvoříme vždy led anebo, při rychlém zchlazení, nekrystalickou pevnou vodu, „sklo“ [7].

Vznik skla se nazývá vitrifikace. Na molekulární úrovni je tento proces spojen se ztrátou rotačních a translačních stupňů volnosti, za zachování pouze vazebních vibrací uvnitř pevné molekulární struktury. Tepelná roztažnost, tepelná kapacita a stlačitelnost klesají na podobné hodnoty, jaké odpovídají krystalu. Ve vitrifikovaném vzorku dochází pouze k velmi pomalým lokálním pohybům molekul, které vedou k utlumení biologických funkcí buňky. Procesem vitrifikace je zabráněno intracelulární krystalizaci vody, jež vede k poškození buněčné tkáně. Zeskelnatění se v přírodě dosahuje již při vyšších teplotách pomocí kryoprotectorů [8].

Voda krystalizuje nejčastěji v hexagonální soustavě, která je stabilní pro širokou škálu teplot. Důvodem je lomený tvar molekuly vody s úhlem $104,95^{\circ}$. Molekuly se uspořádávají do šestiúhelníkového tvaru tak, že na jednu molekulu vody se vážou celkem čtyři další. Vznikají tak volné prostory ve struktuře krystalu a jeho uspořádání je rozvolněnější než v kapalném stavu. To je důvodem menší objemové hustoty ledu oproti kapalné vodě[7].

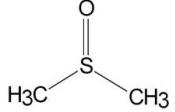
1.1.1.2 Krystalizace vody v biologických systémech

Všechny živé organismy obsahují až devadesát procent vody. Její krystalizace však může poškodit buňky, čímž nedojde k opětovnému obnovení životaschopnosti uchovávaného materiálu po jeho rozmrazení. Při zmrazování živých tkání dochází v první řadě ke krystalizaci extracelulární tekutiny. V důsledku vzniku krystalů vody se koncentrace cytosolu zvyšuje, čímž vzniká osmotický gradient mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem. Tento gradient se buňka snaží vyrovnat vypuzováním vody do okolí. Důsledkem extracelulární krystalizace je tedy buněčná dehydratace, která způsobuje strukturní změny buněčné membrány. Membrána tak ztrácí základní biologické funkce a buňka umírá. Intracelulární krystalizace vede bezprostředně k poškození buňky. Cytoplasma, nacházející se uvnitř buněk, obsahuje nejen vodu, ale i velké množství vysokomolekulárních látek, které se hůře uspořádávají do krystalické mřížky, ale snadněji vitrifikují. Pokud je rychlosť chlazení příliš vysoká, nestihne se zvýšit koncentrace intracelulárního roztoku prostupem

vody do extracelulárního matrixu. Důsledkem je vznik krystalů uvnitř buňky. Ty vyvíjejí nadměrné napětí na buněčnou membránu a mění tak její strukturu. To má za následek opět ztrátu biologických funkcí membrány.

1.1.2 Dimethylsulfoxid

Tab. 3 Vlastnosti Dimethylsulfoxidu [12]

Systematický název	Dimethylsulfoxid
Triviální název	
Zkrácený název	DMSO
Funkční vzorec	$(\text{CH}_3)_2\text{SO}$
Sumární vzorec	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	78,13
Hustota ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	1,1004
Teplota tání ($^{\circ}\text{C}$)	19
Teplota varu ($^{\circ}\text{C}$)	189
Rozpustnost ve vodě	Mísitelný
Skupenství ($21\ ^{\circ}\text{C}$, 101 kPa)	Kapalina
Vzhled	Bezbarvá viskózní kapalina

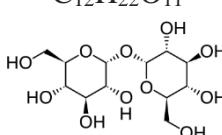
Dimethylsulfoxid (DMSO) bylo zakoupeno od firmy Sigma-Aldrich, čistota 99,9 %. Tab. 4 uvádí použité roztoky DMSO.

Tab. 4 Použité roztoky DMSO

15 % (w/w) DMSO v DI vodě
10 % (w/w) DMSO v DI vodě
5 % (w/w) DMSO v DI vodě
2,5 % (w/w) DMSO v DI vodě

1.1.3 Trehalóza

Tab. 5 Vlastnosti trehalózy

Systematický název	Trehalóza
Triviální název	
Zkrácený název	
Funkční vzorec	
Sumární vzorec	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁
Strukturní vzorec	
Molární hmotnost (g·mol ⁻¹)	342,296
Hustota (g·cm ⁻³)	1,58
Teplota tání (°C)	203
Teplota varu (°C)	
Rozpustnost (w/w g na 100g vody)	68,9
Skupenství (21 °C, 101 kPa)	Pevné
Vzhled	Bílá krystalická látka

Trehalóza 2H₂O je běžně dostupný sacharid zakoupený od firmy Sigma-Aldrich, čistota min 99 %. Tab. 6 uvádí použité roztoky trehalózy.

Tab. 6 Použité roztoky trehalózy

41 % (w/w) Trehalóza v DI vodě
20 % (w/w) Trehalóza v DI vodě
10 % (w/w) Trehalóza v DI vodě
5 % (w/w) (150 mM) Trehalóza v DI vodě
3.3 % (w/w) (100 mM) Trehalóza v DI vodě
1.7 % (w/w) (50 mM) Trehalóza v DI vodě

1.1.4 Trx-ApAFP752

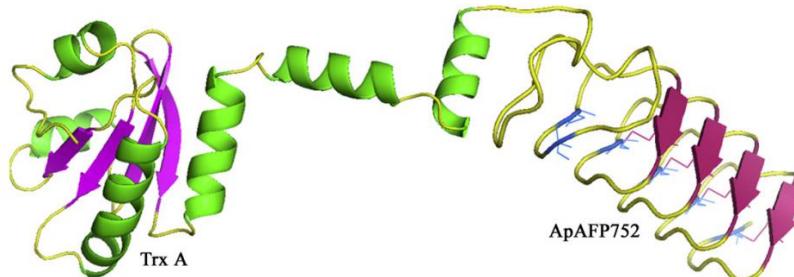
Tab. 7 Vlastnosti AFP

Systematický název	Trx-ApAFP752
Triviální název	
Zkrácený název	
Funkční vzorec	Viz tab. 8
Sumární vzorec	C ₂₃₈₀ H ₃₉₆₉ N ₇₉₃ O ₉₈₅ S ₁₉₀
Strukturní vzorec	Viz obr. 1
Molární hmotnost (g·mol ⁻¹)	65545.41
Hustota (g·cm ⁻³)	
Teplota tání (°C)	
Teplota varu (°C)	
Rozpustnost (w/w g na 100g vody)	Ano
Skupenství (21 °C, 101 kPa)	Pevné
Vzhled	Bílá krystalická látka

Antifreeze protein Trx-ApAFP752 (AFP) byl izolován z *Escherichia coli* v Department of Chemistry, University of Wyoming, 1000 E. University Ave Laramie, WY 82071, USA. Podrobnější informace o izolaci naleznete v příloze č. 1. Tab. 8 ukazuje strukturu proteinu. Na obr. 1 je 3D ribbon backbone diagram strukturního modelu Trx-ApAFP752 proteinu i s navázanou částí theridoxinu pro ilustraci.

Tab. 8 Struktura Trx-ApAFP752. Samotný antifreeze protein je vyznačen červeně

<pre> ATGAGCGATAAAATTATTCACCTGACTGACGACAGTTTGACACGGATGTACTCAAAGCGGA CGGGGCATCCTCGTCGATTCCTGGGAGAGTGGTGCAGCTGCAAAATGATGCCCGA TTCTGGATGAAATCGCTGACGAATATCAGGGCAAACGTGACCGTTGCAAAACTGAACATCGAT CAAAACCCCTGGCACTGCGCCGAAATATGGCATCCGTGGTATCCGACTCTGCTGCTGTTCAAA AACGGTGAAGTGGCGCAACCAAAGTGGGTGACTGTCTAAAGGTAGTTGAAAGAGTTCC CGACGCTAACCTGGCGGGTCTGGTCTGGCATATGCACCATCATCATCATCATTCTTCTGG TCTGGTGCACCGCGTTCTGGTATGAAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTGAAACGCCAGCACA TGGACAGCCCAGATCTGAAAACCTGTATTTCAGGGCGCCATGGCTGATATCGGATCCGAG TGTTATTGCCAATGCACTGGGGTGATTGTTAGTTGTATGGCAGAATGCACCAATTGTGGC AACTGTCGAAATGCGAGAACGTGTACCGATTCTCAATATTGCAATAATGCGATGACATGTAC TAGATCGACCGACTGTTTAATGCCATTACGTGTATTGATTGACCAACTGTTACAAAGCTAC AACATGCATCAATTCAACAGGATGTCCAAAACATAAAGTTGTTAAAAAAATAACTCGAGCACC ACCACCAACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCCGAAAGG </pre> <hr/> <pre> M S D K I I H L T D D S F D T D V L K A D G A I L V D F W A E W C G P C K M I A P I L D E I A D E Y Q G K L T V A K L N I D Q N P G T A P K Y G I R G I P T L L L F K N G E V A A T K V G A L S K G Q L K E F L D A N L A G S G S G H M H H H H H H S S G L V P R G S G M K E T A A A K F E R Q H M D S P D L E N L Y F Q G A M A D I G S E C Y C Q C T G V D C F S C M A E C T N C G N C R N A R T C T D S Q Y C N N A M T C T R S T D C F N A I T C I D S T N C Y K A T T C I N S T G C P K H K V V K K Stop L E H H H H H Stop D P A A N K A R K </pre> <hr/>	
Theridoxin	ApAFP752
BGIII cutsite	XHOI cute site
Sekvence pro TEV cutsite	Tag pro Theridoxin



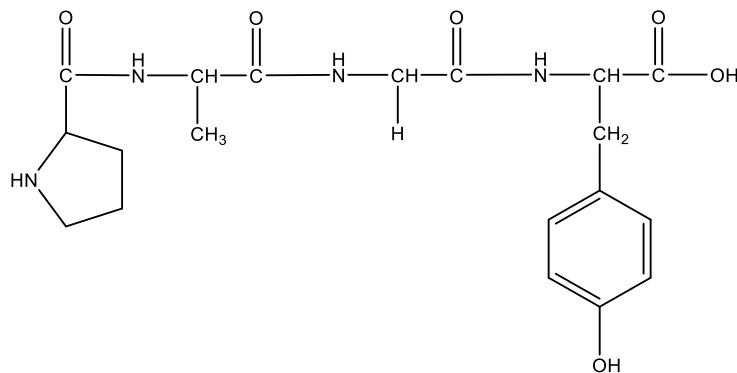
Obr. 1 Ribbon backbone diagram strukturního modelu Trx-ApAFP752 [33]

V této práci je použit pouze jeden roztok AFP – 1 % (w/w) Trx-ApAFP752. Protein je ve fosfátovém pufru obsahující 50mM NaCl. Tato sůl způsobí hydrohality ve spektrech, které budou prokázány Ramanovou spekroskopíí.

1.1.5 Pro-Ala-Gly-Tyr

Tab. 9 Vlastnosti PAGY

Systematický název	Pro-Ala-Gly-Tyr
Triviální název	
Zkrácený název	PAGY
Funkční vzorec	
Sumární vzorec	C ₁₉ H ₂₆ N ₄ O ₆
Strukturní vzorec	Obr. 2
Molární hmotnost (g·mol ⁻¹)	406,433
Hustota (g·cm ⁻³)	
Teplota tání (°C)	
Teplota varu (°C)	
Rozpustnost (w/w g na 100g vody)	Ano
Skupenství (21 °C, 101 kPa)	Pevné
Vzhled	Bílá krystalická látka



Obr. 2 Strukturní vzorec PAGY

Tetrapeptid Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY) byl připraven syntézou na pevné fázi, standardní Fmoc / OtBu strategií. Surový produkt byl izolován HPLC chromatografií (Waters 600 HPLC instrument) na reverzibilní fázi C18 (column Waters Symmetry 300, 19x150 mm, 5 um). Identifikace peptidu a jeho čistota byla potvrzena hmotnostní spektrometrií, technikou elektrospray ionizace (MS / ESI).

V této práci je použit pouze jeden roztok tetrapeptidu – 5 mg·ml⁻¹ PAGY v DI vodě.

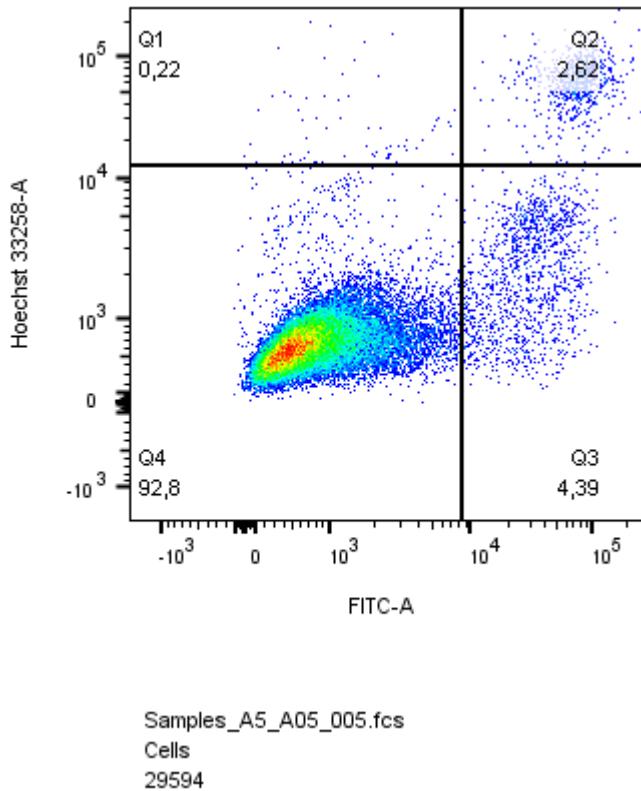
1.2 Metody

1.2.1 Průtoková cytometrie

Cytotoxicita a kryoprotektivní funkce testovaných látek byla testována na buněčné linii YAC1 (myší T lymfom). Buňky byly pěstovány v H-MEMd médiu doplněném 10% FTS (fetální telecí sérum) a standardními antibiotiky při 37 °C a 5 % CO₂. Pro experiment byly buňky resuspendovány v médiu obsahujícím testované látky v příslušné hmotnostní koncentraci. Koncentrace byla $1 \cdot 10^6$ buněk·ml⁻¹. Buňky byly inkubovány 20 minut při pokojové teplotě a následně byla stanovena cytotoxicita, nebo byly vzorky zmrazeny na 24h při -80 °C, není-li uvedeno jinak.

Pro měření viability před/po zmrazení byla použita průtoková cytometrie a značení apoptotických a nekrotických buněk pomocí Annexin-V a Hoechst33258 (obr. 3). Zmrazené vzorky byly rychle rozmrazeny při 37 °C a další postup se shodoval s postupem pro nezmrazené vzorky. Buňky byly před značením promyty v pufru pro značení Annexinem-V. 100 x ředěný Annexin-V fluorescenčně značený FITC (fluorescein isothiokyanátem) byl přidán k peletu buněk v množství 10 µl·vzorek⁻¹. Vzorky byly inkubovány 15 minut při pokojové teplotě a následně bylo přidáno 100 µl pufru. Ke vzorkům byl přidán Hoechst33258 (10 µl·vzorek⁻¹) a po 5 minutách byly vzorky změřeny pomocí průtokového cytometru (BD LSRII).

Detekce viability (obr. 3) je ovlivněná způsobem vložení kříže. Tolerance je ±5 %.



Obr. 3 Detekce viability buněk. (Q1) Nekrotické buňky. (Q2) Pozdně apoptotické buňky. (Q3) Živé buňky.
(Q4) Časně apoptotické buňky

Annixin 5-FITC (osa X) značí apoptotické buňky (váže se na fosfatidylserin v membráně, který je ve vnějším listu (a tedy dostupný ke značení) přítomen pouze u apoptotických buněk). Hoechst 33258 (osa Y) se váže na DNA mrtvých buněk (živé buněky ho vyloučí). Buňky lze tedy na základě značení těmito dvěma látkami rozdělit do čtyř skupin. Živé, časně apoptotické (pozitivní v Annixinu-V, negativní v Hoechst33258), pozdně apoptotické (pozitivní v obou znacích) a nekrotické (pozitivní v Hoechst33258, ale negativní v Annixinu-V).

1.2.2 Diferenční kompenzační kalorimetrie

Diferenční kompenzační kalorimetrie (DSC) je metoda, při níž je měřeno uvolněné/spotřebované teplo během relevantního teplotního režimu. Byly měřeny fázové přechody (teploty tání T_m) vodních roztoků DMSO, disacharidu trehalózy a AFP. Diferenční kompenzační kalorimetrie byla provedena na optickém Linkam diferenčním kompenzačním kalorimetru DSC600 s chladícím systémem LNP95. Tento přístroj umí dosáhnout teplot až -196 °C. Experimentální postup pro veškeré zkoumané vzorky obsahoval 2 kola stejných

kalorimetrických měření mražení/tání od pokojové teploty. V prvním kole byla stanovena teplota mrznutí T_f a teplota tání T_m . Rychlosť chlazení byla $-5 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ než dosáhla teploty $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$, zde byl vzorek ponechán se stabilizovat (5 minut) a poté byl zahřán zpět na pokojovou teplotu. Druhé kolo je zaměřené na cyklení mezi T_f a T_m teplotami o tempu chlazení $1 \text{ } ^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ s 10 minutami stabilizace při dosažení teploty $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$. Tato měření přinesla prakticky stejné výsledky ($\pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$ posun).

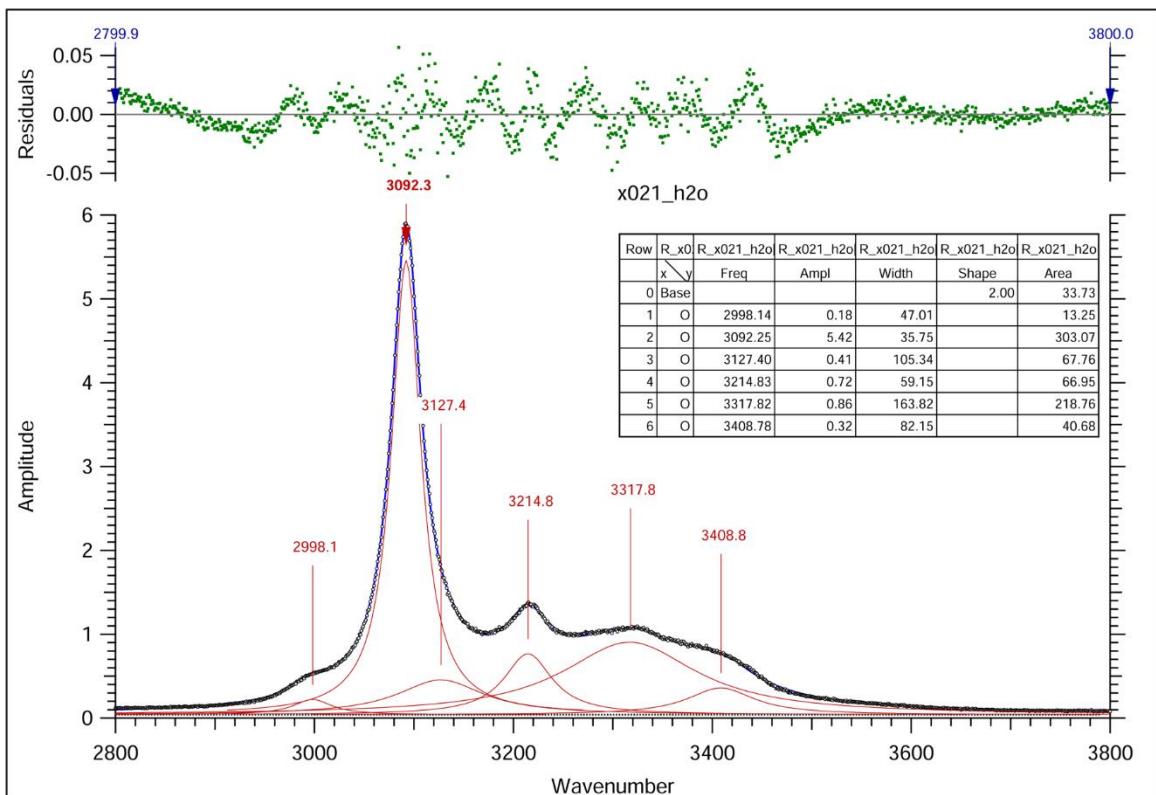
1.2.3 Ramanova spektroskopie

Data pro všechny vzorky byla získána mikrospektroskopem Renishaw RM1000 vybaveným Leica DMLP mikroskopem s objektivem Leica PL FLUOTAR L 50x / 0,55. Excitační vlnová délka laseru byla 488nm (200mW), v případě vzorků AFP a PAGY byl použita vlnová délka laseru 785nm. Teplota během měření byla řízena chladící přístrojem Linkam LNP95. Linkam pracuje s přesností $0,01 \text{ } ^\circ\text{C}$ a umožňuje chlazení vzorků na teplotu $-196 \text{ } ^\circ\text{C}$.

