

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Krystalizační studie nově izolované

halogenalkandehalogenasy DgaA

z *Glacieocola agarilytica* NO2

Bakalářská práce

Ivana Berková

Školitel: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

České Budějovice 2016

Berková, I., (2016): Krystalizační studie nově připravené halogenalkandehalogenasy DgaA z *Glacieocola agarylitica* NO₂. [Crystallization studies recently prepared halogenalkandehalogenas DgaA of *Glacieocola agarylitica* NO₂. Bc. Thesis, in Czech] – 70 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

This bachelors thesis is focused on crystalization study of newly prepared halogenalkandedehalogenase DgaA from bacteria *Glacieocola agarylitica* NO₂. Main target of this work is getting acquainted with methods of protein crystalization and usage of those methods for preparation of suitable DgaA protein crystals of that will be used for X-ray structural analysis. Results from diffraction analysis of DgaA crystals will be starting point for further research focused on structure determination and and description of protein function.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou 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 této kvalifikační práce a databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 13. 12. 2016

Ivana Berková

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Tatyane Prudnikové, Ph.D. za ochotu a trpělivost při vedení celým praktickým experimentem.

Poděkování patří také mé rodině za podporu během celého studia.

I. Úvod:	1
II. Literární přehled	2
2.1. Historické milníky krystalografie	2
2.2. Úvod do současné krystalografie proteinů	5
2.3. Faktory ovlivňující krystalizaci	9
2.4. Metody krystalogeneze	13
2.5. Krystalizační testy	20
2.6. Makromolekulární databáze	23
2.7. Halogenalkandehalogenasy	24
2.8. <i>Glaciecola agarilitica</i> NO2	30
III. Materiál a metody	34
3.1. Krystalizace lysozymu	34
3.2. Krystalizace DgaA	38
3.3. Testování krystalů	46
3.4. Získání difrakčních dat	47
IV. Experimentální výsledky	48
4.1. Výsledky krystalizace lysozymu	48
4.2. Výsledky krystalizace DgaA	53
4.1. Výsledky testování krystalů	55
4.1. Difrakční záznam	56
V. Diskuze	57
VI. Závěr	59
VII. Seznam literatury	60
VIII. Přílohy	67
IX. Seznam zkratk	70

I. Úvod:

Krystalografie proteinů je jednou z klíčových metod strukturní biologie, která se zaměřuje na objasnění prostorové struktury makromolekulárních látek za použití rentgenového (RTG) záření. Znalost struktury proteinů je důležitá k pochopení vztahů, různých proteinových interakcí a mechanismů enzymatických reakcí.

Krystalizace proteinů spočívá v hledání vhodných podmínek pro růst monokrystalů a jejich následnou optimalizaci, poté jsou podmínky využity k pěstování krystalů.

Důležitou roli v historii krystalografie představuje hemoglobin, který byl prvním makromolekulárním krystalem studovaným pomocí rentgenové krystalografie. Ke dni 4. 12. 2016 je v Protein Data Bank (RCSB PDB, 2016) uloženo přes 124 726 struktur biomakromolekul, z nichž přes 90% je vyřešeno pomocí rentgenové krystalografie.

Cíl práce je zaměřen na proteinovou krystalogenesi. Jedná se o metody krystalizace proteinů, pomocí kterých byl krystalizován modelový protein lysozym a následně nově vyizolovaný a purifikovaný protein halogenalkandehalogenasy DgaA z bakterie *Glaciecola agarilytica* NO2.

Teoretická část shrnuje faktory, které ovlivňují krystalizaci makromolekulárních látek, uvádí krystalizační strategie a v neposlední řadě se zabývá halogenalkandehalogenasami.

Praktická část spočívá v aplikaci základních krystalizačních metod na modelový protein lysozym a protein DgaA. V poslední fázi projektu budou naměřena difrakční data studovaného proteinu pro upřesnění struktury.

Cíle práce:

Zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu lysozymu

Charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů

Optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly proteinu DgaA v difrakční kvalitě

Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

II. Literární přehled

2.1. Historické milníky krystalografie

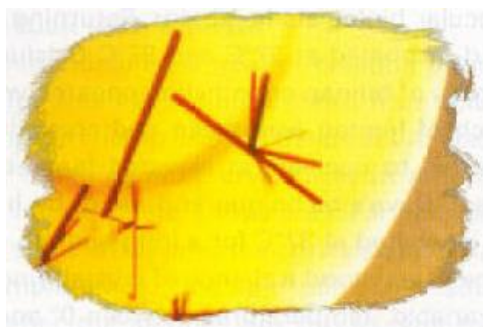
Krystalografie se stala důležitým vědním oborem, neboť její výsledky jsou důležité pro celou řadu oborů z oblastí biotechnologií, molekulární biologie a medicíny. Prvním příspěvkem krystalografie, před více než 170 lety, bylo vypěstování krystalů hemoglobinu (Bergfors, 1999).

1840

Hemoglobin

Rok 1840 se stal prvním důležitým krokem pro následný rozvoj krystalografie, neboť došlo k vypěstování krystalů hemoglobinu. Vzorek hemoglobinu byl získán z krve žížaly, která byla umístěna mezi dvěma sklíčky. Poté se vzorek krve nechal pomalu vysoušet, při čemž docházelo k vypařování vody a zakoncentrování vzorku krve. Z tohoto pokusu bylo patrné, že proteinové krystaly vznikaly pomalou dehydratací. Tento pokus se stal principem pro mnoho metod krystalizace, které se používají v současné krystalografii. Výsledek pokusu je zobrazen na Obr. 1 (Leunissen, 2001).

