

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Ústav komplexních systémů

Bakalářská práce

Strukturně-modelovací studie haloalkan dehalogenasy LinB

Autor: Josef Řežábek

Vedoucí bakalářské práce: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

Konzultant bakalářské práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika, Rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník: 3.

České Budějovice, 2014

Prohlášení autora bakalářské práce

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že, v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění, souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě, případně v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných FROV JU. Zveřejnění probíhá elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. dubna 2014

.....

Josef Řežábek

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za vedení celé bakalářské práce a poskytnutí užitečných rad a materiálů. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. za odbornou pomoc při praktické části experimentu, také Mgr. Tatyňě Prudnikové, Ph.D., Mgr. Oksaně Degtjarik a Mgr. Davidu Řehovi, Ph.D. Závěrem děkuji své rodině za podporu během celého studia.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Josef ŘEŽÁBEK**
Osobní číslo: **V11B022P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Strukturně-modelovací studie haloalkan dehalogenasy LinB**
Zadávající katedra: **Ústav komplexních systémů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Haloalkan dehalogenasy (číselné označení EC 3.8.1.5.) jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení vazby mezi halogenem a uhlíkem. Výsledkem uvedené dehalogenace je tvorba primárního alkoholu a halogenidového iontu. Haloalkan dehalogenasy se vyznačují poměrně vysokou detoxifikační schopností. Nové technologie pro čištění kontaminovaných vod a území halogenovanými organickými polutanty jsou založeny na enzymatickém odbourávání za pomoci haloalkan dehalogenas. Aktivita těchto enzymů s halogenovanými substráty však často není dostatečná pro jejich využití v praktických aplikacích. Možné řešení nabízí proteinové inženýrství a jeho moderní přístup cílené řízené evoluce. Pro objasnění strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkan dehalogenas se úspěšně používají metody proteinové krystalografie a molekulového modelování.

Na pracovišti vedoucího práce byly zahájeny krystalizační studie haloalkan dehalogenasy LinB izolované z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26. Byly konstruovány dvě mutantní formy s cílem studovat efekt mutací na funkčnost enzymu.

Cílem práce bude verifikovat krystalizační experimenty obou mutantních forem a popsat rozdílnost v krystalizačních podmínkách. Student zvládne metodiku přípravy proteinových krystalů, manipulaci s krystaly, řešení proteinových struktur a základní techniky molekulového modelování na reálném systému. Student bude připraven na řešení obdobných projektů na pracovišti vedoucího práce.

Rozsah grafických prací: 3 - 10
Rozsah pracovní zprávy: 20 - 30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

J. Damborsky, R. Chaloupkova, M. Pavlova, E. Chovancova, J. Brezovsky: Structure-Function Relationships and Engineering of Haloalkane Dehalogenases. K. N. Timmis (ed.), Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Springer-Verlag Berlin Heidelberg (2010), pp. 1082-1098.
Jan Brezovský: Počítačové modelování enzymů. Přírodovědecká fakulta na Masarykově univerzitě, Brno. Disertační práce (2011).
Jiří Emmer: Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. University of South Bohemia, Faculty of Science, Č. Budějovice. Master's thesis (2007).

Vedoucí bakalářské práce: doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Ústav komplexních systémů
Konzultant bakalářské práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.
Ústav komplexních systémů
Datum zadání bakalářské práce: 7. prosince 2012
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2014


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zař. č. 728/II
389 25 Vodňany (2)


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

OBSAH

1	Úvod.....	9
2	Literární přehled.....	11
2.1	Historie metody krystalizace a její aplikace	11
2.2	Krystalizace makromolekulárních látek.....	12
2.3	Průběh krystalizace	12
2.3.1	Vznik krystalů	13
2.3.2	Přesycený stav (supersaturace).....	13
2.3.3	Vytvoření jádra krystalů (nukleace)	15
2.3.4	Růst krystalů.....	16
2.3.5	Dokončení růstu krystalů (terminace)	16
2.4	Charakteristika krystalů	16
2.5	Faktory ovlivňující průběh krystalizace.....	17
2.5.1	Redukce rozpustnosti proteinu	19
2.5.2	Proteinová krystalizace	20
2.6	Proteinová krystalografie	20
2.6.1	Krystaly makromolekulární charakteristiky.....	20
2.6.2	Databáze makromolekul	21
2.7	Rentgenová (X-ray) krystalografie	21
2.8	Předkrystalizační test (PCT).....	21
2.9	Metody krystalizace	22
2.10	Standardní a pokročilé metody krystalizace	22
2.10.1	Metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapor Diffusion“)	22
2.10.2	Metoda visící kapky („Hanging Drop Vapor Diffusion“)	23
2.10.3	Metoda difúze přes přepážku („Counter-diffusion“).	24
2.10.4	Metoda pod olejem („Microbatch Under Oil“)	25

2.11	Testy krystalů	26
2.12	Halogenalkandehalogenasy (HLD)	26
2.12.1	Struktura HLD	27
2.12.1.1	Aktivní místo	27
2.12.2	Funkce a použití	28
2.12.3	Enzym LinB	28
2.12.3.1	Varianta LinB32	28
2.12.3.2	Varianta LinB70	28
2.12.3.3	Varianta LinB86	29
3	Materiál a metodika	30
3.1	Experimentální pracoviště a rozčlenění pokusu	30
3.2	Příprava precipitačního roztoku.....	30
3.2.1	Precipitační roztok pro LinB86	31
3.3	Úprava koncentrace proteinu LinB86	31
3.3.1	Příprava tří roztoků mutantního proteinu LinB86	31
3.4	Standardní a pokročilé metody krystalizace.....	32
3.4.1	Metoda sedící kapky (T.M. Bergfors, 1999).....	32
3.4.2	Metoda visící kapky (T.M. Bergfors, 1999)	34
3.4.3	Metoda difúze přes přepážku (T.M. Bergfors, 1999)	35
3.4.4	Metoda krystalizace pod olejem (T.M. Bergfors, 1999).....	37
3.5	Testování krystalů.....	38
3.5.1	Crush test.....	38
3.6	Příprava modelu mutantní formy proteinu LinB86 a molekulárně dynamická studie.....	38
3.6.1	WinCoot.....	39
3.6.2	Swiss-PdbViewer	39
3.6.3	Visual Molecular Dynamics (VMD)	39

3.6.4	GROMACS	40
3.6.5	ChemSketch	41
4	Výsledky	42
4.1	Výsledky krystalizačních experimentů	42
4.1.1	Metoda krystalizace pod olejem („Microbatch Under Oil“)	42
4.1.2	Metoda difúze přes přepážku („Counter-diffusion“).....	43
4.1.3	Metoda visící kapky („Hanging Drop Vapor Diffusion“)	45
4.1.4	Metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapour Diffusion“)	46
4.2	Testování krystalů.....	49
4.3	Molekulové modelování.....	49
4.3.1	WinCoot.....	49
4.3.2	Swiss-PdbViewer	50
4.3.3	Visual Molecular Dynamics (VMD)	51
4.3.4	ChemSketch	52
4.3.5	GROMACS	54
4.3.6	Výpočty enzymatických tunelů	57
5	Diskuze	61
5.1	LinB86.....	61
5.2	LinB	63
5.3	Porovnání enzymatických tunelů u proteinů LinB a LinB86	64
6	Závěr.....	65
7	Přehled použité literatury	66
8	Programy	73
9	Seznam zkratk	74
10	Seznam tabulek	75
11	Seznam obrázků	76

12	Seznam příloh.....	78
13	Přílohy	79
14	Abstrakt.....	85
15	Abstract	87

1 Úvod

V současné době je otázka ochrany životního prostředí v popředí vědeckého výzkumu. Velká pozornost je věnována výzkumu schopnosti bakterií a mikroorganismů, které mají velkou zásluhu právě na odbourávání toxických a nežádoucích látek ze znečištěných lokalit.

Mezi velmi nebezpečné látky se řadí například halogenované sloučeniny produkované především lidskou činností, které mají nejen negativní vliv na jednotlivé organismy, ale jsou škodlivé i v rámci celých ekosystémů z důvodu toxických a někdy i karcinogenních účinků. Znečištěné oblasti těmito polutanty nejsou pouze v České republice, ale jejich výskyt je pozorován i v jiných částech světa. V případě přítomnosti těchto látek ve vodním prostředí dochází k úhynu ryb a jiných vodních organismů. Tyto sloučeniny se hromadí v životním prostředí, mohou pronikat do potravního řetězce a velice pomalu se odbourávají. Toxicita těchto látek intenzivně narůstá, je-li v řetězci přítomen brom, jód či chlor.

Dopad těchto látek na životní prostředí i lidské zdraví je jednoznačně negativní a vzhledem k jejich velkému rozšíření v prostředí je věnována značná pozornost jejich odstraňování. Proces dekontaminace pomocí velmi účinných fyzikálně chemických metod je spojen s velkými finančními náklady, nicméně jedním z alternativních způsobů je levnější a také přirozenější biologická dekontaminace, která využívá organismy schopné v kontaminovaném prostředí přežít a metabolickou transformací účinně odbourávat halogenované uhlovodíky ve znečištěných vodách i v půdě.

Výzkum struktury a funkce biomakromolekulárních látek, jakými jsou uvedené enzymy, je dlouhodobým zájmem mnoha vědeckých týmů po celém světě. Jednou z metod pro určení prostorové molekulární struktury enzymů je rentgenová difrakční analýza na krystalech studovaných enzymů. Optimální podmínky k pěstování krystalů přiměřeně velkých a vhodných pro rentgenovou difrakční analýzu zkoumá proteinová krystalografie.

Cílem bakalářské práce bylo studium halogenalkandehalogenasy LinB izolované z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26, u níž byly zkonstruovány dvě mutantní formy s cílem studovat efekt mutací na funkčnost enzymu. K tomuto studiu měly být použity základní techniky proteinové krystalizace, tj. příprava krystalů, manipulace

s krystaly, řešení proteinových struktur z difrakčních dat a studium struktury a dynamiky enzymu pomocí nástrojů molekulového modelování.

2 Literární přehled

2.1 Historie metody krystalizace a její aplikace

Již v období před 160 lety se zabývali vědci procesem krystalizace. Mezi nejstarší pozorovatele krystalizace patří Hünefeld, který se v roce 1840 pokoušel krystalizovat červené krevní barvivo (hemoglobin) izolované z žížaly (Leunissen, 2001). Hünefeld vytvořil formu krystalu stlačením kapky krve umístěné mezi krycími sklíčky. Na základě pokusu je zřejmé, že krystaly proteinu mohou být vytvořeny za pomoci výparu roztoku proteinu a vzniknou tedy zdlouhavým vysoušením (dehydratací). Na tomto jednoduchém principu je v současnosti prováděna převážná část krystalizačních metod.

Po vzoru Hünefelda se v pozdějších letech badatelé zaměřili na krystalizaci červeného krevního barviva ze zvířat, avšak všechny krystaly získané do roku 1850 vznikly náhodnou cestou a nebyly známy obecné principy pro jejich přípravu.

Až teprve Fünke dokázal stanovit téměř bezchybné metody, které se využívaly pro přípravu krystalů z hemoglobinu. Své metody později podrobně popsal a zveřejnil (Leunissen, 2001).

Od roku 1850 do roku 1900 se vědci zaměřili na jiné typy proteinů, hlavně na proteiny rostlinného původu (globuliny), například z rostlinných semen (Leunissen, 2001). Podstatou krystalizace proteinů bylo například vypařování proteinů z roztoku solí zdlouhavým snižováním teploty.

Summer dokázal v roce 1925 připravit krystaly ureázy jako prvního enzymu, který byl úspěšně krystalizován a téměř ve stejné době byly připraveny krystaly inzulinu (Leunissen, 2001).

O pět let později byly vlastnosti krystalů proteinů zkoumány pomocí rentgenové difrakční analýzy (X-ray), na které měli velký podíl Bernal, Crowfoot a Perutz (McPherson, 2004). Dnes je rentgenová difrakční analýza nezbytná součástí proteinové krystalografie, jelikož napomáhá stanovit molekulární strukturu proteinů z krystalů.

Důležitý zlom v historii proteinové krystalografie nastal v roce 1980, kdy byly zkoumány cenné proteiny z nových postupů rekombinantní DNA.

Většina genů přítomných v DNA má souvislost s nemocemi, mají velký význam pro udržení dobrého zdravotního stavu. Mezi geny a proteiny existuje vazba. Aktivita

genů je závislá na proteinech, neboť proteiny mají zásluhu na jejich kódování, a proto se v dnešní době mnohé výzkumy zabývají detailním řešením molekulární struktury proteinů (Berman et al., 2000).

Využití proteinové krystalografie stoupá i v kosmickém prostoru v orbitálních stanicích díky mikrovegetačním pokusům (McPherson and Weickmann, 1990).

V současnosti mají krystalizační metody svůj základ v přezkoumání již dříve vzniklých technik krystalizace, jejichž podstatou bylo odpaření rozpouštědla. Tato metoda má své významné postavení při krystalizaci globulárních proteinů, avšak dvě třetiny všech proteinů jsou proteiny vyskytující se v membránách a krystalizace těchto proteinů je často velmi obtížná a mnohdy i nemožná. Důvodem je nízká stabilita proteinových komplexů, která je ovlivňována teplotou, světlem a ostatními faktory. Také kvalita připravených krystalů má zásadní význam při řešení stavby proteinů (Otwinowski and Minor, 1997). Podle Ramana et al. (2006) bylo v roce 2006 v databance molekulárních struktur membránových proteinů (MPDB) uloženo pouze 178 membránových proteinů, což představovalo pouze 0,5 % molekulárních struktur v porovnání s proteinovou databankou PDB.

2.2 Krystalizace makromolekulárních látek

Krystalizace makromolekulárních látek spočívá v krystalizaci proteinů, nukleových kyselin a větších komplexů (i viry). Při procesu krystalizace se čerpá z dosavadních praktických postupů, myšlenek a principů. Ačkoliv je v dnešní době známo mnoho teorií, neexistuje společná teorie, která by zahrnovala konkrétní postupy krystalizace makromolekulárních látek. Jde o velmi náročný proces, při kterém je zapotřebí dostatek trpělivosti a často se jedná o metodu „pokus – omyl“ (McPherson, 2004; Kutá Smatanová, 2008).

2.3 Průběh krystalizace

Krystalizaci lze definovat jako proces, který je složen ze tří kroků: nukleace, růst a terminace krystalů. Hlavním předpokladem pro krystalizaci je stav přesycení (supersaturace) a následující stav rovnováhy, kde je podstatný růst krystalů (Kutá Smatanová, 2008).

Krystalizační pokusy probíhají ve dvou fázích. První fází je testování koncentrace proteinu (screening), při kterém se zkoumá rozpustnost vzorku s ohledem na použité srážecí činidlo (precipitant). Zde může nastat vysrážení v podobě beztvaré sraženiny, což signalizuje nadměrnou koncentraci precipitantu, která zabránila růstu krystalů. Druhý krok slouží k určení nejvhodnějších podmínek, které umožní vznik krystalů. Na pozorování průběhu krystalizačních experimentů se běžně používá stereomikroskop. Pomocí různých metod se dají velmi lehce rozeznat krystaly od beztvarych sraženin (Kutá Smatanová, 2008).

2.3.1 Vznik krystalů

V této fázi dochází ke změně skupenského stavu. Kapalina resp. plyn se přemění na pevnou látku (Kutá Smatanová, 2008). Krystalizace probíhá obvykle poměrně vysokou rychlostí a vzniká velké množství krystalů. V ideálním případě vzniká menší množství krystalů větších rozměrů, které jsou následně využity pro další experimenty (Chayen, 1997). Cílem krystalizačních experimentů je připravit krystaly v co nejvyšší kvalitě. Krystaly mohou mít různá poškození, zejména na povrchu (Byrappa and Ohachi, 1965). V případě neúspěchu vzniku kvalitních krystalů je doporučováno opětovné opakování pokusů (Rhodes, 2006).

Uspořádání molekul v krystalické mřížce má za následek tvorbu jader krystalu a jejich následný růst. Mezi molekulami převažují nekovalentní chemické a fyzikální vazby. V případě pozitivního ovlivnění vzniku a růstu krystalů je nutné zabezpečit maximální množství vzájemných působení mezi molekulami rozpuštěné látky v pevném skupenském stavu (McPherson, 1990). Povrch proteinu hraje důležitou roli při růstu krystalů. Může být drsný či hladký. Drsný typ je dán růstovým mechanismem, a to: přilnavým nebo 2D nukleačním typem. Ke spirálovitému růstu dochází u hladkých povrchů. Pro zobrazení růstu konkrétních krystalů se používá fázový diagram (Byrappa and Ohachi, 1965). Jedná se o mapu, která slouží k zobrazení vzájemných vztahů materiálu k okolním faktorům prostředí (Kutá Smatanová, 2008).

2.3.2 Přesycený stav (supersaturace)

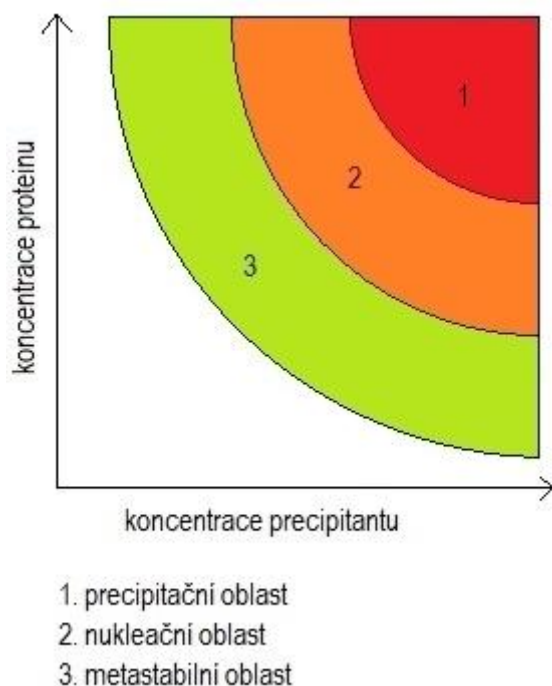
Při krystalizaci makromolekulárních látek je nutné navodit stav přesycení. Při běžných podmínkách se tento stav, při kterém jsou některé makromolekuly těsně

nad mezí rozpustnosti, v roztoku nevyskytuje. Nerovnováha vznikne vytvořením krystalů a dojde k limitu nasycení (McPherson, 2004). K supersaturaci dochází v případě, je-li koncentrace roztoku vyšší než limit rozpustnosti. V případě dosažení tohoto stavu dochází ke slučování proteinu, což se projeví nukleací a růstem krystalů (Kutá Smatanová, 2008). Dosažením stavu supersaturace je docíleno částečnou změnou fyzikálních a chemických podmínek. Pokud změna podmínek nepřinese vznik zárodků krystalů, z roztoku se nevyloučí rozpuštěná látka a roztok se bude dále nacházet v přesyceném stavu. K vyrovnání rovnováhy dochází po vytvoření krystalů, kdy se opět dosáhne limitu nasycení (Kutá Smatanová, 2008)

Oblast supersaturace je ve fázovém diagramu tvořena třemi zónami. Patří sem zóna metastabilní, ve které začínají růst krystaly. Další je zóna labilní (nukleační), kde se může uskutečňovat nukleace a růst. Poslední je zóna precipitační, kde dochází ke vzniku beztvare sraženiny (Li and a Chang, 2009). Nejvhodnější situace nastává, je-li systém přítomen v nukleační oblasti, kde může docházet ke vzniku jader. Pokud se vytvoří několik jader, sníží se koncentrace proteinu v roztoku a systém se posune do metastabilní zóny, ve které dochází k růstu krystalů. Zde se už nevytvářejí jiná jádra. Vznikne tedy malý počet velikostně přijatelných krystalů (Li and a Chang, 2009).

Při růstu krystalů koncentrace proteinu v roztoku klesá a zvyšuje se v pevné fázi = krystalu. Podmínkou získání dostatečně velkých krystalů je jejich pomalý růst. Déletrvajícího růstu lze dosáhnout snížením teploty či koncentrace proteinu. Souvislost mezi koncentrací proteinů a krystalizačním činidlem (precipitantem) vyjadřuje fázový diagram (Byrappa and Ohachi, 1965). Fázový diagram růstu krystalů je zobrazený na Obrázku 1.

Růst krystalů je způsoben snížením přesycení. Pokud by nedošlo k redukci přesycení, vzniklo by velké množství jader či krystalů menších rozměrů. Získání velkých a kvalitních krystalů pomalým růstem lze dosáhnout v případě, že koncentrace proteinu a precipitantu se nalézají v nukleační oblasti. Poté se celý systém přesune do metastabilní oblasti. V případě žádoucí změny přesycení je efektivní manipulace s teplotou. Nevýhodou tohoto diagramu je obtížné stanovení míst, která tvoří hranici mezi jeho oblastmi. Diagram je proto využíván převážně v teoretických oblastech (McPherson, 1999).



Obrázek 1. Fázový diagram růstu krystalů

2.3.3 Vytvoření jádra krystalů (nukleace)

Při této etapě dochází k tvoření jader (Emmer, 2007). Při nukleaci vzniká reciproční kontakt mezi určitými molekulami a musí zde převládat vzájemné působení molekul protein – protein. V případě přesáhnutí mezní hodnoty nasycení vznikají krystalické zárodky (Kutá Smatanová, 2008). Nukleace je nejtěžší etapa, při které se molekuly uspořádávají do konečné formy (McPherson, 2004).

Při nukleaci se molekuly spojují nekovalentními vazbami a dochází ke vzniku komplexů v podobě beztvarych sraženin nebo mikrokystalů (Bollag et al., 1996; Berry, 1995).

Beztvaré sraženiny jsou zastoupeny v hojném množství, je-li koncentrace proteinu značně nad limitem nasycení a vznik sraženiny je daleko rychlejší na rozdíl od růstu krystalů. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné, aby protein nedosáhl přesycení zbytečně rychle (Kutá Smatanová, 2008; McPherson, 1999). Spojení molekul nemusí znamenat, že nově vytvořený krystal má vhodné vlastnosti pro rentgenovou difrakční analýzu. Průběh nukleace je ovlivněn rozpustností konkrétní látky. Na základě toho lze říci, roste-li rozpustnost proteinu v roztoku, je pravděpodobné, že se zde budou vyskytovat mikrokystalická jádra (Berry, 1995). Nukleace a vznik jader krystalů patří mezi

nejpodstatnější etapy růstu krystalů. K nukleaci může dojít spontánně pomocí optimálních podmínek na počátku procesu nebo uměle (Dharanaj et al., 2010).

2.3.4 Růst krystalů

Při tomto dynamickém procesu vzniká vzájemné působení v rámci molekul či iontů s vnějším zárodkem a dochází k umístění molekul na vnější straně zárodku. Difúzní a depoziční stupeň se mohou podílet na průběhu růstu krystalů proteinu. Pomalý nebo žádný růst se projeví v případě, je-li depoziční stupeň malý. Prudký růst je způsoben vyšším depozičním stupněm, kdy dochází k růstu krystalů s poškozením. Vhodné krystaly jsou vytvářeny z menšího množství pevných jader, jejichž rychlost není ovlivňována a nemají žádná poškození (Kutá Smatanová, 2008). Získání velkých a kvalitních krystalů zabezpečí déletrvající růst, kterého lze docílit zredukováním teploty a koncentrace proteinu (Emmer, 2007). Zvětšování = růst krystalů je následkem obsazování prostorů vytvářejících krystal, které jsou obvykle rovinné. Cílový charakter krystalu je určen každým prostorem (Garside et al., 2002).

Na rozdíl od nukleace je růst krystalů lépe charakterizován a průběh tohoto procesu je dobře znám. Při růstu krystalů dochází k dislokacím a dvojrozměrné nukleaci (McPherson, 2004).