Vzorky ($50 \mu\text{l}$) byly vloženy do chladící komůrky v PerkinElmer hliníkových mističkách. Po zchlazení na teplotu kapalného dusíku, se vzorky staly neprůhlednými. Z toho důvodu jsou spektra nashromážděna z povrchu o odhadované hloubce $5 \mu\text{m}$.

Spektra byla sbírána pomocí software WIRE 2.0. Spektrum bylo kalibrováno použitím $520,5 \text{ cm}^{-1}$ pásu silikonu. Sběr spekter byl standardně stanoven na rozsah $50\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ ramanovského posunu a $5\text{-}10\text{s}$ akumulace. Následné zpracování dat bylo provedeno v MATLABu (odtrážení šumu, normalizace k 3170 cm^{-1} , odečtení baseline) a vizualizace spekter byla uskutečněna v OriginPro 2015, s licencí Fyzikálního ústavu AV ČR.

Data byla nafitována harmonickým oscilátorem (obr. 4), v software IGOR Pro 7.0. U dominantního peaku ledu (3092 cm^{-1}) byla spočtena pološířka (FWHM) peaku (cm^{-1}).



Obr. 4 Fitování harmonickým oscilátorem (zde H₂O)

1.2.4 Rentgenová krystalografie

Měření rentgenové krystalografie (XRD) bylo provedeno s použitím DCS 350 kulové teplotní komůrky od firmy Anton-Paar upevněný na Bruker D8 horizontální difraktometr osazený 12kW měděnou rotační anodou. Každý kapalný vzorek byl vložen do hliníkové kyvety, potažený 5µm Mylar folií a utažený ocelovým prstencem přes folii. Svažek byl kolimován použitím Goebel zrcadla s divergencí okolo 0.02 stupňů v horizontálním směru a 4 stupňů ve vertikálním směru. Pro všechny vzorky, ω - χ mapování bylo vykonáno s předpokladem vzniku šesterečného ledu. Výstupem je mapa intenzit difraktovaných fotonů v závislosti na úhlu. Horizontální osa, úhel ω ; vertikální osa, úhel χ . Šedivá škála je logaritmická a má stejný rozsah pro všechny obrázky. Každá mapa byla měřena 90 minut při konstantní teplotě.

1.2.5 Konfokální mikroskopie

Následující přístrojové vybavení bylo použito na konfokální mikroskopii a získání dat: automatizovaný Leica DM RXA fluorescenční mikroskop (Leica, Wetzlar, Germany) vybavený olejovým imerzním Plan Fluotar objektivem (100 \times /NA1.3) a konfokální skenovací jednotkou s 10a Nipkovovým kotoučem (Yokogawa, Japan). CCD kamera CoolSnap HQ (Photometrix, Tuscon, AZ, USA). Laser Ar/Kr (Innova 70C Spectrum, Coherent, Santa Clara, CA, USA). Automatická expozice, výstupní kontrola kvality obrazu a další procesy byly provedeny s použitím software Aquarium. Expoziční čas a dynamický rozsah kamery (R-G-B) byl nastaven na stejné hodnoty pro všechna podložná sklíčka, aby byly získány kvantitativně porovnatelné obrazy.

2 Zkoumané materiály pro kryoprezervaci

2.1 Deionizovaná voda

Při kryoprezervaci je krystalizace vody hlavní problém. Buňky obsahují 80 % vody a krystaly rostoucí z nukleačních center mají destruktivní dopad na fosfolipidové membrány a jiné intracelulární kompartmenty [9]. Průvodním problémem je zvyšování koncentrace látek (podrobněji popsáno v teoretickém úvodu).

Během pomalého mražení se vytvářejí hlavně krystaly v extracelulárním roztoku a buňky se dehydratují. Při rychlém mražení se vytváření menší krystaly ledu v intracelulárním prostoru.

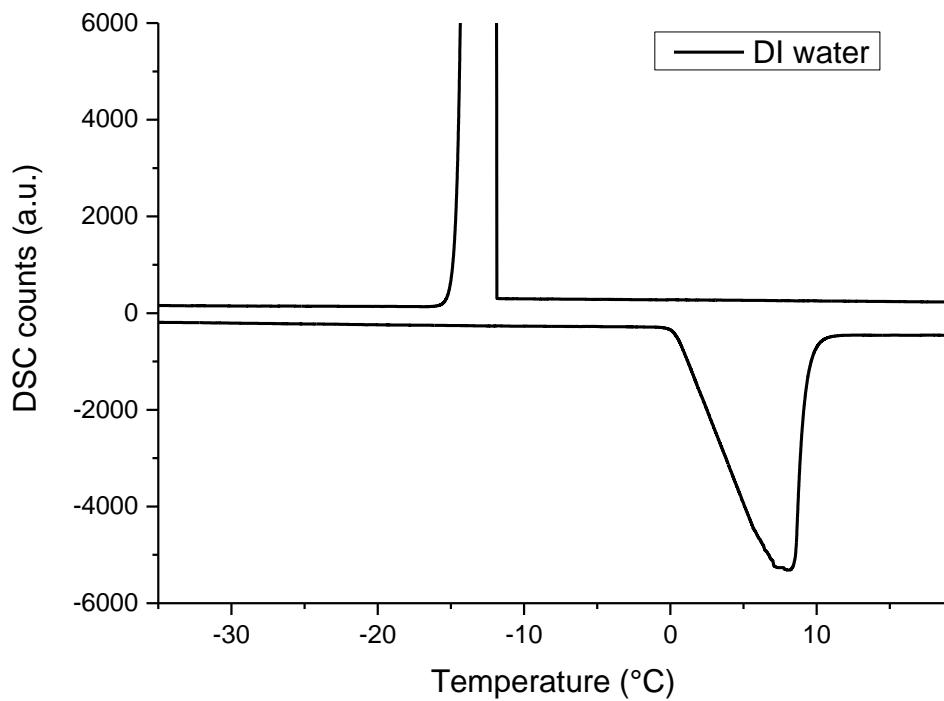
Pro tuto práci je stav vody zcela zásadní. Velikosti krystalů vody a termální vlastnosti vody po aplikaci kryoprotektiv jsou předmětem studia. Voda je dobře popsaná látka, proto zde bude srovnána s popisem vlastností získaných z odborné literatury.

2.1.1 Viabilita buněk

Stanovit viabilitu buněk v čisté deionizované (DI) vodě není třeba. Buňky by podlehly osmotické lýze a rozpadly by se. Buňky byly pěstovány v H-MEMd médiu doplněném 10% FTS a standardními antibiotiky při 37°C a 5% CO₂. K této směsi byla přidána 10% DI voda. Takto připravený vzorek byl použit jako reference přežití buněk bez aplikace kryoprotektiva.

2.1.2 DSC

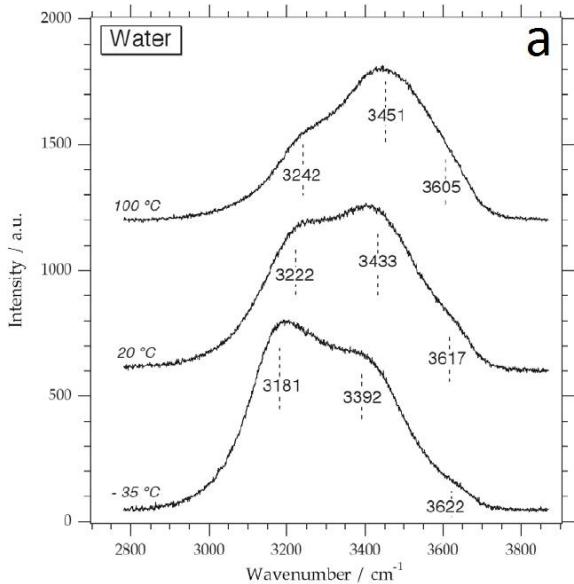
Diferenční kompenzační kalorimetrií (DSC) byly porovnávány roztoky s přidáním a bez přidání kryoprotektiv. DSC křivky mražení a tání DI vody rychlostí 1 K·min⁻¹ jsou prezentovány na obr. 5. Teplota tuhnutí DI vody je -12 °C. Je to důsledek velmi čisté vody, kde je velmi málo nukleačních center. Jakékoli sebemenší znečištění vzorku by teplotu vniku ledu výrazně posunulo k vyšším teplotám. Nejnižší možná superpodchlazená čistá voda je na hranici homogenní nukleace ledu při teplotě -40 °C [10]. Teplota tání DI vody je ovšem na bodě 0 °C, vzniká tedy velká teplotní hystereze.



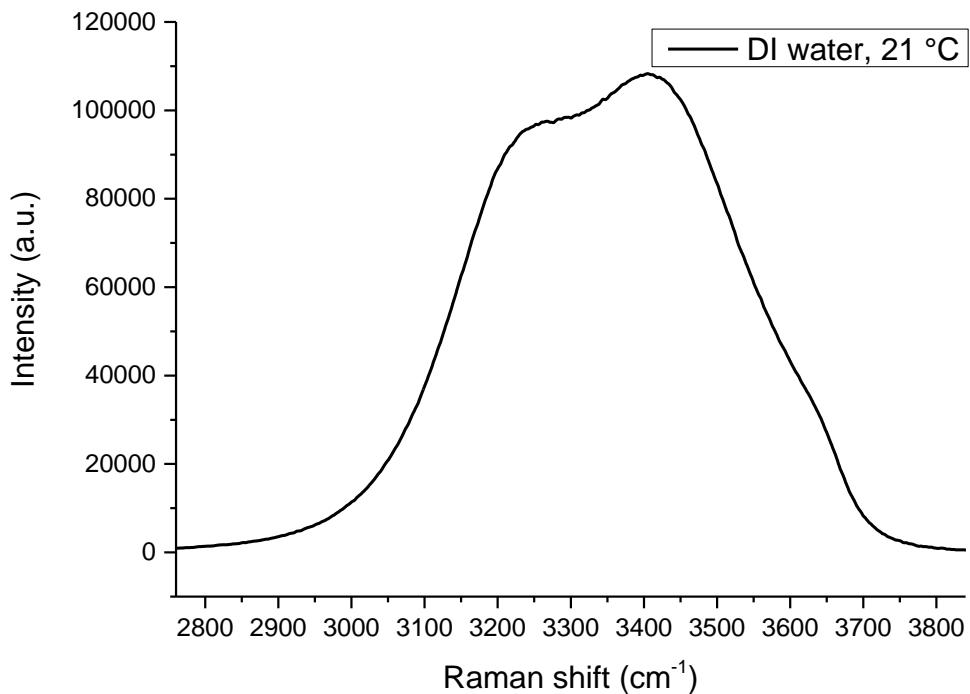
Obr. 5 DSC křivky mražení a tání DI vody rychlosťí $1\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$

2.1.3 Ramanova spektroskopie

V Ramanovském posunu $2800 - 3800\text{ cm}^{-1}$ můžeme sledovat OH vazby. Kvalita Ramanovských spekter je závislá na teplotě a kystalizaci vody. Při nízkých teplotách jsou pásy dobře definovatelné a mají úzké pološírky (FWHM). Při vyšších teplotách se umístění některých peaků posouvá a rozšiřuje. Spektrum vody obsahuje 3 pásy, viz obr. 6, které mění své parametry v závislosti na teplotě. Při $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ jsou pozice peaků na $3222, 3433$ a 3617 cm^{-1} , každý specifický pro stretching vibrace molekul vody. Na obr. 7 je spektrum MilliQ vody naměřené při $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ přístrojem Renishaw RM1000 pro porovnání.



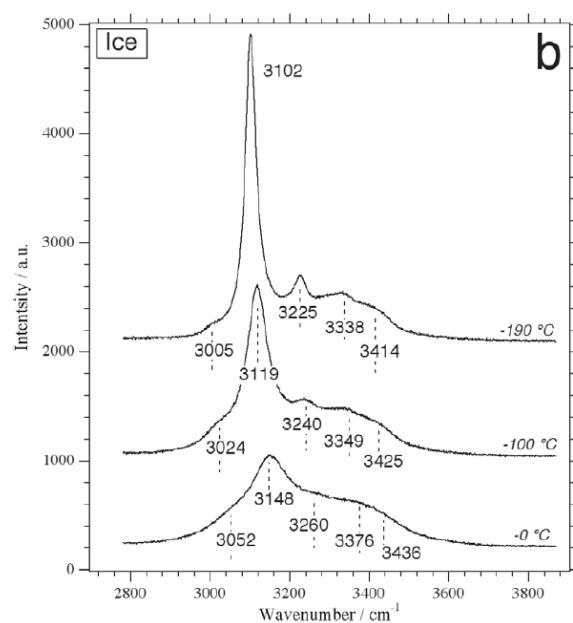
Obr. 6 Ramanovské spektrum vody v pásmu OH vazeb při teplotě -35, 20 a 100 °C [11]



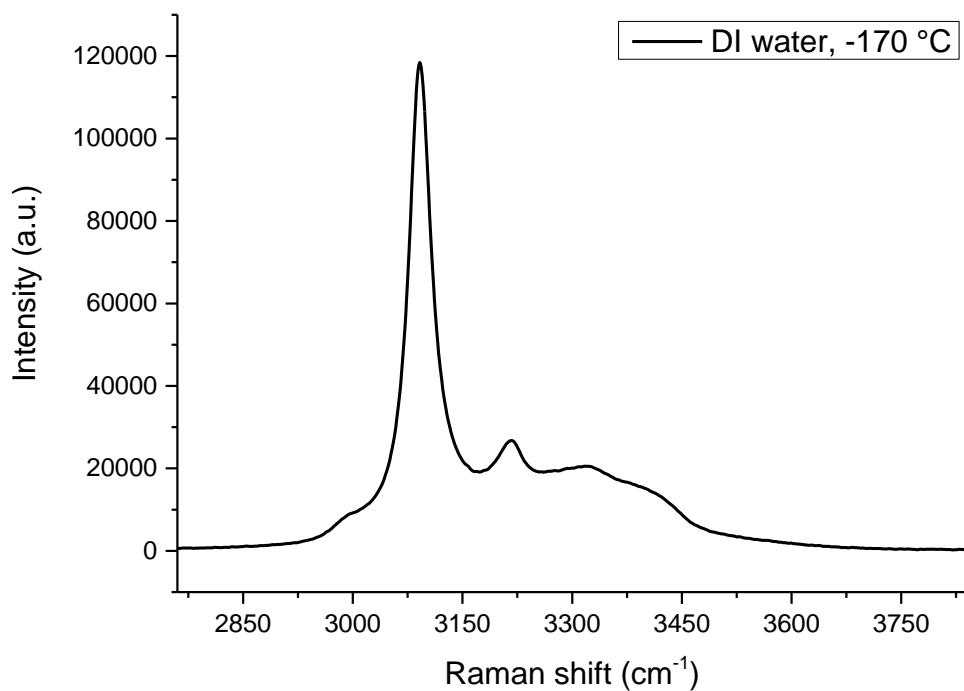
Obr. 7 Ramanovské spektrum MilliQ vody při 21 °C

Led má spektrum významně odlišné od vody s dominantním peakem 3102 cm⁻¹ (obr. 8). Celkové spektrum ledu při -190 °C obsahuje 6 pásů specifických pro OH stretching vibrace ledu. Při -190 °C má led dva dominantní pásy 3102 a 3225 cm⁻¹. Intenzita pásu 3102 cm⁻¹ má vždy faktor 15x vyšší než 3225 cm⁻¹. Krom tohoto, 3 další pásy jsou umístěny na 3005, 3338, and 3414 cm⁻¹. Pás 3255 cm⁻¹, který není zakreslen na obr. 8 má širokou pološířku a

malou intenzitu a způsobuje vzhled kopcovitého pozadí od 3000 do 3500 cm^{-1} . Na obr. 9 je spektrum MilliQ vody naměřené při -170 °C přístrojem Renishaw RM1000 pro porovnání.



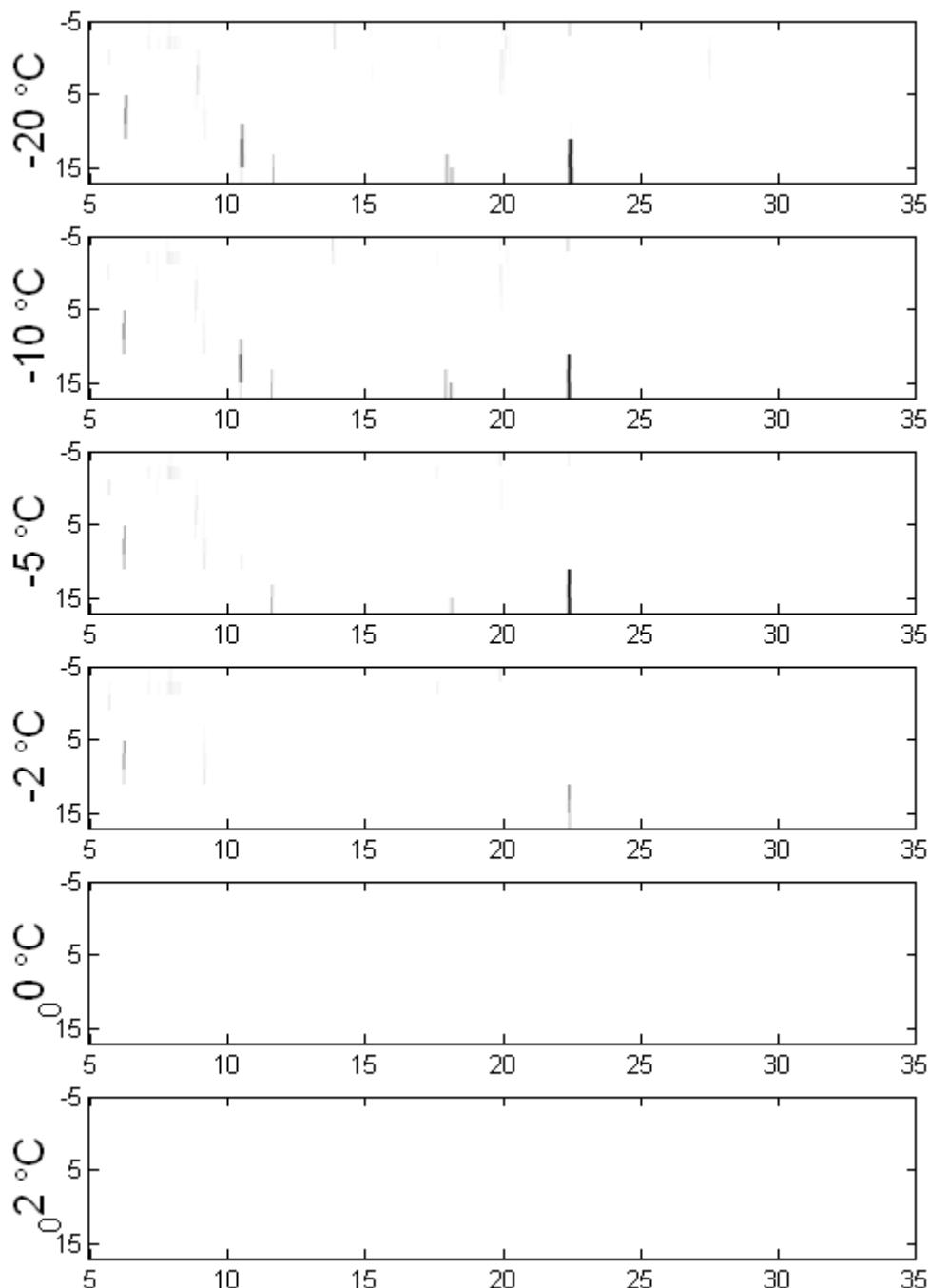
Obr. 8 Ramanovské spektrum vody v pásmu OH vazeb při teplotě 0, -100 a -190 °C [11]



Obr. 9 Ramanovské spektrum MilliQ vody při -170 °C

2.1.4 XRD

Měření rentgenové krystalografie bylo provedeno na zmrzlých vzorcích a výsledky budou porovnány v závěru práce. Čistá voda (obr. 10) má málo velkých krystalů a nejsilnější difraktovanou intenzitu.