Významný objev, který učinil Hünfeld, vedl k důležitému pochopení: 1. je možné krystalizovat biologické makromolekuly a 2. proteinové krystaly mohou vyrůst pomocí metod vypařování (Cudney, 1999).



Hemoglobin

Obr. 1: Krystaly hemoglobinu z krve žížaly (Převzato z: Cudney, 1999).

1850 – 1925

Ureasa, insulin, endothelin

Další významné pokroky se datují k období 1850 – 1900, kdy došlo k pokusu o krystalizaci proteinů zvaných globuliny. Metody vyvinuty pro tento druh proteinů byly: extrakce proteinů v solných roztocích, dialýza solného roztoku extraktu, zpracování proteinových roztoků s alkoholem, acetonem nebo etherem. Byly využity různé proměnné, jako je kolísání teploty, dialýza proti nízké iontové síle roztoku a použití různých organických rozpouštědel (Leunissen, 2001).

V roce 1925 byl poprvé vykrytalizován enzym ureasa a v téže době byl prvně vykrytalizován také hormon insulin (Leunissen, 2001).

Dalším cílem byla snaha o vykrytalizování lidského endothelinu za pomoci metody takzvaného mřížového skenování („Grid screen“). Pokus byl úspěšný. Důležitým faktorem, který v tomto případě ovlivnil úspěch krystalizace, byla teplota. Bylo zaznamenáno, že krystaly lidského endothelinu rostou při teplotě 37°C (Cudney, 1999).

Ribonukleáza A

Dalším úspěchem krystalizace bylo vykrytalizování ribonukleasy A, získané ze slinivky skotu. Krystalizace probíhala metodou difúze par v sedící a sendvičové kapce pod rozsvíceným mikroskopem. Důležitým faktorem během růstu krystalu byla teplota. Bylo pozorováno, že krystaly rostly pouze tehdy, když byl mikroskop vypnut, neboť světlo, které vydával, způsobilo nepatrnou změnu teploty. Z tohoto zjištění vyplývá, že i jemné změny teplot mohou být významné při nukleaci a růstu proteinových krystalů. Výsledek pokusu je zaznamenán na Obr. 2. Konečným řešením krystalizace bylo cyklování teplot a to z důvodu tvorby větších krystalů (Cudney, 1999).

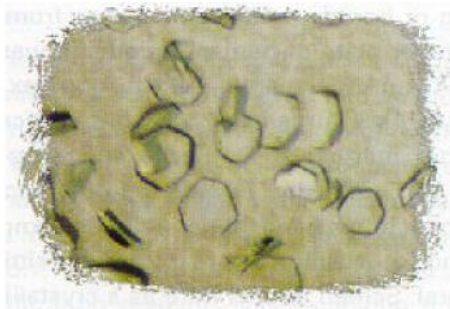


Ribonukleáza A

Obr. 2: Krystaly ribonukleázy A (Převzato z: Cudney, 1999).

Edestin

U tohoto proteinu probíhala krystalizace odlišným způsobem, než u proteinů předchozích. Krystaly edestinu byly získány ze sraženiny tak, že se vzorek dvakrát odstředil, přefiltroval a poté smíchal s krystalizačním činidlem. Výsledné krystaly edestinu jsou na Obr. 3. Tato technika vyprodukovala méně krystalů, přesto byly větší a bez výskytu amorfni sraženiny (Cudney, 1999).



Edestin

Obr. 3: Krystaly edestinu (Převzato z: Cudney, 1999).

Výše zmíněné krystalizační pokusy vedly k položení základů některých metod krystalografie, které používáme i v současné době. Úspěšné výsledky těchto pokusů vedly vědce ke snaze dále rozvíjet tento vědní obor, tak jak ho známe dnes.

1930

Rok 1930, se stal přelomovým bodem, neboť v tomto roce byla prvně použita rentgenová difrakční analýza k charakterizaci krystalů proteinů (McPherson, 2004).

2.2. Úvod do současné krystalografie proteinů

Proteinová krystalografie je vědní obor, který se zabývá zjišťováním struktur biologických makromolekul, jejich vlastnostmi a jejich využitím pro farmaceutické, zemědělské a jiné průmyslové odvětví (Saridakis a kol., 2009). Krystalizace je založena na mnoha zásadách, zkušenostech a nápadech. Do dnešní doby neexistuje žádná jednotná teorie, která říká, jak přesně se má postupovat při pěstování krystalů proteinů. Veškeré pokusy jsou tedy založené na zkušenostech, trpělivosti, vytrvalosti a intuici, neboť růst krystalů je do značné míry empirický. Nicméně v současné době se rozvíjejí racionální přístupy ke krystalizaci, založené na pochopení základních vlastností těchto látek a jejich fyzikálně-chemických vlastností, které jsou zásadní pro pochopení toho, jak dané krystaly proteinů pěstovat. Parametry, které ovlivňují růst krystalů, nebo jiné faktory přispívající ke vzniku různých druhů krystalů, které je ve většině případů nutné optimalizovat a tak získat co možná nejlepší krystaly vhodné pro difrakci (McPherson, 2004).