2.3.5 Dokončení růstu krystalů (terminace)

K terminaci dochází v případě, kdy se roztok proteinu postupně přibližuje k hodnotám, při kterých dochází k rozpustnosti proteinu. Rozpustnost je zapříčiněna postupným uvolňováním molekul z důvodu tvorby krystalu (Berry, 1995). Krystaly, které budou využity pro rentgenovou difrakční analýzu, většinou vznikají v průběhu delší doby, kdy dochází k postupnému zvětšování jejich rozměrů. Může dojít k vytvoření malých mikrokystalů či mnohokrystalů. Příkladem mnohokrystalů jsou dendrity nebo sfěrulity. Má-li protein nevhodné vlastnosti pro krystalizaci, na konci procesu vznikají nekystalické gely nebo beztvaré pudry (Kutá Smatanová, 2008).

2.4 Charakteristika krystalů

Krystaly jsou definovány jako pevné stejnorodé látky s přímo stanoveným chemickým složením. Některé krystaly jsou zářivě lesklé a jsou tvořeny pravidelně

uspořádanými stranami (Chirgadze, 2001; Kutá Smatanová, 2008). V ideálním případě lze krystal znázornit jako nekonečné a dokonalé pole tvořené stavebními bloky, které jsou seřazeny do základních buněk. Reálné krystaly používané k pokusům jsou rozměrově ohraničené a jsou nepravidelné z důvodu jejich deformací (Kutá Smatanová, 2008).

2.5 Faktory ovlivňující průběh krystalizace

Krystalizace je proces ovlivněn různými faktory, které mají pozitivní nebo negativní vliv na její rychlost a působí na finální vlastnosti a vzhled krystalů. Negativní faktory mohou způsobit to, že ke krystalizaci vůbec nedojde (Cox and Phillips, 2008).

Proces krystalizace ovlivňuje:

1. Čistota proteinu. Rhodes (2006) uvádí čistotu makromolekuly jako jeden z nejvýznamnějších faktorů. Krystalizační pokusy musejí být prováděny s dokonale čistým proteinem. V případě znečištění je podmínkou úspěšně zvládnuté krystalizace udělat purifikační opatření, neboť znečištěním proteinu mohou být poškozeny krystalové buňky (Drenth, 1999; Kutá Smatanová, 2008). V ojedinělých pokusech se mohou nečistoty pozitivně podílet na krystalizaci proteinu, ale je zde riziko horší kvality dat (Drenth, 1999). Se zvyšující se čistotou proteinu roste možnost, že bude docházet k růstu krystalů (Kutá Smatanová, 2008).

2. Srážedlo (precipitant). Jako srážedla se používají organické a anorganické sloučeniny, například chlorid sodný (NaCl) nebo síran amonný $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Také se využívají makromolekulární sloučeniny jako je polyethylenglykol (PEG). Precipitant se přidává k proteinu v takové koncentraci, aby nedošlo k jeho degradaci (Drenth, 1999). Precipitant napomáhá proteinu dostat se do přesyceného stavu. K precipitantu se přidávají pufrы, které jsou odpovědné za udržování stálého pH (McPherson, 2004). Nejčastěji se používají pufrы, které udržují pH v rozmezí od 6,0 do 8,0. Důvodem pro to je fakt, že většina proteinů je stabilních v oblasti neutrálního pH (Kutá Smatanová, 2008). K precipitačnímu roztoku se mohou dále přidávat i jiné přísady, které mohou pozitivně ovlivnit uspořádání molekul proteinu do krystalu (McPherson, 2004).

3. Vnější faktory. Teplota, pH, výskyt jiných látek a metody krystalizace mohou také významně ovlivnit celý průběh krystalizace (Drenth, 1999; McPherson, 2004). Je nesmírně důležité nezapomínat na fyzikální faktory (gravitace, povrch, viskozita), které mohou zapříčinit úspěch či neúspěch krystalizace (Kutá Smatanová, 2008). Důležitá je také aktivita enzymů a je nezbytné, aby v průběhu krystalizačního procesu nebyly přítomny cizorodé sloučeniny (Chen et al., 1994).

Při krystalizačním experimentu je nezbytné, aby byl protein ve stavu přesycení, protože v tomto stavu je koncentrace proteinu téměř nad mezní hodnotou rozpustnosti. Proteinové krystaly se začínou vytvářet pouze v případě, je-li protein v přesyceném stavu a molekuly proteinu mají tendenci se spájet dle určitého řádu (Drenth, 1999). Faktory mající vliv na průběh růstu makromolekulárních krystalů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1. Faktory mající vliv na průběh růstu makromolekulárních krystalů. Převzato z Smatanová, I. (2003).

Faktory			
1.	ph a pufr	13.	gravitace, proudění a sedimentace
2.	iontová síla (i_d) a koncentrace (c_m) a původ precipitačního činidla	14.	vibrace a zvuk
3.	teplota a teplotní změny	15.	objem krystalizačního vzorku
4.	koncentrace makromolekulárního roztoku (c_p)	16.	přítomnost amorfni nebo jiné látky
5.	čistota makromolekulárního roztoku	17.	tvár krystalizační nádoby
6.	aditiva, efektory, ligandy	18.	proteolýza
7.	zdroje makromolekul – organismy	19.	kontaminace mikroby
8.	substráty, koenzymy, inhibitory	20.	tlak
9.	redukující nebo oxidující prostředí	21.	elektrické a magnetické pole
10.	kovy a jiné specifické ionty	22.	lidský faktor – manipulace a čistota práce
11.	rychlost dosažení přesycení a rychlost růstu	23.	viskozita matečného roztoku
12.	povrchové faktory nebo detergenty	24.	heterogenní nebo epitaxiální nukleační činidla

2.5.1 Redukce rozpustnosti proteinu

Pro redukci rozpustnosti proteinu v roztoku lze aplikovat několik způsobů, jak je uvedeno např. v Kutá Smatanová (2008):

- Přeměna proteinu samotného
- Aplikace soli
- Přejchod pH na jiné hodnoty
- Aplikace polymerů či iontů

Při růstu krystalů je důležité, aby hladina přesycení roztoku proteinu klesla na hodnoty okolo limitu nasycení. V případě velkého přesycení se vytváří mnoho krystalizačních jader a rostou krystaly menších rozměrů (Kutá Smatanová, 2008).

2.5.2 Proteinová krystalizace

Proteinová krystalizace je proces založený na zkušenostech, na stanovení optimálních činidel a konkrétních fyzikálně-chemických parametrů (McPherson, 2004). K vytvoření jader krystalů je nutné nejprve vyhledat vhodné krystalizační podmínky. Stanovené optimální podmínky se dále upravují tak, aby byly získány monokrystaly v největší kvalitě, které budou dále zkoumány rentgenovou difrakcí (Kundrot, 2004).

Dnes je k určení struktury biomakromolekul nejvíce využívána rentgenová difrakční analýza. Za pomoci této metody bylo objasněno 85 % veškerých makromolekul uložených v PDB (Li and a Chang, 2009). Velmi náročnou, ale přesto nutnou a důležitou podmínkou pro použití rentgenové strukturní analýzy je příprava monokrystalů vhodné velikosti a kvality. Proteinové krystaly jsou na rozdíl od krystalů nízkomolekulárních látek menší, méně tvrdší, mají vyšší tendenci k poškození a vyšší citlivost k teplotě a radiaci (McPherson, 2004).

U proteinů je velmi důležité předem stanovit podmínky pro růst krystalů (McPherson, 1999; Ducruix and Giege, 1999). Známé jsou určité postupy, pomocí nichž se dají stanovit konkrétní podmínky pro krystalizaci, přesto v dnešní době není přesně předepsaný postup, po aplikaci kterého bychom získaly proteinové krystaly bez neustálého pátrání a podrobování se zkouškám.

2.6 Proteinová krystalografie

Důležitým a často používaným výrazem v této oblasti je termín makromolekula. Biologická krystalogeneze se zabývá metodami určenými pro získání proteinových krystalů, určených pro rentgenovou difrakční analýzu (Kutá Smatanová, 2008).

2.6.1 Krystaly makromolekulární charakteristiky

Rozdíl mezi krystaly makromolekulárních látek a krystaly menších molekul je ve velikosti a citlivosti. Makromolekulární látky nedosahují tak velké velikosti, nemají dobré mechanické vlastnosti a většinou obsahují ve svém objemu 20 – 80% rozpouštědla. Další nevýhodnou vlastností těchto krystalů je jejich drobnost a náchylnost k vnějším faktorům. Tyto krystaly musí být uloženy v prostředí jejich vzniku. Odstraňování vody je předpokladem jejich poškození (Kutá Smatanová, 2008).

2.6.2 Databáze makromolekul

Krystaly makromolekul, jejich vlastnosti a údaje o krystalizačním procesu jsou uloženy v databázi BMCD. Všechny uložené informace byly získány z literatury (Gilliland et al., 1994; Gilliland, 1998). BMCD obsahuje makromolekuly, z kterých byly vytvořeny krystaly difrakční kvality (Gilliland et al., 1994). Veškeré dosavadní poznatky o krystalizaci jednotlivých makromolekul včetně dat naměřených pomocí X-ray lze nalézt v proteinové databance RCSB PDB (Berman et al., 2000).

2.7 Rentgenová (X-ray) krystalografie

Rentgenová krystalografie je významná metoda, která se používá pro stanovení struktury a funkce makromolekulárních látek. Jedná se o významný technický objev, pomocí něhož lze stanovit strukturu proteinů a jiných komplexů pomocí zkoumání difrakce na jejich atomech (Kutá Smatanová, 2008). Podstatou krystalografie je ozařování proteinových krystalů paprsky rentgenového záření. Pokud paprsky X-ray procházejí krystalem, tak mohou být neohrazené nebo při setkání s elektrony může dojít k difrakci (Twyman, 2004). Nutnou podmínkou rentgenové difrakční analýzy je získání kvalitních krystalů, které jsou schopny difraktovat X-ray záření (Bollag et al., 1996).

X-ray krystalografie má významné postavení v oblastech vědy a průmyslu. Její důležitost se projevuje také v chemii, fyzice a v mnoha jiných dalších oborech (Woolfson, 1997).

2.8 Předkrystalizační test (PCT)

Cílem testu je stanovení optimální koncentrace proteinového roztoku pro jeho následné použití ke krystalizačním experimentům. Vhodná koncentrace proteinu je důležitá ke správnému výsledku celého pokusu. V případě velké koncentrace roztoku proteinu dochází k tvorbě beztvarych sraženin, kdežto u velmi nízkých koncentrací nedochází k žádným změnám a výsledkem jsou čisté průhledné kapky. Kapky a sraženiny jsou vytvářeny v důsledku nevhodně zvoleného precipitantu. PCT stanovuje požadavky na vhodnou koncentraci proteinového roztoku nebo směřuje k předpokladu nových diagnostických pokusů (Kutá Smatanová, 2008).

2.9 Metody krystalizace

Krystalografie je zásadním prostředkem ke stanovení struktury makromolekul. Metody krystalizace neboli krystalogeneze slouží k vypěstování krystalů v kvalitě vhodné k difrakčnímu měření. V dnešní době je známa celá řada metod používaných ke krystalizaci makromolekulárních látek (Ducruix and Giege, 1999; Bergfors, 1999).

Krystalizační metody jsou rozčleněné do tří skupin:

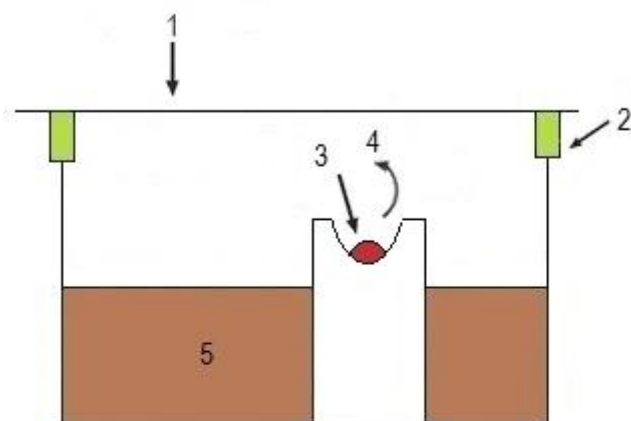
- 1. Standardní**
- 2. Pokročilé**
- 3. Alternativní**

2.10 Standardní a pokročilé metody krystalizace

V praxi se nejvíce používají metody, jejichž podstatou je difúze vodních par, oddělování látek na základě rozdílné rozpustnosti a metoda krystalizace pod olejem (McPherson, 2009).

2.10.1 Metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapor Diffusion“)

Metoda sedící kapky je jednou z nejvíce používaných metod krystalizace. K provedení nenáročného pokusu je potřeba krystalizační destičky. Sedící kapka je tvořena roztoky proteinu a precipitantu (srážecího činidla). Kapka tvořená roztokem srážecího činidla a proteinu v určitém poměru má nižší hodnotu koncentrace srážecího činidla než je jeho hodnota v rezervoáru. Pro vytvoření rovnováhy mezi rezervoárem a kapkou dochází k vypařování vody z kapky a zvyšování stavu nasycení. Rovnováha nastane v případě, že je koncentrace precipitantu v rezervoáru téměř stejná jako jeho koncentrace v kapce. Krystalizační destička je uzavřena lepicí páskou nebo plastovým sklíčkem za pomoci silikonu (Kutá Smatanová, 2008). Většina krystalizačních destiček má přehledně popsané řádky a sloupce kvůli lepší přehlednosti (Bergfors, 2009). Metoda sedící kapky je znázorněna na Obrázku 2.



1. krycí sklíčko
2. tuk
3. kapka proteinu a srážedla
4. voda
5. srážecí činidlo v rezervoáru

Obrázek 2. Znárodnění krystalizačního experimentu pomocí metody sedící kapky

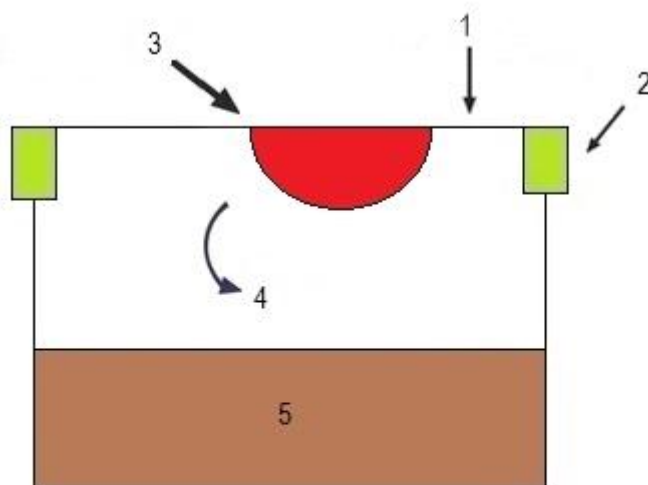
Výhody metody sedící kapky jsou (Bergfors, 2009):

- Nízká finanční nákladnost
- Časová nenáročnost
- Umístění kapek v pevné poloze
- Možnost pracovat s většími objemy
- Snadná manipulace

2.10.2 Metoda visící kapky („Hanging Drop Vapor Diffusion“)

Stejně jako v předchozím případě, i zde se jedná o běžně využívanou metodu krystalizace, při které se používají krystalizační destičky. Kapka vytvořena smícháním roztoku proteinu s precipitantem obsahuje precipitant v nižší koncentraci než je koncentrace srážecího činidla v rezervoáru. Kapka je zavěšena na krycím sklíčku, které překrývá rezervoár s krystalizačním roztokem. Krycí sklíčko přiléhá k otvoru pomocí silikonu. Voda je uvolněna z kapky a pomalu dochází ke stavu přesycení. Ke změnám koncentrace dochází jak v rezervoáru, tak v kapce (Kutá Smatanová, 1999; Carter and Smith, 1989). Destičky se vkládají do polystyrenové krabice z důvodu zamezení případným teplotním změnám, které by mohly negativně ovlivnit průběh celého pokusu.

Při krystalizaci je vhodné použít VDX destičku (Kutá Smatanová, 2008; Doublíé, 2007). Metoda visící kapky je znázorněna na Obrázku 3.



1. krycí sklíčko
2. tuk
3. kapka proteinu a srážedla
4. voda
5. srážecí činidlo v rezervoáru

Obrázek 3. Znáznornění krystalizačního experimentu pomocí metody visící kapky

Kutá Smatanová (2008) uvádí výhody této metody:

- Účinnost
- Snadná manipulace s krystaly
- Jeden rezervoár postačí na více pokusů

Luft and DeTitta (1992) uvádí jako výhodu této metody malé množství proteinu potřebného k pokusu.

2.10.3 Metoda difúze přes přepážku („Counter-diffusion“)

Metoda krystalizace v kapilárách je označována za progresivnější způsob provádění krystalizace. Je účinná, nenáročná a slouží k získání optimálních krystalů pro další zkoumání (Garcia–Ruiz et al., 1993). Protein a precipitant jsou ve vzájemném kontaktu. Do kapiláry se umísťují opačnými směry a při krystalizaci do sebe prostupují (Kutá Smatanová, 2008). V důsledku prostupu nastává přesycení a postupná tvorba mikrokrystalů. Později dochází k intenzivnímu růstu krystalů s optimálními vlastnostmi

pro následné zkoumání. Podstatou pokusu je vhodně stanovená koncentrace proteinu a precipitantu (Garcia–Ruiz et al., 1993).

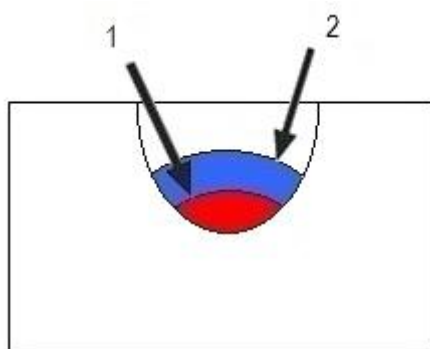
2.10.4 Metoda pod olejem („Microbatch Under Oil“)

Jako první ji charakterizovala Chayen et al. (1992). Podstatou metody je smísení proteinu s precipitantem. Následná směs je aplikována pod vrstvu parafinového oleje. Při krystalizaci dochází pouze k malému či žádnému průchodu vody přes vrstvu oleje (Chayen et al., 1992). Vytvořená kapka je aplikována do krystalizační destičky ručně pomocí pipety nebo automaticky nastaveným dávkovačem. Kapka sestupuje do důlku na základě její větší hmotnosti v porovnání s olejem (Chayen, 1997).

Při dávkování pomocí pipety je nutné dbát na výměnu plastové špičky pipety z důvodu nechtěného zanesení látek z jiných pokusů. Průběh krystalizace je ovlivněn charakterem oleje a velikostí jeho vrstvy. Při metodě pod olejem dochází k redukci počtu krystalů, ale velikost krystalů roste (Chayen, 1997). Metoda krystalizace pod olejem je znázorněna na Obrázku 4.

Chayen (1997) uvádí některé výhody této metody:

- Potřeba malého množství proteinu a precipitantu
- Nenáročnost v porovnání s jinými metodami. V případě automatického dávkování je uskutečněno minimálně 100 testů v časovém úseku pod 25 minut.



1. kapka proteinu a srážecího činidla
2. kapka oleje

Obrázek 4. Znázornění krystalizačního experimentu pomocí metody pod olejem

2.11 Testy krystalů

Pro zjištění vlastností krystalů jsou definovány metody (Bergfors, 2009):

- Crush (drtící) test - je založen na poškození krystalu špičatým nástrojem. V případě snadného narušení zkoumaného krystalu se jedná o protein. Nesnadné narušení krystalu poukazuje na sůl.
- Dehydratační test - spočívá v následné dehydrataci krystalů. V případě rychlého rozdrolení krystalu jde o protein, nenarušení krystalu udává přítomnost soli.
- Izit - jedná se o barvicí test. Základ spočívá v prostupování molekul barviva do struktury krystalu. Jestliže dojde k prostoupení barviva do krystalu a následnému zbarvení krystalu, jde ve většině případech o proteinový krystal. Sůl neumožňuje přechod barviva do své struktury, tudíž nedojde ke zbarvení krystalu.
- SDS PAGE elektroforéza - je založena na opětovném rozpuštění krystalů. Následná elektroforéza určí, zda se jedná o krystal soli či proteinu.
- Rentgenová difrakční analýza - patří mezi nejlépe vypovídající způsob testování krystalů. Lze ji využít i v případě neuspokojivé kvantity krystalů. Difrakční údaj soli je vyjádřen menším zastoupením větších difrakčních obrazců. Difrakční záznam proteinu je charakterizován velkým množstvím menších uspořádaných skvrn.

2.12 Halogenalkandehalogenasy (HLD)

Halogenalkandehalogenasy jsou enzymy, které urychlují hydrolytický rozklad vazby mezi halogenem a uhlíkem. Produktem dehalogenace je alkohol a halogenidový iont (Janssen, 2004). Bakteriální enzymy jsou významné při mineralizaci halogenovaných komplexů, resp. látek, které ohrožují životní prostředí (Janssen et al., 2005). Jejich charakteristikou je detoxikační schopnost, pomocí níž dokážou čistit znečištěné vody či území, kde jsou přítomny halogenované uhlovodíky (Degtjarik et al., 2013).

K první izolaci HLD došlo v roce 1985 a zdrojem HLD byla bakterie *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Keuning et al., 1985). Na základě uvedené úspěšné izolace HLD byly další izolace prováděny stejným způsobem (Damborský et al., 2001).

HLD jsou obsaženy v bakteriích žijících v půdě kontaminované halogenovanými látkami (Keuning et al., 1985; Nagata et al., 1993; Curragh et al., 1994). Jsou přítomny u některých mořských bakterií (Jesenská et al., 2009; Chan et al., 2010), také u bakterií vyvolávajících nemoci (Jesenská et al., 2002; Jesenská et al., 2005), nebo je obsahují rostlinní parazité (Hasan et al., 2011). Část bakterií obsahujících HLD žije na halogenovaných sloučeninách a jako zdroj energie využívají pouze uhlík. Bakterie využívají enzymy pro jejich správný metabolismus (Janssen, 2004).

2.12.1 Struktura HLD

HLD jsou řazeny do skupiny α/β - hydrolas (Nardini and Dijkstra, 1999). Proteiny patřící do této skupiny mají stejného předchůdce (Damborsky et al., 2010). HLD je tvořena dvěma částmi, tzv. doménami: hlavní a vrchní (víčkovou) „cap“ doménou. Hlavní doména je tvořena osmi β skládanými listy, které jsou obklopeny šesti α šroubovicemi (Ollis et al., 1992). Víčková doména je připojena na hlavní doménu a je více náchylná k mutacím. Tvoří ji 4 až 5 α šroubovic (Chovancova et al., 2007). Mezi hlavní a vrchní doménou se nachází aktivní místo enzymu (Verschueren et al., 1993).

2.12.1.1 Aktivní místo

Aktivní místo se nachází v samotném nitru enzymu (Chovancova et al., 2007). Kontakt mezi ním a okolím je zprostředkován tunely, které zajišťují pohyb ligandů dovnitř či ven z enzymu. Tunely mají svůj velký význam při navázání substrátu a uvolnění produktu (Otyepka and Damborský, 2002; Petřek et al., 2006). Aktivní místo má různou velikost mezi jednotlivými halogenalkandehalogenasami. Je tvořeno aminokyselinami z hlavní i vrchní cap domény (Chovancova et al., 2007). Tyto aminokyseliny jsou základem tzv. katalytické triády. Ke katalytické triádě patří ještě dvě aminokyseliny a vzniká katalytická pentáda, která se u jednotlivých HLD liší podle jejich rozdílného původu (Damborský et al., 2010; Chovancova et al., 2007). Pentáda HLD druhé skupiny, kam patří i enzym LinB, je obvykle tvořena aminokyselinami Asp – His - Asp + Trp - Asn (Chovancova et al., 2007). Avšak u LinB86 je jedna Asp nahrazena Glu. Damborský and Koča (1999) uvádí, že je dehalogenace uskutečňována v samotném nitru enzymu za pomoci pentády.