Obr. 10 Úhlové závislosti difraktované intenzity čisté vody. Tavící proces (od shora dolů) krystalů vody sledovaný pro linii 110 šesterečné vody. Horizontální osa, úhel ω ; vertikální osa, úhel χ . Šedivá škála je logaritmická a má stejný rozsah pro všechny obrázky

2.2 Dimethylsulfoxid

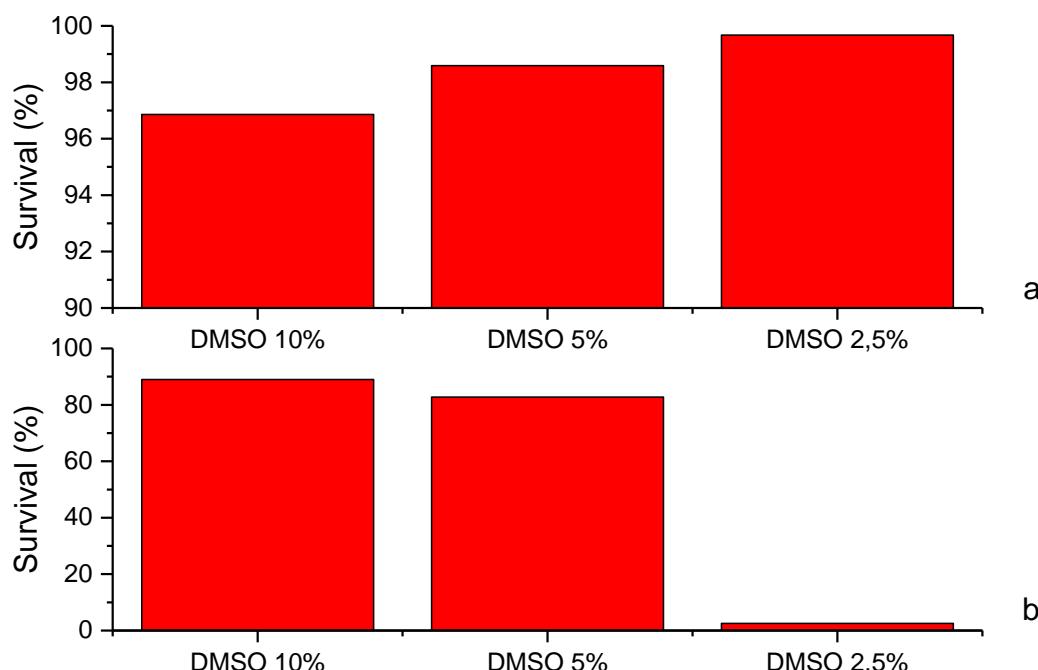
Dimethylsulfoxid (DMSO) je bezbarvá, hydroskopická kapalina, prakticky bez zápachu, nebo s lehkým česnekovým odérem, s nasládlou chutí. Mísitelná s vodou, alkoholy, ethery, benzenem, chloroformem a acetonem [12].

DMSO je běžné kryoprotektivum, v současnosti je nejčastěji součástí kryoprotektivních směsí, například s ethylenglykolem tvoří dobře rozpustitelnou směs, u které bylo dosaženo výborných kryoprotektivních výsledků u embrií. Kryoprotektiva s malou molekulou, jako je tomu u DMSO, jsou obecně výhodnější, rychleji prostupují do buněk a zkracují expoziční dobu. Při rozmražení se DMSO rychle dostává z buněk, buňky mohou rychle nabýt na svém původním objemu a předejít osmotickému poškození [13].

DMSO byl použit jako první konvenční kryoprotektivum pro kryoprezervaci embrií. DMSO unikátně ochraňuje buňky, roztok by však neměl přijít do kontaktu s buňkami při teplotě vyšší než 5 °C. Experimentálně se prokázalo, že expozice touto látkou poškozuje buňky ve stejném míře, ať je zamrazíme, nebo ne [14]. Ve vyšších koncentracích a delších expozičních časech je pro buňky zhoubný, jak je popsáno v kapitole o viabilitě buněk. Proto by se do budoucna měl najít vhodnější kryoprotektant. V této studii poslouží DMSO jako referenční vzorek výborného doposud používaného kryoprotektiva, se kterým srovnáme vybrané potenciální kryoprotektanty.

2.2.1 Viabilita buněk

Přežití buněk po 30 minutové inkubaci v DMSO je patrné z obr. 11. Koncentrace DMSO nižší než 10 w/w% nejsou cytotoxické [15]. Zpracovaná cytotoxicita DMSO po 30 minutové inkubaci potvrzuje apoptotické buňky méně než 4 % (obr. 11a). Úhyn buněk sleduje klesající trend v závislosti na zvyšující se koncentraci DMSO, nejnižší úhyn buněk (0,32 %) je pozorován při koncentraci 2,5w/w% DMSO, nejvyšší (3,14 %) při koncentraci 10w/w% DMSO. Kryoprotektivní vlastnosti materiálu prezentuje obr. 11b Nejlepších kryoprotektivních účinků (89,01 % přežitých buněk) dosáhla koncentrace 10w/w% DMSO, v těsném závěsu (82,76 % přežitých buněk) koncentrace 5w/w% DMSO. Téměř žádné kryoprotektivní účinky nemá koncentrace DMSO nižší než 2,5 w/w% (2,57 % přežitých buněk).



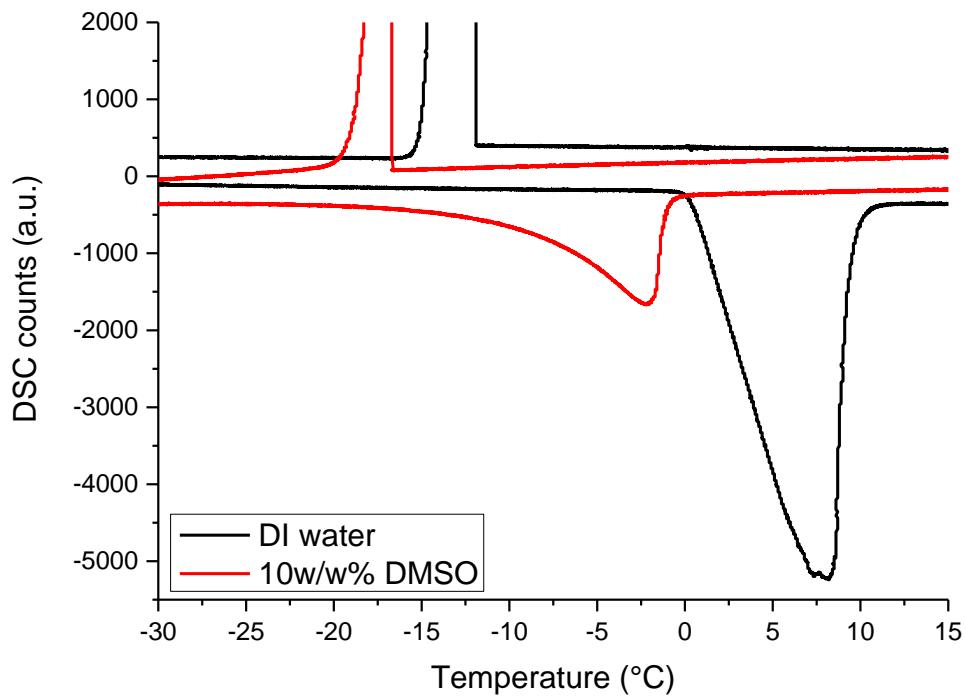
Obr. 11 Cytotoxita DMSO. (a) Porovnání přežití buněk v závislosti koncentrací DMSO po 30 min inkubaci.
 (b) Porovnání přežití buněk v závislosti koncentrací DMSO po cyklu mražení/tání

2.2.2 DSC

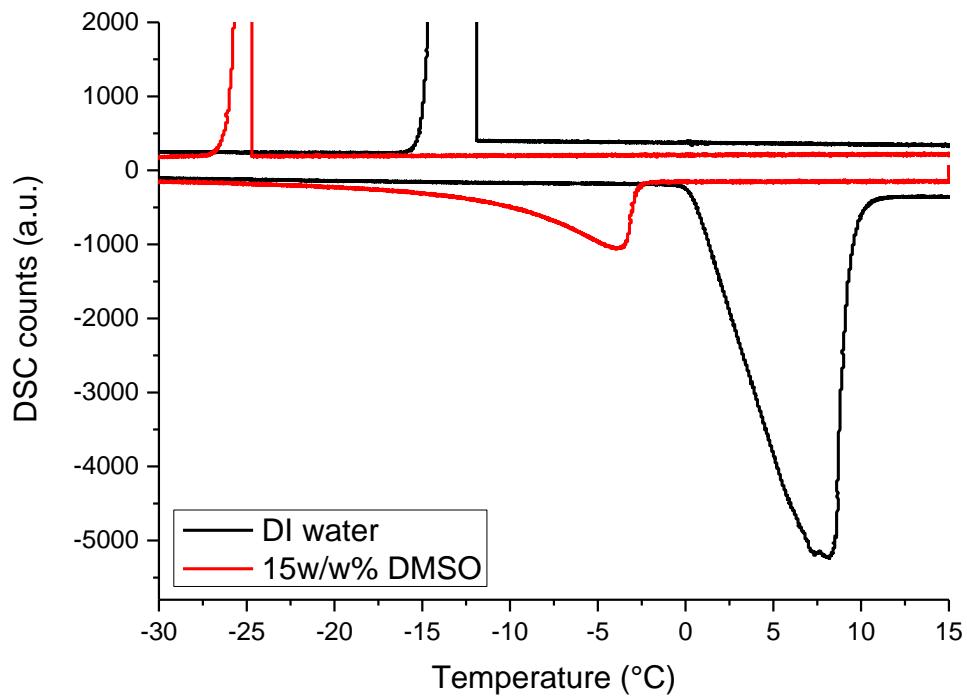
Diferenční kompenzační kalorimetrií (DSC) byly porovnávány roztoky s přidáním a bez přidání kryoprotektiv. Obr. 12 reprezentuje kalorimetrické křivky mražení a tání systému 10w/w% DMSO/DI voda a DI vody rychlosťí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Pouze jeden exotermní přechod tuhnutí ($-16,7^\circ\text{C}$) je pozorován v teplotním rozsahu 20°C až -170°C . Obr. 13 reprezentuje kalorimetrické křivky mražení a tání systému 15w/w% DMSO/DI voda a DI vody rychlosťí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$. Zde je exotermní přechod tuhnutí $-24,7^\circ\text{C}$, eutektická teplota systému DMSO/voda je $-63^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ [16]. Endotermní přechod 10 w/w% DMSO/DI tání je -10°C (obr. 12) a 15 w/w% DMSO/DI je -12°C (obr. 13). V obou případech je zřejmá velká teplotní hystereze. Teploty fázových přechodů roztoků DMSO jsou v tab. 10.

Tab. 10 Tabulka fázových přechodů roztoků DMSO

Roztok	Teplota tuhnutí (°C)	Teplota tání (°C)
15w/w% DMSO v DI vodě	-24,7	-12
10w/w% DMSO v DI vodě	-16,7	-10
DI voda	-12	0



Obr. 12 DSC křivky mražení a tání 10w/w% DMSO v DI vodě a DI vody rychlostí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$



Obr. 13 DSC křivky mražení a tání 15w/w% DMSO v DI vodě a DI vody rychlostí $1\text{ K}\cdot\text{min}^{-1}$

2.2.3 Ramanova spektroskopie

CH stretching pásy DMSO jsou patrné z obr. 14a. Při pokojové teplotě jsou zřejmé dva pásy 2994 a 2913 cm^{-1} , příčinou jsou symetrické, resp. antisymetrické stretching vibrace. FWHM těchto pásů je $9,4$ a $5,4\text{ cm}^{-1}$. Relativní intenzity těchto pásů jsou 32 a 68 \% .

Po zchlazení DMSO na teplotu kapalného dusíku jsou pozorované pásy na 2994 a 2913 cm^{-1} rozděleny na dílčí peaky. Tři antisymetrické pásy jsou na 3001 , 2995 a 2988 cm^{-1} . FWHM těchto pásů je $5,0$, $4,9$ and $4,9\text{ cm}^{-1}$. CH symetrické stretching pásy se při nízké teplotě rozdělí na 3 složky - 2923 , 2909 a 2885 cm^{-1} , FWHM je $4,9$, $4,2$ a $8,0\text{ cm}^{-1}$.

Ve spektru CH antisymetrických stretching pásů, byly pozorovány slabé pásy na 2830 a 2809 cm^{-1} při nízké teplotě. Je pravděpodobné, že tyto peaky jsou způsobené kombinacemi pásů.

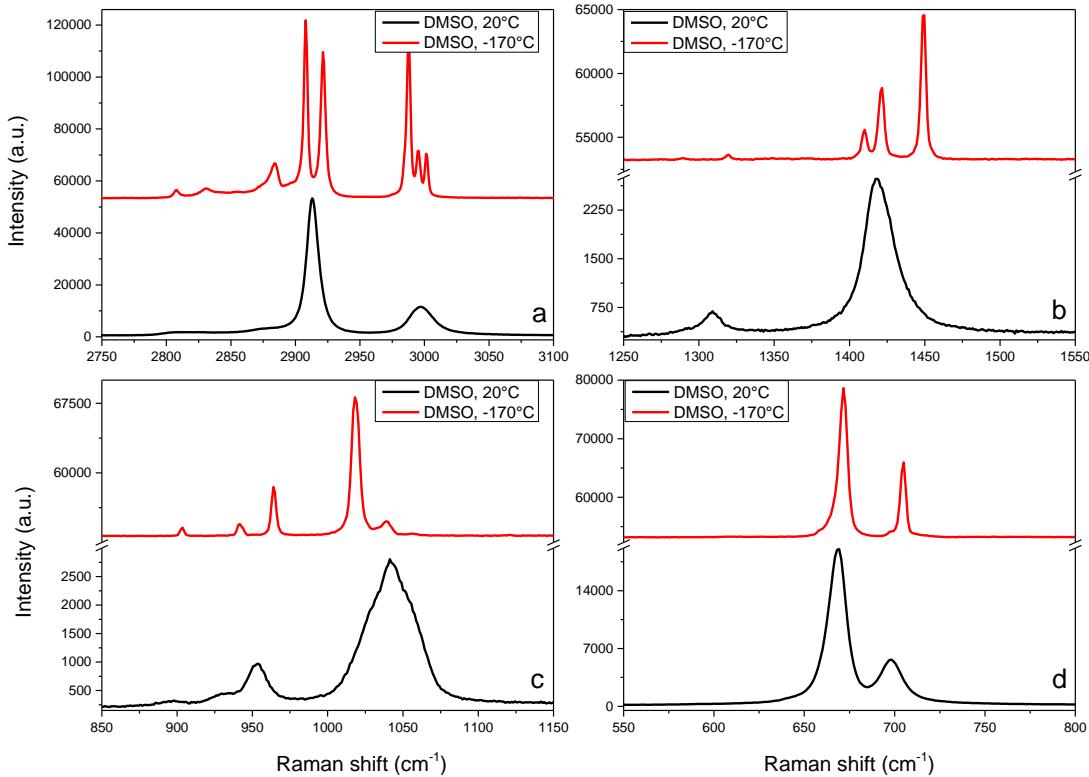
Metylové (CH_3) bending vibrace DMSO jsou patrné z obr. 14b. HCH bending pásy jsou centrované okolo 1426 cm^{-1} . Tento pás je široký a skládá se ze dvou vnitřních peaků na 1426 a 1417 cm^{-1} s pološírkou $21,6$ a $18,7\text{ cm}^{-1}$, poměr relativních intenzit je $2:7$.

Po zmražení jsou tyto pásy rozděleny na 3 komponenty 1450, 1422 a 1410 cm⁻¹ s pološírkou 4.7, 4.5, 5.3 a 6.3 cm⁻¹. Rozdíl mezi spektry při 20 °C a -170 °C je dán rozdílem ve fázi. Pevný DMSO má 3 rozdílné bending pásy, peak na vysokém vlnočtu 1450 cm⁻¹ je připisován CH₃ jednotce, která je momentálně silně vodíkově navázána na SO jednotku. Nízký pás pozorován na 1307 cm⁻¹ se posunul na 1320 cm⁻¹ při teplotě - 170 °C.

SO stretching pásy jsou centrovány okolo 1050 cm⁻¹ (obr. 14c). Pod tímto pásem byly detekovány 3 peaky - 1058, 1042 a 1026 cm⁻¹ s FWHM 19.8, 23.8 a 22.1 cm⁻¹, patří zřejmě nepřiřazeným monomerům. Při nízké teplotě byly pozorovány pásy na 1057, 1038 a 1019 cm⁻¹. Pás 1019 cm⁻¹ je přičítán polymernímu DMSO. Zdá se, že DMSO při -170 °C je silně svázáno vodíkovými vazbami a tvorí polymerní strukturu.

CS stretching pásy jsou centrovány okolo 698 a 667 cm⁻¹ s pološírkami 13.5 a 12.6 cm⁻¹, (obr. 14d). Tyto spektra se při zchlazení na -170 °C posouvají na 705 a 672 cm⁻¹ a mají FWHM 5.2 a 7.2 cm⁻¹. Posun pásku při nižších teplotách není přesně znám, ale vliv přilehlých jednotek musí být při chlazení snížen.

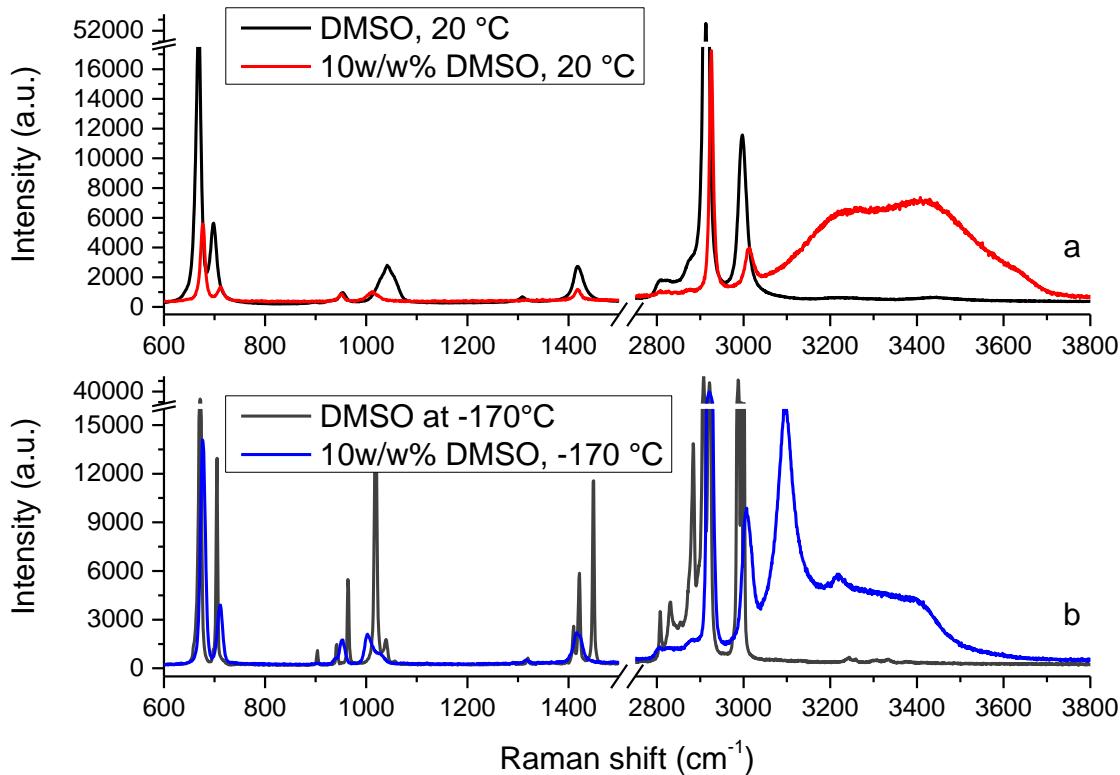
CSC, CSO bending pásy jsou pozorovatelné v pásmu od 300 do 400 cm⁻¹ (obr. 16b). Při pokojové teplotě jsou pozorovatelné pásy při 333 a 382 cm⁻¹ s FWHM 13.1 and 11.3 cm⁻¹ pás na 304 cm⁻¹ je připisován C-S-C vazbě. Při nízkých teplotách se pásky rozdělí na 387, 337, 323 and 315 cm⁻¹. Pás 382 cm⁻¹ se posune na 387 cm⁻¹.