Než je získán krystal proteinu vhodný pro difrakci, následuje celá řada kroků. Počínaje čištěním makromolekul, jejich charakterizací až po optimalizaci podmínek a vypěstování krystalu (Kutá Smatanová, 2008). V současné době se proteiny získávají buď z přírodních zdrojů nebo izolací z rekombinantních systémů, což znamená, že se protein produkuje například v bakterii *E.coli* (Kratochvíl a kol., 2008). Získaný protein projde procesem čištění (purifikace) a poté přichází na řadu samotná krystalizace proteinu, která se skládá z několika kroků: supersaturace, nukleace, růst krystalů a ukončení růstu krystalů proteinu (Kutá Smatanová, 2008).

2.2.1. Princip krystalizace

Krystalizace je proces, kdy látka přechází z roztoku (taveniny) do pevného skupenství a dochází k tvorbě krystalů. Jedná se o pozvolné sdružování atomů, molekul nebo iontů, které se uspořádají do symetrického uspořádání - krystalu. Jedná se o poměrně složitý proces, který lze ovlivnit celou řadou vnějších vlivů (Strukturní Analýza [online]. Taraba, Richtera, 2002).

2.2.2. Krystalizace proteinu

Krystalizace proteinů je na rozdíl od krystalizace anorganických nebo organických látek daleko složitější. Ve většine případů se provádí ve vodných roztocích (Fyzikální ústav AV ČR, c 2008 – 2014). Podle A. McPhersona a kol. (1995) je proteinová krystalizace založena na využití tří zásad. První zahrnuje rušivé vztahy mezi makromolekulami a ostatními komponenty v roztoku (molekuly vody a ionty), druhá se týká změny struktury a třetí zahrnuje zvýšení počtu příznivých sil mezi jednotlivými makromolekulami. Krystalizace proteinů se od krystalizace anorganických látek liší především obtížností, labilitou, dynamickými vlastnostmi a časovou náročností. Je to empirický proces, při kterém hledáme vhodné podmínky a následně je optimalizujeme, aby došlo k produkci vhodných krystalů.

Obtížnost této metody také spočívá ve vlastnostech proteinů, neboť ty jsou vysoce senzitivní a jen nepatrná změna některých z podmínek může vést k jejich denaturaci, degradaci nebo změně vlastností. Z těchto důvodů je velice důležité proteiny udržovat v hydratované formě při konstaním pH a teplotě (Kutá Smatanová, 2008).

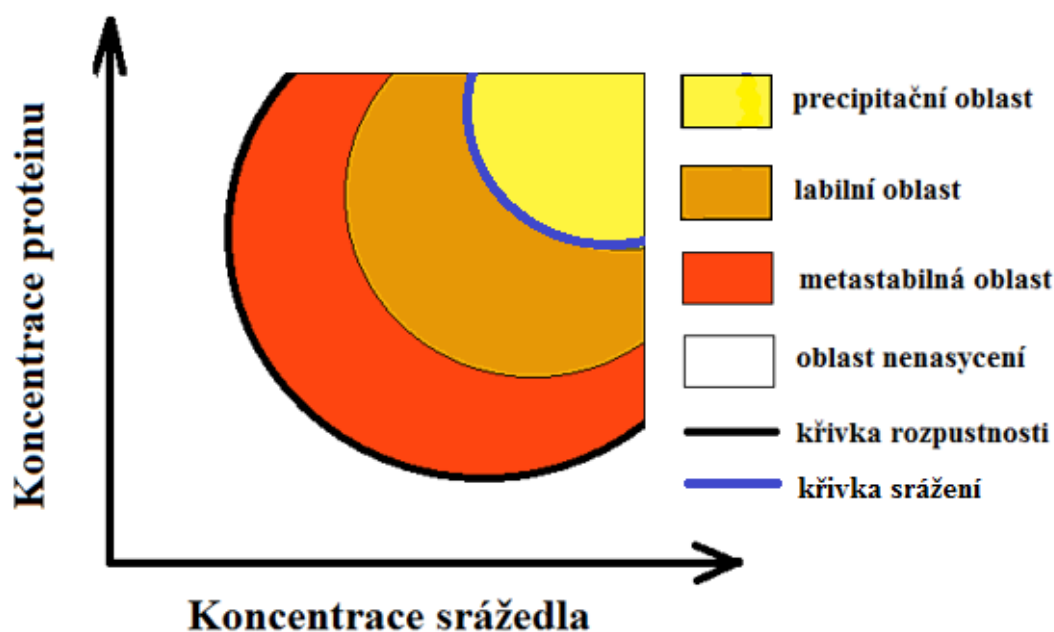
K tomu, aby byla krystalizace proteinů úspěšná, je důležité splnit několik podmínek. Především je důležité dosáhnout přesyceného (supersaturovaného) roztoku, kdy může dojít k precipitaci nebo vytvoření stabilních krystalických jader. Další podmínkou je dosažení teplotního gradientu, který má vliv na kondenzaci molekul z plynu nebo na kondenzaci kapaliny (Kutá Smatanová, 2008).