2.12.2 Funkce a použití

Dnes je halogenalkandehalogenasam věnována velká pozornost z důvodu jejich urychlovací aktivity při reakcích, která byla již mnohokrát vyzkoušena a ověřena. Nejvíce jsou HLD prospěšné jako biokatalyzátory (Drienovska et al., 2012). Podílejí se na odbourávání nečistot ze znečištěných oblastí. Mají dostatečně vysoké detoxikační schopnosti, pomocí nichž dokážou čistit znečištěné vody či území, kde jsou přítomny halogenované uhlovodíky (Degtjarik et al., 2013). Výskyt halogenalkandehalogenas v pitné vodě způsobuje zdravotní potíže (Holloway et al., 1998).

2.12.3 Enzym LinB

Bakteriální enzym LinB patří do druhé skupiny HLD s označením HLD-II (Marek et al., 2000). Jeho zdrojem je půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26. Vlastnosti enzymu se mohou využít v biologickém rozkladu látek znečišťujících životní prostředí (Degtjarik et al., 2013). Enzym LinB je tvořen hlavní a vrchní cap doménou (Marek et al., 2000).

2.12.3.1 Varianta LinB32

V enzymu LinB32 je mutace s označením L177W. Následkem této mutace dochází k blokaci základního tunelu tohoto enzymu. LinB32 má proto odlišný výběr substrátu a určuje mezní hodnotu výstupu iontu halogenidu do okolního prostředí (Chaloupková et al., 2003; Biedermannová et al., 2012).

2.12.3.2 Varianta LinB70

LinB70 má z části odlišnou katalytickou účinnost a její mutace jsou označeny pod názvy L44I a H107Q (Degtjarik et al., 2013). V enzymu LinB70 je oblast pro navázání halogenidu v téměř stejné pozici jako u DbeA (Degtjarik et al., 2013). Enzym DbeA je nově objevená HLD izolována z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 (Ikeda–Ohtsubo et al., v přípravě).

2.12.3.3 Varianta LinB86

Do dnešní doby nebyl publikován žádný článek ohledně varianty LinB86. Cílem mutagenese bylo uzavření hlavního vstupního tunelu do aktivního místa a zároveň otevření alternativní cesty pro průchod ligandu (Degtjarik, vlastní sdělení).

3 Materiál a metodika

3.1 Experimentální pracoviště a rozčlenění pokusu

V bakalářské práci je popsána studie mutantní formy proteinu halogenalkandehalogenasy LinB86 izolované z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26.

Metodika se zabývá molekulárně dynamickou studií mutantní formy proteinu a nalezením optimálních podmínek k produkci krystalů výše zmíněného mutantního proteinu pomocí standardních a pokročilých metod krystalizace. Veškeré experimenty byly provedeny v Ústavu komplexních systémů Fakulty rybářství a ochrany vod Jihočeské univerzity se sídlem v Nových Hradech.

Experimentální práce byla rozčleněna do několika po sobě jdoucích kroků. V prvním kroku byl připraven precipitační roztok (precipitant). Ve druhém kroku byla upravena koncentrace mutantního proteinu LinB86. Poté následovala přeměněna nově vzniklé koncentrace do tří konkrétních roztoků. Ve třetím kroku byly aplikovány standardní a pokročilé krystalizační metody, konkrétně metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapor Diffusion“), metoda visící kapky („Hanging Drop Vapor Diffusion“), metoda difúze přes přepážku („Counter-diffusion“) a metoda krystalizace pod olejem („Microbatch Under Oil“). Čtvrtý krok byl zaměřen na testování vzniklých krystalů pomocí Crush testu, který určil, zda se jedná o krystaly proteinu nebo krystaly soli. V posledním pátém kroku byl připraven model mutantní formy proteinu LinB86 a byly provedeny molekulárně dynamické studie.

3.2 Příprava precipitačního roztoku

V prvním experimentálním kroku byl připraven precipitační roztok používaný pro nukleaci a následný růst krystalů mutantního proteinu LinB86. Precipitační roztok byl připraven ze zásobních roztoků („stock solutions“) používaných pro optimální krystalizaci s použitím komerční sady krystalizačních roztoků „Morpheus ® HT-96“ [Molecular Dimensions Limited, Suffolk, UK].

3.2.1 Precipitační roztok pro LinB86

K přípravě precipitačního roztoku byly použity následující roztoky: 800 mM Divalents mix (MgCl_2 ; CaCl_2), 1 M Buffer System 2 o pH 7,5 (pufry: Na HEPES, MOPS - acid) a 60 % P 550 MME_P20K (PEGMME 550; PEG 20K - polyethylenglykol). Precipitační roztok o objemu 30 ml byl připraven z 80 mM Divalents mix, 0,1 M Buffer System 2, 20% P 550 MME_P20K a destilované vody. Tyto roztoky byly smíchány v množství:

3 ml Divalents mix

3 ml Buffer System 2

10 ml P 550 MME_P20K

14 ml destilované vody

Pomocí pipety byly všechny roztoky (14 ml destilované vody, 3 ml Divalents mix, 3 ml Buffer System 2 a 10 ml P550 MME_P20K) smíchány v odměrném válci a bylo připraveno 30 ml precipitačního roztoku.

3.3 Úprava koncentrace proteinu LinB86

Ve druhém kroku byla upravena koncentrace proteinu. Počáteční koncentrace mutantního proteinu LinB86 byla $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Tato koncentrace byla k provedení experimentu nedostatečná a musela být zvýšena na $22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Do malé centrifugační zkumavky s filtrem Amicon® Ultra a velikostí pórů 3 KDa [EMD Millipore Corporation, MA, USA] byla napipetována destilovaná voda o objemu 400 μl a protein LinB86 o koncentraci $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Poté byla zkumavka vložena do centrifugy „Centrifuge 5415 R“ Eppendorf [Eppendorf North America, NY] a vzorek byl postupně zahuštěn na požadovanou koncentraci. Výsledkem byl proteinový roztok o koncentraci $22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a redukce objemu ve zkumavce o 200 μl .

3.3.1 Příprava tří roztoků mutantního proteinu LinB86

K přípravě roztoků byly použity tři malé plastové zkumavky. Do každé zkumavky byl napipetován proteinový roztok o konkrétní koncentraci ($16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). Veškeré výpočty byly provedeny jednoduchou matematikou. Nyní bylo

k dispozici 200 μl roztoku proteinu z centrifugy pro tři zkumavky ($200 \mu\text{l} / 3 = 66,666 \mu\text{l}$; pro lepší výpočet bylo používáno číslo 65 μl pro každou zkumavku).

1. zkumavka: $65 \mu\text{l} \cdot 16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} / 22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} = 47,27 \mu\text{l}$ proteinu
2. zkumavka: $65 \mu\text{l} \cdot 18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} / 22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} = 53,18 \mu\text{l}$ proteinu
3. zkumavka: $65 \mu\text{l} \cdot 20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} / 22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} = 59,09 \mu\text{l}$ proteinu

Dále bylo vypočteno množství potřebného pufru (0,1M Tris-HCl) do každé zkumavky:

1. zkumavka: $65 \mu\text{l} - 47,27 \mu\text{l}$ proteinu = 17,73 μl pufru
2. zkumavka: $65 \mu\text{l} - 53,18 \mu\text{l}$ proteinu = 11,82 μl pufru
3. zkumavka: $65 \mu\text{l} - 59,09 \mu\text{l}$ proteinu = 5,91 μl pufru

3.4 Standardní a pokročilé metody krystalizace

Po přípravě precipitantu a tří roztoků proteinu byla zahájena třetí fáze experimentu. Tato fáze je nejobtížnější a zabírá největší podíl času v rámci krystalizačních experimentů. Nejlépe je provádět krystalizační experimenty vzápětí po purifikaci proteinu z důvodu jeho stability. Časem totiž dochází k postupné degradaci proteinu a destruovaný protein není schopen krystalizovat. Vlastní krystalizace byla prováděna níže zmíněnými metodami.

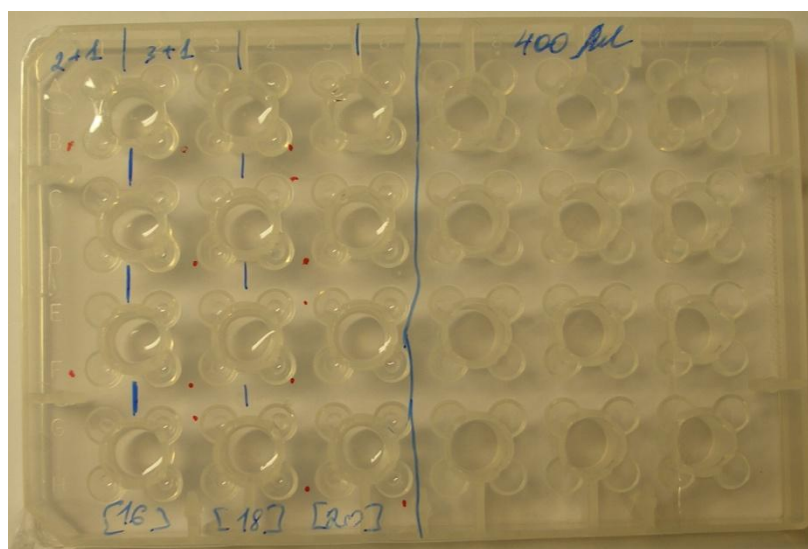
3.4.1 Metoda sedící kapky (T.M. Bergfors, 1999)

Při metodě sedící kapky byla použita krystalizační destička (Obrázek 5) s názvem CombiClover crystallization plates [EBS plate, Emerald BioStructures, WA, USA]. Destička byla tvořena čtyřadvaceti rezervoáry. Každý rezervoár byl obklopen čtyřmi jamkami (dvě jamky na pravé straně od rezervoáru a dvě jamky na levé straně od rezervoáru). Pro pokus stačilo naplnění pouze dvanácti rezervoárů srážecím činidlem. Do jamek okolo naplněných rezervoárů byl přidán protein o určitém množství a příslušné koncentraci.

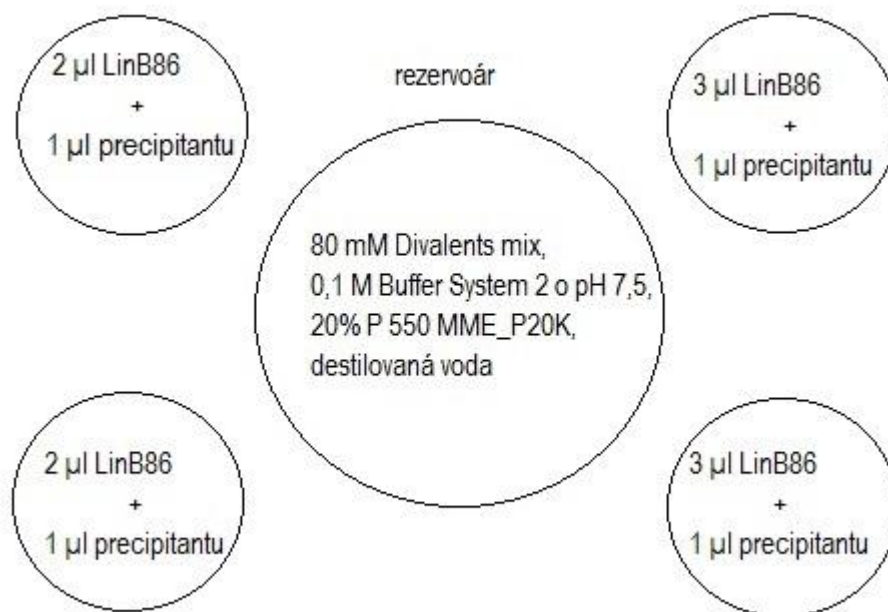
Jelikož byl experiment založen na testování třech koncentrací mutantního proteinu, bylo potřeba si rozčlenit prostor v krystalizační destičce pro každou koncentraci zvlášť. V prvním sloupci destičky, který obsahoval čtyři rezervoáry, se pracovalo s proteinem

o koncentraci $16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, ve druhém sloupci destičky byl protein o koncentraci $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a ve třetím sloupci protein o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Do prvních čtyř rezervoárů prvního sloupce byl do každého z nich napipetován precipitant o objemu $400 \mu\text{l}$. Poté byl pomocí mikropipety aplikován protein o objemu $2 \mu\text{l}$ do všech levých jamek nacházejících se těsně u rezervoárů. Do všech zbylých pravých jamek byl aplikován protein o objemu $3 \mu\text{l}$. Následně do všech jamek byl na závěr ještě přidán precipitant z rezervoáru o objemu $1 \mu\text{l}$ (Obrázek 6). Tento postup byl použit i ve zbývajících dvou sloupcích destičky, avšak s jinými koncentracemi proteinu, tj. ve druhém sloupci byl použit protein o koncentraci $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a ve třetím sloupci protein o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Ihned po provedení pokusu se destička přelepila lepicí páskou, nasadilo se na ni víčko a vše se oblepilo lepicí páskou kvůli zabránění přístupu vzduchu. Nakonec se destička umístila do chladicího boxu.



Obrázek 5. Krystalizační destička určená pro metodu sedící kapky (foto autor)

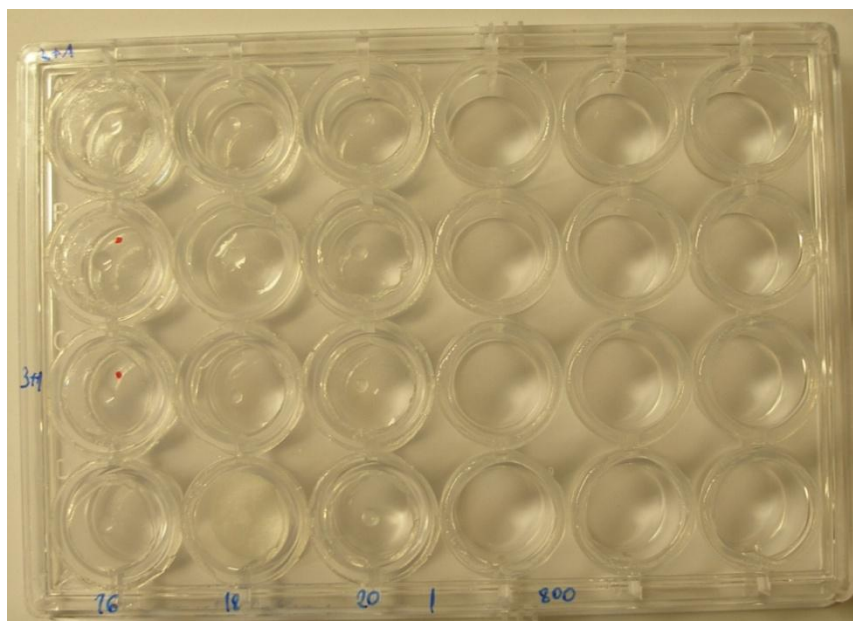


Obrázek 6. Znárodnění krystalizačního experimentu pro LinB86

3.4.2 Metoda visící kapky (T.M. Bergfors, 1999)

K metodě visící kapky byla použita krystalizační destička (Obrázek 7) s názvem „Linbro plate“ [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Destička obsahovala čtyřiadvacet rezervoárů umístěných v šesti svislých sloupcích po čtyřech rezervoárech, ale k pokusu stačilo pouze dvanáct otvorů, resp. tři svislé sloupce. Každé hrdlo rezervoáru bylo lemováno silikonovým tukem, pomocí něhož lze přichytit krycí sklíčko o doporučené velikosti 22 mm a utěsnit rezervoár, nad kterým při správně provedeném pokusu visí kapka proteinu z krycího sklíčka.

Do každého ze dvanácti rezervoárů bylo pomocí mikropipety napipetováno srážecí činidlo o objemu 800 µl. Poté se na každé krycí sklíčko aplikovalo určité množství proteinu a srážecího roztoku. Na první dvě krycí sklíčka prvního svislého sloupce byly na každé z nich napipetovány 2 µl proteinu o koncentraci 16 mg · ml⁻¹ a 1 µl srážecího roztoku (poměr 2:1). Na zbylá dvě krycí sklíčka prvního svislého sloupce byly napipetovány 3 µl proteinu a 1 µl srážecího činidla (poměr 3:1). Tímto stejným způsobem se postupovalo i ve zbylých dvou svislých sloupcích, avšak rozdíl byl v koncentraci proteinu. Ve druhém sloupci destičky byla použita koncentrace 18 mg · ml⁻¹ a ve třetím sloupci koncentrace 20 mg · ml⁻¹ (Tabulka 2). Když krycí sklíčko obsahovalo protein a srážedlo, muselo být opatrně otočeno o 180 ° a lehce přimáčknuto na hrdlo rezervoáru. Nakonec se destička uložila do chladicího boxu.



Obrázek 7. Krystalizační destička určená pro metodu visící kapky (foto autor)

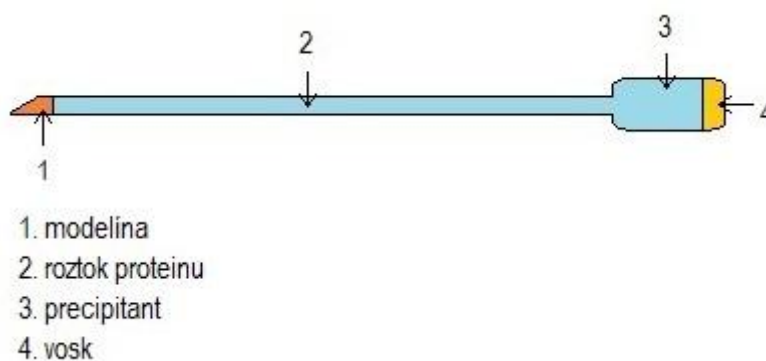
Tabulka 2. Znázornění obsahu roztoku proteinu a precipitantu v krystalizační destičce

	1. sloupec	2. sloupec	3. sloupec
1. rezervoár	2+1	2+1	2+1 μ l
2. rezervoár	2+1	2+1	2+1 μ l
3. rezervoár	3+1	3+1	3+1 μ l
4. rezervoár	3+1	3+1	3+1 μ l

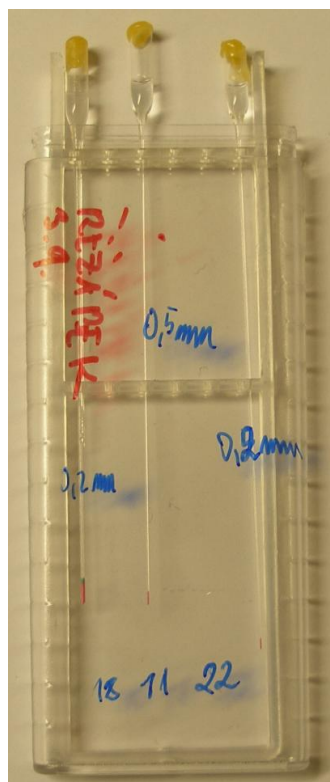
3.4.3 Metoda difúze přes přepážku (T.M. Bergfors, 1999)

K této metodě posloužily skleněné kapiláry Glass [Hampton Research, Aliso Viejo, USA] o délce 80 mm. Před začátkem pokusu musely být kapilárám seříznuty špičky, aby byl do nich umožněn vstup proteinu. Kapilára byla užším koncem ponořena do roztoku proteinu, který stoupal směrem k její rozšířené části. Když byl roztok proteinu na hranici mezi úzkou a rozšířenou částí kapiláry, byla kapilára vytažena z roztoku a její spodní část utěsněna modelínou. Následně byl do rozšířené části kapiláry napipetován precipitant o objemu 30 μ l. Došlo tedy ke kontaktu roztoku proteinu a srážecího činidla (Obrázek 8). Kapilára se uložila do předem připraveného krystalizačního boxu GCB® [Triana Sci&Tech, Španělsko] (Obrázek 9) a její rozšířená část byla utěsněna rozehřátým voskem kvůli zamezení vniknutí vzduchu.

K této metodě postačily pouze tři kapiláry, z nichž každá obsahovala různou koncentraci roztoku proteinu. Dvě kapiláry o průměru 0,2 mm obsahovaly roztok proteinu o koncentraci 11 a 18 mg . ml⁻¹. Do kapiláry o tloušťce 0,3 mm byl aplikován roztok proteinu o koncentraci 22 mg . ml⁻¹. Opět po dokončení celého pokusu se krystalizační box uložil do chladicího boxu.



Obrázek 8. Znárodnění kapiláry

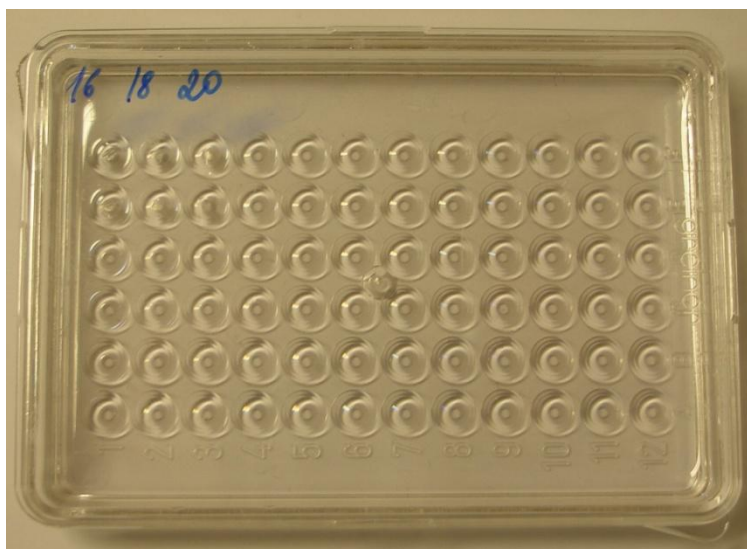


Obrázek 9. Znárodnění kapilár v krystalizačním boxu (foto autor)

3.4.4 Metoda krystalizace pod olejem (T.M. Bergfors, 1999)

K této metodě byla použita krystalizační destička „Terasaki plate“ [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] (Obrázek 10), ve které se nachází 72 jamek, avšak v tomto pokusu bylo využito pouze dvanácti jamek. Nejprve se do destičky nanesly 4 ml oleje, který vznikl smícháním 2 ml parafínového a 2 ml silikonového oleje. Poté se mohly do jamek pipetovat kapky precipitantu a roztoku proteinu. Nutností bylo dodržet toto správné pořadí, tedy do jamek byly přenášeny pomocí mikropipety nejprve kapky precipitantu a až poté kapky roztoku proteinu.

Destička byla tvořena dvanácti svislými sloupci, kdy každý sloupec obsahoval šest jamek. K provedení pokusu stačili pouze čtyři jamky z každého ze tří sloupců (tři sloupce = tři koncentrace). Do prvních dvou jamek prvního sloupce byl napipetován nejprve 1 μl precipitantu a následně 2 μl roztoku proteinu o koncentraci 16 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Do zbylých dvou jamek prvního sloupce se nanesl mikropipetou 1 μl precipitantu a 3 μl roztoku proteinu. Stejný postup byl proveden i ve zbylých dvou sloupcích, ale s jinou koncentrací roztoku proteinu, resp. roztok proteinu druhého sloupce byl 18 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a třetího sloupce 20 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Tabulka 3).



Obrázek 10. Krystalizační destička pro metodu krystalizace pod olejem (foto autor)

Tabulka 3. Znárodnění obsahu precipitantu a roztoku proteinu v krystalizační destičce

	1. sloupec	2. sloupec	3. sloupec
1. jamka	1+2	1+2	1+2 μ l
2. jamka	1+2	1+2	1+2 μ l
3. jamka	1+3	1+3	1+3 μ l
4. jamka	1+3	1+3	1+3 μ l

3.5 Testování krystalů

Podstatou čtvrté fáze bylo zjistit pomocí Crush testu, zda vzniklé krystaly byly vytvořeny z proteinu či precipitantu. Cílem krystalizačních experimentů bylo připravit krystaly pouze z proteinu. Krystaly soli jsou nežádoucí a v některých případech při vysoké koncentraci pufrů mohou vznikat přednostně.