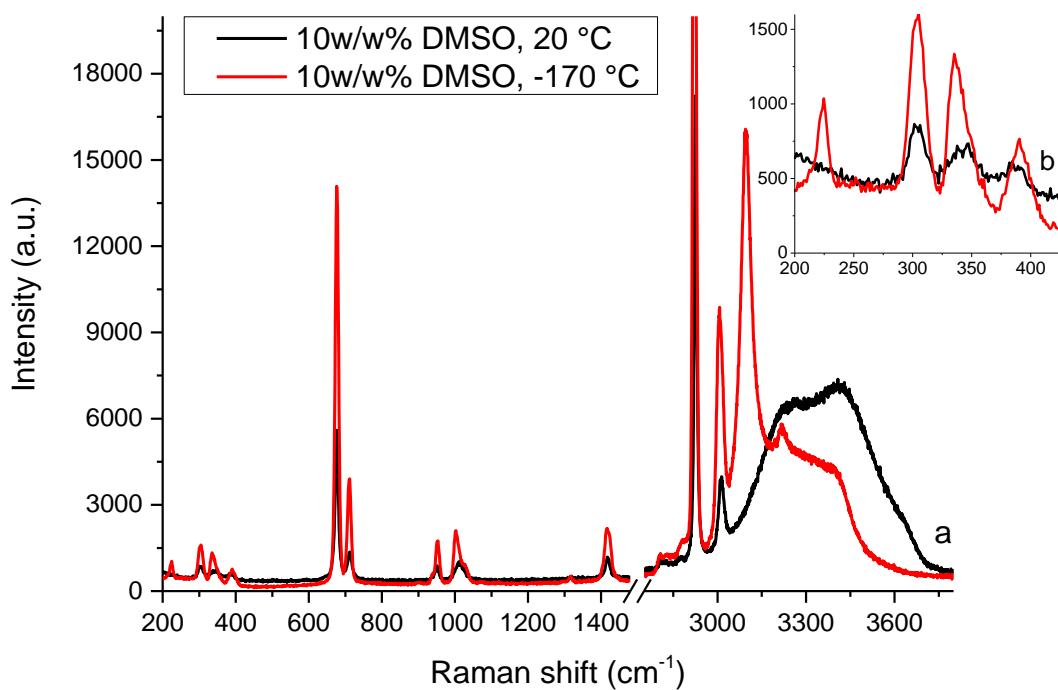
Obr. 14 Ramanovské pásy DMSO při pokojové teplotě a -170 °C. (a) CH stretching pásy. (b) HCH deformační pásy. (c) SO streching pásy. (d) CS stretching pásy

Na obr. 15a jsou porovnány spektra čistého a 10w/w% DMSO při pokojové teplotě. Zajímavý je posun CH pásů čistého DMSO (2994 a 2913 cm⁻¹) na 3011 a 2925 cm⁻¹, dále posun SO pásů (1050 cm⁻¹) na 1011 cm⁻¹ a CS stretching pásů okolo 698 a 667 cm⁻¹ na 711 a 676 cm⁻¹ jen vlivem přidané vody.

Na obr. 15b jsou porovnána spektra čistého a 10w/w% DMSO při -170 °C. Zde je zajímavý posun CS stretching pásů na 705 a 672 cm⁻¹ na 711 a 677 cm⁻¹. Polymerní struktura čistého DMSO při -170 °C je silně ovlivněná vodou. SO vazby na 1019 cm⁻¹ téměř vymizely a posunuly se na 1002 cm⁻¹. Vlivem vody úplně vymizí CH pásy na 2909 a 2885 cm⁻¹ a tři antisymetrické pásy na 3001, 2995 a 2988 cm⁻¹ se slijí v jeden pás na 3007 cm⁻¹. Dominantní peak ledu na 3095 cm⁻¹ má FWHM 36,6 cm⁻¹.



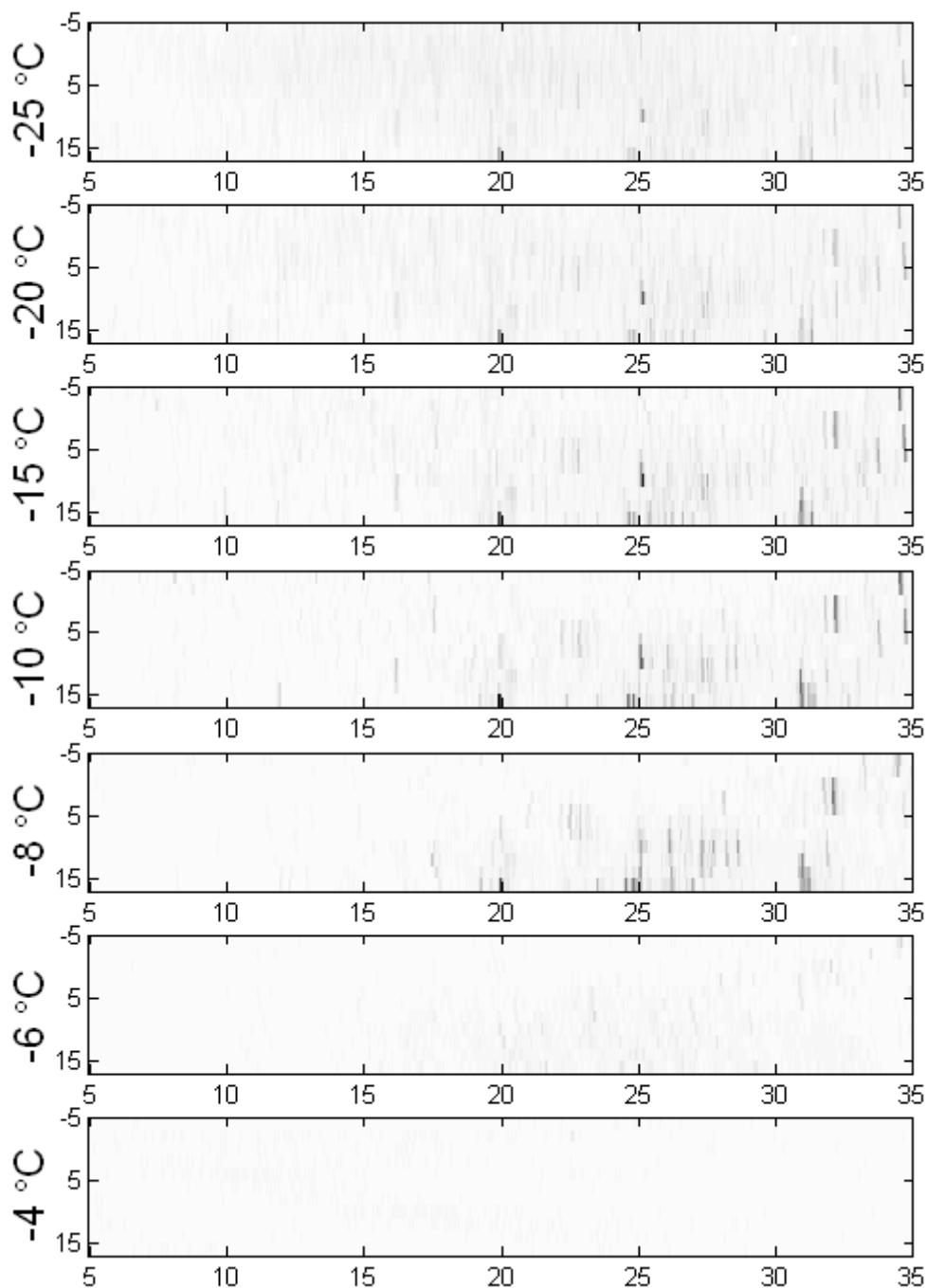
Obr. 15 Ramanovské spektrum DMSO a 10w/w% DMSO v DI vodě při pokojové teplotě a při -170 °C. (a) Porovnání čistého a 10w/w% DMSO při pokojové teplotě. (b) Porovnání čistého a 10w/w% DMSO při -170 °C.



Obr. 16 Ramanovské spektrum 10w/w% DMSO v DI vodě při pokojové teplotě a při -170 °C

2.2.4 XRD

Měření rentgenové krystalografie bylo provedeno na zmrzlých vzorcích a výsledky budou porovnány v závěru práce. Velikosti krytalů se dají porovnat pouze se stejně měřenými vzorky. Proto uvedu srovnání i s ostatními vzorky. 10w/w% DMSO (obr. 17) má nejmenší krystality v poměru ke všem vzorkům (DI voda, AFP, DMSO, trehalóza)



Obr. 17 Úhlové závislosti difraktované intenzity 10w/w% DMSO. Tavící proces (od shora dolů) krytalů vody sledovaný pro linii 110 hexagonální vody. Horizontální osa, úhel ω ; vertikální osa, úhel χ . Šedivá škála je logaritmická a má stejný rozsah pro všechny obrázky

Z posunu sklonu lze usoudit, že velikosti krystalů 10 w/w % DMSO jsou přibližně poloviční velikosti k ostatním vzorkům.

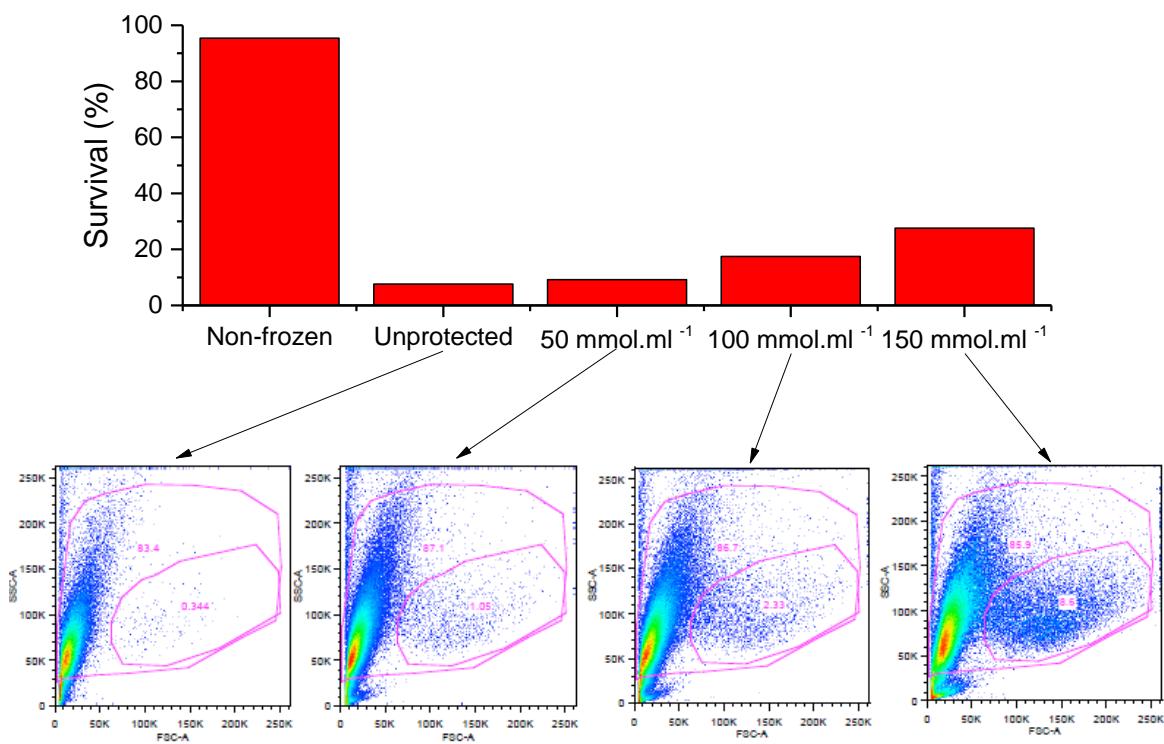
2.3 Trehalóza

Trehalóza je bílý hydroskopický prášek se sladkou chutí, rozpustná ve vodě, ethanolu, benzenu a dimethyletheru.

Bylo prokázáno, že trehalóza je více účinný kryoprotektant než běžně používané kryoprotektanty (sacharóza, matlóza) ke stabilizaci proteinů ve vodním roztoku. Trehalóza pro svou velkou molekulu patří mezi nepronikající kryoprotektiva a její vlastností je osmoticky dehydratovat buňku a tím jí chránit před krystalizací, která by poškodila buněčné membrány. Cukry, tedy i trehalóza (složená z 2 molekul glukózy) jsou obvykle méně toxické, než penetrující kryoprotektiva o stejných koncentracích. Kombinace DMSO a trehalózy byla stanovena jako jedna z nejoptimálnějších kombinací, přesto výsledky nejsou tak dokonalé jako čerstvý nezmrazený vzorek [18]. 50mM trehalóza má výrazně vyšší přežívání kmenových buněk po cyklu mražení/tání než DMSO a mohutnější proliferaci. Zajímavé je, že 200mM trehalóza neměla tak vysoké přežívání kmenových buněk, ale proliferační aktivita přeživších buněk byla znatelně vyšší. Směs DMSO a trehalózy vypadá jako efektivní kryoprotektant [20].

2.3.1 Viabilita buněk

Buňky byly 20 minut inkubovány, následně zmraženy na teplotu -80 °C, po 24h rozmraženy a resuspendovány ve fosfátovém pufru (PBS). Trehalóza je poživatelný sacharid a není toxická, proto se budeme zabývat pouze cytotoxicitou buněk jen po cyklu mražení/tání (obr. 18). Úhyn buněk sleduje klesající trend v závislosti na zvyšující se koncentraci trehalózy. Standardem je přežití buněk, které jsme nezmrazili (95,4 %) a porovnání přežití buněk bez aplikace kryoprotektiva (7,6 %). Nejvyšší úhyn buněk (přežití 9,19 %) je pozorován u buněk s aplikovanou trehalózou o celkové koncentraci 50mmol·ml⁻¹. Nevyšší přežití buněk (27,6 %) je po aplikaci trehalózy o koncentraci 150 mmol·ml⁻¹



Obr. 18 Cytotoxita trehalózy. Porovnání přežití buněk v závislosti koncentraci trehalózy po cyklu mražení/tání

2.3.2 DSC

Diferenční kompenzační kalorimetrií (DSC) byly porovnávány roztoky s přidáním a bez přidání kryoprotektiv. Obr. 19 reprezentuje kalorimetrické křivky mražení a tání systému 41w/w% trehalózy, 10w/w% trehalózy, 3,3w/w% trehalózy a DI vody mražené rychlosťí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$.

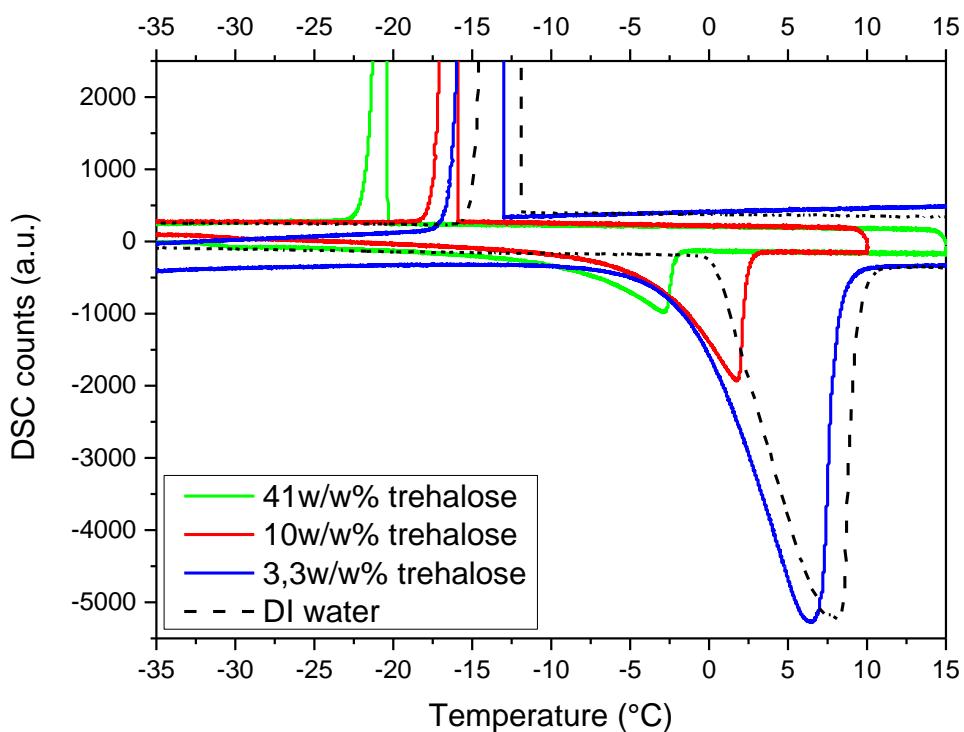
U všech roztoků je pozorován pouze jeden exotermní přechod tuhnutí v teplotním rozsahu 20 až -170 °C. DSC výsledné křivky ukazují, že všechny roztoky obsahující kryoprotector mají posunutý bod mrznutí/tání k nižším hodnotám. Největší posun bodu mrznutí související s koncentrací v roztoku byl pozorován u 41w/w% trehalózy (-20,4 °C). 10w/w% trehalóza má bod tuhnutí -16 °C. 3,3w/w% trehalóza má bod tuhnutí -13,1 °C (tab. 11).

Endotermní přechod (tání) 41w/w% trehalózy je -13 °C, u 10w/w% trehalózy je -5 °C, u 3,3w/w% trehalózy je -1 °C (tab. 11). Ve všech případech je zřejmá velká teplotní hystereze způsobená vlivem trehalózy na růst krystalů. Vzniká amorfni led, který také jednodušeji taje.

Byla nalezena teplota skelné fáze roztoku trehalózy a vody – 38 °C [17].

Tab. 11 Tabulka fázových přechodů roztoků trehalózy

Roztok	Teplota tuhnutí (°C)	Teplota tání (°C)
41w/w% trehalóza v DI vodě	-20,4	-13
10w/w% trehalóza v DI vodě	-16	-5
3,3w/w% trehalóza v DI vodě	-13,1	-1
DI voda	-12	0



Obr. 19 DSC křivky mražení a tání 41w/w% trehalózy, 10w/w% trehalózy, 3,3w/w% trehalózy a DI vody rychlosťí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$

2.3.3 Ramanova spektroskopie

Ramanovská spektra trehalózy kvůli její složitosti nemůžeme popsat stejně dopodrobna jako v případě DMSO. Určité peaky jsou neznámé a jiné bychom mohli jen odhadovat. Ramanovské spektrum má obecně známé části CH a OH vazeb, ale v případě složitých, v našem případě cyklických, látek slouží spektrum jako otisk, podle kterého můžeme látku detektovat.

Nejprve si popíšeme spektrum čisté trehalózy (obr. 20). V pásmu od 3000 do 3600 cm⁻¹ jsou přítomná spektra OH vazeb, peaky v této oblasti jsou způsobeny strukturou trehalózy, která jich obsahuje velké množství. Dále pak tím, že je trehalóza hydroskopická látka a protože měřená látka byla trehalóza 2H₂O. Pozorované dominantní peaky jsou na vlnočtu 3164, 3278, 3346, 3405, 3436 a 3501 cm⁻¹.

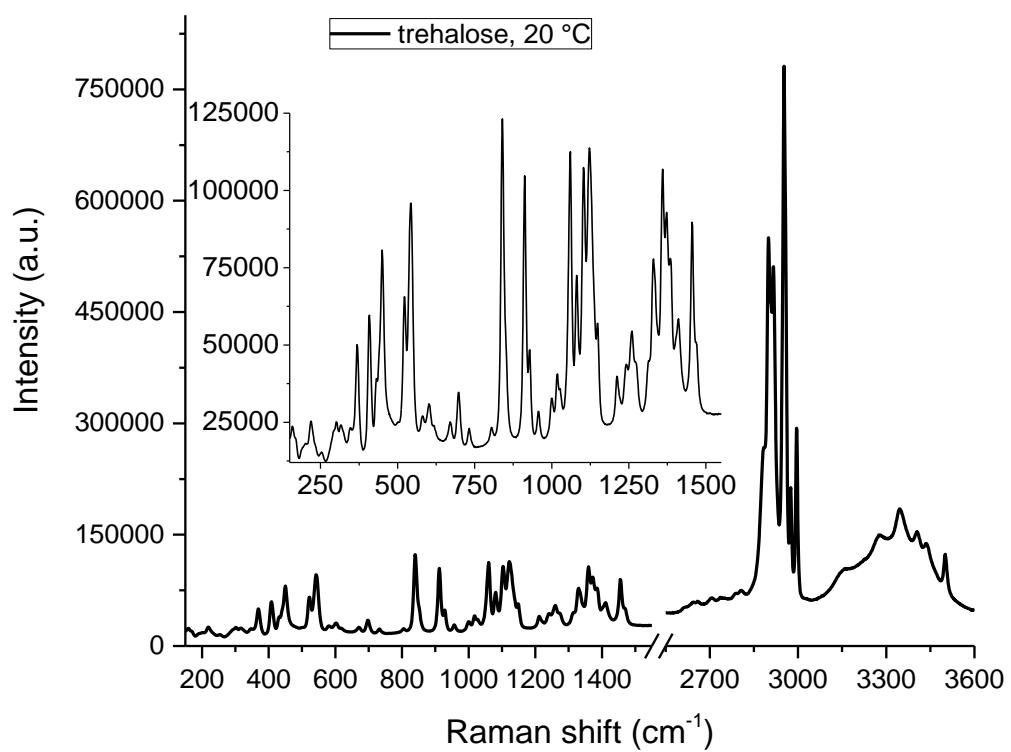
CH stretching pásy trehalózy jsou patrné z obr. 20. Při pokojové teplotě byly naměřeny dominantní peaky na vlnočtech: 2885, 2889, 2907, 2916, 2952, 2974 a 2995 cm⁻¹.

OD stretching pásy jsou pozorovatelné v pásmu 2600 - 2800cm⁻¹ [21].

Velmi silný peak je pozorovatelný od 541 to 523 cm⁻¹. Tento pás je spojován s exocyklickou deformací. Pás na 407 cm⁻¹ je spojován se silnou endocyklickou defomací. V oblasti 800-950 cm⁻¹ jsou pozorovatelné CCH, COH a OCH boční deformace. V oblasti 950-1200 cm⁻¹ jsou viditelné C-O a C-C vazby. V oblasti 1250-1500 jsou CH₂ a CH₂OH deformace. Pásy trehalózy od 300 do 1500 cm⁻¹ jsou podrobněji popsány v tab. 12.