V neposlední řadě je nutné znát faktory, které vedou ke vzniku a růstu krystalů. Proces, při němž vznikají krystaly, se skládá ze tří fází – nukleace, růst a ukončení růstu krystalů (Kutá Smatanová, 2008).

Supersaturace

Jak již bylo napsáno, krystalizace makromolekul vyžaduje vytvoření přesyceného stavu. Je to nerovnovážný stav, kterého je docíleno úpravou některých fyzikálně-chemických podmínek (koncentrace proteinu a rozpouštědla, teplota, pH a jiné), ve kterém je určité množství molekul ve stavu přesahující hranice rozpustnosti. Rovnováha je obnovována formováním pevné fáze, v našem případě tvorbou krystalů a tím je dosaženo limitu nasycení. K tomu, aby došlo k vytvoření přesycených roztoků, je třeba některé z jejich vlastností upravit (např. snížit jejich chemickou aktivitu) tak, aby byla snížena schopnost rozpouštění makromolekul v roztoku. To znamená, že jsou zrušené veškeré interakce mezi rozpouštědlem a rozpuštěnou látkou, mezi makromolekulami v roztoku tak, aby došlo k podpoře ve vytvoření pevného stavu, krystalů

(McPherson, 2004). Na fázovém diagramu (Obr. 4.) je oblast supersaturace rozdělena do několika částí. Je to oblast metastabilní – v této části dochází pouze k růstu krystalů, dále oblast labilní – může zde probíhat nukleace a růst krystalů a poslední oblast je precipitační – zde dochází ke vzniku amorfni sraženiny. Nejdůležitější je oblast labilní, neboť zde vznikají krystalizační jádra (Li a kol., 2009).



Obr. 4: Fázový diagram supersaturace (Podle podkladů Chirgadze (2001) vytvořila Ivana Berková).

Nukleace

Nukleace je oblast, ve které dochází k tvorbě krystalizačních jader. Je nezbytným a prvním krokem k růstu skutečných krystalů proteinů (Li a kol., 2009). Krystalizační zárodky se začínají tvořit po překročení limitu nasycení. Tohoto stavu se dosáhne tím, že dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul proteinu (Kutá Smatanová, 2008). Podle McPhersona (2004) dochází k tvorbě kritických jader, označovaných za malé proteinové agregáty. I po sloučení vhodně orientovaných molekul, není jednoznačné, zda vzniknou kvalitní krystaly vhodné pro rentgenovou analýzu.

Míra nukleace závisí na rozpustnosti dané látky, tedy pokud má protein vysokou rozpustnost, je i vyšší šance na získání mikrokrytalických jader (Berry, 1995). Čím vyšší je přesycení roztoku, tím nižší je energetická bariéra a snadněji vznikají kritická jádra (Saridakis a kol.,

2009). Pokud je však přesycení nadměrné, zvyšuje se rychlost, vznikají stovky drobných krystalů a dochází tak k nedostatku prostoru pro tvorbu velkých krystalů (Nanev, 2006; Saridakis a kol., 2009). Mohou také vznikat strukturní defekty a dojít tak k předčasnému ukončení růstu krystalů nebo začlenění nečistot (Chernov, 2003).

Růst krystalů

Růst krystalů je dynamický proces, při kterém dochází ke vzájemné interakci vhodně orientovaných molekul nebo iontů. Rychlost této fáze může ovlivnit difúzní nebo depoziční stupeň. Podle míry ovlivnění budou vznikat krystaly kvalitní, defektní nebo žádné (Kutá Smatanová, 2008). Kvalitní krystaly vhodné pro rentgenovou analýzu vznikají pomalým růstem, čehož můžeme docílit snížením teploty nebo koncentrace proteinu (Emmer, 2007).

Společným znakem pro růst krystalů a nukleace je vytvoření stavu supersaturace (přesycení) matečného roztoku. Je to proměnná, která pohání oba procesy. Supersaturace je stav narušení rovnováhy a systém má tendenci tuto rovnováhu vyrovat. Vyrovnání této nerovnováhy spočívá ve vytvoření pevného skupenství ve formě krystalů, kdy je dosaženo hranice nasycení. (McPherson, 2004).

Terminace růstu

Terminace růstu krystalů je konečná fáze, při níž mohou vznikat krystaly vhodné k difrakci. Tyto krystaly se většinou získávají pomalým růstem, kdy v čase zvětšují svůj objem. V jiném případě vzniká větší množství drobných mikrokystalů nebo multikrystalických agregátů (dendrity, sferulity), které také mohou být vhodnou alternativou pro analýzu. Zcela nevhodné pro difrakci jsou nekystalické gely, amorfni pufry nebo stav, kdy nedojde k tvorbě krystalů a roztok zůstane čirý (Kutá Smatanová, 2008). Za ukončený růst krystalů považujeme dosažení rovnováhy v systému, kdy nedochází k tvorbě nebo zvětšování krystalů (McPherson, 2004).

2.3. Faktory ovlivňující krystalizaci

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují průběh růstu krystalů. Stručný přehled těchto faktorů je uveden v Tab. I. Těchto faktorů je příliš mnoho k tomu, aby bylo možné je kompletizovat a to převážně z důvodu vysoké specifity proteinů, neboť proteiny jsou vysoce individuální, skládají se z různého počtu aminokyselin, mají různé pořadí aminokyselin v řetězci a různé vlastnosti. K neúspěšné krystalizaci proteinů může také dojít i v případě, že se jen nepatrně odchylíme od přípravy daného proteinu nebo provedeme krystalizaci v jiném časovém sledu (Kutá Smatanová, 2008).