3.5.1 Crush test

Všechny doposud používané krystalizační destičky byly vloženy pod mikroskop a následovalo rozbíjení krystalů jehlou. Došlo-li k rychlé a snadné deformaci krystalu, jednalo se o krystal proteinu, který je více náchylný na vnější vlivy. Obtížnější rozbíjení je naopak charakteristické pro krystaly soli.

3.6 Příprava modelu mutantní formy proteinu LinB86 a molekulárně dynamická studie

Ve volně přístupné databance Protein Data Bank (PDB) byl vyhledán soubor typu pdb (protein data bank) obsahující strukturní data divoké formy proteinu LinB (zdroj <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>) a následně načten do programu Swiss-PdbViewer (zdroj <http://spdbv.vital-it.ch/>) (Guex and Peitsch, 1997), v němž byla provedena mutace konkrétních aminokyselin. Počítačový program VMD (zdroj <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>) (Humphrey et al., 1996) poskytl dokonalý pohled na celou molekulární strukturu mutantního proteinu pomocí nejrůznějších nástrojů pro vizualizaci modelu. Největší pozornost byla věnována prozkoumání aktivního místa, základní domény a vrchní domény.

Pro tvorbu chemických vzorců a schémat enzymatické dehalogenace byl použit molekulárně grafický editor ChemSketch (zdroj <http://www.acdlabs.com/download/>) (ACD/ChemSketch Freeware, 2012). Programem WinCoot (zdroj <http://www.le.ac.uk/>) (Emsley et al., 2010) byla načtena mapa elektronové hustoty mutantní formy proteinu

LinB86 pocházející ze zpracovaných experimentálních dat z rentgenové difrakce. Následně byla uvedeným programem řešena prostorová struktura proteinu. K načtení molekulární struktury nativního proteinu LinB a poté i struktury jeho mutantní formy LinB86 byl použit program PyMOL (Schrödinger, 2011). Program CAVER 3.0 (Chovancová et al., 2012), který umožňuje zobrazit tunely vedoucí k aktivnímu místu enzymu, byl spuštěn jako plugin v programu PyMOL.

3.6.1 WinCoot

Volně přístupný krystalografický program WinCoot je molekulárně grafická interaktivní aplikace pro účely modelování a ověřování struktury proteinů. WinCoot dokončuje prvotní modely vytvořené z difrakčních experimentů. Vstupními daty jsou obvykle mapa elektronové hustoty a primární sekvence proteinu. Do mapy elektronové hustoty (reprezentované prostorovou sítí) je načtena sekvence proteinu, která je na základě elektronové hustoty převedena na drátový model molekuly proteinu. Tento model je pak často nezbytné manuálně pomocí různých nástrojů upravovat, aby se model co nejlépe podobal reálné molekulární struktuře proteinu (Emsley et al., 2010).

3.6.2 Swiss-PdbViewer

Swiss-PdbViewer je grafický molekulárně modelovací program, který mimo základní funkce umožňuje provádět mutaci aminokyselin (Guex and Peitsch, 1997). V souvislosti s proteinem LinB86 byla tímto programem načtena molekulární struktura proteinu LinB divokého typu a upravena na studovanou mutantní formu LinB86 náhradou konkrétních aminokyselin (Obrázek 30). Tryptofan 140 byl nahrazen alaninem (symbolicky W140A); fenylalanin 143 leucinem (F143L); leucin 177 tryptofanem (L177W) a izoleucin 211 leucinem (I211L). Ke struktuře byly dodatečně přidány dvě aminokyseliny Met 1 a Ser 2.

3.6.3 Visual Molecular Dynamics (VMD)

Jedná se o jeden z nejvíce využívaných modelovacích programů, který lze opět volně stáhnout na internetových stránkách. Zobrazuje 3D molekulární struktury, příkladem mohou být lipidy a proteiny. Ve VMD lze volit různé typy zobrazení, zbarvení a animace modelů molekul (Humphrey et al., 1996). U mutantní formy proteinu LinB86

byly pomocí VMD zobrazeny dvě domény tvořící protein, aktivní místo a jeho aminokyselinová triáda (histidin, kyselina glutamová, kyselina asparagová) a pentáda (triáda a tryptofan s asparaginem).

3.6.4 GROMACS

GROMACS (GRONingen Machine for Chemical Simulations) (Van der Spoel et al., 2005) je nejpopulárnějším softwarovým nástrojem pro molekulárně-dynamické simulace na proteinech, lipidech a nukleových kyselinách. Program je počítačový software s otevřeným zdrojovým kódem (tzv. open source) a je šířen pod všeobecnou veřejnou licenci GNU. Program je možné spustit na mnoha hardwarových platformách, procesorech CPU i GPU, je ovládán příkazovým řádkem a používá soubory pro vstupní a výstupní data.

Pro spuštění simulací je velmi podstatná příprava vstupních dat, které jsou obsaženy ve třech souborech. Veškeré informace o tvaru a rozměrech periodického boxu, o atomech, tj. o počtu, atomových typech, jejich prostorových souřadnicích a rychlostech jsou uloženy v souboru zakončeném příponou *.gro*. Tento soubor je možné vytvořit skriptem konverzí ze souboru s databázovým formátem PDB. Druhý soubor s příponou *.top* obsahuje informaci o silovém poli, vazebných a nevazebných interakcích, atomových typech a nábojích. Topologický soubor lze vytvořit manuálně nebo pomocí standardního nástroje GROMACSu *pdb2gmx*. Třetím nepostradatelným souborem je tzv. parametrický soubor s příponou *.mpd*, který definuje typ výpočtu a jeho parametry. Mezi základní typy výpočtu se řadí minimalizace energie, NVT ekvilibrace (tzv. termostatování), NPT ekvilibrace (barostatování) a produkční fáze simulace.

Postup přípravy uvedených souborů je následující. Protein musíme nejdříve solvatovat, neboli vyplnit vhodným rozpouštědlem - nejčastěji vodou či organickými rozpouštědly. Po tomto kroku lze programem zaměnit některé molekuly solventu ionty (nejčastěji ionty Na^+ a Cl^-) z důvodu vyrovnání celkového náboje. Protein je uzavřen do tzv. boxu, nejčastěji kvádru, přičemž se uvedený box nekonečněkrát nakopíruje kolem sebe ve všech směrech. Ve všech boxech se odehrávají stejné děje, takže v případě, že molekula opustí stěnu boxu, na opačnou stěnu boxu přichází stejná molekula. Simulace je nezbytná při realistické teplotě, a proto jsou před startem simulace všem atomům přiděleny náhodné rychlosti podle Maxwell-Boltzmannovského

rozdělení rychlostí. Tzv. ekvilibrace je složená ze tří po sobě jdoucích částí (minimalizace energie, termostatování a barostatování). Prvním krokem ekvilibrace je minimalizace energie, jejímž cílem je nalezení co nejvíce energeticky stabilní konformace. V průběhu solvatace v boxu může dojít ke vzniku neuspokojivé konfigurace, která obsahuje nadměrnou potenciální energii. Ta se ve většině případech změní na kinetickou energii a dojde k neplánovanému zvýšení teploty v systému.

Po fázi minimalizace energie nastává termostatování. Jeho cílem je stabilizace teploty v rámci celého systému pomocí změny rychlostí. Jiné pojmenování tohoto kroku ekvilibrace je NVT ekvilibrace (N = počet molekul; V = objem boxu; T = teplota systému).

Dalším krokem je barostatování. Jedná se o finální fázi ekvilibrace. Cílem barostatování je získání optimálního potřebného tlaku a jeho následné ustálení. Dochází k rozšiřování boxu z důvodu zachování stálé teploty, tlaku a počtu částic. Synonymem slova barostatování je NPT ekvilibrace (N = počet molekul; P = tlak; T = teplota).

Produkční běh simulace následuje po ekvilibraci. Finální výsledky tohoto kroku jsou podrobeny výzkumu i přesto, že je produkční běh časově náročnější na rozdíl od ekvilibrace a teplota je zde obtížněji regulována.

Posledním krokem molekulární dynamiky je konečná analýza dat, z níž jsou vyhotoveny výsledky v podobě grafů (pomocí utilit `g_dist`; `g_density`; `g_rdf`) (Van der Spoel et al., 2005).

3.6.5 ChemSketch

Program umožňuje vytvoření široké nabídky chemických vzorců, pro něž lze vyhledat konkrétní fyzikálně-chemické vlastnosti (například chemický název, sumární vzorec, molární hmotnost, optická aktivita, chemická reaktivita aj.). Výhodou programu je časová nenáročnost a poměrně intuitivní ovládání, tj. snadná tvorba chemických vzorců a reakčních schémat. Menší nevýhodou je neschopnost automatické tvorby aniontů, a tak je nutností chybějící ionty doplnit ke struktuře samostatně (ACD/ChemSketch Freeware, 2012).

4 Výsledky

4.1 Výsledky krystalizačních experimentů

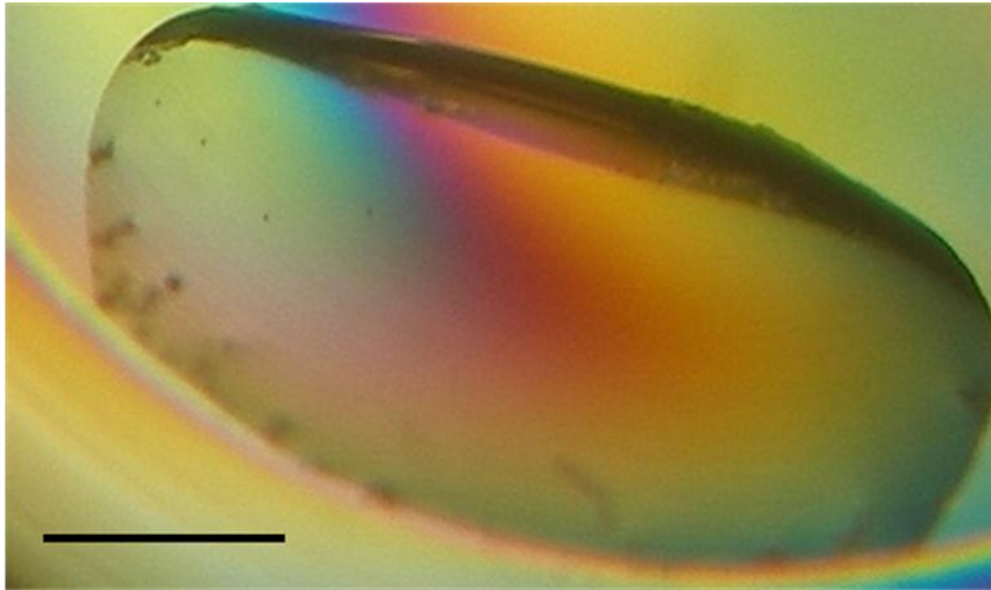
Ke krystalizačním experimentům byla použita mutantní varianta proteinu halogenalkandehalogenasy LinB86 ve třech koncentracích (16 mg . ml⁻¹; 18 mg . ml⁻¹; 20 mg . ml⁻¹) a ve dvou poměrech precipitační činidlo (precipitant) : protein. První poměr byl 1:2 (tzn. 1 μl precipitantu a 2 μl proteinu) a druhý poměr 1:3 (1 μl precipitantu a 3 μl proteinu). Pouze v případě použití metody difúze přes přepážku byly použity koncentrace proteinu 11 mg . ml⁻¹; 18 mg . ml⁻¹; 22 mg . ml⁻¹ a nebyly zde stanoveny poměry precipitantu vůči proteinu, protože při této metodě se nepoužívají krystalizační destičky, nýbrž skleněné kapiláry.

Výsledky krystalizačních experimentů s různými podmínkami krystalizace byly pozorovány pod mikroskopem značky Olympus SZX9 dvakrát týdně během několika týdnů a foceny fotoaparátem značky Olympus PEN Lite E-PL3, který je součástí mikroskopu. Pozitivní i negativní výsledky experimentů jsou uvedeny v jednotlivých kapitolách níže. Měřítka na obrázcích je 100 μm.

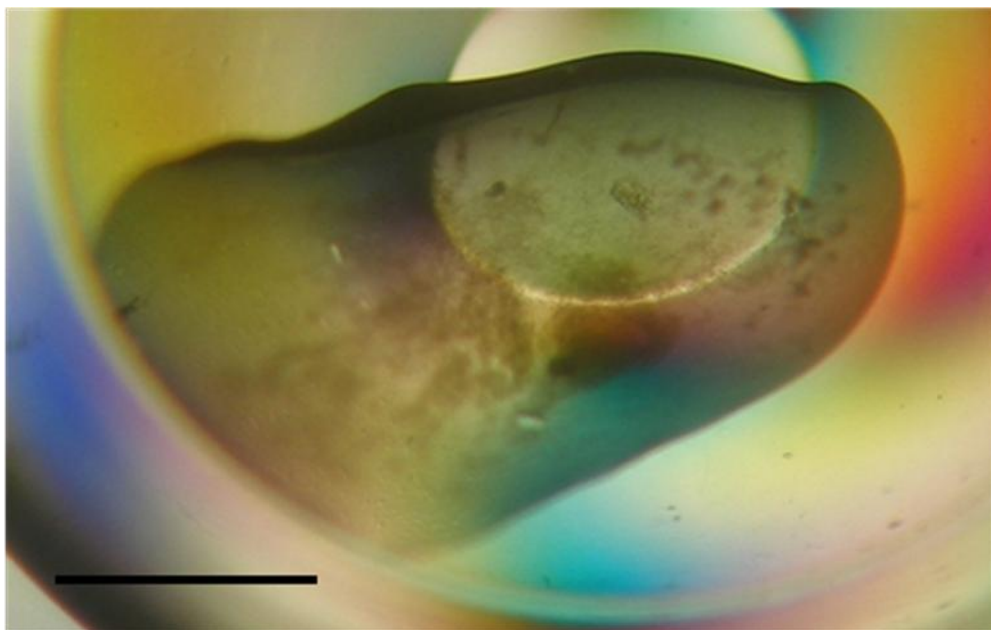
Ve všech experimentech byl použit precipitační roztok připravený ze složek: 80 mM Divalents mix, 0,1 M Buffer System 2, 20% P 550 MME_P20K a destilované vody. Jako nejúspěšnější techniky se ukázaly metoda sedící kapky a metoda visící kapky.

4.1.1 Metoda krystalizace pod olejem („Microbatch Under Oil“)

V tomto krystalizačním experimentu byly použity tři koncentrace proteinu a dva různé poměry proteinu a precipitantu, metoda krystalizace pod olejem však nebyla úspěšná ani v jednom případě. Ve všech koncentracích proteinu použitého v obou poměrech vznikla amorfni sraženina, jejíž hustota se zvyšovala s rostoucí koncentrací proteinu. V případě proteinu, který měl koncentraci 16 mg . ml⁻¹ a jeho poměr vůči precipitantu byl 2:1, došlo k vytvoření lehké amorfni sraženiny (Obrázek 11). Při nejvyšší koncentraci proteinu (20 mg . ml⁻¹) a poměru 2:1 se vytvořila hustá amorfni sraženina (Obrázek 12). Krystaly proteinu se touto metodou nepodařilo připravit. Doba trvání experimentu byla několik týdnů.



Obrázek 11. *Lehká amorfní sraženina proteinu (foto autor)*



Obrázek 12. *Hustá amorfní sraženina proteinu (foto autor)*

4.1.2 Metoda difúze přes přepážku („Counter-diffusion“)

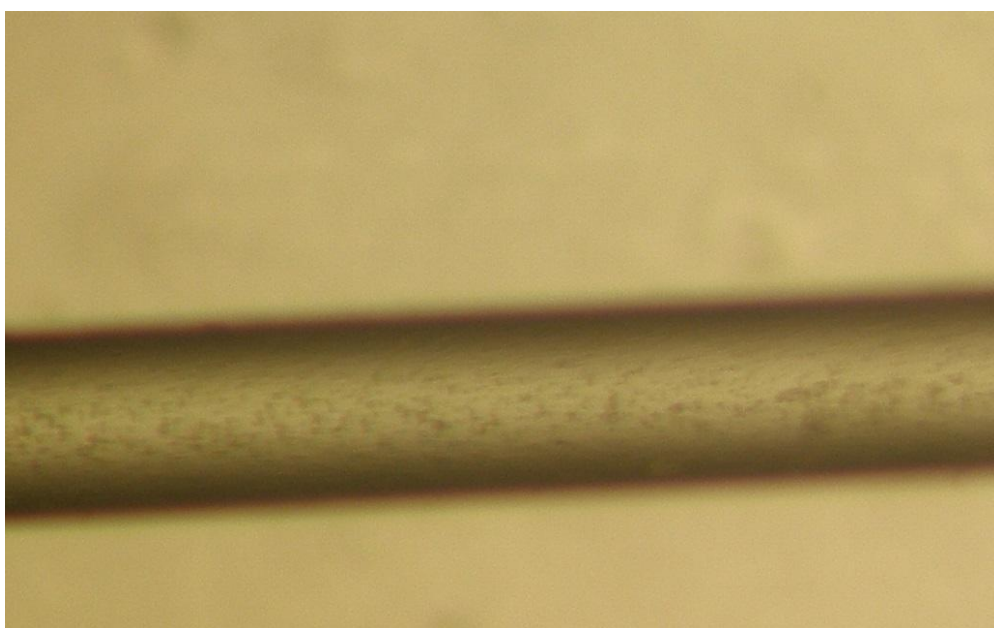
Metoda difúze přes přepážku byla oproti metodě krystalizace pod olejem úspěšnější jak pro vytvoření, tak pro následný růst proteinových krystalů. V tomto případě byly použity tři kapiláry, z nichž každá obsahovala protein o určité koncentraci.

Ke vzniku a následnému růstu mikrokystalů proteinu došlo v kapiláře obsahující koncentraci proteinu $22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ (Obrázek 13). Ve zbylých dvou kapilárách

s proteinem o koncentracích $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ se netvořily krystaly proteinu pravděpodobně z důvodu jeho nízké koncentrace. U těchto dvou koncentrací vznikly pouze amorfní sraženiny. Sraženiny vzniklé v kapiláře s koncentrací proteinu $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ jsou zobrazeny na Obrázku 14. Doba potřebná ke vzniku mikrokrystalů byla přibližně deset dní.



Obrázek 13. *Vzniklé mikrokrystaly proteinu v kapiláře s vnitřním průměrem 0,3 mm (foto autor)*

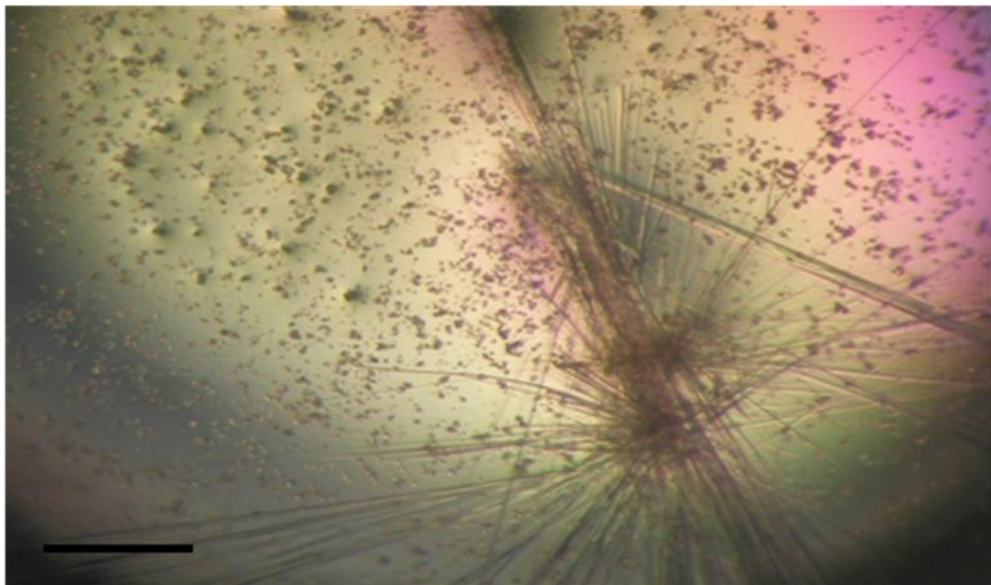


Obrázek 14. *Amorfní sraženiny v kapiláře s vnitřním průměrem 0,2 mm (foto autor)*

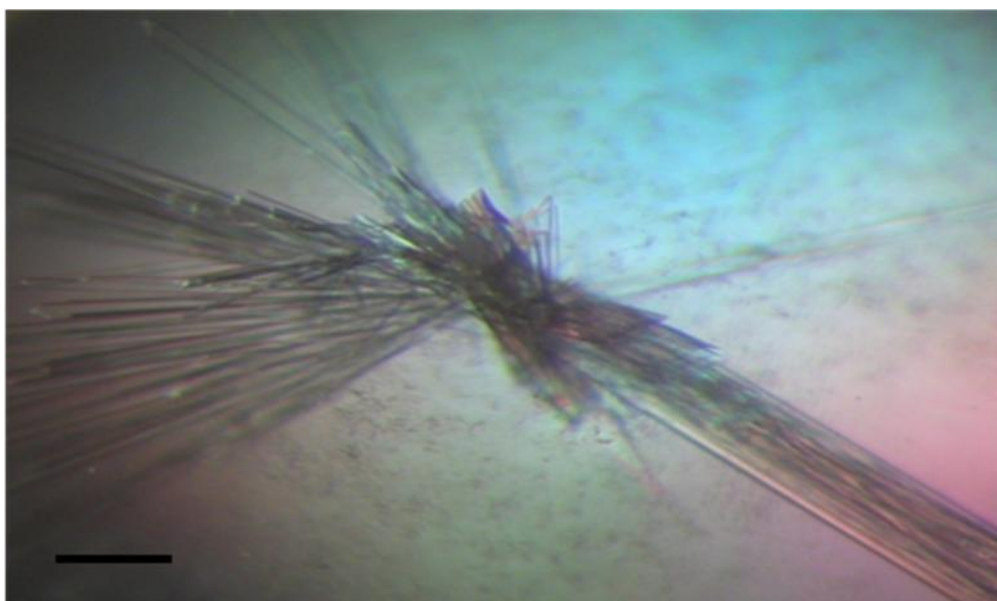
4.1.3 Metoda visící kapky („Hanging Drop Vapor Diffusion“)

Krystalizace proteinu metodou visící kapky byla úspěšná. Podobnost výsledků této metody s metodou sedící kapky byla značná. Proteiny vykryštovaly ve všech třech koncentracích a v obou použitých poměrech proteinu a precipitantu.

Při nejnižší koncentraci proteinu ($16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) vznikly malé tenké jehličkovité krystaly spojené do shluku. Z proteinu o koncentraci $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ vyrostly dlouhé jehlicové krystaly seskupené do shluku (Obrázek 15). Při nejvyšší koncentraci ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) byly pozorovány největší tyčinkovité krystaly seskupené do shluku (Obrázek 16). Krystaly na Obrázku 15 a Obrázku 16 vznikly z poměru proteinu vůči precipitantu 2:1. Čas potřebný k vykryštování enzymu LinB86 byl sedm dní.