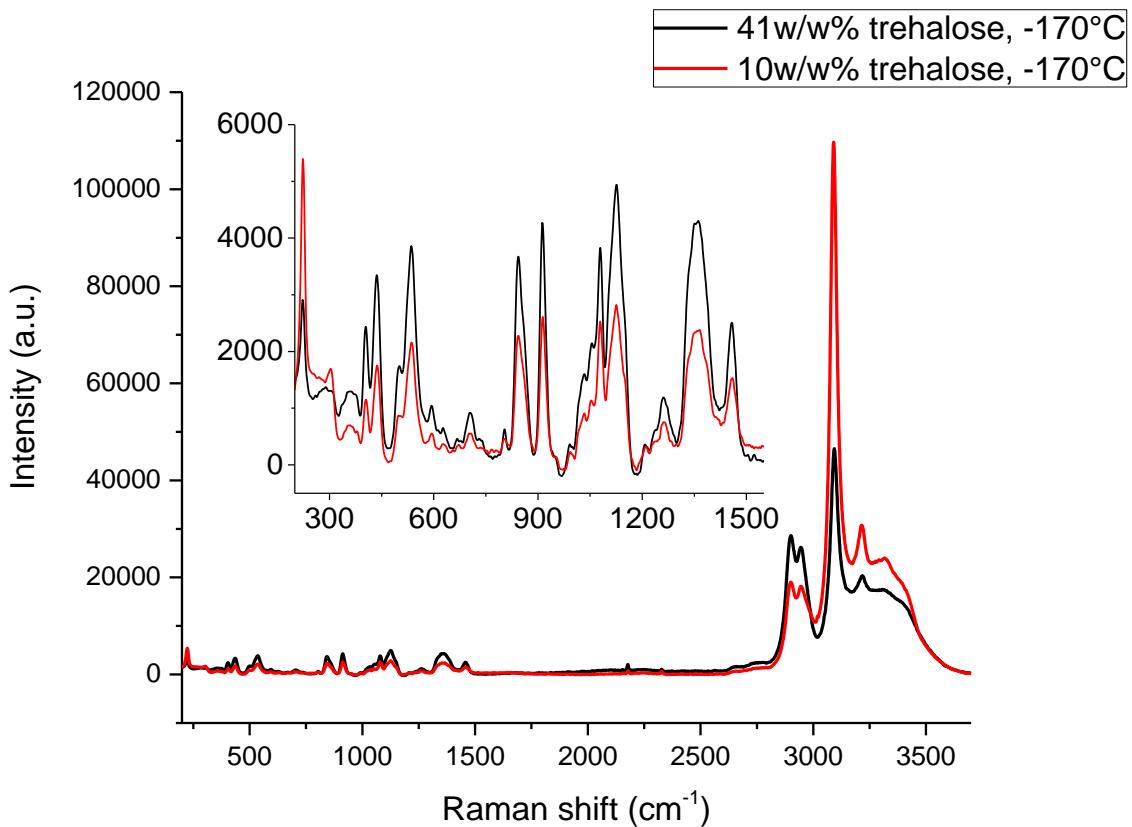
Tab. 12 Ramanovské pásy čisté trehalózy 2H₂O v rozmezí ramanovských posunů od 300 do 1500 cm⁻¹. Zkratky: w, slabý; m, střední; s, silný; mw, středně slabý; ms, středně silný; vs, velmi silný [32]

369(s)	407(vs)	430(m)	450(s)	523(vs)	540(s)	580(mw)
604(m)	671(m)	697(m)	732(w)	804(m)	838(vs)	912(vs)
927(w)	957(mw)	1018(m)	1061(m)	1080(m)	1102(s)	1120(vs)
1149(vs)	1211(w)	1220(w)	1240(mw)	1261(mw)	1273(mw)	1313(mw)
1330(m)	1358(vs)	1371(m)	1386(m)	1411(m)	1455(m)	1469(mw)



Obr. 20 Ramanovské pásy čisté krystalické trehalózy při pokojové teplotě

Porovnání ramanovských spekter 41w/w% trehalózy a 10w/w% trehalózy při teplotě -170°C (obr. 21).

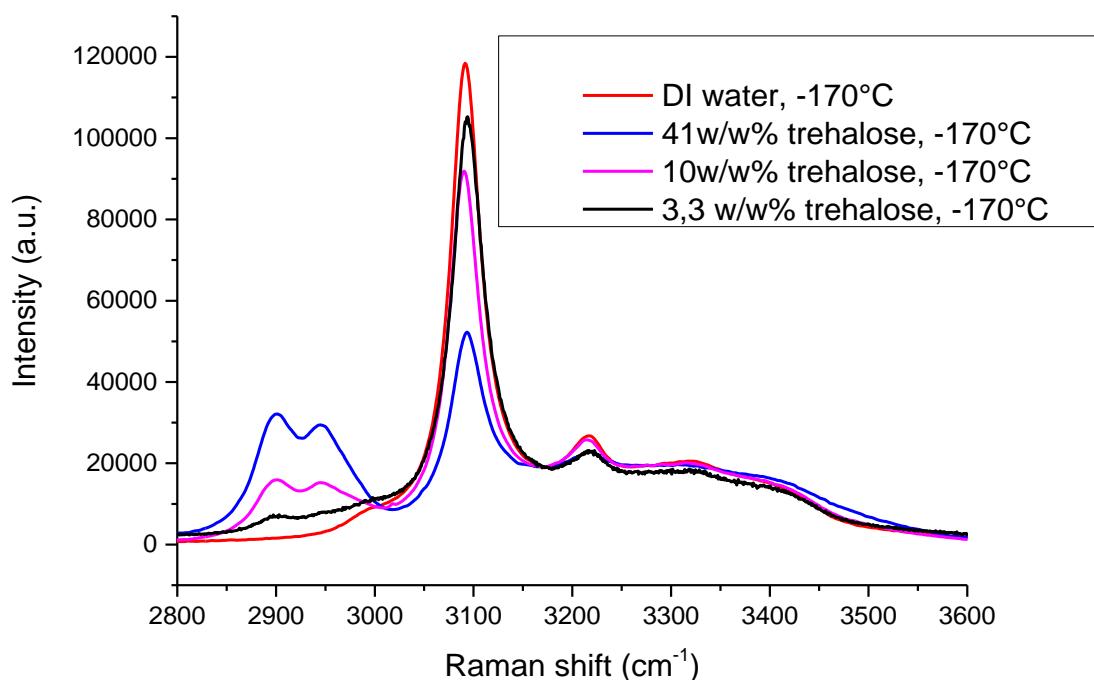


Obr. 21 Porovnání Ramanovských spekter 41w/w% trehalózy a 10w/w% trehalózy při nízké teplotě (-170°C)

Obr. 22 porovnává Ramanovská spektra 41w/w% trehalózy, 10w/w% trehalózy, 3,3w/w% trehalózy a DI vody při nízké teplotě (-170 °C). Zde se zaměřujeme na peak 3100 cm⁻¹, tedy pás ledu. Deionizovaná voda nám dává referenci velkého krystalu ledu. Zde je dobře patrný vliv trehalózy na stavbu krystalu ledu. Se zvyšující se koncentrací trehalózy se snižuje schopnost vody tvořit celistvé krystaly vody, vytváří se polyamorfní krystality. Relativní intenzita peaků a změřené pološířky nafitovaných peaků trehalózy jsou vypsány v tab. 13.

Tab. 13 Pološířky pásů ledu a jejich relativní intenzita vybraných materiálů z obr. 22

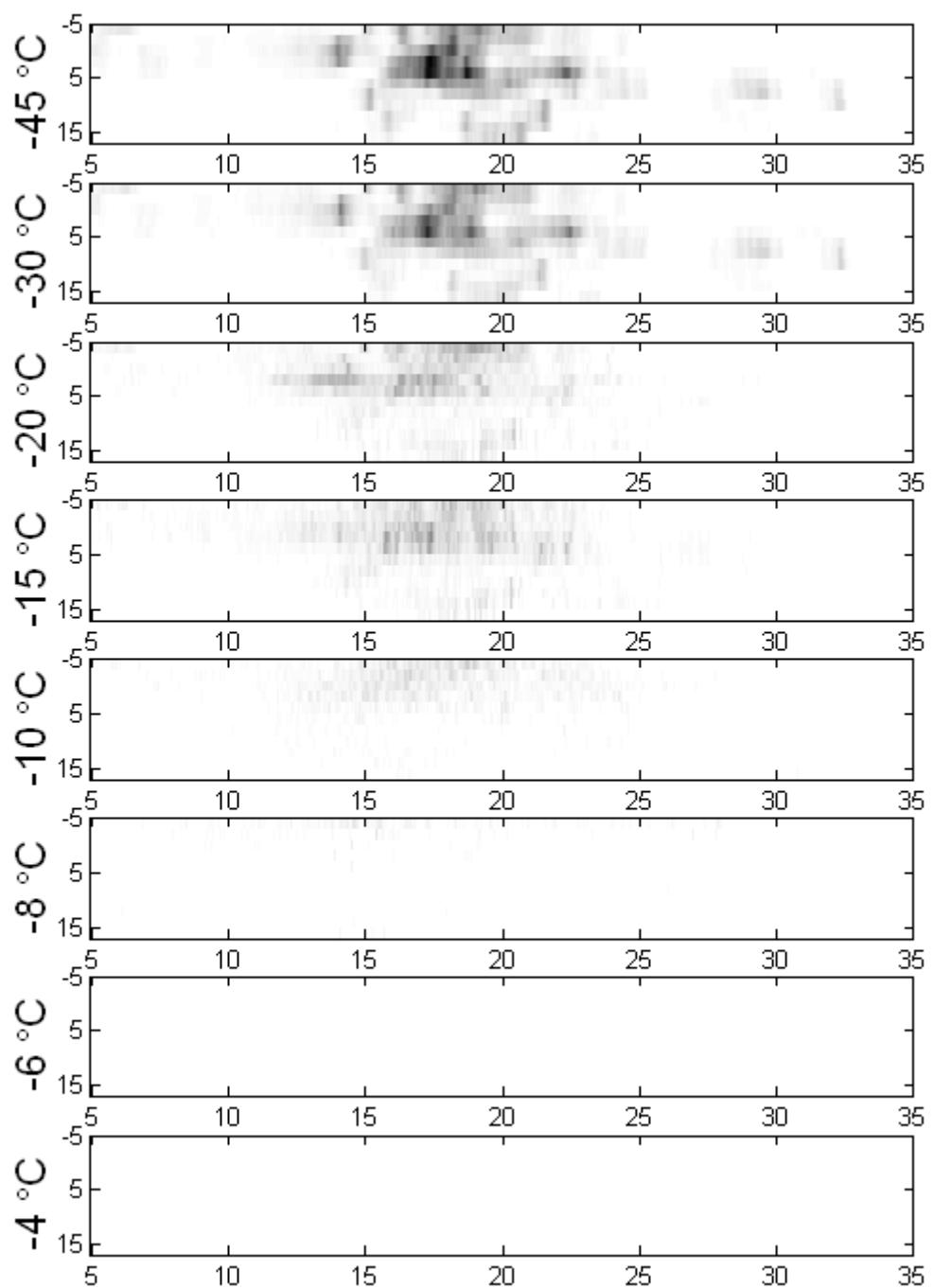
	FWHM na 3100 cm ⁻¹ (cm ⁻¹)	Relativní intenzita (%)
41w/w% Trehalóza	40,56	32,19
10w/w% Trehalóza	36,38	28,57
3,3w/w% Trehalóza	37,30	24,98
DI voda	35,75	14,25



Obr. 22 Porovnání Ramanovských spekter 41w/w% trehalózy, 10w/w% trehalózy, 3,3w/w% trehalózy a DI vody při nízké teplotě (-170 °C)

2.3.4 XRD

Měření rentgenové krystalografie bylo provedeno na zmrzlých vzorcích a výsledky budou porovnány v závěru práce. Velikosti krystalů se dají porovnat pouze se stejně měřenými vzorky. Vodní roztok 41w/w% trehalózy (obr. 23) se projevuje tím, že se krystaly shlukují s podobně orientovanými krystaly. To naznačuje, že růst krystalu na jádře je doprovázen srážením s jinou fází vedoucí k zahnutým krystalům různých tvarů. Trehalóza ve vodním roztoku podporuje shlukování krystalů, oproti tomu AFP nebo DMSO vykazují náhodná krystalová jádra a růst [17].



Obr. 23 Úhlové závislosti difraktované intenzity 41 w/w% trehalózy. Tavící proces (od shora dolů) krystalů vody sledovaný pro linii 110 šesterečné vody

2.4 Trx-ApAFP752

Antifreeze protein Trx-ApAFP752 (AFP) byl izolován z pouštního brouka *Anatolica polita* u kterého je známo že přežije i teploty až -30 °C. U tohoto proteinu je popsána termální hystereze [22,23], zajímavá především tím, že snižuje teplotu tuhnutí a neovlivňuje teplotu tání, podrobněji popsanou v kapitole DSC. Obecně je přijato, že AFP fungují na adsorpčně - inhibičním mechanismu navázání na povrch led/kapalina. Analýzy krystalových struktur antifreeze proteinů různých druhů ukázaly, že se AFP standardně naváží na krystal svou plochou hydrofilní stranou s kyslíkovými atomy k ledové mřížce. Takto nastavené AFP bezprostředně interagují s jednou nebo více plochami rostoucího ledového krystalu. Ledu podobná mřížka nacházející se ve většině AFP je považována za hlavní vazebnou funkci AFP. Antifreeze proteiny z brouků jsou považovány za mnohem více aktivní než AFP z ryb, či rostlin. [33].

2.4.1 Viabilita buněk

Viabilita buněk nebyla znovu studována z důvodu malého množství drahého materiálu. Cytotoxicita materiálu je posána v [17]. Viabilita byla studována průtokovou cytometrií. Po cyklu mražení/tání, byly buňky ponechány 24h inkubovat, aby byla zjištěna i pozdní apoptóza buněk. AFP nemělo negativní dopad na chromatin ani na jadernou membránu buněk. Přesto jen 32,3 % buněk přežilo cyklus mražení tání po 24 h. Samotné AFP tedy nevykazuje tak oslnivé výsledky v porovnání s DMSO, ale významně ovlivňuje přežití buněk v porovnání s referenčním vzorkem bez kryoprotektiva [17]. Zajímavostí je, že testované bylo 1 w/w% AFP v DI vodě, s takovou koncentrací se DMSO nemůže rovnat.

2.4.2 DSC

Diferenční kompenzační kalorimetrií (DSC) byly porovnávány roztoky s přidáním a bez přidání kryoprotektiv. Obr. 24 reprezentuje kalorimetrické křivky mražení a tání systému 1 w/w%, 0,6191 w/w%, 0,0182 w/w% Trx-ApAFP752 a DI vody rychlosí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$.

U všech roztoků je pozorován jeden dominantní exotermní přechod – krystalizace vody v teplotním rozsahu 20 °C až -170 °C. DSC výsledné křivky ukazují, že všechny roztoky

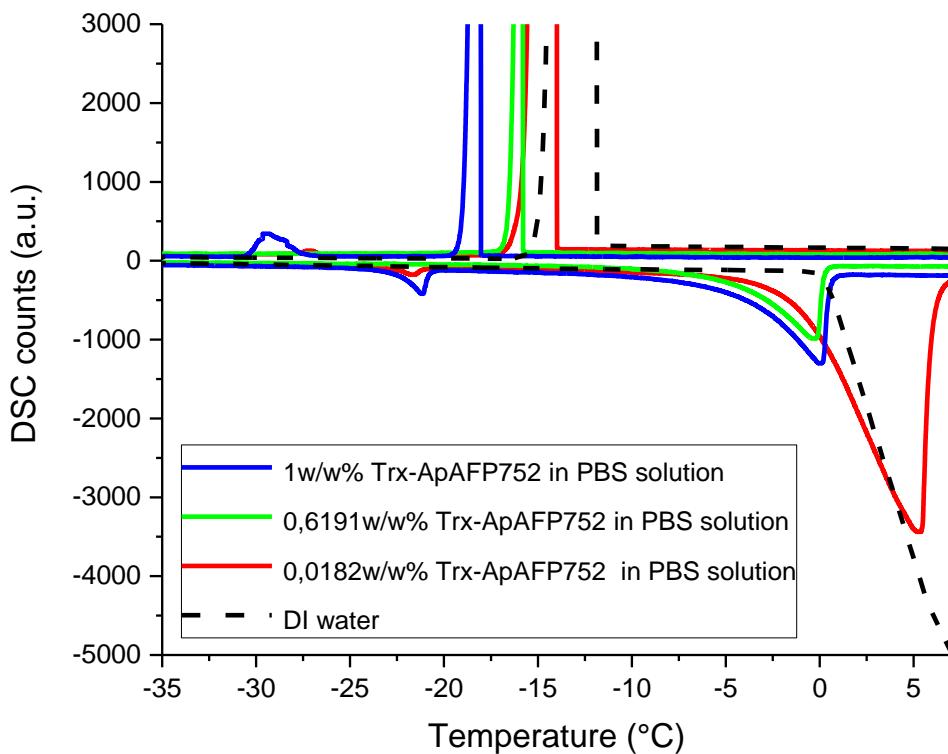
obsahující kryoprotектant mají posunutý bod mrznutí/tání k nižším hodnotám. Největší posun bodu mrznutí související s koncentrací v roztoku byl pozorován u 1w/w% Trx-ApAFP752 (-18 °C). 0,6191w/w% Trx-ApAFP752 má bod tuhnutí -15,8 °C. 0,0182w/w% Trx-ApAFP752 má bod tuhnutí -14 °C.

Endotermní přechod (tání) 1w/w%, 0,6191w/w%, 0,0182w/w% Trx-ApAFP752 je 0 °C (tab. 14). To ovšem nekoreluje s DSC (obr. 24), tato chyba je způsobená nečistotou AFP (obsahuje sůl), která je velmi dobře detekovaná v podobě hydrohalitu v Ramanovském spektru (obr. 26a). Antifreeze protein neovlivňuje teplotu tání [17][24]. Ve všech případech je zřejmá velká teplotní hystereze způsobená vlivem AFP na růst krystalů.

Silné interakce mezi AFP a první vrstvou solvatační vody vedou k narušení struktury poskytující ochranu proti růstu ledových krystalů a vytváří největší teplotní hysterezi (18 °C) [17]. Tato hystereze roste s koncentrací AFP. Vznik eutektické fáze byl sledován v roztoku AFP v bodě tání -23 °C a -31 °C v PBS.

Tab. 14 Tabulka fázových přechodů roztoků Trx-ApAFP752

	Teplota tuhnutí (°C)	Teplota tání (°C)
1w/w% Trx-ApAFP752 v DI vodě	-18,0	0
0,6191w/w% Trx-ApAFP752 v DI vodě	-15,8	0
0,0182w/w% Trx-ApAFP752 v DI vodě	-14,0	0
DI voda	-12,0	0



Obr. 24 DSC křivky mražení a tání 1w/w%, 0,6191w/w%, 0,0182w/w% Trx-ApAFP752 a DI vody rychlosťí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$

2.4.3 Ramanova spektroskopie

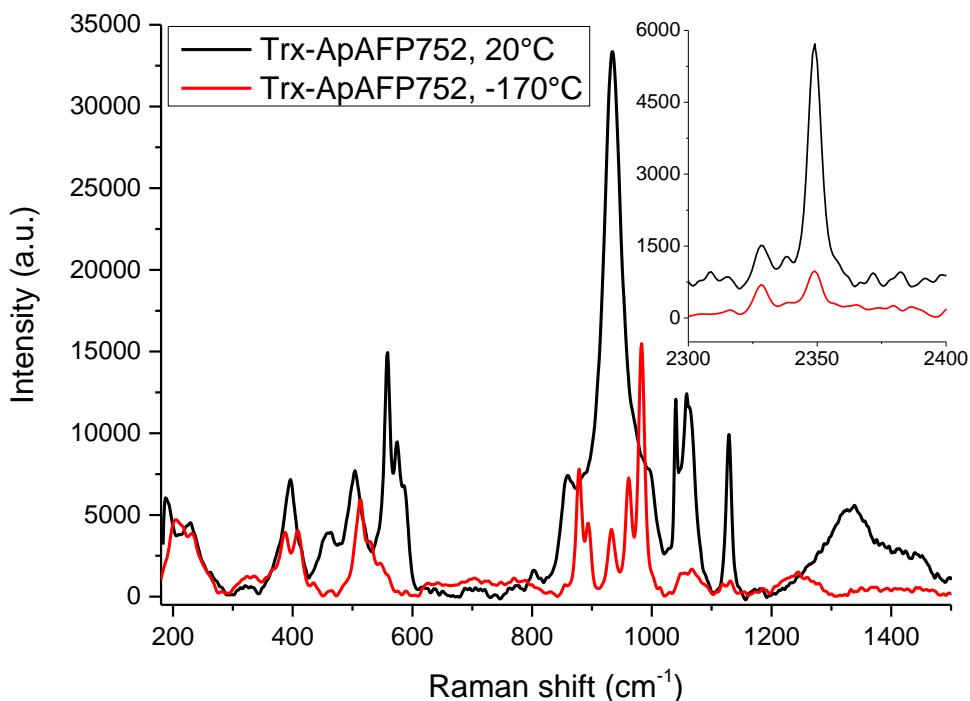
Ramanovská spektra Trx-ApAFP752 při nízké (-170 °C) a pokojové teplotě (obr. 25) byla naměřena laserem v infračerveném spektru 785nm, kvůli silné luminiscenci vzorku s laserem ve viditelném spektru (488nm). Objektiv spektrometru silně interferoval, ale po úpravách signálu se podařilo nejsilnější pásy získat.