Teplota

Neexistuje konkrétní teplota, která je vhodná pro krystalizaci všech proteinů. Uvádí se několik konkrétních teplot (teplotních rozmezí), které jsou charakteristické, ale vše záleží na daném proteinu, jeho vlastnostech a na srážedle. Teplota konfiguruje převážně ve vztahu s rozpustností daného proteinu (Bergfors, 1999).

Rozpustnost je závislá na teplotě, většinou roste se zvyšující se teplotou v podmínkách srážedel s nízkou iontovou silou, jako je např. roztok polyethylenglykolu (PEG). Naopak je tomu u roztoku o vysoké iontové síle, kde dochází k menší rozpustnosti proteinu při pokojové teplotě (25°C) než při nízké teplotě (4°C) (Bergfors, 1999).

Je zaznamenán teplotní rozsah od 0°C – 60°C, kdy došlo k vykrytalizování různých proteinů, i když obvykle se uvádí teplota 4°C nebo pokojová teplota. Nízké teploty jsou vhodné pro labilní protein, kdy nízká teplota zajišťuje jeho stabilizaci a zastavuje růst některých mikroorganismů. Teplota je důležitá proměnná i při výběru organického rozpouštědla, protože pokud pracujeme s těkavými organickými látkami, jako jsou isopropanol, ethanol, nebo výše zmíněný PEG, je důležitá nízká teplota. (Bergfors, 1999).

Precipitant (precipitační činidlo, srážedlo, srážecí činidlo)

Jako další důležitá proměnná při pěstování krystalů proteinu se uvádí, vhodná volba srážedla (precipitantu). Funkce jednotlivých precipitantů je založena na vysrážení proteinových molekul z roztoku ve formě uspořádaných krystalů a nikoli ve formě neuspořádaných agregátů (Bergfors, 1999).

Precipitanty lze rozdělit do čtyř kategorií na základě jejich účinků: 1. soli ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaCl, MgCl_2), 2. organická rozpouštědla (methanol, ethanol, terc-butanol, aceton, 2-methyl – 2,4 – pentadiol (MPD), glukosa, 3. speciální kategorie organických rozpouštědel tvořící dlouhé polymerní látky (polyethylenglykol (PEG), polypropylenglykol P400, karboxymethylcelulosa a další) a 4. povrchově aktivní látky (Kutá Smatanová, 2008).

Anorganická srážedla (soli) narušují hydratační vrstvu proteinů a výsledkem je snížení interakcí mezi proteinem - rozpouštědlem a zvýšení přitažlivých interakcí mezi proteinem - proteinem (Kutá Smatanová, 2008).

Specifické organické precipitanty lze považovat za velmi výhodné, neboť nedenaturují proteiny. Do této kategorie řadíme výše zmíněný MPD nebo PEG, lišící se v molekulové hmotnosti. Výhoda polyethylenglykolu, spočívá v krystalizaci proteinů v úzkém rozsahu koncentrací precipitantu a v kratším krystalizačním čase, na rozdíl od MPD, neboť snižuje dielektrickou konstantu roztoku (Kutá Smatanová, 2008).

Volba precipinatu je většinou empirická. Typ precipitantu závisí také na pI (izoelektrický bod) proteinu (Bergfors, 1999). Podle BMCD (Biological Macromolecule Crystallization Database) existuje několik nejpoužívanějších srážedel, které jsou vhodné pro vypěstování krystalů proteinů – jako je síran amonný a polyethylenglykol (PEG) 4000-8000. Správný rozsah koncentrací je uveden v BMCD (Gilliand a kol., 1994).

Koncentrace a pH pufru

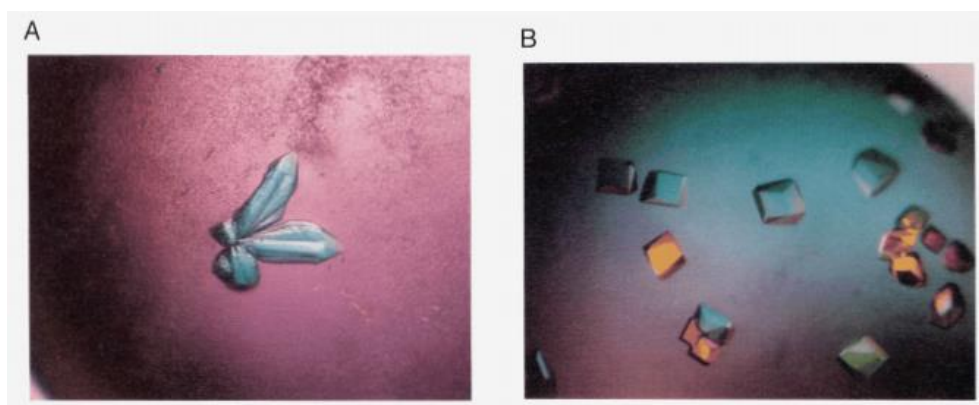
Pufř je definován jako směs kyseliny a její konjugované báze, který udržuje stálé pH v roztoku po přidání kyseliny nebo báze. Při výběru pufru je důležité dbát na to, aby byl protein zachován v požadovaném pH a aby byla zajištěna reprodukovatelnost experimentálních výsledků (Bollag a kol., 1996).