Obrázek 15. *Jehlicové krystaly seskupeny do shluku připraveny použitím metody visící kapky (foto autor a kolektiv)*

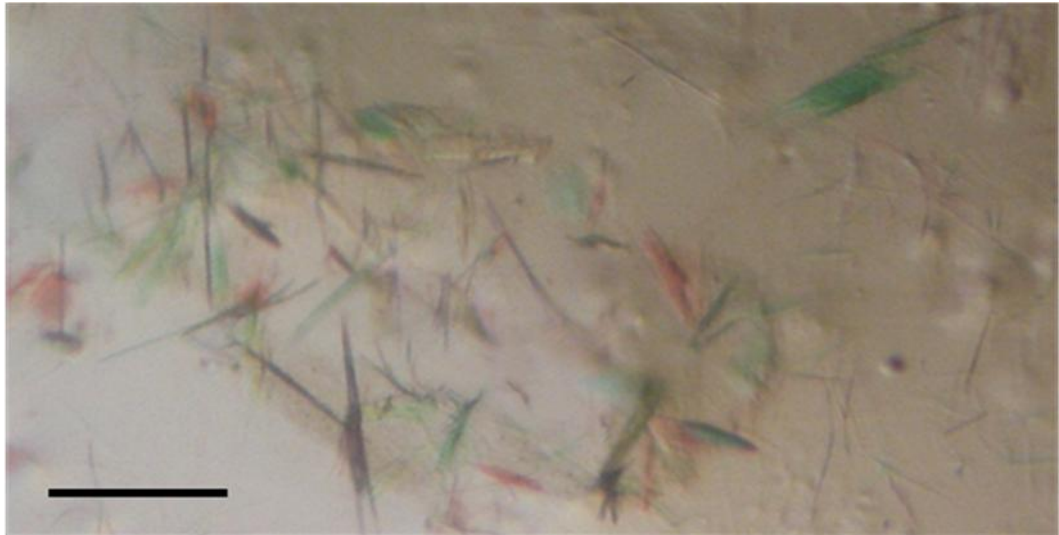


Obrázek 16. Tyčinkovité krystaly proteinu seskupeny do shluku připraveny použitím metody visící kapky (foto autor a kolektiv)

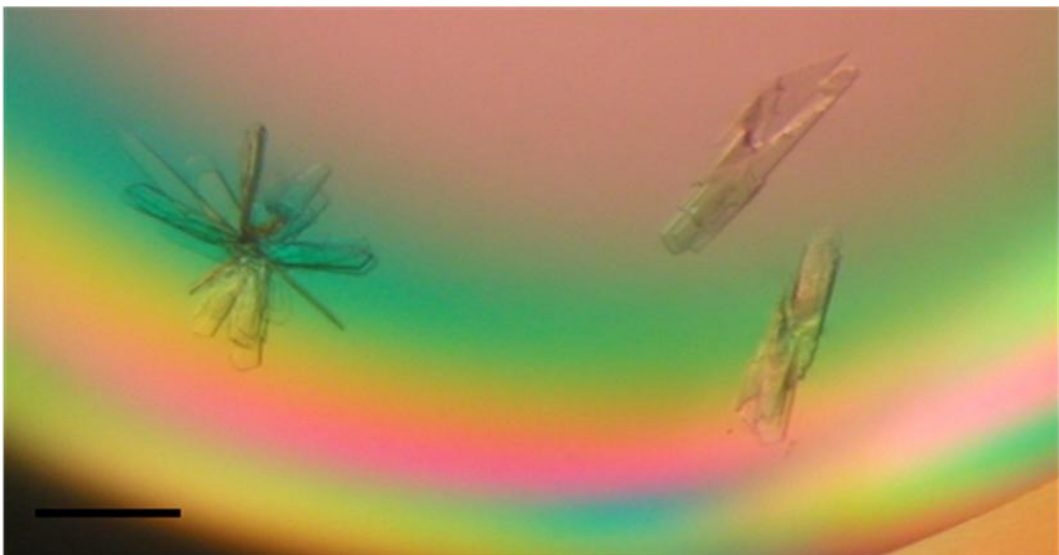
4.1.4 Metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapour Diffusion“)

Výsledky této metody byly také uspokojující, protože krystaly vykryštovaly ve všech třech koncentracích a v obou poměrech jako v předchozí metodě. Koncentrace proteinu a jeho poměry vůči precipitantu byly totožné jako v případě použití metody visící kapky. Při koncentraci LinB86 $16 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ došlo k vytvoření nejmenších krystalů ve tvaru jehliček (Obrázek 17), u proteinu o koncentraci $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ vzniklo několik malých destičkových shluků (rod clusters) (Obrázek 18) a u proteinu o koncentraci $20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ vyrostly větší tyčinkovité až destičkovité krystaly (Obrázek 19; Obrázek 20) a také malé 3D krystaly o velikosti $70 \times 50 \times 230 \text{ } \mu\text{m}$ (Obrázek 21). Všechny krystaly na obrázcích vyrostly z poměru proteinu a precipitantu 3:1 v průběhu sedmi dní.

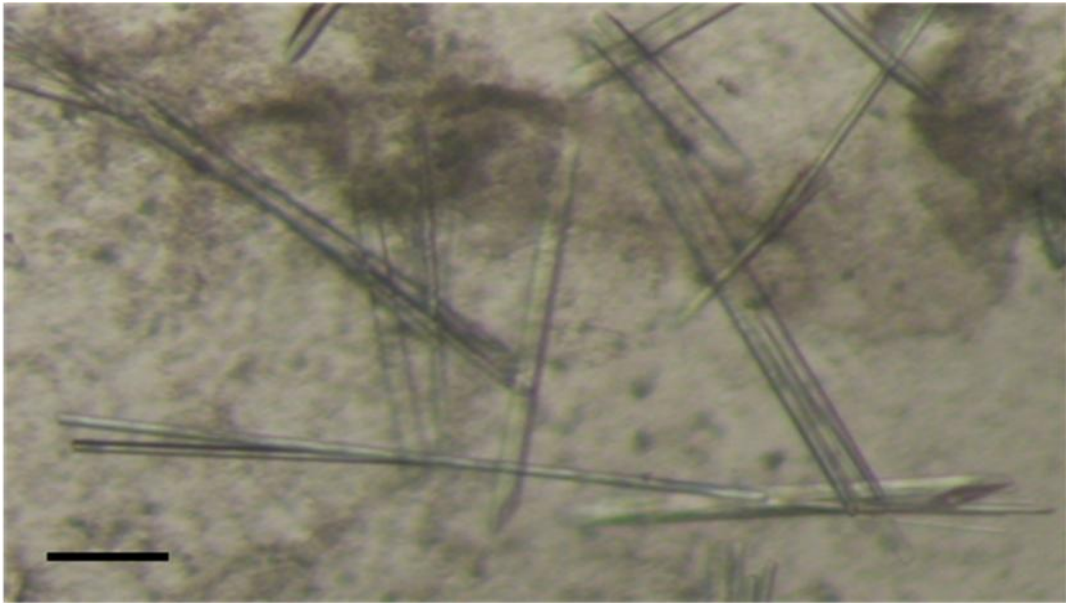
Na základě výsledků z experimentů pomocí techniky sedící kapky lze říci, že poměry precipitantu vůči proteinu neměly výrazný vliv na průběh krystalizace, avšak významnou roli sehrály koncentrace proteinu. Se zvyšující se koncentrací proteinu narostly jednotlivé monokrystaly LinB86 enzymu, které jsou vhodné k jejich použití pro rentgenovou difrakční analýzu.



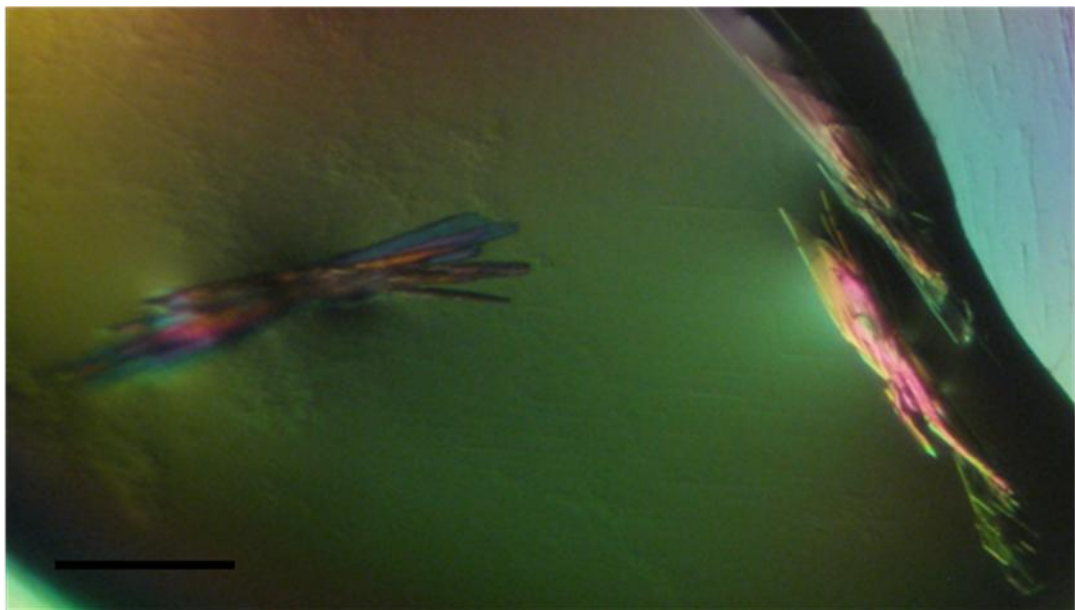
Obrázek 17. *Jehličkovité krystaly proteinu připraveny metodou sedící kapky (foto autor a kolektiv)*



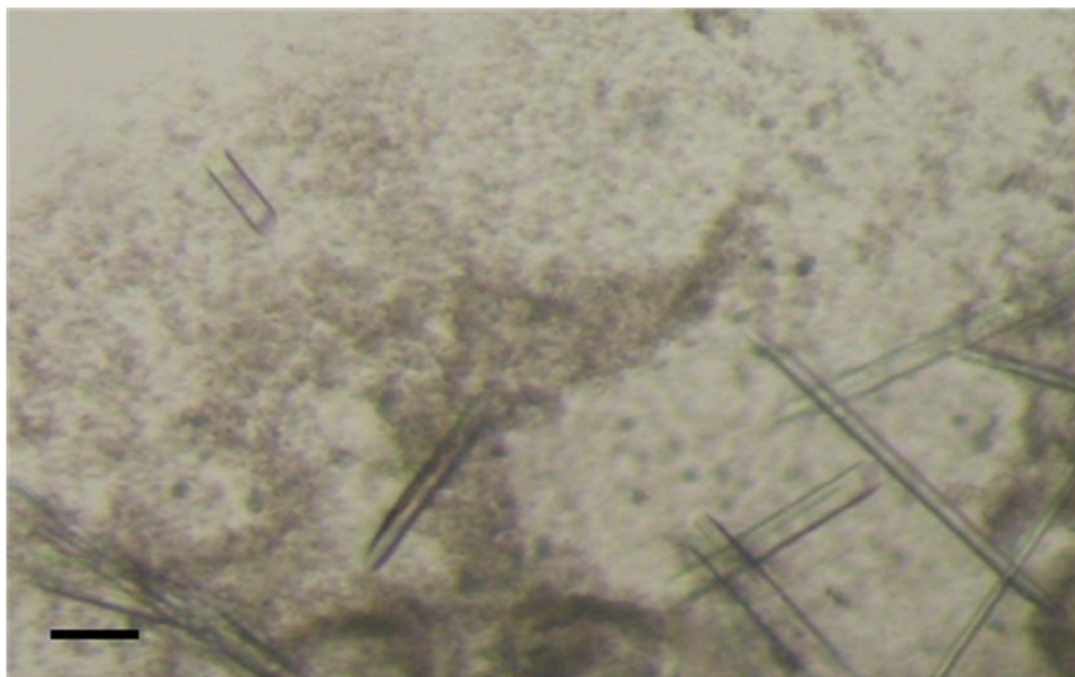
Obrázek 18. *Destičkový shluk krystalů vyrostlých pomocí metody sedící kapky (foto autor a kolektiv)*



Obrázek 19. *Velké tyčinkovité až destičkovité krystaly (foto autor a kolektiv)*



Obrázek 20. *Velké tyčinkovité až destičkovité shluky krystalů (foto autor a kolektiv)*



Obrázek 21. 3D monokrystaly LinB86 (foto autor a kolektiv)

4.2 Testování krystalů

Testování vzniklých krystalů bylo provedeno tzv. Crush testem. Pomocí testu se prokázalo, že připravené krystaly proteinu narostlé metodou sedící a visící kapky byly krystaly proteinu, nikoliv soli. Amorfni sraženina byla přítomna ve všech případech metody krystalizace pod olejem a u koncentrací proteinu $11 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ a $18 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ při použití metody difúze přes přepážku.

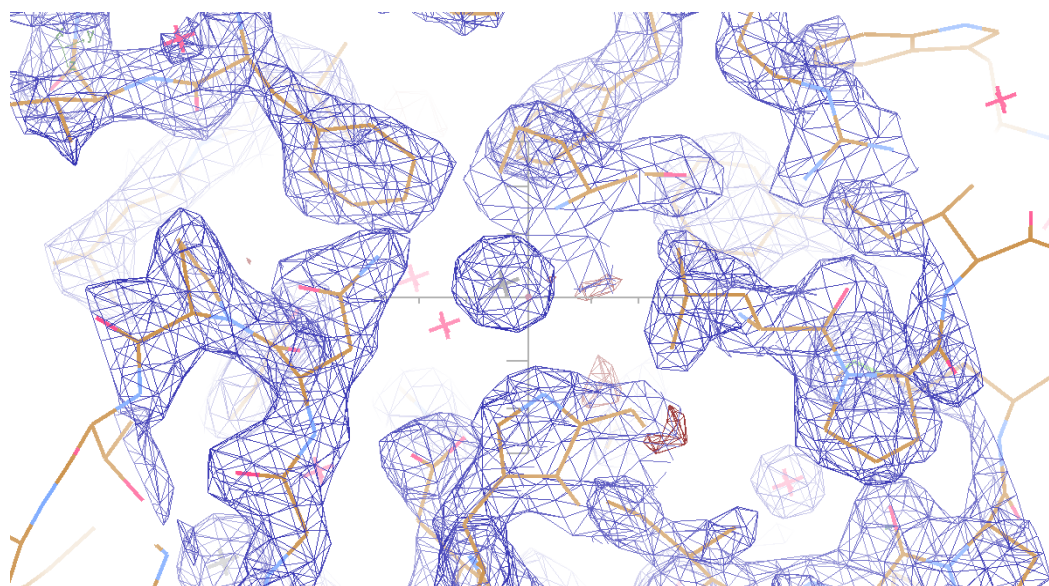
4.3 Molekulové modelování

K modelování bylo použito sedm počítačových programů: WinCoot, Swiss-PdbViewer, VMD, GROMACS, ChemSketch, PyMOL a CAVER.

4.3.1 WinCoot

Pomocí programu WinCoot (Emsley et al., 2010) byla načtena aminokyselinová sekvence a prozkoumána mapa elektronové hustoty proteinu LinB86 (Obrázek 22). Do této mapy byl poté umístěn model proteinu a jeho prostorová struktura byla dále upravována a upřesňována. Při sestavování mapy elektronové hustoty může docházet ke změnám (posunům) aminokyselin v jejich prostorovém uspořádání. V případě jejich

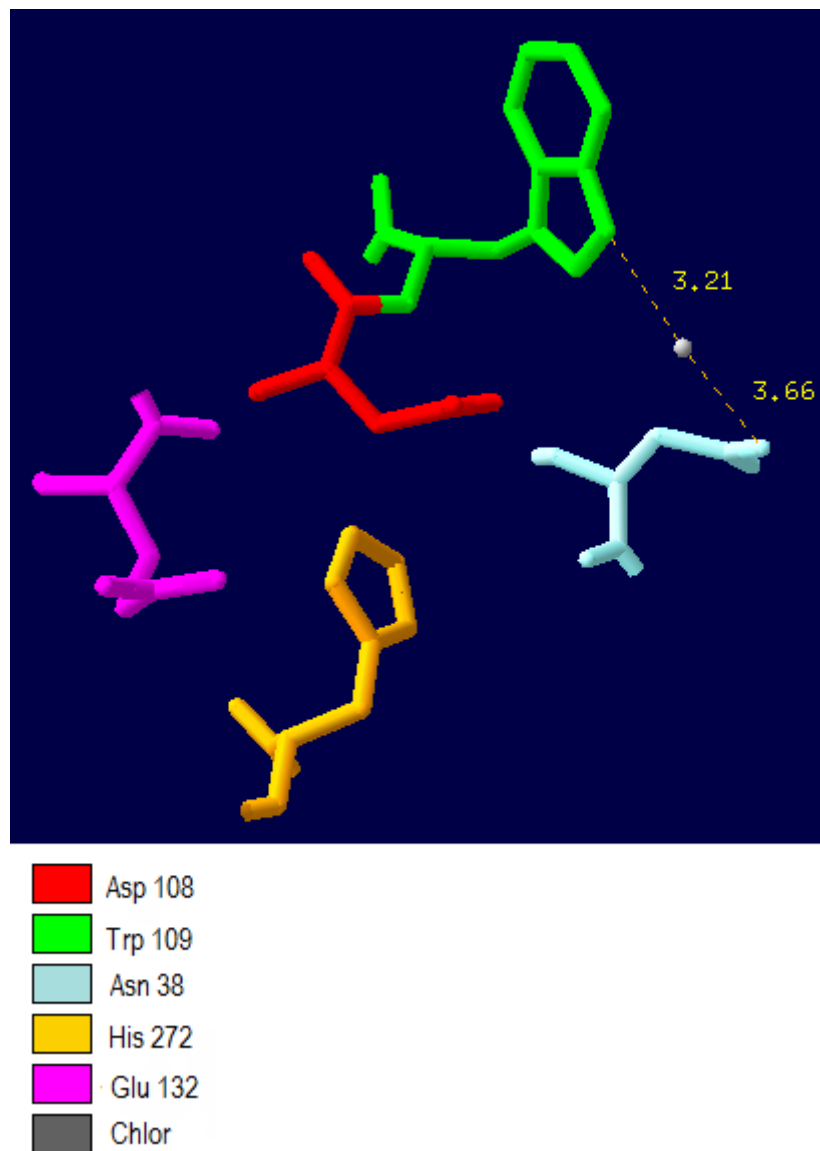
zjištění musí být tyto změny odstraněny nebo mohou být do volných částí elektronové hustoty namodelovány molekuly vody.



Obrázek 22. Mapa elektronové hustoty proteinu LinB86

4.3.2 Swiss-PdbViewer

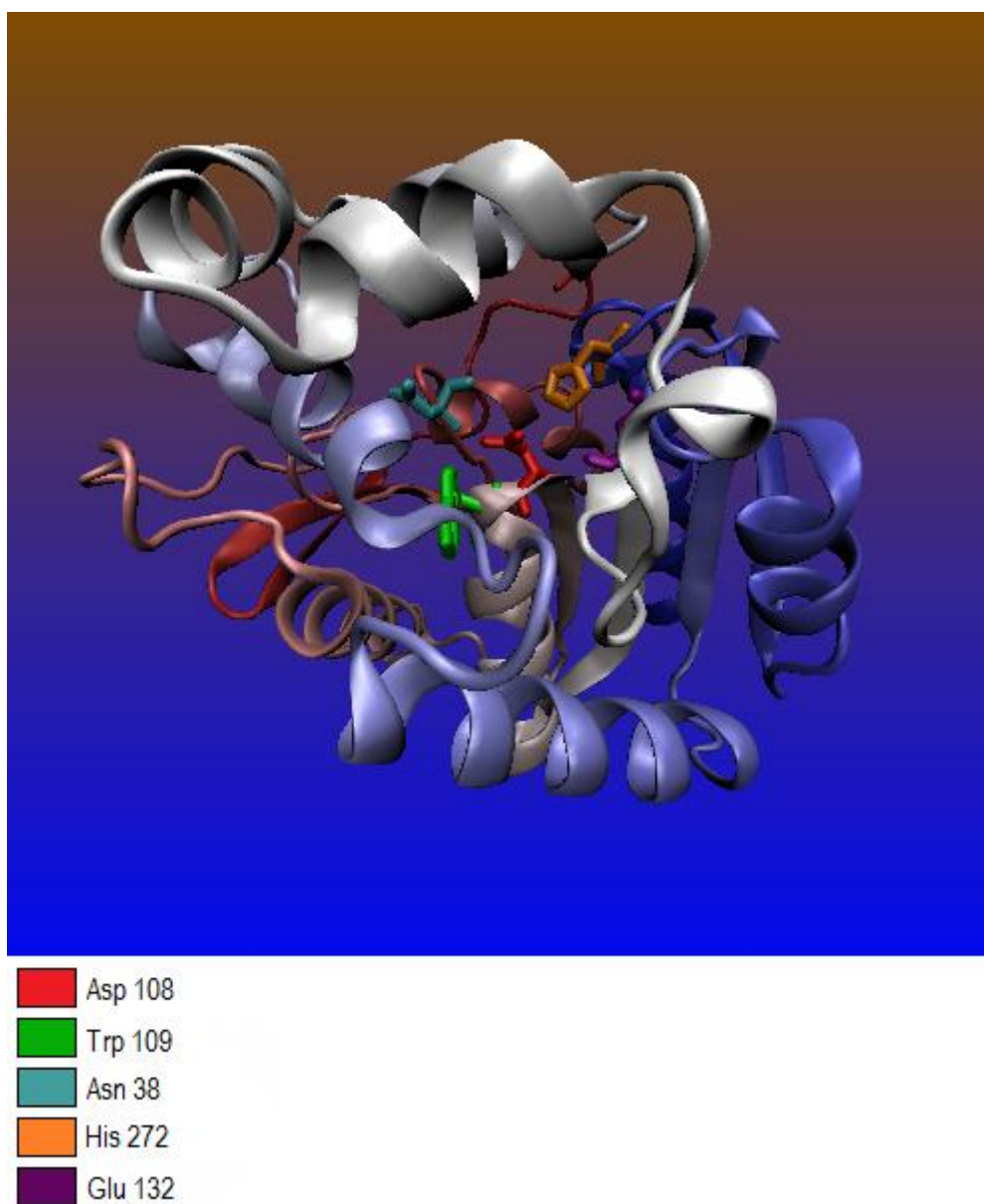
Pomocí programu Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997) byly provedeny mutace aminokyselin nativní (divoké) formy proteinu LinB. Program graficky znázornil pentádu a halogen v aktivním místě mutantního proteinu LinB86 (Obrázek 23).



Obrázek 23. *Pentáda a chlor v aktivním místě enzymu*

4.3.3 Visual Molecular Dynamics (VMD)

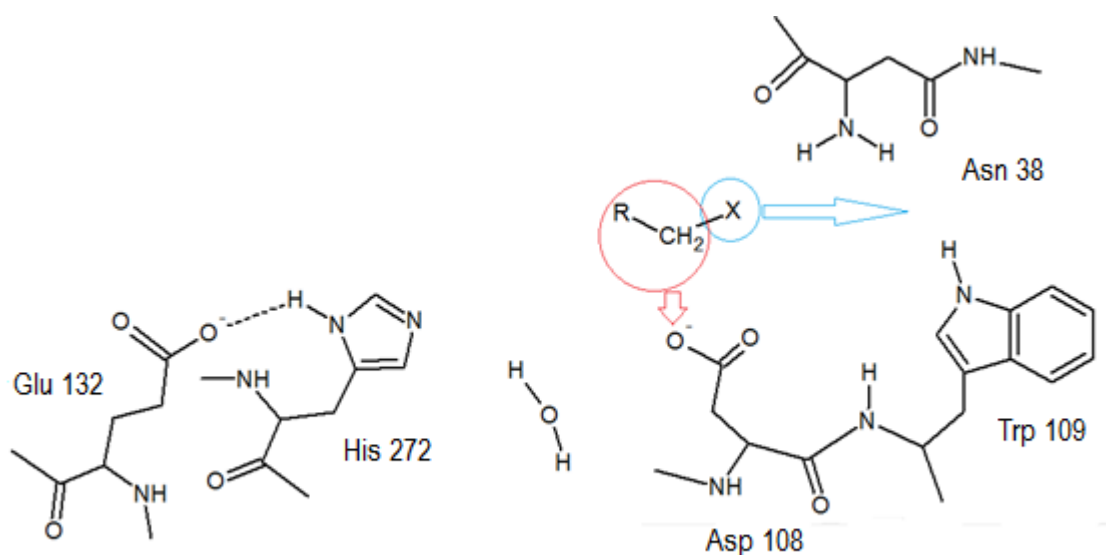
Programem VMD (Humphrey et al., 1996) byla zobrazena struktura mutantní formy halogenalkandehalogenasy LinB86 několika modely. První pohled na strukturu enzymu je zobrazen na Obrázku 24. Ostatní náhledy na protein znázorňují Příloha 1, Příloha 2, Příloha 3 a Příloha 4. V nitru proteinu bylo tímto programem zobrazeno enzymatické aktivní místo enzymu, kde se odehrává dehalogenace. V uvedeném místě je přítomna tzv. triáda tvořená trojicí aminokyselin His 272 - Glu 132 - Asp 108. K triádě přiléhají dvě aminokyseliny Trp 109 - Asn 38. Spojením triády a těchto dvou aminokyselin vzniká tzv. pentáda, která je v kontaktu s halogenem v aktivním místě.