Ramanovská spektra AFP kvůli jeho složitosti nemůžeme popsat stejně dopodrobna jako v případě DMSO. Spektrum je jako otisk, podle kterého můžeme látku detekovat.

Zajímavá je výrazná změna spekter AFP po zmražení, u krystalické látky bychom takovou změnu nepředpokládali. Intenzita pásů na 459, 557, 1058, 1128 cm^{-1} při teplotě -170 °C inhibuje na 2-6 % relativní intenzity. Ostatní peaky čistého AFP jsou popsány v tab. 15.

Tab. 15 Ramanovské pásy čistého krystalického antifreeze proteinu Trx-ApAFP752 při pokojové a nízké teplotě (-170 °C), v rozmezí ramanovských posunů od 300 do 1500 cm⁻¹. Zkratky: w, slabý; m, střední; s, silný; mw, středně slabý; ms, středně silný; vs, velmi silný [32]

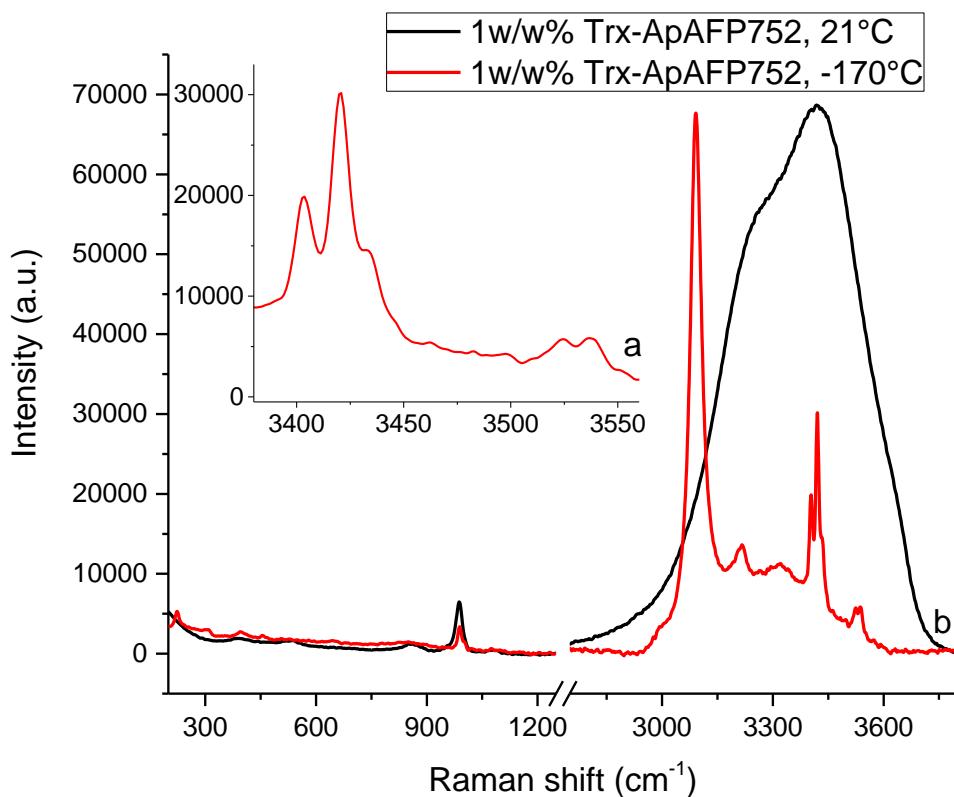
	395(m)	460(w)	507(m)	557(s)	574(s)	857(m)
Trx-ApAFP752, 20°C						
	935(vs)	1039(s)	1058(s)	1132(s)	1333(m)	
Trx-ApAFP752, -170°C	397(s)	460(s)	879(s)	892(m)	933(m)	
	959(m)	983(s)	460(w)	1132(s)	1244(m)	



Obr. 25 Ramanovské pásy čistého krystalického antifreeze proteinu Trx-ApAFP752 při pokojové a nízké teplotě (-170 °C)

Obr. 26 porovnává spektra 1w/w% AFP při pokojové a nízké teplotě (-170 °C). Peak ledu na 3100 cm⁻¹ je porovnán s DI vodou a ostatními materiály v závěru práce. Zde je zajímavé spektrum AFP při nízké teplotě. Nízké teploty roztoků solných systémů H₂O – NaCl, H₂O - CaCl₂, a H₂O – N a Cl – CaCl₂ vytvoří hydrohalit, který je dobře detekovatelný (obr. 26a) [34]. Spektrální rozsah (3000 to 3600 cm⁻¹) koresponduje s nejsilnějšími Ramanovskými pásy ledu a solnými hydráty. Pásy jsou generovány interními stretching vibracemi typickými pro molekuly H₂O.

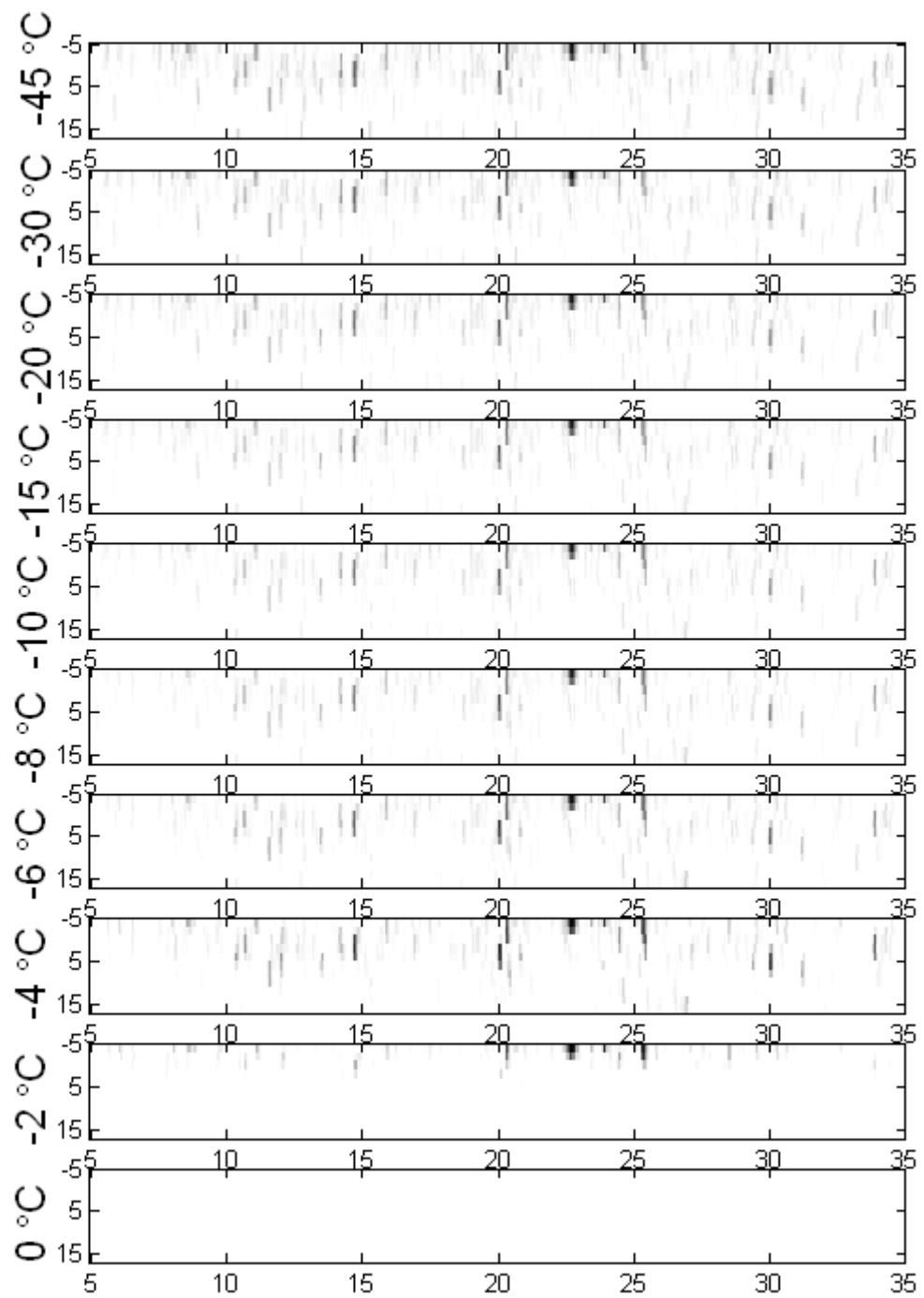
Spektrum H₂O je dobře popsáno v kapitole o *DI vodě*, ovšem tyto peaky, se také vyskytují ve spektru AFP. Čtyři peaky (obr. 26a) jsou připsány O – H stretching vibracím hydrohalitu na 3403, 3420, 3435, and 3536 cm⁻¹.



Obr. 26 Porovnání Ramanovských spekter 1w/w% Trx-ApAFP752 při pokojové a nízké teplotě (-170°C). (a) Detail hydrohalitu

2.4.4 XRD

Měření rentgenové krystalografie bylo provedeno na zmrzlých vzorcích a výsledky budou porovnány v závěru práce. Velikosti krystalů se dají porovnávat pouze se stejně měřenými vzorky. Proto uvedu srovnání i s ostatními vzorky. XRD vodního roztoku 1w/w% Trx-ApAFP752 (obr. 27) má v porovnání s ostatními vzorky velmi malé krystality. To potvrzuje hypotézu, že se AFP váže na krystaly a zabraňuje jim v růstu. AFP znehodnocuje stavbu ledu nevíce ze všech měřených vzorků. Nakonec je dobře vidět teplotní hystereze vzorku (THA). Roztok dosáhne pevného stavu až při -18°C, zatímco jsou krystaly během ohřívání XRD dobře změřitelné i při -2 °C.



Obr. 27 Úhlové závislosti difraktované intenzity 1w/w% Trx-ApAFP752. Tavící proces (od shora dolů) krystalů vody sledovaný pro linii 110 šesterečné vody. Horizontální osa, úhel ω ; vertikální osa, úhel χ . Šedivá škála je logaritmická a má stejný rozsah pro všechny obrázky

2.5 Pro-Ala-Gly-Tyr

První použití tetrapeptidu Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY), jako kryoprotektivní látky, vychází z článku [22]. PAGY byl studován zejména jako kryoprotektivní materiál s antioxidačními vlastnostmi, které byly prokázány. Hlavní motivací bylo uchování přirozených vlastností rybího masa, po jeho zamrazení a následném rozmrazení.

V článku [23] byl peptid PAGY izolován z kůže Jesetera amurského. V našem případě byl tetrapeptid připraven syntézou podrobněji popsanou v kapitole *Experimentální metody & materiály*.

Kryoprotektivní účinky PAGY byly studovány pouze na rybím mletém mase. Cílem bylo v mase zadržet co největší objem vody, která se po rozmrazení vyplavuje vlivem vzniklých krystalů. Vznik ledu přejímá molekuly vody z membrán, proteinů, enzymů, DNA a vlastní krystal rozřeže biomembrány buněk.

Část vody je pevně navázána na strukturu masa, například na myofibrilách. Druhá část vody je zadržená v mase a je nejvíce náchylná na vyplavení. Třetí část je volná voda v mase, která uvolňuje během rigor mortis.

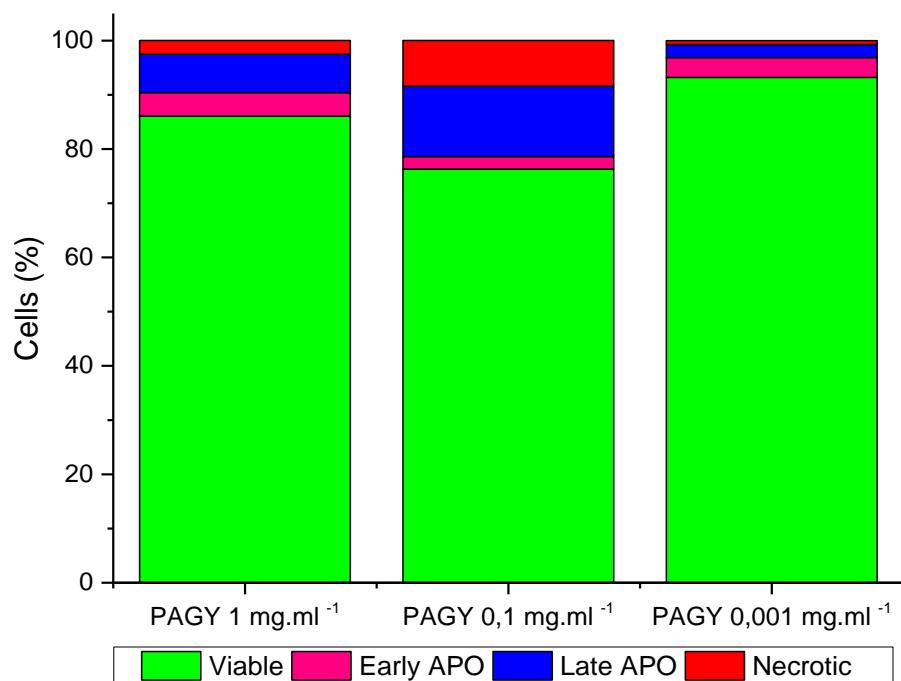
Po 6 cyklech mražení/tání klesl objem zadržené vody v mase z 98 % na 78 % a vzrostl objem volné vody z 0,5 % na 19 %. Po aplikaci PAGY o celkové koncentraci 25 ppm se po 6 cyklech objem zadržené vody zvýšil na 82,26 % a snížil objem volné vody na 15 %.

Celkově lze shrnout, že změny v rozložení vody jsou způsobené poškozením proteinů, vedoucí k jeho hromadění a denaturaci. To snižuje jeho rozpustnost a ztrátu funkčních vlastností, jako například držet vodu.

Výsledné hodnoty indikují kryoprotektivní efekt PAGY na ztrátě vody z mletého masa Jesetera amurského vyvolaný cykly mražení/tání. V této práci popíší fyzikální vlastnosti materiálu, doby vzniku krystalitů a jejich velikosti.

2.5.1 Viabilita buněk

Buňky byly inkubované s různými koncentracemi testovaných látka v médiu RPMI-1640 s 10% FTS po dobu 24 h (37 °C, 5 % CO₂), kontrolní vzorky byly inkubovány ve stejném režimu v čistém médiu s 10% FTS. Po inkubaci byly sebrány supernatanty obsahující mrtvé buňky a smíchány s adherentní frakcí (živé buňky) izolovanou pomocí EDTA+Trypsin. Vzorky byly promyty pufrem (Annexin V binding buffer), označeny a změřeny. Obr. 28 ukazuje rozložení buněčných populací na základě značení po 24 hod. inkubaci. Je vidět, že u mrtvých buněk většinou proběhla apoptóza (modré segmenty). Nekrotická buněčná smrt (červené segmenty) nastala v relativně zanedbatelném množství případů. Standardem jsou buňky bez přidání kryoprotektiva, kde byla naměřena viabilita 86,6 % (nižší viabilita kontroly je způsobena mírně přerůstající kulturou). PAGY o koncentraci 1 mg·ml⁻¹ vykazuje přežití buněk 93,2 %, PAGY o koncentraci 0,1 mg·ml⁻¹ 76,3 %, PAGY o koncentraci 0,001 mg·ml⁻¹ 86,1 %. Počet přežití buněk se stanovuje s přesností ±5 %. Vyšší viabilita některých vzorků může být způsobena vyšší proliferací buněk v přítomnosti látky (to by byl problém), ale vzhledem k malým rozdílům to spíše připisují možnému rozptylu.



Obr. 28 Cytotoxicita PAGY. Porovnání přežití buněk v závislosti na koncentraci po 24 h inkubaci

2.5.2 DSC

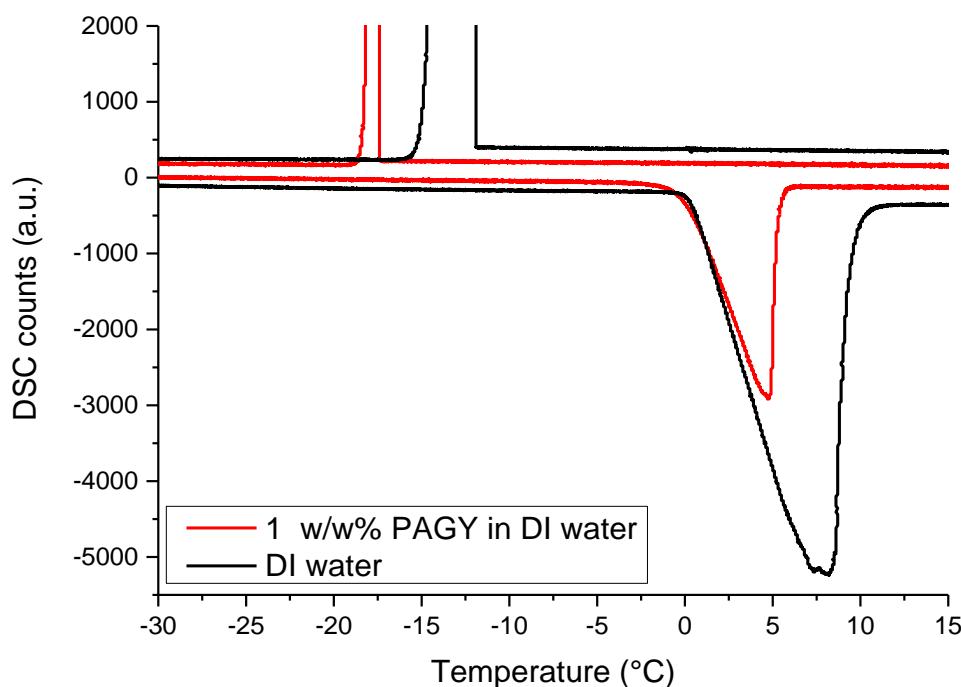
Diferenční kompenzační kalorimetrií (DSC) byly porovnávány roztoky s přidáním a bez přidání kryoprotektiv. Obr. 29 reprezentuje kalorimetrické křivky mražení a tání systému 1w/w% PAGY, a DI vody rychlostí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$

U všech roztoků je pozorován jeden dominantní exotermní přechod – krystalizace vody v teplotním rozsahu $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-170 \text{ }^{\circ}\text{C}$. DSC výsledné křivky ukazují, že roztoky PAGY obsahující kryoprotector mají posunutý bod mrznutí/tání k nižším hodnotám. Tab. 16 prezentuje teploty fázových přechodů roztoku PAGY a je srovnána s DI vodou.

V roztoku PAGY je zřejmá velká teplotní hystereze způsobená zatím neznámým vlivem na růst krystalů.

Tab. 16 Tabulka fázových přechodů roztoků PAGY

Roztok	Teplota tuhnutí ($^{\circ}\text{C}$)	Teplota tání ($^{\circ}\text{C}$)
1w/w% PAGY v DI vodě	-16,8	0
DI voda	-12	0

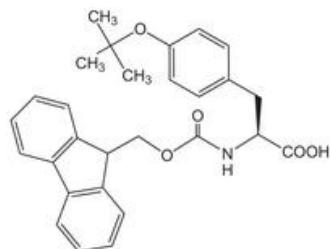


Obr. 29 DSC křivky mražení a tání 1w/w% PAGY a DI vody rychlostí $1 \text{ K} \cdot \text{min}^{-1}$

2.5.3 Ramanova spektroskopie

Ramanovská spektra Pro-Ala-Gly-Tyr (PAGY) byla naměřena laserem (785nm) v infračerveném spektru. Silná interference ve spektru byla odečtena, po úpravách signálu se podařilo získat jen nejsilnější pásy. Peaky čistého PAGY jsou popsány v tab. 17.

Silná luminiscence vzorku, znemožnila měření při nízkých teplotách. Veškeré roztoky PAGY silně luminiskovali a spektra se nepodařilo naměřit. Důvodem byl tyrosin, konkrétně molekula Fmoc-Tyr(tBu)-OH (obr. 30), ze které bylo PAGY syntetizováno. Tato látka má široké luminiscenční spektrum, zejména pro její aromatická jádra.