Pro získání krystalů daného proteinu je důležité použít vhodný pufř o vhodné koncentraci a pH. Pokud nejsou známe hodnoty, při kterých protein krystalizuje, použijeme 10 mM HEPES o hodnotě pH 7.0 nebo Tris o pH 8.0, v jiném případě se použije známá hodnota uvedená v BMCD. (Bergfors, 1999).

Při použití některých solí je důležité mít na paměti jejich těkavý charakter, který má vliv na pH. Další nevýhoda těchto, často úspěšně používaných, anorganických pufrů spočívá v časté krystalizaci soli (Bergfors, 1999).

Kationty

Kationty představují faktor, který příznivě ovlivňuje růst, velikost a kvalitu krystalů. Trankhanov a kol. (1995) testovali vliv různých dvojmocných kationtů na získání krystalické formy leucinu a isoleucinu. Výsledek tohoto pokusu je viditelný na Obr. 5. V tomto pokusu byl použit specificky vázaný protein (LBP) ($M_r = 37\ 000$). Úspěchu bylo dosaženo s použitím kationtu Cd^{2+} , kdy došlo k dramatickému zlepšení velikosti krystalů, morfologii a difrakční kvality. Kationt Cd^{2+} měl vliv na vznik šestiúhelníkových krystalů, namísto tvaru jehliček, které nebyly vhodné pro difrakční analýzu.



Obr. 5: Porovnání výsledku krystalu LBP-leucin komplex bez Cd^{2+} (A) a za použití Cd^{2+} (B) (Převzato z Trankhanov a kol., 1995).

Ostatní faktory

Úspěšnou krystalizaci také ovlivňují ostatní sloučeniny stabilizující strukturu nebo konformaci proteinů. Jsou jimi pomocná rozpouštědla – ionty, osmolyty a detergenty nebo rozpouštědla, která podněcují růst krystalů (Trakhanov a kol., 1995; Bolen, 2004; Arakawa a kol., 1985; Schein, 1990; Zulauf a kol., 1989). Hledání nových aditiv, které by zvýšily úspěšnost vypěstování krystalů proteinů, je stále v zájmu krystalografické komunity. Použití malých molekul podporujících růst krystalů, se staly základem některých komerčně dostupných sad krystalizačních roztoků (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) (McPherson a kol., 2006).

Tab. I: Faktory ovlivňující průběh krystalizace (Podle podkladů McPherson (2004) vytvořila Ivana Berková).

Fyzikální	Chemické	Biochemické
Teplota / teplotní variace	pH	Čistota / nečistota makromolekul
Povrch	Typ srážedla (precipitantu)	Ligandy, inhibitory, efek-tory
Metodika	Koncentrace precipitantu	Agregátní stav makromolekul
Gravitace	Iontová síla	Post – translační modifi-kace
Tlak	Specifické ionty	Zdroj makromolekul
Čas	Stupeň přesycení	Proteolýza / hydrolýza
Vibrace / zvuk / mechanické od-chylky	Oxidační / redukční pro-středí	Chemické modifikace
Elektrostatické / magnetické pole	Koncentrace makromolekul	Genetické modifikace
Dielektrické vlastnosti media	Kovové ionty	Inherentní symetrie makromolekul
Viskozita media	Zesilující prostředky / polyionty	Stabilita makromolekul
Míra rovnováhy	Detergenty / povrchově aktivní látky	Isoelektrický bod
Homogenní nebo heterogenní nukleace	Makromolekulární nečis-toty	Historie vzorku

2.4. Metody krystalogeneze

K vypěstování krystalů a následnému objasnění vlastností a struktury proteinů je zapotřebí znalost a správný výběr krystalizační metody. V současné době existuje několik krystalizačních metod, kterými lze připravit krystal proteinu. Během krystalizace dochází k manipulaci fyzikálně – chemických podmínek (koncentrace proteinu, teplota, pH a další) s cílem přivést makromolekulární roztok do stadia přesycení. Krystalizační metody lze rozdělit do tří hlavních skupin: základní, pokročilé a alternativní. (Bergfors, 1999).

Metody základní

Metody založené na difúzi par (Vapour Diffusion Crystallization)

Při těchto technikách se používá malé množství proteinu, které se mísí se stejným nebo podobným množstvím krystalizačního roztoku (pufr, sůl nebo srážedlo) (Bergfors, 1999). Metody jsou založené na difúzi par rozpouštědla z roztoku proteinu a precipitantu v kapce do roztoku v rezervoáru, ve kterém je vyšší koncentrace srážecího činidla. Zmenšováním objemu kapky dochází ke zvyšování koncentrace proteinu a systém přechází do stavu přesycení (Li a kol., 2009).