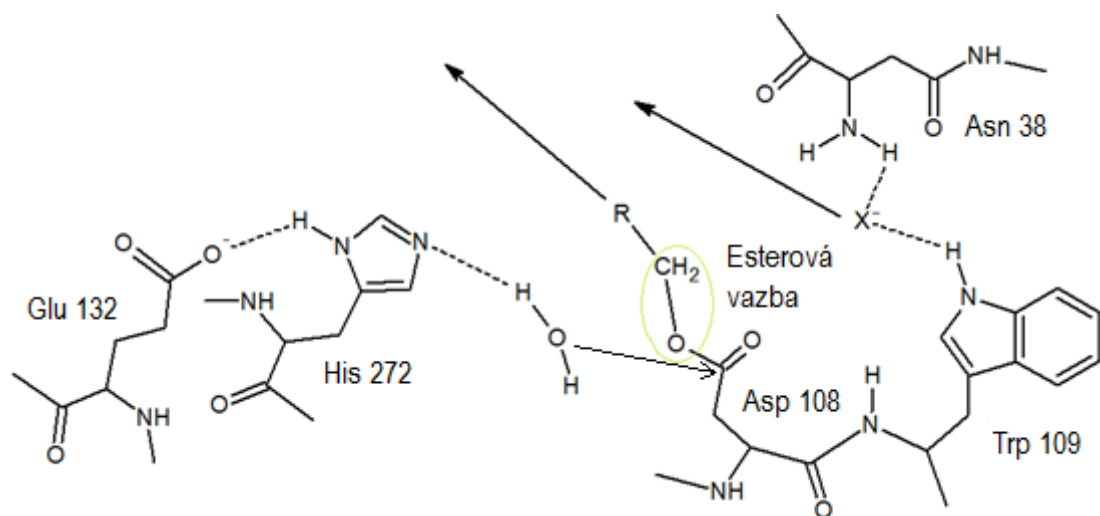
Obrázek 24. *Struktura mutantního proteinu LinB86*

4.3.4 ChemSketch

Program ChemSketch (ACD/ChemSketch Freeware, 2012) graficky znázornil schéma dehalogenace substrátu v aktivním místě tvořeném pěti aminokyselinami (pentádou) mutantní formy proteinu LinB86 za vzniku halogenidového iontu a primárního alkoholu (Obrázek 25; Obrázek 26).



Obrázek 25. První fáze reakce. Asp 108 napadá uhlík s navázaným halogenem v substrátu (substituce nukleofilní) a odštěpený halogenid (X) zaujímá pozici mezi vodíky aminokyselin Asn 38 a Trp 109. Zbytek substrátu je navázán na Asp 108 za vzniku esterové vazby.



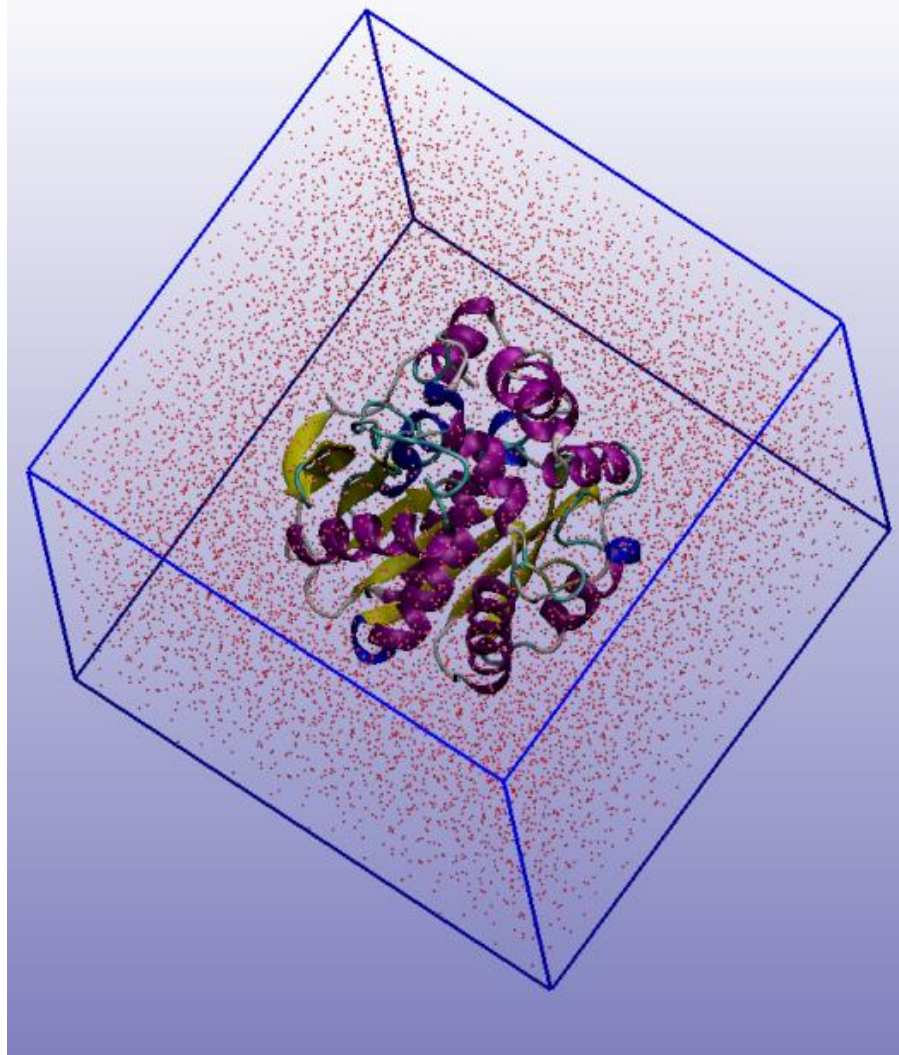
Obrázek 26. Druhá fáze reakce. Halogenid (X) vytvořil vodíkovou interakci s aminokyselinami Asn 38 a Trp 109. Při následné hydrolýze esteru molekula vody aktivovaná aminokyselinou His 272 rozkládá nově vzniklou esterovou vazbu mezi Asp 108 a zbytkem substrátu a tím vzniká primární alkohol.

4.3.5 GROMACS

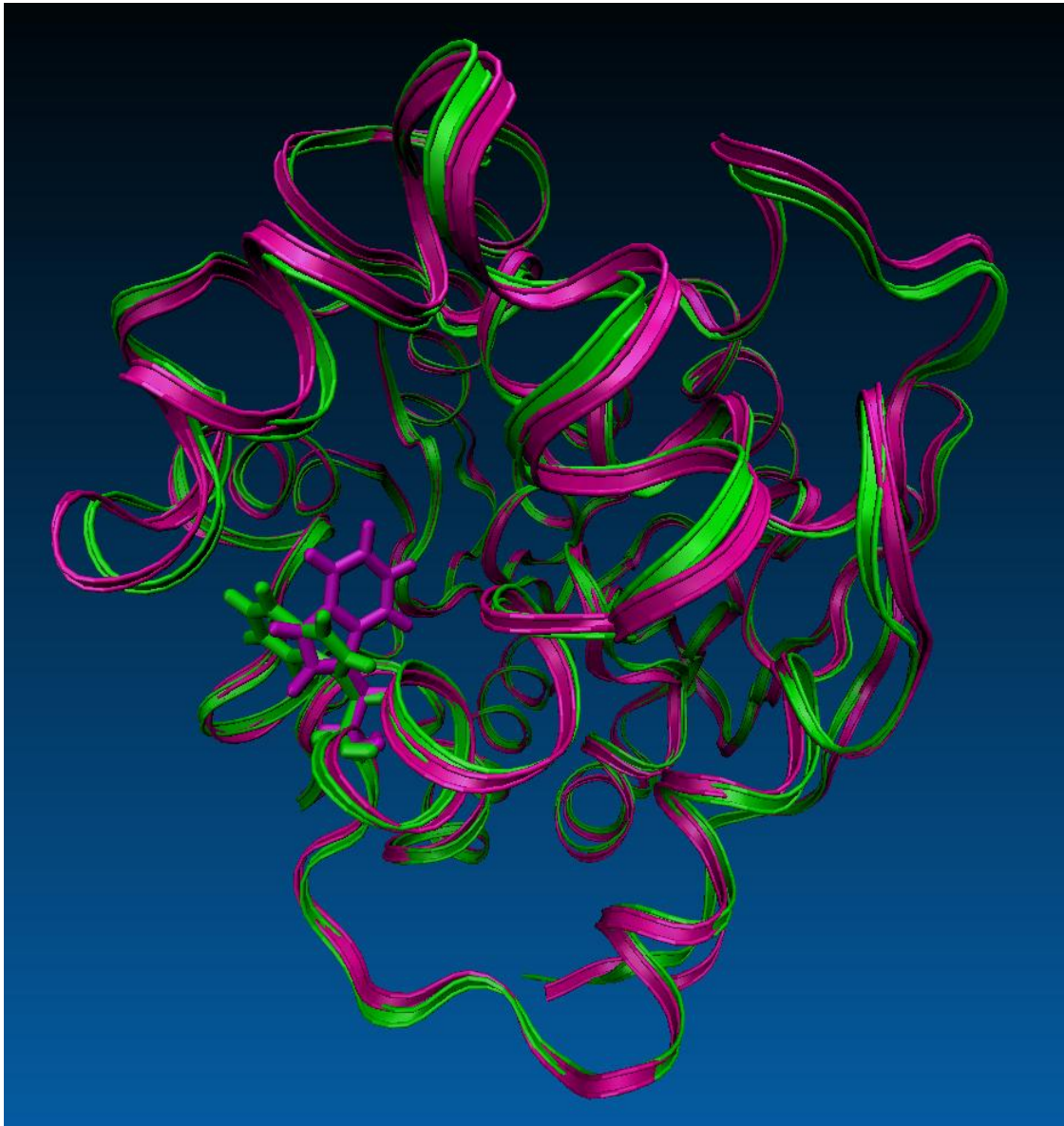
Veškeré výpočty byly provedeny v Ústavu komplexních systémů FROV JU v Nových Hradech, v němž se nachází PC cluster, což je superpočítač sestavený propojením více počítačů, v nichž je nainstalován operační systém Linux s programovým vybavením (včetně aplikace GROMACS). PC cluster slouží k vědeckým účelům, především k molekulárně-dynamickým studiím. Účelem aplikace GROMACS je sledování chování reálného molekulárního systému (např. proteinu) v konkrétním prostředí (např. voda) po určitou dobu.

Na PC clusteru byla zadána struktura mutantní formy proteinu LinB86 a následně byl spuštěn samotný molekulárně-dynamický výpočet. Byla počítána trajektorie atomů proteinu s krokem jedné femtosekundy po dobu sto nanosekund. Uvedená simulace byla provedena v periodickém boxu, tzv. PBS (Periodic Boundary System) (Obrázek 27), ve kterém byl uzavřen protein s molekulami vody, z nichž některé byly nahrazeny ionty chloridu sodného z důvodu zneutralizování náboje na proteinu. Celková doba spuštěné simulace byla čtrnáct dní.

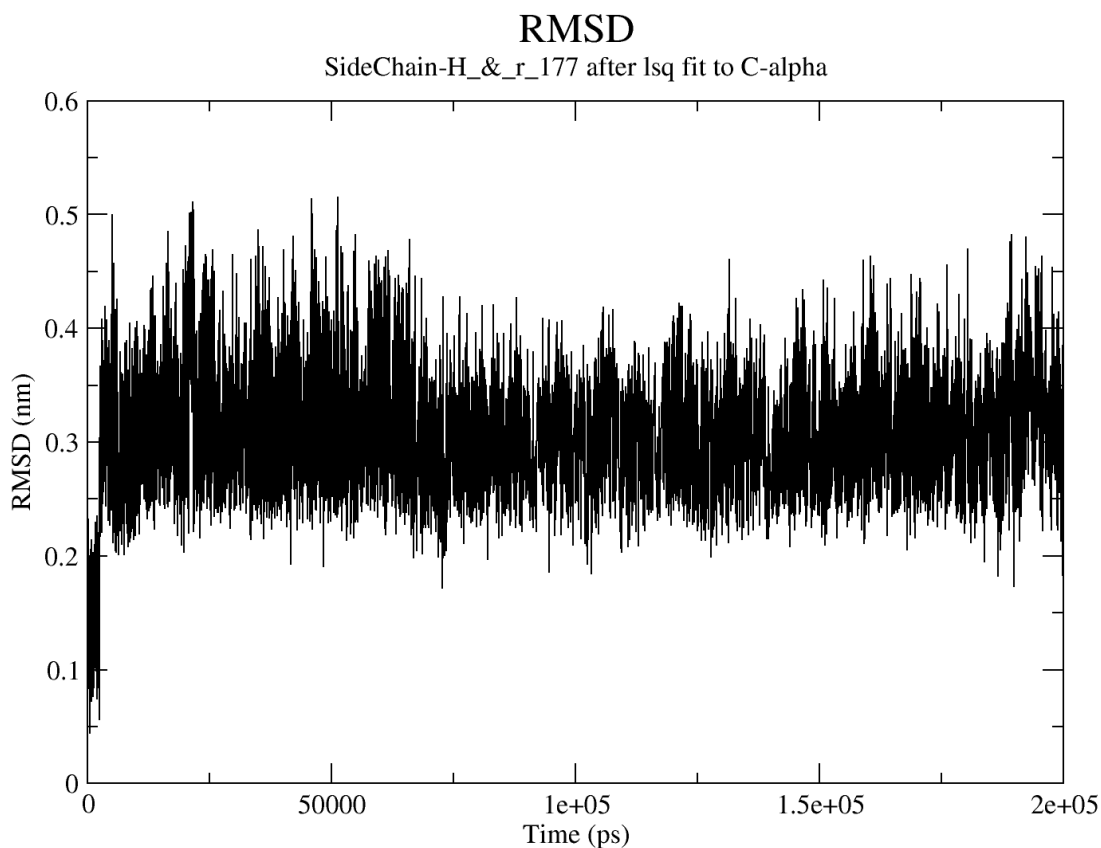
Výsledky molekulárně-dynamických simulací potvrdily stabilitu mutantní formy LinB86 ve vodním prostředí. Nejzajímavějším výsledkem bylo odhalení dvou rozdílných pozic aminokyseliny Trp 177, která se nachází v enzymatickém tunelu a je jednou ze čtyř aminokyselin, u nichž byla provedena mutace. Původní pozice Trp 177 se po deseti nanosekundách simulace změnila na kolmou k uvedené původní pozici (Obrázek 28). Popisovanou strukturní změnu aminokyseliny Trp 177 názorně demonstruje i výsledný časový průběh RMSD (Root-Mean-Square Deviation, neboli standardní odchylka nejmenších čtverců odchylek) (Graf 1).



Obrázek 27. *Periodický box s proteinem LinB86.* Červené body uvnitř boxu znázorňují molekuly vody.



Obrázek 28. *Stužkové modely mutantní formy enzymu LinB86 se zvýrazněnou aminokyselinou Trp 177 na začátku a na konci molekulárně-dynamické simulace. Zelený stužkový model představuje počáteční stav a růžový model finální stav molekulárně-dynamické simulace. Tyčinkový model zobrazuje aminokyselinu Trp 177 v místě tunelu vedoucímu k aktivnímu místu enzymu.*



Graf 1. Graf RMSD zobrazující odchylku od původní pozice pro aminokyselinu Trp 177 v průběhu molekulárně-dynamické simulace (200 nanosekund). Z průběhu grafu RMSD je patrná výrazná změna pozice Trp 177 v simulovaném čase 10 ns.

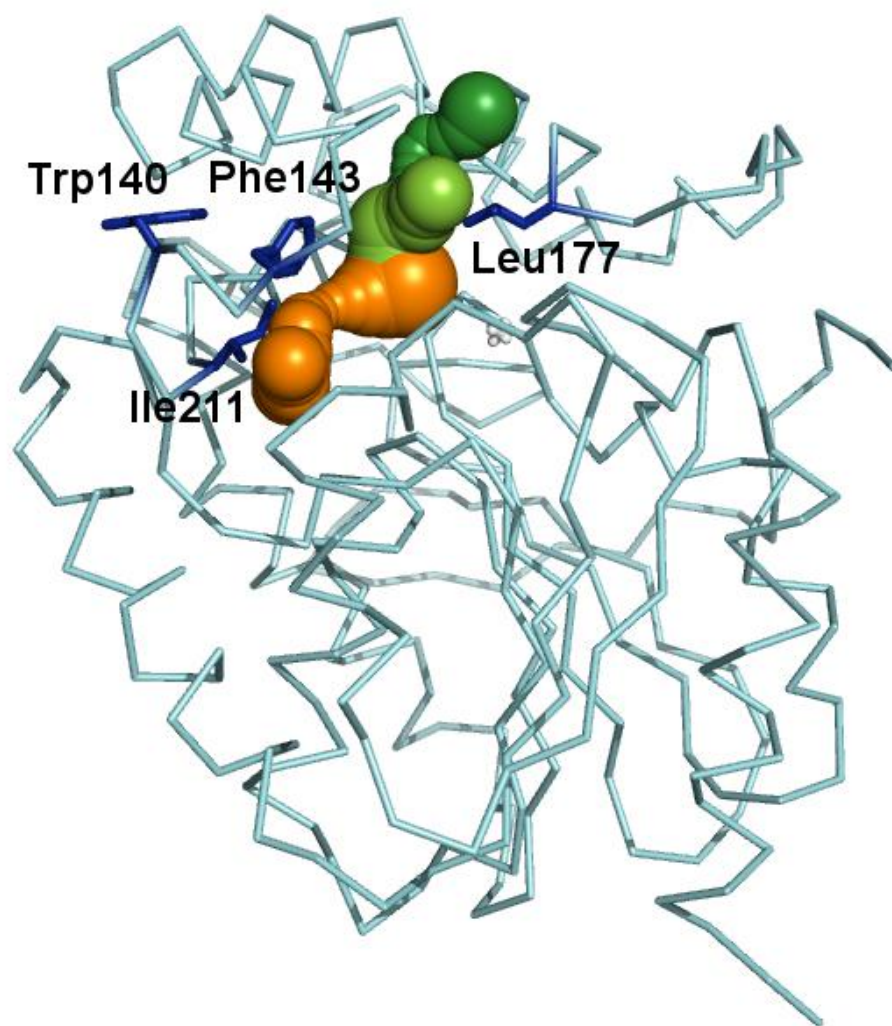
4.3.6 Výpočty enzymatických tunelů

V programu PyMOL (Schrödinger, 2011) byla načtena molekulární struktura nativního proteinu LinB a poté i struktura jeho mutantní formy LinB86 a pomocí pluginu byl spuštěn program CAVER 3.0 (Chovancová et al., 2012), který umožňuje zobrazit tunely vedoucí k aktivnímu místu enzymu. Jako startovací bod pro výpočet tunelu bylo vybráno centrum katalytické pentády, resp. aminokyseliny 38, 108, 109, 132, 272 (Chovancová et al., 2012).

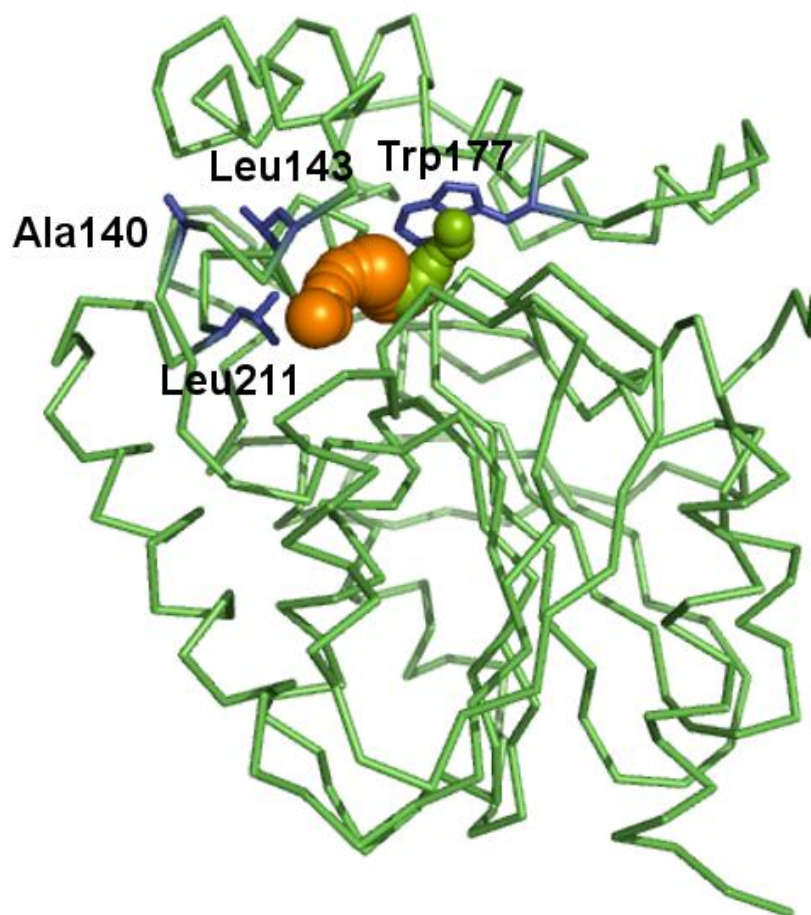
Obrázek 29 zobrazuje tzv. trace model nativního (wild type) proteinu LinB, jehož koordináty byly získány z proteinové databanky s kódovým označením 2BFN. Barevné tyčinkové modely znázorňují aminokyseliny, které jsou u mutantní formy enzymu LinB86 nahrazeny, tj. L177W, W140A, F143L, I211L. Objemné sférické útvary představují tunely vedoucí k enzymatickému aktivnímu místu. Zeleně je označen hlavní

tunel, resp. tmavě zeleně horní část tunelu a světle zeleně spodní část hlavního tunelu. Oranžový tunel znázorňuje vedlejší tunel, tzv. slot (z angl. otvor, štěrbina).

Obrázek 30 zobrazuje tzv. trace model mutantní formy proteinu LinB86, jehož koordináty byly získány z molekulárně-dynamické studie po simulačním čase 200 ns. Barevné tyčinkové modely znázorňují aminokyseliny, které byly u nativní formy enzymu LinB nahrazeny, tj. L177W, W140A, F143L, I211L. Objemné sférické útvary opět představují tunely vedoucí k enzymatickému aktivnímu místu. Zeleně je označen hlavní tunel, resp. světle zeleně spodní část hlavního tunelu. Oranžový tunel znázorňuje vedlejší tunel, tzv. slot (z angl. otvor, štěrbina).