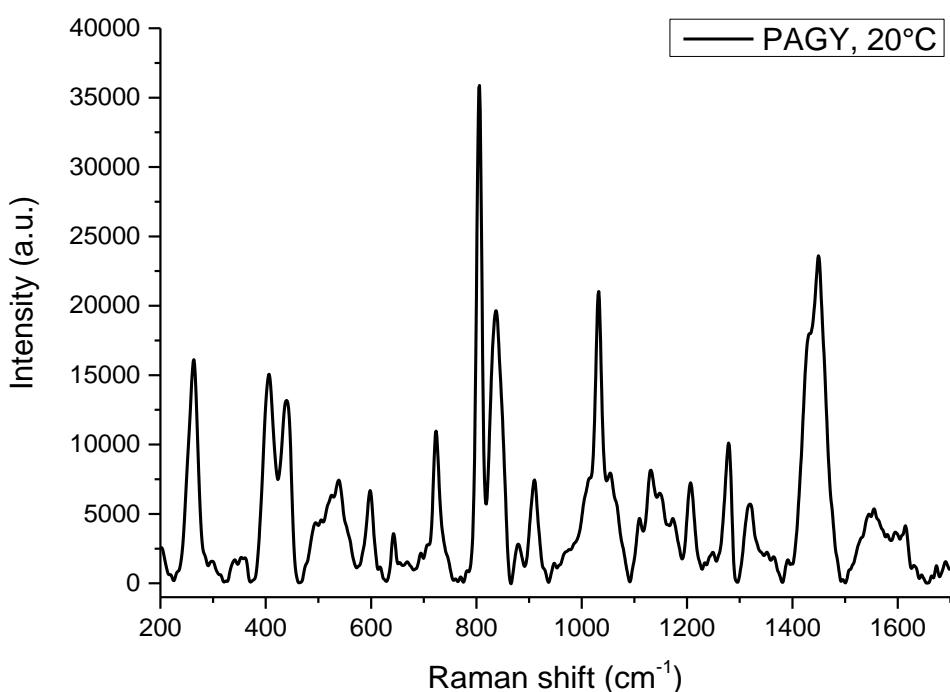


Obr. 30 Fmoc-Tyr(tBu)-OH

Peak ledu pro tento materiál tedy není, ale stanovení velikosti krystalitů a fázových přechodů bude popsáno v závěru práce z XRD a DSC.

Tab. 17 Ramanovské pásy čistého krystalického PAGY při pokojové teplotě, v rozmezí ramanovských posunů od 200 do 1500 cm⁻¹. Zkratky: w, slabý; m, střední; s, silný; mw, středně slabý; ms, středně silný; vs, velmi silný [32]

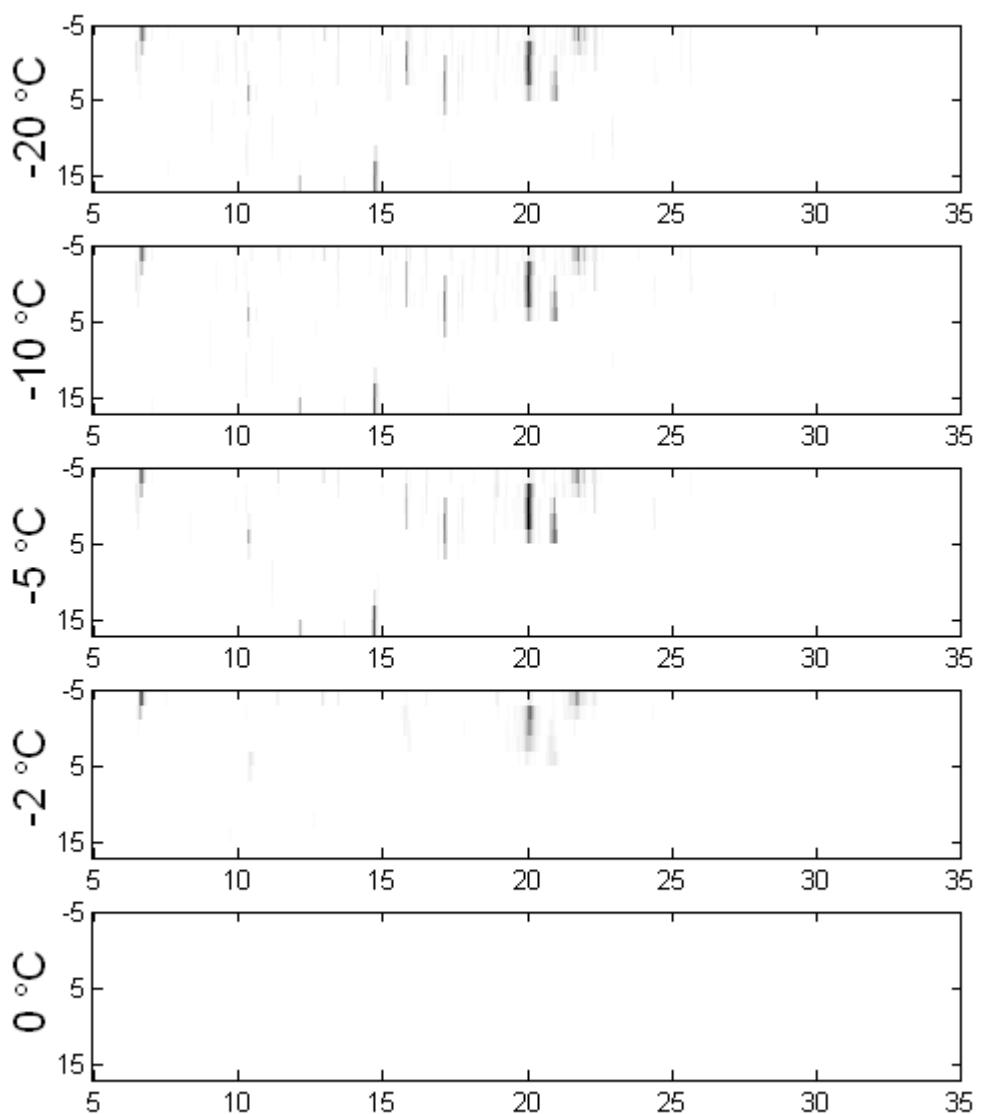
	263(s)	400(s)	442(s)	597(m)	643(w)
PAGY, 20°C	723(s)	805(vs)	837(s)	910(m)	1031(s)
	1130(w)	1206m	1278(s)	1317(w)	1451(vs)



Obr. 31 Ramanovské pásy čistého krystalického PAGY při pokojové teplotě

2.5.4 XRD

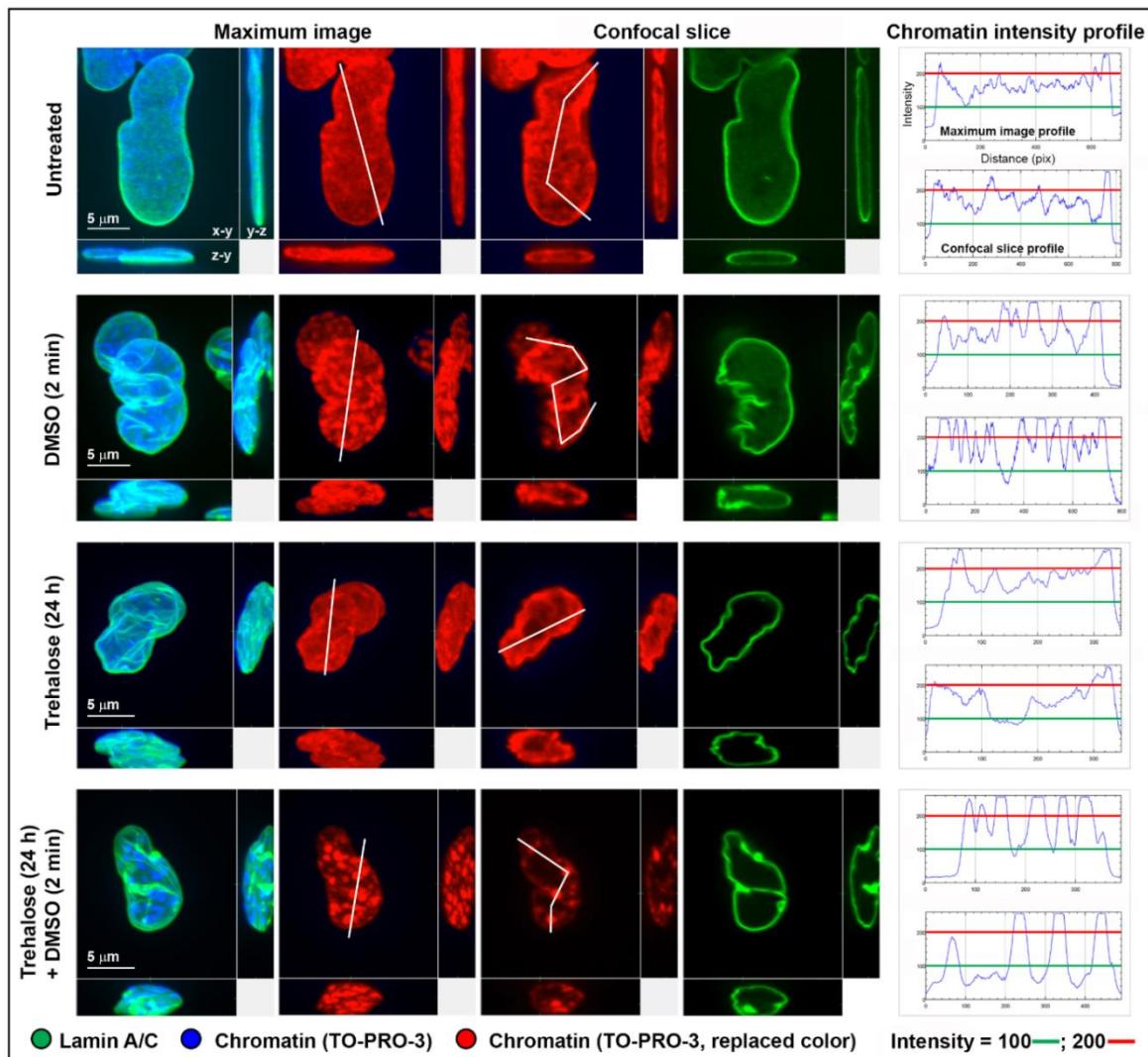
Měření rentgenové krystalografie bylo provedeno na zmrzlých vzorcích a výsledky budou porovnány v závěru práce. Velikosti krystalů se dají porovnávat pouze se stejně měřenými vzorky. Proto uvedu srovnání i s ostatními vzorky. XRD vodního roztoku $5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ PAGY má v porovnání s ostatními vzorky velké krystaly. Dle XRD jsou tyto krystaly téměř srovnatelné s čistou vodou. To potvrzuje hypotézu, že PAGY nemá na růst krystalů vody vliv. Velikosti krystalů jsou srovnatelné s čistou vodou. Kryoprotektivní vlastnosti PAGY popsáne v článku [4,22,23] fungují na jiných, zatím neznámých procesech, odlišných však od DMSO, trehalózy a AFP. Teplotní hystereze vzorku (THA) je dobře patrná, roztok dosáhne pevného stavu až při $-16,8\text{ }^{\circ}\text{C}$, zatímco jsou krystaly během ohřívání XRD dobře změřitelné i při $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 32 Úhlové závislosti difraktované intenzity 5mg/ml PAGY. Proces tání (od shora dolů) krystalů vody sledovaný pro linii 110 šesterečné vody. Horizontální osa, úhel ω ; vertikální osa, úhel χ . Šedivá škála je logaritmická a má stejný rozsah pro všechny obrázky

2.6 Fluorescenční konfokální mikroskopie

Stav buněčných jader po aplikaci kryoprotektantů před mražením i po mrazícím cyklu byl monitorován fluorescenční konfokální mikroskopii. Stav buněčných jader byl korelován se statistikou přežití mražených buněk. Bylo zjištěno, že největší pravděpodobnost přežití cyklus mražení/rozmrážování měly buňky, jejichž jádra měla silně kondenzovaný chromatin a to i v nezmraženém stavu po aplikaci kryoprotektantu. Největší kondenzace chromatinu byla zjištěna i po krátké aplikaci (2 min.) DMSO. Životaschopnost mražených buněk korelovala se stupněm kondenzace chromatinu, jež doprovázela deformace jaderné membrány (obr. 33) [17].



Obr. 33 Srovnání efektu mražení a rozmrážování na stav chromatinu a jaderné membrány buněk bez aplikace kryoprotektantů a po aplikaci trehalózy, DMSO a kombinace DMSO a trehalózy [17]

3 Diskuze

Existují dvě třídy látek, které inhibují zamrzání vody. Ta první zahrnuje rozpuštěné látky, které snižují bod mrznutí i bod tání. Mezi takové látky patří sůl (NaCl), glycerol, glukóza apod. První třída mění rovnovážný bod fázového přechodu a mění termodynamiku celého systému. Druhá třída obsahuje látky, které blokují tvorbu krystalu ledu především na základě kinetických jevů. Do druhé třídy patří Antifreeze proteiny (AFP), které jsou známé pro svou termální hysterezi (rozdíl mezi bodem mrznutí a tání), - snižují teplotu tuhnutí látky, ale neovlivňují bod tání. AFP se naváže na povrch krystalů ledu a inhibuje jejich růst. Přesný mechanizmus vazby na led a inhibice růstu ledového krystalu na molekulární úrovni nejsou přesně známy. To je závažný problém, protože nedostatek porozumění vazby led/AFP brání vývoji účinnějších technik kryoprotekce [24].

Kombinací experimentálních metod byly systematicky studovány zástupci obou kryoprotektivních tříd z pohledu vzniku a růstu krystalů ledu, což je pro přežití buněk zásadní. Nejprve bylo ukázáno, jaký vliv mají DMSO, trehalóza, AFP a PAGY na přežití zmražených buněk. Krystaly ledu se nejdříve formují v extracelulárním prostředí, což má za následek zvýšení koncentrace roztoku. Zmražení buněk v roztoku bez přidání kryoprotektiv způsobilo nekrózu velké většiny testovaných buněk. Buňky byly testovány v roztoku FTS, který vykazuje sám o sobě určitou kryoprotektivitu (přežití 7,6 %, obr. 18) v porovnání s vodou, kde by byla viabilita nulová.

Kryoprotektivní efekt velkých AFP molekul byl relativně malý: 32,3 % buněk přežilo cyklus mražení/tání. AFP působí zejména v extracelulárním prostoru, protože velká molekula nemůže difundovat do buňky a endocytóza je pomalý proces.

Trehalóza ovlivňuje termodynamiku mražení/tání v roztoku. Molekuly trehalózy jsou schopné prostoupit do intracelulárního prostoru pinocytózou, nicméně spontánní vstřebání do buňky je závislé na jejím typu [25]. Je třeba poznamenat, že trehalóza působí také jako přírodní osmolyt, který stabilizuje fosfolipidové membrány [27] a terciální proteinové struktury[26], tedy chrání před dehydratací.

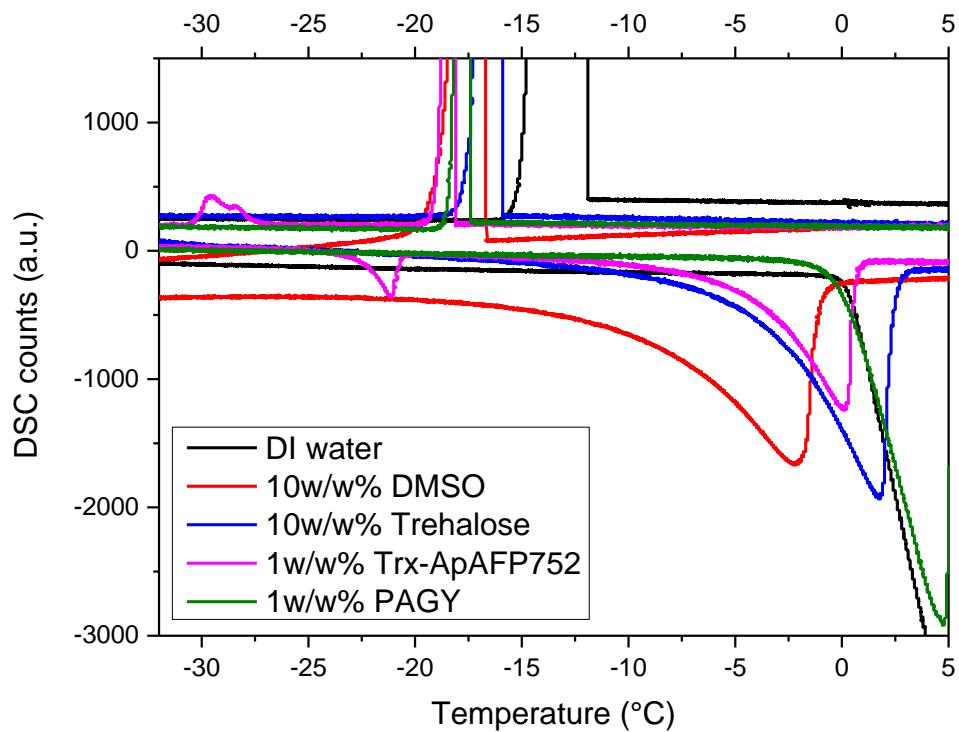
Malé molekuly DMSO také účinkují termodynamicky na proces mrznutí/tání a jednoduše penetrují do intracelulárního prostoru [31]. DMSO umí kryoprezervovat buňku tak, že působí v intracelulárním i extracelulárním prostoru a vyvolává důležité změny v krystalizaci ledu. 89 % buněk přežilo cyklus mražení/tání v roztoku DMSO (obr. 11).

PAGY je nový materiál. PAGY posunul bod tuhnutí, ale bod tání neovlivnil (obr. 34). U tohoto materiálu byla sledována pouze cytotoxicita bez cyklu mražení/tání z důvodu malého množství obtížně syntetizovatelného materiálu. Viabilita buněk po inkubaci byla srovnatelná s referencí a závěrem je, že PAGY není toxický k lidským fibroblastům.

Výsledky z DSC ukazují, že všechny roztoky obsahující kryoprotектanty posunuly bod tuhnutí/tání k nižším hodnotám v porovnání k čisté vodě. Největší termální posun byl pozorován u AFP. Tento efekt může být interpretován jako narušení stavby krystalů zapříčiněný působením kryoprotектantů. Silné interakce mezi AFP a první vrstvou solvatační vody vedou k narušení struktury poskytující ochranu proti růstu ledových krystalů a vytváří největší teplotní hysterezi (18°C) [17]. (obr. 34). AFP (obsahuje sůl), která je velmi dobře detekovaná v podobě hydrohalitu v Ramanovském spektru (obr. 26a). Antifreeze protein neovlivňuje teplotu tání [28][29]. Ve všech případech je zřejmá velká teplotní hystereze způsobená vlivem AFP na růst krystalů.

Tab. 18 Porovnání fázových přechodů (DSC) testovaných materiálů

	Teplota tuhnutí ($^{\circ}\text{C}$)	Teplota tání ($^{\circ}\text{C}$)
DI voda	-12,0	0
DMSO 10 w/w%	-16,7	-10
Trehalóza 10 w/w%	-16	-5
Trx-ApAFP752 1 w/w%	-18,0	0
PAGY 1w/w%	-16,8	0

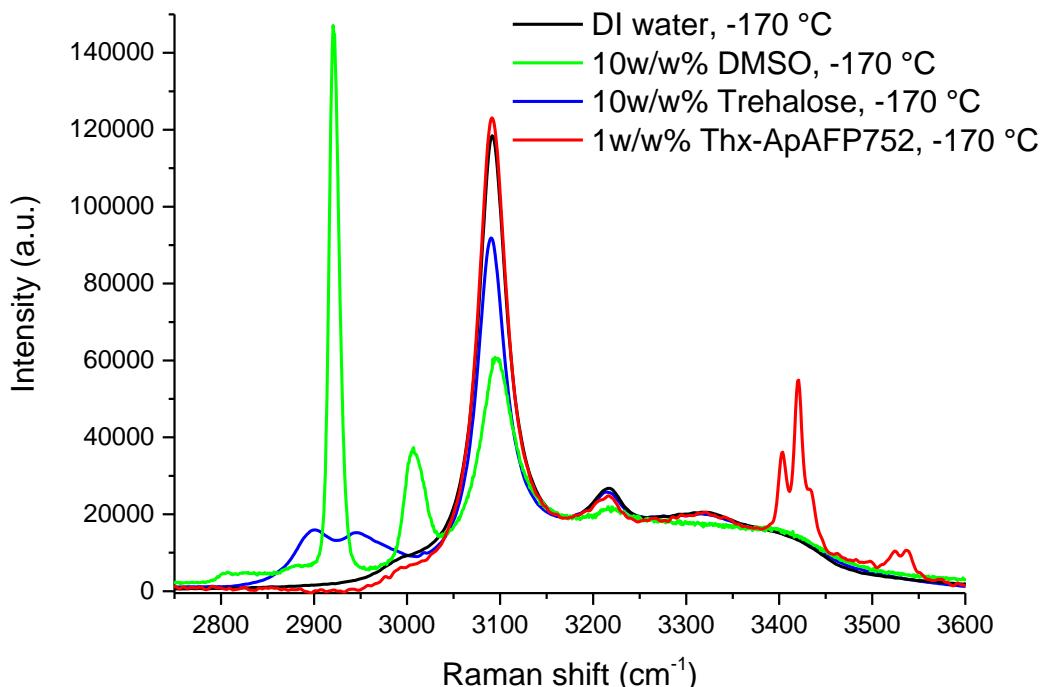


Obr. 34 DSC křivky mražení a tání. Porovnání všech zmražených vzorků

Přítomnost kryoprotektiv v roztoku zpravidla vede k rozšíření Ramanovského peaku ledu (obr. 35) na 3100 cm^{-1} přiřazených symetrickým vibracím molekul vody, které jsou plně vodíkově navázány (struktura ledu). Rozšíření tohoto peaku by mělo odpovídat nepravidelnosti a horšímu rozložení molekul v krystalové mřížce, když jsou kryoprotektanty přítomny v roztoku. Rozšíření pološířky peaku ledu platí i u AFP (tab. 19), které však má relativní intenzitu peaku srovnatelnou s peakem čisté vody (obr. 35). Pravděpodobně to souvisí s funkcí AFP navázat se na rostoucí krystal vody, zabránit mu v růstu, ale zároveň neovlivnit jeho okolí. DMSO a trehalóza ovlivňují samotný vznik a růst krystalů v celém objemu. DMSO ovlivňuje dynamiku vody také velkým dipolem, který je větší než u trehalózy a ovlivňuje okolní vodu s poměrně vysokou permitivitou. Široký peak ledu (největší naměřená pološířka) 41% w/w roztoku trehalózy je způsobený hlavně vysokou koncentrací, pološířka píku se snižuje v závislosti na koncentraci (obr. 22).