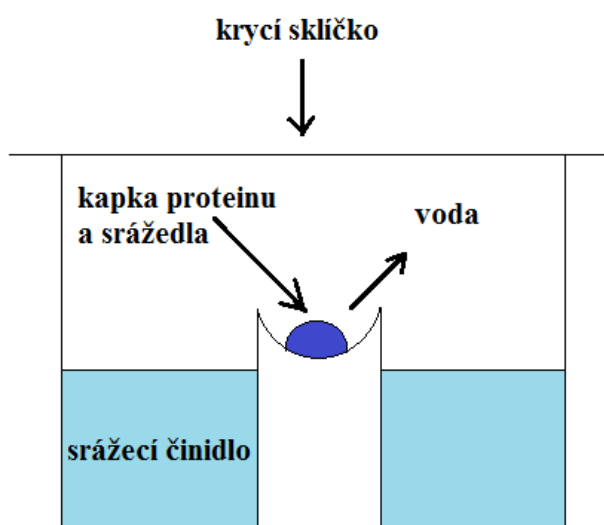
Hnací silou je snaha o ustálení rovnováhy koncentrací mezi kapkou roztoku (protein + srážedlo) a roztokem v rezervoáru obsahujícím vysokou koncentraci soli nebo netěkavé srážecí činidlo. Dochází ke stavu přesycení a začínají se tvořit krystaly proteinu (Bergfors, 1999). Metody založené na difúzi par se vyznačují dynamickým procesem, kdy se podmínky neustále mění v průběhu krystalizace. Z tohoto hlediska je velmi náročné určit konkrétní stupeň krystalizace, který může být optimalizován (Chayen, 1997).

I když se jedná o nejběžnější techniky používané pro pěstování krystalů proteinů, provází je některé problémy, jako jsou změny v poklesu objemu, změny pH v důsledku použití těkavých iontů, mírné změny teplot, dále změny, které mohou způsobit rozpuštění krystalů a změny během procesu krystalizace (Ochi a kol., 2009).

Metoda sedící kapky (Sitting Drop Vapor Diffusion)

Oblíbená metoda, která se používá pro široké rozmezí objemů (< 20 μ l), nebo v přítomnosti přísad, které snižují povrchové napětí kapky (Bergfors, 1999).

Princip této metody spočívá v tom, že kapka tvořená směsí vzorku (protein) a srážecího činidla je umístěná ve stojánku v rezervoáru naplněném srážecím činidlem. Schéma je vyobrazeno na Obr. 6. Kapka obsahuje nižší koncentraci srážedla, než je koncentrace precipitantu v rezervoáru. Z důvodu dosažení rovnovážného stavu, voda opouští kapku a končí v rezervoáru. Dochází k přesycení vzorku. Rovnováhy je dosaženo, když je koncentrace činidla v kapce stejná jako v rezervoáru (Hampton Research catalogue, 2015).

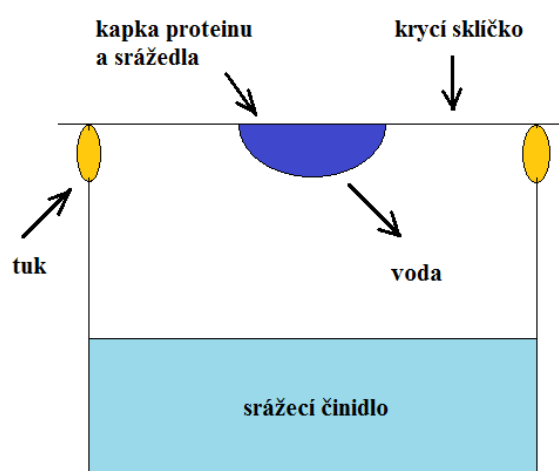


Obr. 6: Metoda sedící kapky (Podle podkladů Hampton Research (2015) vytvořila Ivana Berková)

Metoda visící kapky (Hanging Drop Vapor Diffusion)

Množství vzorku, které se používá pro metodu visící kapky, se pohybuje maximálně do 10 μ l. Pro větší se používají metody sedící nebo sendvičové kapky. Velice důležitý je i tvar kapky, neboť ovlivňuje počet nukleačních míst a tím samotnou velikost krystalů (Bergfors, 1999).

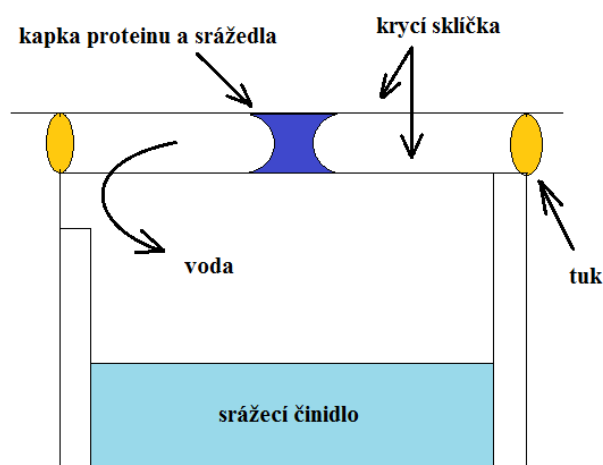
Při této technice kapka visí na vnitřní straně krycího sklíčka, které je upevněno ke krystalizační destičce pomocí silikonového tuku nebo viskozního oleje (Kutá Smatanová, 2008). Schéma je vyobrazeno na Obr. 7. Podle Chayen (2005) tato metoda poskytuje kvalitnější krystaly a možnost větší flexibility ke změně podmínek.



Obr. 7: Metoda visící kapky (Podle podkladů Hampton Research (2015) vytvořila Ivana Berková).