Obrázek 29. *Nativní protein LinB s tunely vedoucími k aktivnímu místu enzymu*



Obrázek 30. *Mutantní forma proteinu LinB86 s tunely vedoucími k aktivnímu místu enzymu*

5 Diskuze

5.1 LinB86

Krystalizační experimenty s mutantní formou halogenalkandehalogenasy LinB86 byly provedeny s využitím standardních a také pokročilých krystalizačních metod v laboratoři při laboratorní teplotě 18 °C. Vhodné krystalizační podmínky umožnily vznik krystalů proteinu LinB86 při použití většiny krystalizačních metod. Uvedené metody se s úspěchem vyvíjí a také používají ve většině světových laboratořích Chayen et al. (1992), McPherson (2004), Bergfors (1999), Kutá Smatanová (2008). Krystalizační techniky jsou založeny na různých fyzikálně-chemických principech, nejčastěji se jedná o krystalizaci založenou na difúzi par prováděnou v krystalizačních destičkách nebo v kapilárách (v případě metody difúze přes přepážku). Tyto metody jsou až na drobné úpravy mezi autory shodné a neustále se v dnešní době zdokonalují. Protein zvolený ke krystalizačním experimentům by měl mít vysokou čistotu (Rhodes, 2006). V případě znečištění proteinu protein nekrystalizuje nebo dochází k jeho postupné degradaci. V případě vzniku krystalů mohou být tyto krystaly porušeny (Drenth, 1999; Kutá Smatanová, 2008) nebo může dojít ke vzniku krystalů, které nejsou schopny difraktovat rentgenové záření. U mutantní formy proteinu LinB86 byla zkoumána čistota proteinu pomocí SDS-PAGE elektroforézy (Degtjarik, osobní sdělení) a ke krystalizačním experimentům bylo připraveno srážecí činidlo (precipitant) z roztoků: 800 mM Divalents mix, 1 M Buffer System 2 o pH 7,5 a 60 % P 550 MME_P20K. Podle Drentha (1999) je srážecí činidlo jedním z nejdůležitějších faktorů úspěšné krystalizace. Každý protein vyžaduje specifické srážecí činidlo. Například Malcher (2013) krystalizoval mutantní formu proteinu halogenalkandehalogenasy DhaA31 za pomoci zcela rozdílného precipitantu než byl použit v tomto případě. Podle McPhersona (2004) je vhodné stabilizovat pH precipitantu pomocí příslušného pufru. V mém případě byl použit jako pufr 0,1M Tris-HCl.

Krystalizační experimenty provedeny metodou sedící a visící kapky patří v dnešní době mezi nejpobulárnější a nejúčinnější metody krystalizace (Kutá Smatanová, 1999; Kutá Smatanová, 2008; Carter and Smith, 1989), což se potvrdilo i v mých krystalizačních experimentech. Tyto metody byly použity při krystalizaci zkoumaného proteinu LinB86 a potvrdily hypotézu, že jsou nejúčinnější ze všech testovaných metod,

protože při krystalizaci LinB86 těmito dvěma metodami došlo ke vzniku a následnému růstu krystalů v nevhodnější kvalitě pro difrakční experiment. Výsledky metody visící a sedící kapky byly velmi podobné.

V případě použití metody visící kapky byly vzestupně od nejnižší po nejvyšší koncentraci proteinu a v obou použitých poměrech protein : precipitant pozorovány vzestupné velikosti a rozdílné tvary krystalů. Při nejnižší koncentraci proteinu byly patrné malé tenké jehličkovité krystaly, při vyšší koncentraci vznikaly delší jehlicové krystaly uspořádané do shluku a při nejvyšší koncentraci LinB86 došlo k vytvoření největších tyčinkovitých krystalů seskupených do shluku. Lze konstatovat, že poměr proteinu vůči precipitantu v této metodě neměl výrazný vliv na vznik krystalů, ale bylo zjištěno, že s rostoucí koncentrací proteinu se zvyšuje velikost a kvalita krystalů. Tuto metodu použil v roce 2013 Malcher (2013), ale v tomto případě byl vznik a následný růst krystalů pozorován pouze v podmínkách, kdy byl poměr proteinu vůči precipitantu 1:1. Ve zbylých případech nedošlo k vytvoření krystalů.

Metoda sedící kapky byla úspěšná stejně jako předchozí metoda visící kapky. Při nejnižší koncentraci proteinu LinB86 vznikly nejmenší krystaly ve tvaru jehliček, při vyšší koncentraci byly pozorovány větší destičkovité shluky a při nejvyšší koncentraci vznikly největší tyčinkovité až destičkovité krystaly a také malé 3D krystaly. Poměry proteinu vůči precipitantu neměly vliv na průběh krystalizace na rozdíl od koncentrace. S rostoucí koncentrací vznikaly větší a kvalitnější monokrystaly. Krystaly vyrostly v průběhu jednoho týdne. Stejnou metodu použil v roce 2013 Malcher (2013) při krystalizaci proteinu DhaA31. I když pracoval s různými poměry protein : precipitant, pozitivní výsledek zaznamenal pouze ve dvou případech, při kterých vznikly a vyrostly krystaly. V ostatních poměrech nevznikly krystaly proteinu zřejmě vlivem vnějších faktorů jako např. změna teploty, přítomnost nečistot, atd. (Drenth, 1999).

Při použití metod krystalizace pod olejem a difúze přes přepážku nebyly zaznamenány uspokojivé výsledky jako v případě použití předchozích dvou metod. Jedná se o náročnější metody, ale v některých případech jsou jedinými metodami, které přináší pozitivní výsledky. Při krystalizaci mutantní formy proteinu LinB86 pomocí metody krystalizace pod olejem došlo pouze k vytvoření amorfni (beztvaré) sraženiny, jejíž hustota narůstala se zvyšující se koncentrací proteinu. Podle Drentha (1999) mohla být příčinou neúspěchu nejspíš přítomnost nečistot nebo nesprávné provedení

experimentu. Metoda difúze přes přepážku byla úspěšná pouze v kapiláře s nejvyšší koncentrací proteinu, ve které narostly monokrystaly LinB86.

5.2 LinB

Marek et al. (2000) se zabývali krystalizací nativního proteinu LinB izolovaného z půdní bakterie *Sphingomonas paucimobilis*. Ze všech použitých krystalizačních metod byly nejlepší výsledky, resp. nejkvalitnější krystaly získány za použití „microseedingu“ (očkování) při krystalizacích prováděných metodou visící kapky při 4, 8 °C (Marek et al., 2000). Metoda visící kapky byla úspěšná i v případě krystalizace mutantní formy proteinu LinB86, u kterého však nemusela být použita metoda „microseedingu“. Jako precipitant pro nativní enzym LinB byl použit roztok obsahující 18-20% polyethylenglykol M_r 6000 (PEG 6000), 0,2M octan vápenatý a 0,1M Tris-HCl s pH 8,9 (Marek et al., 2000). Samostatný monokrystal proteinu LinB byl zachycen do nylonové smyčky (Hampton Research) a na několik sekund ponořen do kryoprotektantu tvořeného z 20% (w/v) PEG 6000, 10% (w/v) sacharózy a 10% (v/v) PEG 400. Poté byl krystal, který byl chlazený tekutým dusíkem, (Oxford Cryostream Cooler) měřený na krystalografické lince (beamline) BL711 na synchrotronu MAX-II ve švédském Lundu (Marek et al., 2000). V případě mutantní formy proteinu LinB86 byly krystaly měřeny na synchrotronu BESSY (Berlín, Německo) a nyní se difrakční data zpracovávají do finální podoby (Degtjarik, vlastní sdělení). Dále byl proveden difrakční experiment nejenom s krystaly nativního proteinu LinB, ale také s komplexem LinB s 1,3-dibrompropanem, vhodným substrátem pro tento enzym. Monokrystaly enzymu LinB byly namočeny po dobu čtyř hodin do rezervoáru s přidaným 25 mM 1,3-dibrompropanem (DBP) při 4,8 °C. Bylo zjištěno, že i přes krátkou dobu expozice proteinových krystalů v DPB došlo k úplné dehalogenaci, což bylo pozorováno v aktivním místě enzymu (Marek et al., 2000).

Struktura nativního enzymu LinB byla naměřena do rozlišení 1,58 Å. Celková struktura enzymu LinB je velmi podobná dalším dvěma strukturám známých halogenalakandehalogenas. Molekula proteinu LinB je tvořena dvěma doménami. Hlavní doména obsahuje aminokyseliny 3 - 132 a 214 - 296. Vrchní doména obsahuje aminokyseliny 133 - 213, skládá se z pěti α -šroubovic a tvoří víčko enzymu (Marek et al., 2000). Protein LinB86 je tvořen také dvěma doménami, mezi kterými se nachází aktivní místo enzymu obsahující Asp 108, Trp 109, Asn 38, His 272 a Glu 132.

Aktivní místa LinB a DhaA jsou mnohem větší a méně skrytá než od aktivního místa DhlA. Aktivní místo a tunel těchto dvou enzymů se lépe otevírají pro vstup větších substrátů, avšak účinně neinteragují s 1,2-dichlorethanem, což má za následek neschopnost dehalogenace tohoto substrátu (Marek et al., 2000).

5.3 Porovnání enzymatických tunelů u proteinů LinB a LinB86

U mutantní formy proteinu LinB86 došlo během simulace k částečnému zablokování hlavního tunelu nejpravděpodobněji vlivem Trp 177, který nahradil původní Leu 177 divokého typu enzymu. Předpokládané alternativní cesty (tunely) pro vstup substrátu do enzymu nalezeny nebyly, nicméně detailnější analýza molekulárně-dynamické simulace možná odhalí konformaci, u níž je alternativní tunel dočasně otevřený.

6 Závěr

Bakalářská práce je zaměřena na studium mutantní formy halogenalkandehalogenasy LinB86 izolované z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26. Tato mutantní forma byla porovnána s nativním enzymem LinB z důvodu objasnění efektu mutace na funkčnost enzymu.

V bakalářské práci jsou podrobně popsány metody proteinové krystalizace a molekulové modelování mutantní formy proteinu LinB86. Krystalizace byla provedena standardními a pokročilými krystalizačními metodami s různými krystalizačními podmínkami, konkrétně metodou sedící kapky, metodou visící kapky, metodou krystalizace pod olejem a metodou difúze přes přepážku. Výsledky metod sedící a visící kapky byly pozitivní, neboť došlo k vytvoření a následnému růstu krystalů vhodných pro rentgenovou difrakční analýzu ve všech testovaných podmínkách. V případě použití metody difúze přes přepážku byl pozorován vznik a růst mikrokrystalů pouze u nejvyšší koncentrace proteinu a metoda krystalizace pod olejem nebyla úspěšná ani v jedné ze tří koncentrací proteinu v různém poměru proteinu vůči precipitantu. Pomocí počítačových programů pro molekulové modelování byly provedeny mutace konkrétních aminokyselin nativního enzymu LinB za účelem přípravy jeho mutantní formy LinB86, která byla zkoumána experimentálně. K tomu byl použit program Swiss-PdbViewer, dále bylo zobrazeno aktivní místo enzymu programem VMD, znázorněna dehalogenační reakce pomocí programu ChemSketch, zobrazena elektronová hustota proteinu programem WinCoot a programem GROMACS bylo zkoumáno chování proteinu ve vodním prostředí. Pomocí programů PyMOL a CAVER byly zobrazeny a analyzovány tunely vedoucí k aktivnímu místu enzymu. Lze konstatovat, že cíle bakalářské práce se podařilo úspěšně splnit a získané výsledky budou částí připravované publikace o LinB86.

V dnešní době má studium halogenalkandehalogenas pomocí metod krystalografie a molekulového modelování významné postavení v experimentálním a teoretickém výzkumu. V rámci ochrany životního prostředí a čištění vod kontaminovaných nebezpečnými polutanty halogenovaného původu je nutné věnovat čas a úsilí výzkumu halogenalkandehalogenas, které mohou být použity jako vhodné dekontaminanty.

7 Přehled použité literatury

Bergfors, M.T., 1999. Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips. International University Line. Sand Diego, p. 306.

Bergfors, M.T., 2009. Protein Crystallization. International University Line. La Jolla, p. 427.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G.L., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The Protein Data Bank. Nucleic. Acids. Res. 28, 232-242.

Berry, M.B., 1995. Protein Crystallization: Theory and Practice. [online]. [cit. 2013-3-6].
Dostupné z:
<<http://www.xtal.tsinghua.edu.cn/group5/web/material/Protein%20Crystallization>>

Biedermannová, L., Prokop, Z., Gora, A., Chovancová, E., Kovács, M., Damborsky, J., Wade, R.C., 2012. A single mutation in a tunnel to the active site changes the mechanism and kinetics of product release in haloalkane dehalogenase LinB. Biol. Chem. 287, 29062-29074.

Bollag, M.D., Rozycki, D.M., Stuart, J.E., 1996. Protein Methods. Wiley-Liss, Inc. New York, p. 415.

Byrappa, K., Ohachi, T., 1965. Crystal Growth Technology. William Andrew, Inc. New York, p. 590.

Carter, C.D., Smith, E.R., 1989. Hanging drop crystal growth apparatus and method. United States of America. 4886646.

Cox, M.M., Phillips, G.M., 2008. The Handbook of Proteins: structure, function and methods. John Wiley & Sons. New York, p. 1319.

Curragh, H., Flynn, O., Larkin, M.J., Stafford, T.M., Hamilton, J.T., Harper, D.B., 1994. Haloalkane degradation and assimilation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064. Microbiology. 140 (Pt 6), 1433-1442.

- Damborsky, J., Chaloupkova, R., Pavlova, M., Chovancova, E., Brezovsky, J., 2010. Structure-Function Relationships and Engineering of Haloalkane Dehalogenases. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1081-1098.
- Damborský, J., Koča, J., 1999. Analysis of the reaction mechanism and substrate specificity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons. Protein Eng. 12, 989-998.
- Damborský, J., Rorije, E., Jesenská, A., Nagata, Y., Klopman, G., Peijnenburg, J.G.M., 2001. Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2681-2689.
- Degtjarik, O., Chaloupkova, R., Rezacova, P., Kutý, M., Damborsky, J., Smatanova, I.K., 2013. Differences in crystallization of two LinB variants from *Sphingobium japonicum* UT26. Acta. Cryst. F69, Part 3, 284-287.
- Dharanaj, G., Byrappa, K., Prasad, V., Dudley, M., 2010. Springer Handbook of Crystal Growth. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p. 1332.
- Doublié, S., 2007. Macromolecular Crystallography Protocols. Humana Press, Inc. New Jersey, p. 363.
- Drenth, J., 1999. Principles of Protein X-ray Crystallography, Second Edition. Springer-Verlag. New York.
- Drienovska, I., Chovancova, E., Koudelakova, T., Damborsky, J., Chaloupkova, R., 2012. Biochemical Characterization of a Novel Haloalkane Dehalogenase from a cold-adapted bacterium. Appl. Environ. Microb. 78 (14), 4995-4998.
- Ducruix, A., Giege, R., 1999. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: a practical approach. Oxford University Press. Oxford, p. 435.
- Emmer, J., 2007. Structural studies of the haloalkane dehalogenase mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis. University of South Bohemia.

- Garcia-Ruiz, J.M., Moreno, A., Viedma, C., Coll, M., 1993. Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Mat. Res. Bull.* 28, 541-546.
- Garside, J., Mersmann, A., Nývlt, J., 2002. Measurement of Crystal Growth and Nucleations Rates. *ICHEME. Rugby*, p. 195.
- Gilliland, G.L., 1998. A biological macromolecule crystallization database: A basis for a crystallization strategy. *J.Cryst. Growth.* 90, 50-51.
- Gilliland, G.L., Tung, M., Blakeslee, D.M., Ladner, J., 1994. The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0, Data and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data. *Acta. Cryst. D50*, 408-413.
- Hasan, K., Fortova, A., Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Ishitsuka, M., Nagata, Y., Damborsky, J., Prokop, Z., 2011. Biochemical Characteristics of the Novel Haloalkane Dehalogenase DatA Isolated from the Plant Pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 1881-1884.
- Holloway, P., Trevors, J.T., Lee, H., 1998. A colorimetric assay for detecting haloalkane dehalogenase activity. *J. Microbiol. Meth.* 1, 31-36.
- Chaloupková, R., Sýkorová, J., Prokop, Z., Jesenská, A., Monincová, M., Pavlová, M., Tsuda, M., Nagata, Y., Damborský, J., 2003. Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *J. Biol. Chem.* 278 (52), 52622-52628.
- Chan, W.Y., Wong, M., Guthrie, J., Savchenko, A.V., Yakunin, A.F., Pai, E.F., Edwards, E.A., 2010. Sequence-and activity-based screening of microbial genomes for novel dehalogenases. *Microb. Biotechnol.* 3 (1), 107-120.
- Chayen, N.E., 1997. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger crystals. *J. Appl. Crystallogr.* 30, 198-202.

- Chayen, N.E., Shaw Stewart, P.D., Blow, D.M., 1992. Microbatch crystallization under oil-a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *J. Cryst. Growth.* 122, 176-180.
- Chen, Z. W., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J.J., Bartsch, R.G., Meyer, T.E., Cusanovich, M.A., Mathews, F.S., 1994. The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science.* 266, 430-432.
- Chirgadze, D., 2001. Protein Crystallization in Action. [online]. [cit. 2013-2-3]. Dostupné z: <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~dima/whitepapers/xtal-in-action/node3.html>
- Chovancova, E., Kosinski, J., Bujnicki, J.M., Damborsky, J., 2007. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins.* 67 (2), 305-316.
- Janssen, D.B., 2004. Evolving haloalkane dehalogenase. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 8, 150-159.
- Janssen, D.B., Dinkla, I.J.T., Poelarends, G.J., Terpstra, P., 2005. Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environ. Microbiol.* 7, 1868-1882.
- Jesenská, A., Bartoš, M., Czerneková, V., Rychlík, I., Pavlík, I., Damborský, J., 2002. Cloning and Expression of the Haloalkane Dehalogenase gene dhmA from *Mycobacterium avium* N85 and Preliminary Characterization of DhmA. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (8), 3724-3730.
- Jesenská, A., Monincová, M., Koudeláková, T., Hasan, K., Chaloupková, R., Prokop, Z., Geerlof, A., Damborský, J., 2009. Biochemical Characterization of Haloalkane Dehalogenases DrbA and DmbC, Representatives of a Novel Subfamily. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5157-5160.
- Jesenská, A., Pavlová, M., Strouhal, M., Chaloupková, R., Těšínská, I., Monincová, M., Prokop, Z., Bartoš, M., Pavlík, I., Rychlík, I., Möbius, P., Nagata, Y., Damborský, J., 2005. Cloning, Biochemical Properties, and Distribution of Mycobacterial Haloalkane Dehalogenases. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (11), 6736-6745.

- Keuning, S., Janssen, D.B., Witholt, B., 1985. Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J. Bacteriol.* 163, 635-639.
- Kundrot, C.E., 2004. Which strategy for a protein crystallization project? *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (5), 525-536.
- Kutá Smatanová, I., 1999. Diplomová práce. MU Brno.
- Kutá Smatanová, I., 2008. Crystallization techniques in protein crystallography. Habilitation thesis. Palacky university Olomouc.
- Leunissen, M., 2001. An essay on several aspects of protein crystallization research. *Protein Crystallography*. [online]. [cit. 2013-1-1]. Dostupné z: <<http://people.ds.cam.ac.uk/ml527/publications/assets/leunissen-literaturesearch.pdf>>
- Li, M., a Chang, W.R., 2009. Protein crystallization. *Photosynth. Res.* 102, 223-229.
- Luft, J.R., DeTitta, G.T.A., 1992. A macromolecular hanging-drop vapor-diffusion technique. *J. Appl. Crystallogr.* [online]. [cit. 2013-1-15]. Dostupné z: <<http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889891011354>>.
- Malcher, P., 2013. Bakalářská práce. JČU České Budějovice.
- Marek, J., Vévodová, J., Smatanová, I.K., Nagata, Y., Svensson, L.A., Newman, J., Takagi, M., Damborský, J., 2000. Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry.* 39, 14082-14086.
- McPherson, A., 1990. Review Current approaches to macromolecular crystallization. *Eur. J. Biochem.* pp. 49-71.
- McPherson, A., 1999. Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- McPherson, A., 2004. Introduction to protein crystallization. *Methods.* 34, 254-265.

- McPherson, A., 2009. Introduction to Macromolecular Crystallography. John Wiley & Sons. New Jersey, p. 267.
- McPherson, A., Weickmann, J., 1990. X-ray analysis of new crystal forms of the sweet protein thaumatin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7, 1053-1060.
- Nagata, Y., Nariya, T., Ohtomo, R., Fukuda, M., Yano, K., Takagi, M., 1993. Cloning and sequencing of a dehalogenase gene encoding an enzyme with hydrolase activity involved in the degradation of gamma-hexachlorocyclohexane in *Pseudomonas paucimobilis*. *J. Bacteriol.* 175, 6403-6410.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W., 1999. α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 732-737.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A., 1992. The α/β hydrolase fold. *Protein. Eng.* 5, 197-211.
- Otwinowski, Z., Minor, W., 1997. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods. Enzymol.* 276, 307-326.
- Otyepka, M., Damborský, J., 2002. Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains. *Protein. Sci.* 1, 1206-1217.
- Petřek, M., Otyepka, M., Banáš, P., Košinová, P., Koča, J., Damborský, J., 2006. A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC. Bioinformatics.* 7, 316.
- Raman, P., Cherezov, V., Caffrey, M., 2006. The Membrane Protein Data Bank. *Cell. Mol. Life Sci.* 63, 36-51.
- Rhodes, G., 2006. Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models. Elsevier, Inc. London, p. 295.
- Smatanová, I., 2003. Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi. Učební text.
- Twyman, R., 2004. Principles of Proteomics. Taylor & Francis. New York, p. 266.

Verschueren, K.H.G., Seljee, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W., 1993. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*. 363, 693-698.

Woolfson, M.M., 1997. *An Introduction to X-ray Crystallography*. Cambridge University Press. Cambridge, p. 399.

8 Programy

CAVER 3.0

Chovancová, E., Pavelka, A., Beneš, P., Strnad, O., Brezovský, J., Kozlíková, B., Gora, A., Šustr, V., Klvaňa, M., Medek, P., Biedermannová, L., Sochor, J., Damborský, J., 2012. CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *Plos. Comput. Biol.* 8: e1002708.

GROMACS

Van der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., Berendsen, H.J., 2005. "GROMACS: fast, flexible, and free". *J. Comput.Chem.* 26 (16): 1701–1718.

ChemSketch

ACD/ChemSketch Freeware, 2012, Version 10.00. Advanced Chemistry Development, Inc. Toronto, ON, Canada. www.acdlabs.com

PyMOL

Schrödinger, L.L.C., 2011. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.

Swiss-PdbViewer

Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.

VMD

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K., 1996. VMD – Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics*, vol. 14, pp. 33-38.

WinCoot

Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W., Cowtan, K., 2010. Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica Section D – Biological Crystallography* 66, 486-501.