Tab. 19 Porovnání FWHM a intenzit ledových pásů materiálů na 3100 cm^{-1}

	FWHM (cm^{-1})	Relativní intenzita (%)
DI voda	35,75	30,04
DMSO 10 w/w%	36,60	15,39
Trx-ApAFP752 1 w/w%	36,32	31,23
Trehalóza 10 w/w%	36,38	23,33

Obr. 35 Porovnání intenzit Ramanovských spekter peaku ledu (3100 cm^{-1}) zmražených vzorků normalizovaných k 3175 cm^{-1}

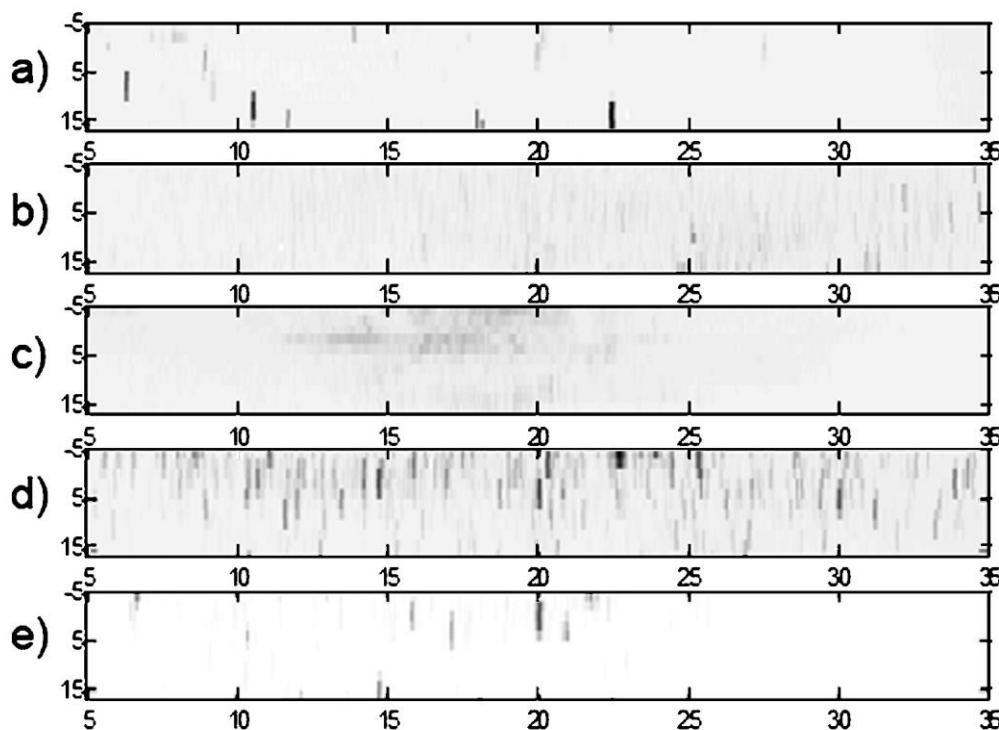
Mechanismus kryoprotekce, kromě jiných účinků, je dán velikostí krystalů. V této práci byla stanovena rentgenovou krystalografií (XRD). Měření XRD bylo provedeno na zmražených vzorcích, rozložení a velikosti krystalů byly porovnány s ostatními vzorky (obr. 36). Čistá voda má jen málo velkých krystalů a nejsilnější difraktovanou intenzitu. Vodný roztok 1w/w% PAGY má krystality nejvíce podobné čisté vodě, difraktovaná intenzita je stejná a rozložení a velikost krystalů téměř srovnatelná, z toho lze usoudit, že PAGY nemá na růst krystalů téměř žádný vliv.

Roztok trehalózy (10 w/w%) vytváří krystalové shluky (klastry), které jsou orientovány podobným směrem. To ukazuje, že krystal roste na jednom jádru a zřejmě je doprovázen další fází vedoucí k zakřiveným krystalům. Trehalóza zřejmě podporuje shlukování krystalů

v zamrzlých vzorcích. Ostatní vzorky AFP nebo DMSO vykazují náhodná krystalová jádra a růst.

AFP je materiál inhibitující růst krystalů. Nejmenší průměr krystalů a největší termální hystereze byla detekována (DSC) ve zmraženém 1w/w% roztoku AFP. Nicméně viabilita buněk AFP nebyla velká, což je dáné působením AFP v extracelulárním prostoru, zatímco je buňka poškozena krystality v intracelulárním prostoru. Krystaly ledu v roztoku DMSO byly 2x menší, než ve zmraženém roztoku 10 w/w% trehalózy. Měření AFP, které obsahuje sůl, komplikuje eutektická krystalizace, jež je dobře patrná z DSC a Ramanovy spektroskopie. Eutektická fáze hraje negativní roli při přežívání buněk během mražení [30].

Stav buněčných jader po aplikaci kryoprotectorů před mražením i po mrazicím cyklu byl monitorován fluorescenční konfokální mikroskopii. Životaschopnost mražených buněk korelovala se stupněm kondenzace chromatinu, která byla doprovázená deformací jaderné membrány. Největší kondenzace chromatinu (i životaschopnost) byla zjištěna i po krátké aplikaci (2 min.) DMSO.



Obr. 36 Úhlové závislosti difraktované intenzity. Porovnání všech zmražených vzorků (a) DI voda, (b) 10w/w% DMSO, (c) 10w/w% trehalóza, (d) 1w/w% Trx-ApAFP752, (e) 1w/w% PAGY. Horizontální osa je úhel ω , vertikální osa je úhel χ . Intenzita v šedivé škále je logaritmická a je stejná pro všechny materiály

Závěr

V souladu s cílem této práce se podařilo popsat fázové přechody (kapalina/pevná fáze) látek užívaných pro kryoprezervaci buněk.

Kryoprotektivní materiály (DMSO, trehalóza, AFP, PAGY) vybrané na základě důkladné rešerše představují konvenční kryoprotektanty (DMSO, trehalóza) a kryoprotektanty ve fázi výzkumu/testování (AFP, PAGY). Tyto materiály byly popsány a porovnány.

DMSO je nejlepší kryoprotektant ze všech studovaných materiálů. V 10 % w/w roztoku DMSO přežilo 89 % buněk po cyklu mrznutí/tání. Velikost krystalů vody je velmi malá/zhruba poloviční, než u 10w/w% roztoku trehalózy. 10% w/w DMSO roztok měl významně posunutý bod tuhnutí a tání k nižším teplotám. V roztoku trehalózy vytvářejí krystaly vody souhlasně orientované klastry, které mohou být příčinou kryoprotektivních vlastností.

AFP vykazuje největší termální hysterezi (18 °C) a se signifikantní viabilitou buněk a je do budoucna potenciálně velmi zajímavý kryoprotektant s extracelulárním efektem.

Tetrapeptid PAGY byl nejméně známý a prostudovaný kryoprotektant. Ve zmraženém roztoku nedochází k významné změně velikosti krystalů ledu ve srovnání s deionizovanou vodou. PAGY posouvá teplotu mražení roztoku, bod tání je prakticky totožný se standardním ledem.

Stav buněčných jader po aplikaci kryoprotektantů před mražením i po mrazícím cyklu byl monitorován fluorescenční konfokální mikroskopíí. Bylo zjištěno, že největší pravděpodobnost přežití cyklus mražení/rozmražování měly buňky, jejichž jádra měla silně kondenzovaný chromatin a to i v nezmraženém stavu po aplikaci kryoprotektantu. Největší kondenzace chromatinu byla zjištěna i po krátké aplikaci (2 min.) DMSO. Životaschopnost mražených buněk korelovala se stupněm kondenzace chromatinu, jež doprovázela deformace jaderné membrány (viz obr. 33).

Bibliografie

- [1] KOMENDER, Janusz. Cell and tissue preservation and storage for transplantation. Present and future. *Annals of Transplantation* [online]. 2004;9(1):88–90. [cit. 2016-05-27]. Dostupné z:
<http://www.annalsoftransplantation.com/download/index/idArt/142789>
- [2] TONER J.P, et al. Combined impact of the number of pre-ovulatory oocytes and cryopreservation on IVF outcome. *Hum Reprod* 1991;6(2):284–289.
- [3] SCHNORR Ja, et al. Evaluation of the clinical efficacy of embryo cryopreservation. *Mol Cell Endocrinol* 2000;169(1–2):85–89.
- [4] NIKOO, Mehdi, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods* [online]. 2014, **7**, 609-620 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.jff.2013.12.024. ISSN 17564646.
- [5] MA, Ji. Differential expression of two antifreeze proteins in the desert beetle *Anatolica polita* (Coleoptera: Tenebrionidae): seasonal variation and environmental effects. *CRYO LETTERS*. 2012, **2012**(5), 11. ISSN 0143-2044.
- [6] MAO, Xinfang, et al. Calorimetric studies on an insect antifreeze protein ApAFP752 from *Anatolica polita*. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [online]. 2011, **104**(1), 343-349 [cit. 2016-04-25]. DOI: 10.1007/s10973-010-1067-3. ISSN 1388-6150.
- [7] RAGASOVÁ, Ina. *Krystalizace v podchlazeném roztoku sacharózy*. Pardubice, 2012. Diplomová práce. FAKULTA CHEMICKO – TECHNOLOGICKÁ. Vedoucí práce Ing. Jana Shánělová, Ph.D.
- [8] KASHCHIEV, Dimo. *Nucleation: basic theory with applications*. Boston: Butterworth Heinemann, 2000. ISBN 0750646829.
- [9] VAJTA, Gábor and Masashige KUWAYAMA. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology* [online]. 2006, **65**(1), 236-244 [cit. 2016-05-03]. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.026. ISSN 0093691x.
- [10] REED, Barbara M. Plant cryopreservation: a practical guide. New York: Springer, c2008. ISBN 0387722750.

- [11] BAKKER, Ronald J. Raman spectra of fluid and crystal mixtures in the systems H₂O, H₂O-NaCl and H₂O-MgCl₂ at low temperatures: Applications to fluid-inclusion research. *The Canadian Mineralogist* [online]. 2004, 33 [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.2113/gscanmin.42.5.1283.
- [12] SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. Dimethyl Sulfoxide (DMSO): Material Safety Data Sheet. In:*Université de Lausanne* [online]. 2009 [cit. 2016-05-01]. Dostupné z: https://www.unil.ch/cig/files/live/sites/cig/files/FAQ/Safety/PDF/MSDS/Dimethylsulfoxyde_MSDS.pdf
- [13] OSTRÓ A., et al 2009: Kryobiologie gamet a embryí. In: *REPRODUKČNÍ MEDICÍNA – současnost a perspektivy*. Olomouc: 69-75
- [14] MORTIMER Sharon, and GAUTAM N. A. *Contemporary perspectives on assisted reproductive technology*. New Delhi, India: Elsevier, 2006. ISBN 9788181477828.
- [15] DA VIOLANTE, Georges, et al. Evaluation of the Cytotoxicity Effect of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 Colon Tumor Cell Cultures. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*[online]. 25(12), 1600-1603 [cit. 2016-05-08]. DOI: 10.1248/bpb.25.1600. ISSN 09186158.
- [16] KISELEV, M. A., et al. DMSO-induced dehydration of DPPC membranes studied by X-ray diffraction, small-angle neutron scattering, and calorimetry. *Journal of Alloys and Compounds* [online]. 1999, 286(1-2), 195-202 [cit. 2016-05-08]. DOI: 10.1016/S0925-8388(98)01006-8. ISSN 09258388.
- [17] FALK, Martin et al. *Cryopreserved human cell DNA double-strand breaks, nuclear envelope and chromatin higher-order structure: correlation with physico-chemical properties of cryoprotectants* [online]. 2016
- [18] HEDOUX, Alain, et al. Mechanism of Protein Stabilization by Trehalose During Freeze-Drying Analyzed by In Situ Micro-Raman Spectroscopy. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2013, 102(8), 2484-2494 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1002/jps.23638. ISSN 00223549.
- [19] PU, L, et al. Long-term preservation of adipose aspirates after conventional lipoplasty. *Aesthetic Surgery Journal* [online]. 2004, 24(6), 536-541 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1016/j.asj.2004.09.002. ISSN 1090820x.
- [20] YONG-AN, Lee. Cryopreservation in Trehalose Preserves Functional Capacity of Murine Spermatogonial Stem Cells. *Plos One* [online]. 2013 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1371/journal.pone.0054889.

- [21] AHLQVIST, MU and LS TAYLOR. Water diffusion in hydrated crystalline and amorphous sugars monitored using H/D exchange. *Journal of Pharmaceutical Sciences* [online]. 2002, 9 [cit. 2016-05-13]. Dostupné z: [http://www.jpharmsci.org/article/S0022-3549\(16\)30958-3/pdf](http://www.jpharmsci.org/article/S0022-3549(16)30958-3/pdf)
- [22] NIKOO, Mehdi, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods* [online]. 2014, 7, 609-620 [cit. 2016-03-16]. DOI: 10.1016/j.jff.2013.12.024. ISSN 17564646.
- [23] NIKOO, M., et al. Physical and chemical properties of gelatin from the skin of cultured Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*). *Journal of Applied Ichthyology* [online]. 2013, 29(5), 943-950 [cit. 2016-04-03]. DOI: 10.1111/jai.12238. ISSN 01758659.
- [24] YANG, Daniel et al. Identification of the Ice-Binding Surface on a Type III Antifreeze Protein with a “Flatness Function” Algorithm. *Biophysical Journal* [online]. 1998, 74(5), 2142-2151 [cit. 2016-05-21]. DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77923-8. ISSN 00063495.
- [25] KRASTEVA, N., et al. Effect of Sugars and Dimethyl Sulfoxide on the Structure and Phase Behavior of DPPC Monolayers. *Langmuir* [online]. 2001, 17(4), 1209-1214 [cit. 2016-05-27]. DOI: 10.1021/la000998b. ISSN 0743-7463.
- [26] KRATOCHVÍLOVÁ, Irena, et al. Charge Transport in DNA Oligonucleotides with Various Base-Pairing Patterns. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2010, 114(15), 5196-5205 [cit. 2016-05-27]. DOI: 10.1021/jp100264v. ISSN 1520-6106.
- [27] KRATOCHVÍLOVÁ, I. et al. Theoretical and Experimental Study of Charge Transfer through DNA: Impact of Mercury Mediated T-Hg-T Base Pair. *J. Phys. Chem. B* 118, 5374–5381 (2014).
- [28] DRORI, R., et al. Ice-binding proteins that accumulate on different ice crystal planes produce distinct thermal hysteresis dynamics. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2014, 11(98), 20140526-20140526 [cit. 2016-05-21]. DOI: 10.1098/rsif.2014.0526. ISSN 1742-5689.
- [29] DRORI, Ran, et al. When Are Antifreeze Proteins in Solution Essential for Ice Growth Inhibition? *Langmuir* [online]. 2015, 31(21), 5805-5811 [cit. 2016-05-21]. DOI: 10.1021/acs.langmuir.5b00345. ISSN 0743-7463.

- [30] KOZUBEK, M., ET AL. Automated acquisition and processing of multidimensional image data in confocal in vivo microscopy. *Microsc. Res. Tech.* **64**, 164–175 (2004).
- [31] LISETH, K., et al. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft. *Cyotherapy* [online]. 2005, **7**(4), 328-333 [cit. 2016-05-05]. DOI: 10.1080/14653240500238251. ISSN 14653249.
- [32] GELDER, Joke De a Kris De GUSSEM. Reference database of Raman spectra of biological molecules. *Journal of Raman spectroscopy* [online]. 2007 [cit. 2016-05-13]. DOI: 10.1002/jrs.1734.
- [33] MAO, Xinfang, et al. Characterization of a novel β -helix antifreeze protein from the desert beetle *Anatolica polita*. *Cryobiology* [online]. 2011, **62**(2), 91-99 [cit. 2016-05-14]. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2011.01.001. ISSN 00112240.
- [34] SAMSON, I. M. and R. T. WALKER. Cryogenic raman spectroscopic studies in the system NACL-CACL2-H₂O and implications for low temperature phase behavior in aqueous fluid inclusions. *The Canadian Mineralogist* [online]. 2000, **38**(1), 35-43 [cit. 2016-05-15]. DOI: 10.2113/gscanmin.38.1.35. ISSN 0008-4476.

Přílohy

Příloha 1

The recombinant plasmid pET32b-*Apafp752*¹ was transformed into *Escherichia coli* Rosetta-gami (DE3) competent cells (Novagen). A single transformed colony was used to inoculate 25 mL of Luria-Bertani (LB) medium containing 0.3 mM ampicillin and cultured overnight at 37 °C and shaken at 225 rpm. 4 mL of the overnight culture was transferred into 1 L of fresh LB medium with 0.3 mM ampicillin and grown at 37 °C and 225 rpm until the optical density at 600 nm (OD₆₀₀) reached 0.6-0.7. The culture was induced with 1 mL of 400 mM isopropanol-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG), to cause over-expression of TrxA-ApAFP752, for 8 hours at 25 °C. The cells were harvested by centrifugation (20 minutes, 8700 g, 4 °C) and stored at -80 °C until purification.

The cell pellet was resuspended with ice-cold binding buffer (EDTA-free protease inhibitor, 50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole and Benzonase nuclease at pH 8.0) and lysed using a French press (1300 psi). The lysate was collected and centrifuged (20 minutes, 27200 g, 4 °C) to remove the cell debris. The supernatant was filtered through a 0.22 µm syringe-driven filter (Millipore) and concentrated to 5 mL before being purified by a Fast Protein Liquid Chromatographer (FPLC; GE Healthcare ÄKTA purifier 900) equipped with a Ni-NTA column (GE Healthcare). The sample was loaded into the Ni-NTA column, washed with washing buffer (50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl, 20 mM imidazole at pH 8.0), and eluted with the same buffer containing 500 mM imidazole through a gradient elution. The fractions were pooled and dialysed in sodium phosphate buffer (50 mM sodium phosphate, 150 mM NaCl at pH 8.0) for 2 hours, then switched to fresh buffer and left overnight. The purity of the sample was analysed by 12.5% SDS-PAGE and stained with Coomassie blue; TrxA-ApAFP752 has a molecular weight of 27 kDa and was compared to a stained protein ladder (BioRad). Additional purification steps were taken to obtain a pure sample and SDS-PAGE was used after each step to analyse the purity. The sample was divided into three fractions that were each concentrated to 1 mL and run through a Superdex 75 10/300 GL size exclusion column (GE Healthcare) equilibrated with sodium phosphate buffer. Fractions that were still not pure were run through a Ni-NTA column and dialysed for a second time.

Once the desired purity was obtained, the sample was buffer exchanged into a K_xH_yPO₄ buffer (50 mM potassium phosphate, 20 mM NaCl, and 1 mM NaN₃ at pH 8.0). The concentration was estimated using UV-Visible spectrophotometry at 280 nm with the calculated extinction coefficient of 19,575 cm⁻¹. The sample was concentrated to 1 mL and lyophilized overnight. For further experiments, the protein was rehydrated as needed and buffer exchanged.