9 Seznam zkratek

Asp - kyselina asparagová

Asn - asparagin

DBP - 1,2-dibrompropan

DhaA - halogenalkandehalogenasa izolovaná z bakterie *Rhodococcus rhodochrous*
NCIMB13064

DhaA31 - mutantní forma halogenalkandehalogenasy DhaA

DhlA- halogenalkandehalogenasa izolovaná z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10

Glu - kyselina glutamová

His - histidin

LinB - halogenalkandehalogenasa izolovaná z bakterie *Sphingobium japonicum* UT26

LinB86 - mutantní forma halogenalkandehalogenasy LinB

0,1M Tris-HCl - 0,1M 2-Amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol-hydrochlorid

Trp - tryptofan

Met - methionin

MOPS acid - kyselina 3-morfolinopropan-1-sulfonová

M_r 6000 - molekulární hmotnost 6000 Da

Na HEPES - sodná sůl 2-[4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl]ethansulfonové kyseliny

PEG400 - polyethylenglykol s relativní molekulovou hmotností 380 - 420

Ser - serotonin

10 Seznam tabulek

Tabulka 1. Faktory mající vliv na průběh růstu makromolekulárních krystalů.....	19
Tabulka 2. Znázornění obsahu roztoku proteinu a precipitantu v krystalizační destičce.....	35
Tabulka 3. Znázornění obsahu precipitantu a roztoku proteinu v krystalizační destičce.....	38

11 Seznam obrázků

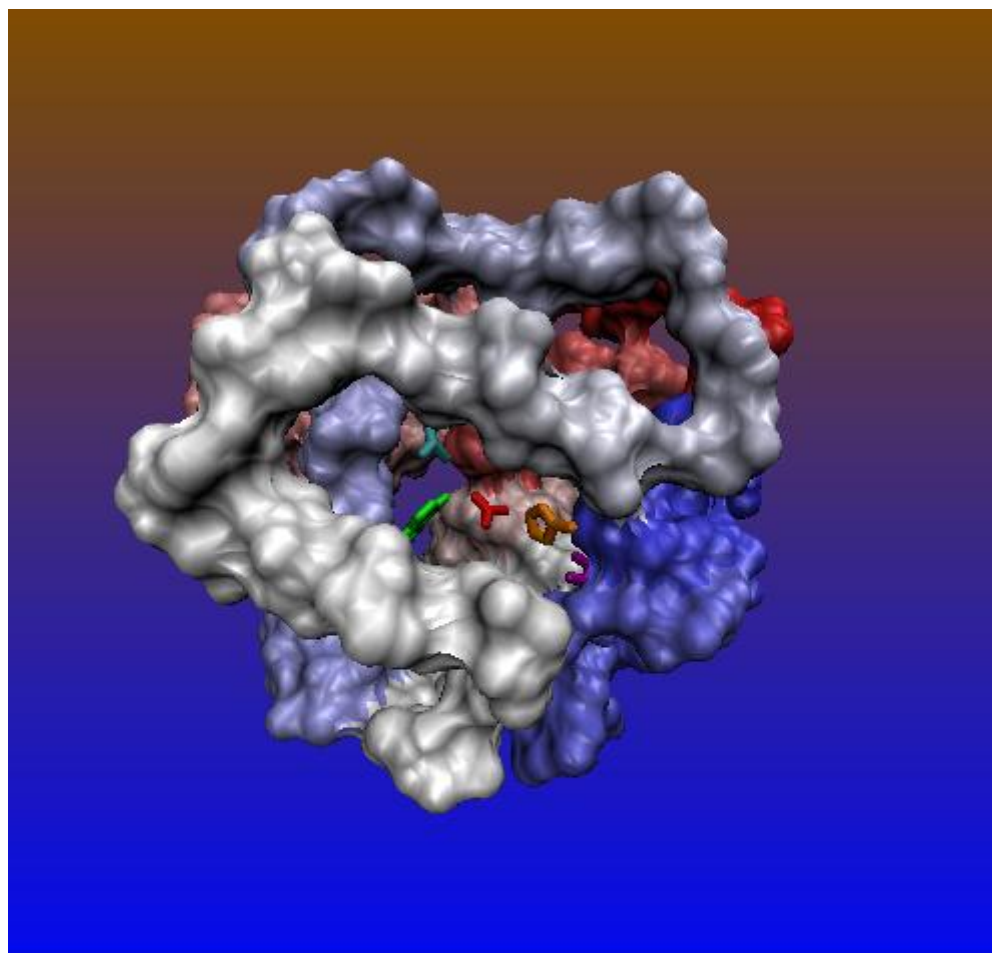
Obrázek 1. Fázový diagram růstu krystalů	15
Obrázek 2. Znázornění krystalizačního experimentu pomocí metody sedící kapky	23
Obrázek 3. Znázornění krystalizačního experimentu pomocí metody visící kapky	24
Obrázek 4. Znázornění krystalizačního experimentu pomocí metody pod olejem	25
Obrázek 5. Krystalizační destička určená pro metodu sedící kapky (foto autor)	33
Obrázek 6. Znázornění krystalizačního experimentu pro LinB86.....	34
Obrázek 7. Krystalizační destička určená pro metodu visící kapky (foto autor).....	35
Obrázek 8. Znázornění kapiláry	36
Obrázek 9. Znázornění kapilár v krystalizačním boxu (foto autor).....	36
Obrázek 10. Krystalizační destička pro metodu krystalizace pod olejem (foto autor)	37
Obrázek 11. Lehká amorfni sraženina proteinu (foto autor)	43
Obrázek 12. Hustá amorfni sraženina proteinu (foto autor).....	43
Obrázek 13. Vzniklé mikrokrystaly proteinu v kapiláře s vnitřním průměrem 0,3 mm (foto autor).....	44
Obrázek 14. Amorfni sraženiny v kapiláře s vnitřním průměrem 0,2 mm (foto autor)	44
Obrázek 15. Jehlicové krystaly seskupeny do shluku připraveny použitím metody visící kapky (foto autor a kolektiv)	45
Obrázek 16. Tyčinkovité krystaly proteinu seskupeny do shluku připraveny použitím metody visící kapky (foto autor a kolektiv)	46
Obrázek 17. Jehličkovité krystaly proteinu připraveny metodou sedící kapky (foto autor a kolektiv)	47
Obrázek 18. Destičkovitý shluk krystalů vyrostlých pomocí metody sedící kapky (foto autor a kolektiv)	47
Obrázek 19. Velké tyčinkovité až destičkovité krystaly (foto autor a kolektiv)	48
Obrázek 20. Velké tyčinkovité až destičkovité shluky krystalů (foto autor a kolektiv)	48
Obrázek 21. 3D monokrystaly LinB86 (foto autor a kolektiv)	49
Obrázek 22. Mapa elektronové hustoty proteinu LinB86	50
Obrázek 23. Pentáda a chlor v aktivním místě enzymu	51
Obrázek 24. Struktura mutantního proteinu LinB86	52
Obrázek 25. První fáze reakce.....	53
Obrázek 26. Druhá fáze reakce.	53
Obrázek 27. Periodický box s proteinem LinB86.	55






Obrázek 28. Stužkové modely mutantní formy enzymu LinB86 se zvýrazněnou aminokyselinou Trp 177 na začátku a na konci molekulárně-dynamické simulace.	56
Obrázek 29. Nativní protein LinB s tunely vedoucími k aktivnímu místu enzymu	59
Obrázek 30. Mutantní forma proteinu LinB86 s tunely vedoucími k aktivnímu místu enzymu	60

12 Seznam příloh

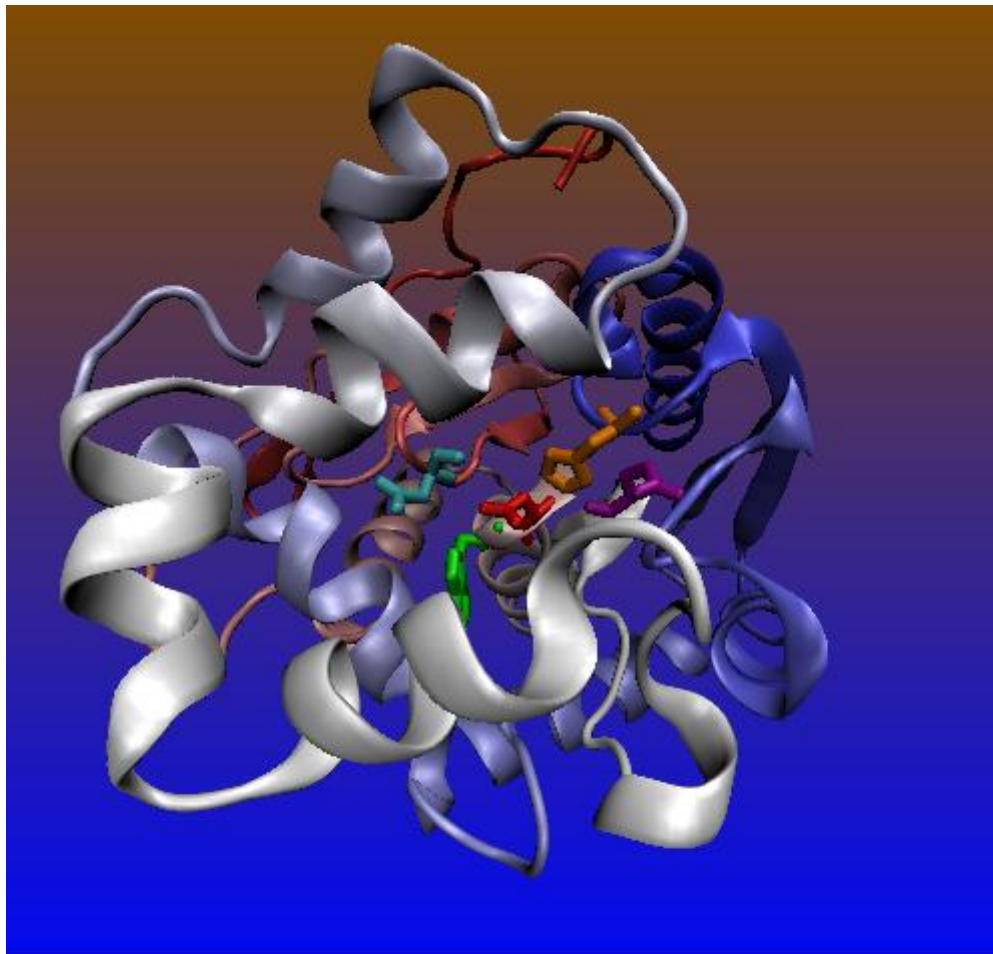
Příloha 1. Struktura proteinu LinB86.....	79
Příloha 2. Struktura proteinu LinB86.....	80
Příloha 3. Struktura proteinu LinB86.....	81
Příloha 4. Struktura proteinu LinB86.....	82
Příloha 5. Publikovaný článek v časopise MATERIALS STRUCTURE in Chemistry, Biology, Physics and Technology	83
Příloha 6. Certifikát o absolvování kurzu Krystalizace makromolekulárních látek	84

13 Přílohy



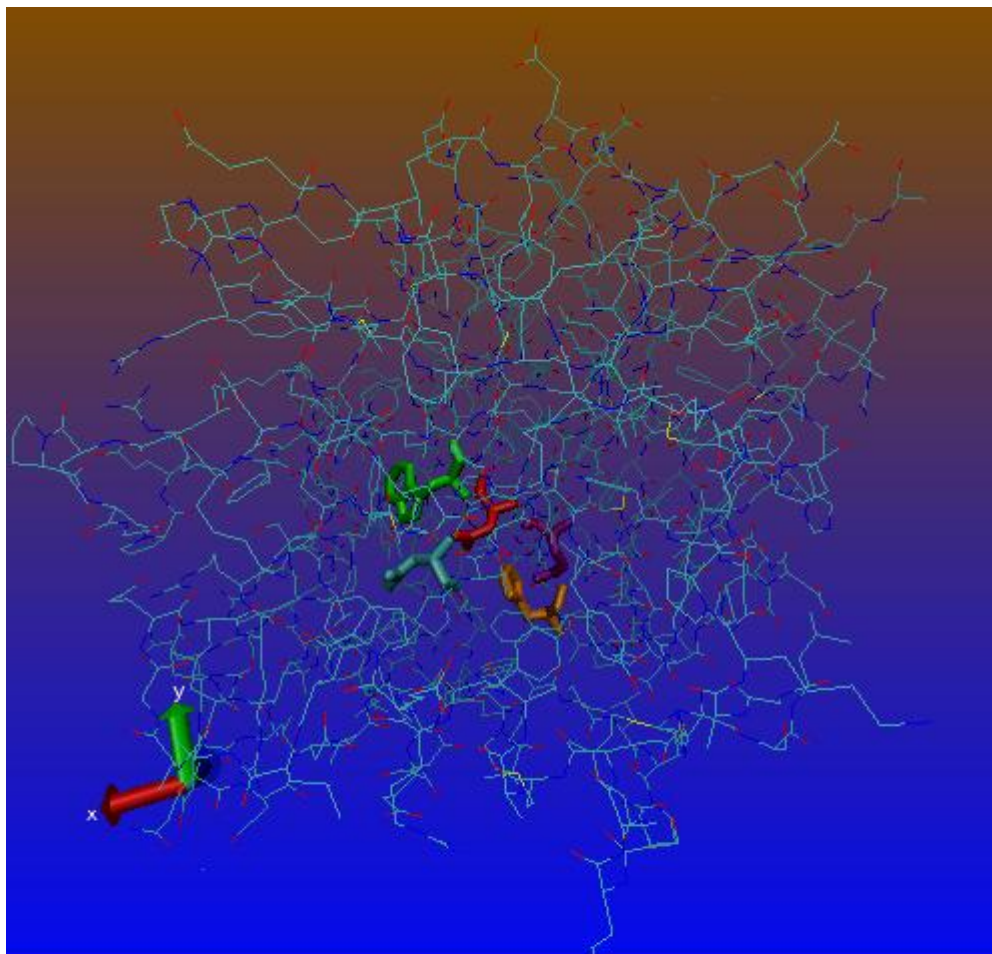
	Asp 108
	Trp 109
	Asn 38
	His 272
	Glu 132

Příloha 1. *Struktura proteinu LinB86*



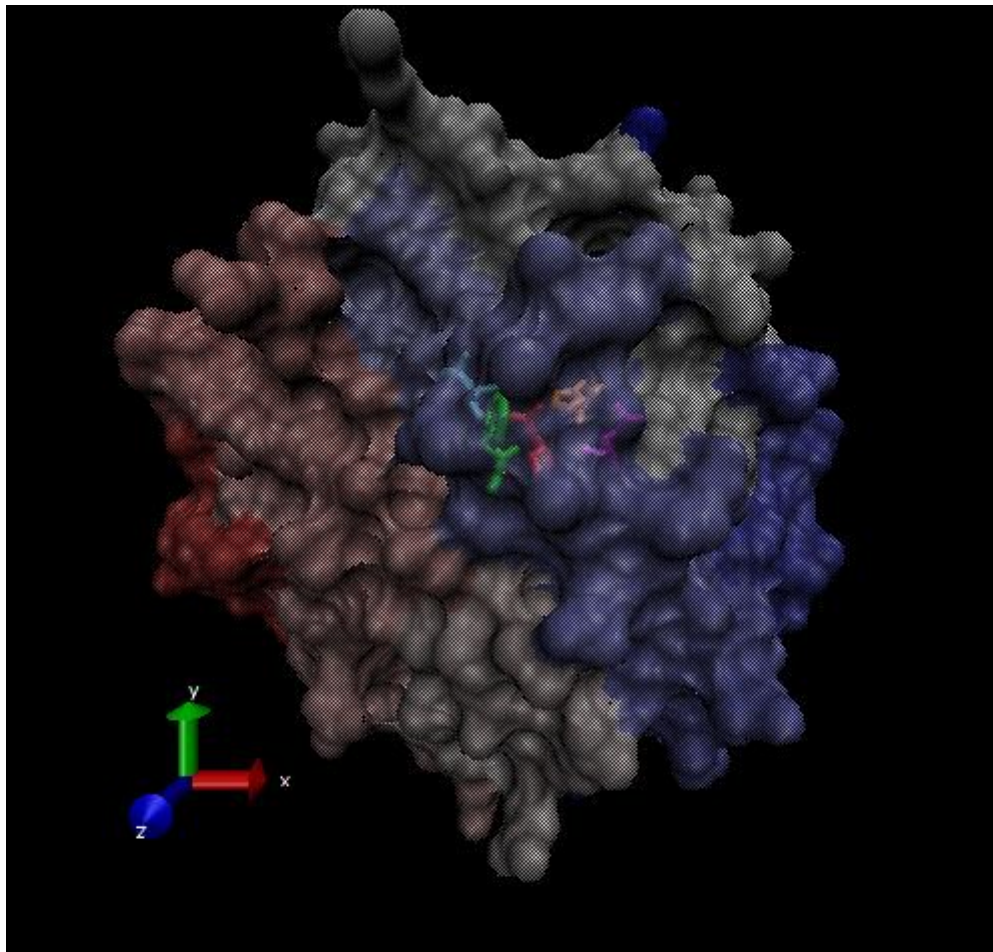
- Asp 108
- Trp 109
- Asn 38
- His 272
- Glu 132

Příloha 2. *Struktura proteinu LinB86*



- Asp 108
- Trp 109
- Asn 38
- His 272
- Glu 132

Příloha 3. *Struktura proteinu LinB86*



- Asp 108
- Trp 109
- Asn 38
- His 272
- Glu 132

Příloha 4. *Struktura proteinu LinB86*



P8

CRYSTALLIZATION AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF LINB86 HALOALKANE DEHALOGENASE MUTANT

O. Degtjarik^{1,2}, I. Iermak^{1,2}, J. Rezabek³, R. Chaloupkova⁵, P. Rezacova⁴, M. Kutý^{2,3}, J. Damborsky⁵ and I. Kuta Smatanova^{1,3}

¹University of South Bohemia, Faculty of Science, Branišovska 31, CZ-37005 České Budejovice, Czech Rep

²Acad. Sci. of the Czech Rep., Inst. of Nanobiology and Struct. Biology GCRC, Zamek 136, Nove Hradý

³University of South Bohemia, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, Institute of Complex Systems and CENAKVA, Zamek 136, CZ-373 33 Nove Hradý, Czech Republic

⁴Inst. of Molecular Genetics of the Acad. Sci. of the Czech Republic, v.v.i., Flemingovo no. 2, 16637 Prague

⁵Loschmidt Laboratories, Faculty of Science, Masaryk University, Kamenice 5, 62500 Brno, Czech Republic

LinB is a microbial enzyme of the haloalkane dehalogenase family that catalyze the cleavage of the carbon-halogen bond in halogenated aliphatic pollutants, resulting in the formation of a corresponding alcohol, a halide ion and a proton. Haloalkane dehalogenase LinB isolated from a bacterium *Sphingobium japonicum* UT26 has relatively broad substrate specificity and can be potentially used for biosensing and biodegradation of environmental pollutants. Different variants of haloalkane dehalogenase LinB were constructed with a goal to study the effect of mutations on enzyme functions. In LinB86 (W140A + F143L + L177W + I211L) variant mutations lead to blocking of the main tunnel and opening of alternative way for connection the deeply buried active site with the surrounding solvent.

Crystals of LinB86 were obtained Index (Hampton Research, USA) and Morpheus (Molecular Dimensions Ltd.,

UK) screens. Full data set was collected on the beamline ID-29 of ESRF (Grenoble, France) at 2.43 Å resolution. Crystals belong to H-centered trigonal *H32* space group. Matthews coefficient of $V_M = 2.55 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ suggests that the crystals contain two molecules per asymmetric unit, which corresponds to a solvent content of 51.79%. Crystal structure of LinB86 was solved by molecular replacement using the coordinates from LinB32 (L177W) haloalkane dehalogenase mutant. The structure refinement is currently in progress.

This research was supported by the GA CR (P207/12/0775), GAJU (141/2013/P) and ME CR (CZ.1.05/2.1.00/01.0024).

Příloha 5. Publikovaný článek v časopise *MATERIALS STRUCTURE in Chemistry, Biology, Physics and Technology*



Certifikát

o úspěšném absolvování kurzu

Krystalizace makromolekulárních látek

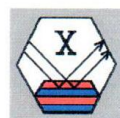
pro:

Josef Řežábek

Nové Hradky, 27.-29. 11. 2012

Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
a Akademie věd ČR, Nové Hradky

RNDr. Jindřich Hašek, DrSc.
předseda České a Slovenské
Krystalografické společnosti



www.xray.cz

Příloha 6. Certifikát o absolvování kurzu Krystalizace makromolekulárních látek

14 Abstrakt

Strukturně-modelovací studie haloalkan dehalogenasy LinB

V dnešní době stále častěji nacházíme v životním prostředí halogenované sloučeniny, které se velice pomalu odbourávají a mají negativní vliv na lidské zdraví i organismy vyskytujících se ve vodě i v půdě. Vzhledem k jejich velkému rozšíření v přírodě je věnována velká pozornost jejich odstraňování například pomocí mikroorganismů (bakterií), které v kontaminovaném prostředí přežívají a metabolickou transformací halogenované uhlovodíky účinně odbourávají pomocí vlastních enzymů, tzv. halogenalkandehalogenas. Tyto enzymy katalyzují hydrolýzu halogenovaného uhlovodíku za vzniku halogenidového iontu a primárního alkoholu.

Cílem bakalářské práce bylo strukturně-dynamické studium mutantní formy proteinu LinB86 izolovaného z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26. K tomuto studiu byly použity základní i pokročilé techniky proteinové krystalizace, dále základy řešení proteinových struktur z difrakčních dat a studium struktury a dynamiky enzymu pomocí standardních softwarových nástrojů molekulového modelování.

Krystalizace mutantní formy enzymu LinB86 metodami sedící a visící kapky poskytla kvalitní krystaly, metoda difúze přes přepážku byla pozitivní pouze při nejvyšší koncentraci proteinu a metoda krystalizace pod olejem nebyla úspěšná. Programem WinCoot byla zpracována molekulární struktura proteinu LinB86 v experimentální mapě elektronové hustoty. Programem Swiss-PdbViewer byla provedena bodová mutace čtyř aminokyselin v halogenalkandehalogenase divokého typu a program VMD poskytl zobrazení prostorového modelu proteinu i jeho aktivního místa. Programem GROMACS byla načtena struktura mutantní formy enzymu LinB86 ve vodním prostředí a následně zpracována molekulárně-dynamickou simulací. Výsledné simulace potvrdily stabilitu mutantní formy LinB86 ve vodním prostředí a nejzajímavějším výsledkem bylo odhalení dvou rozdílných pozic aminokyseliny Trp 177, která se nachází v enzymatickém tunelu vedoucím k jeho aktivnímu místu a je jednou ze čtyř aminokyselin, u nichž byla provedena mutace.

Uvedené výsledky budou součástí připravované publikace o LinB86 a dále využity při studiu halogenalkandehalogenas a jejich dalších mutantních forem.

Klíčová slova: protein, krystalizace, struktura proteinu, halogenalkandehalogenasa, mutantní forma LinB86, molekulárně-modelovací simulace

15 Abstract

Structure-modelling studies of the haloalkane dehalogenase LinB

Nowadays there are more and more halogenated pollutants in the life environment that are very resistant and they have negative influence on the human health as well as on organisms living in the water and soil. In respect of their distribution in the nature a big attention is focused on possibility to eliminate these compounds for example with the help of microorganism (bacteria), which are able to survive in this contaminated environment and with the use of own enzymes (named haloalkanedehalogenases) they can effectively degrade halogenated hydrocarbons. These enzymes catalyze hydrolysis of halogenated hydrocarbon and produce halogen anion and primary alcohol.

The main aim of this bachelor thesis was structure-dynamics study of LinB86 mutant variant protein isolated from the soil bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. Standard and advanced protein crystallization techniques, basis of solving protein structures from diffraction data and study of enzyme structure and dynamics with the use of standard SW for molecular modelling were applied.

Crystallization of the LinB86 mutant form using sitting and hanging drop vapour diffusion crystallization techniques provided crystals in good quality while advanced counter-diffusion method gave us positive results only in the case of highest enzyme's concentration and using of microbatch methods was not successful. Molecular structure of LinB86 in the electron density map was processed by program WinCoot. Point mutations of four amino acids in wild type of haloalkanedehalogenase LinB were done by the use of Swiss-PdbViewer and the whole model structure and active site of enzyme LinB86 were presented graphically with VMD program. Structure of mutant variant of LinB86 enzyme was loaded into water environment with GROMACS program followed by molecular dynamic simulation. Results of simulation confirmed stability of LinB86 in water environment and revealed two different positions of Trp 177 which is situated in the active site tunnel. This amino acid Trp 177 is one of four mutated amino acids of native LinB.

Obtained results should be a part of prepared publication about LinB86 mutant variant and also they will be used for following studies of haloalkanedehalogenases and their mutant variants.

Keywords: protein, crystallization, protein structure, haloalkanedehalogenase, mutant variant of LinB86, molecular-modelling simulations