Metoda sendvičové kapky (Sandwich Drop Vapor Diffusion)

Technika opět spočívá ve smíchání roztoku proteinu a srážecího činidla. Kapka je vložena mezi dvě krycí sklička (Bergfors, 1999). Kapka se umístí do středu menšího 18 mm krycího sklička a pak je překryta větším 22 mm krycím sklíčkem (Hampton Research catalogue, 2015). Pro tuto metodu jsou speciálně navrženy „Q“ krystalizační destičky. Schéma je vyobrazeno na Obr. 8. Metoda poskytuje způsob zmenšení ploch kapky a umožňuje pomalejší difúzy par než metody sedící a visící kapky (Bergfors, 1999). Tato metoda se vyznačuje lepšími optickými vlastnostmi pro mikroskopové prohlížení (Kutá Smatanová, 2008).



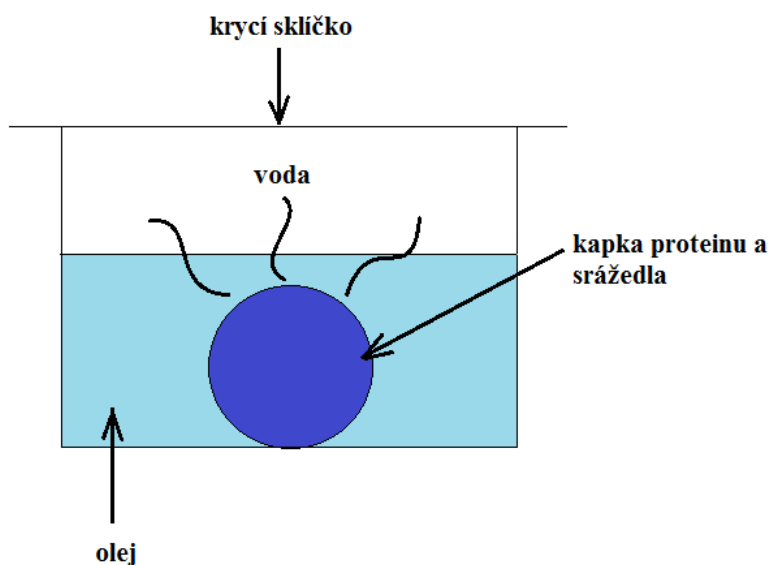
Obr. 8: Metoda sendvičkové kapky (Podle podkladů Hampton Research (2015) vytvořila Ivana Berková).

Dávková krystalizace (Batch crystallization)

Princip metody spočívá ve smíchání srážecího činidla a proteinového roztoku. Přesycení je dosaženo přímo, nikoli na základě difúze par. Metodu můžeme používat pro velké objemy ve zkumavce nebo v jiném zásobníku, pokud již známe krystalizační podmínky. Může být také použita v mikroměřítku pro zjištění podmínek rozpustnosti (Bergfors, 1999). Tato technika je oblíbená zejména u krystalizací malých molekul. Výhodou je rychlost a jednoduchost (Hampton Research catalogue, 2015).

Dávková krystalizace pod olejem (Microbatch Under Oil)

Princip techniky spočívá v napipetování malé kapky vzorku ve směsi s krystalizačním činidlem pod vrstvu oleje. Schéma je vyobrazeno na Obr. 9. Olej se používá proto, aby nedošlo k rychlému odpařování a snižování koncentrace, neboť oleje zamezují odpařování vody ze vzorku. Výhody krystalizace pod olejem zahrnují použití velmi malého množství vzorku (< 2 μ l) a objemu činidla (Hampton Research catalogue, 2015).

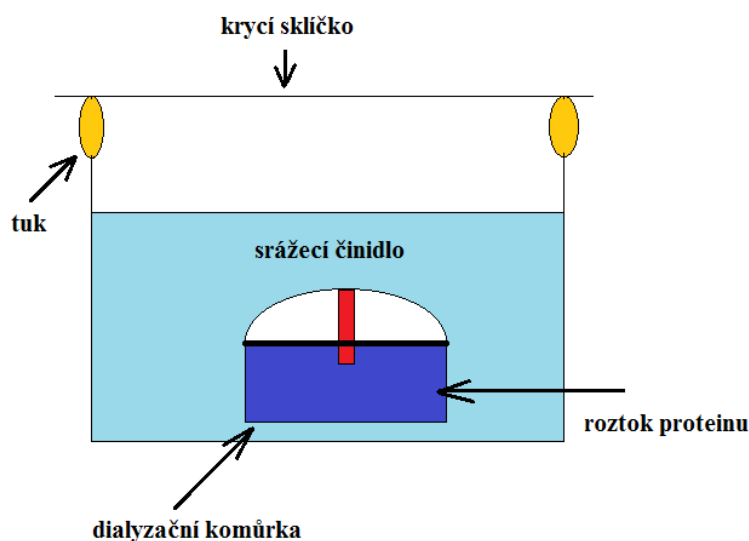


Obr. 9: Krystalizace pod olejem (Podle podkladů Hampton Research (2015) vytvořila Ivana Berková).

Velmi důležitá je viskozita olejů, neboť ta ovlivňuje rychlost a velikost proteinových krystalů. Používají se zejména parafinové a silikonové oleje nebo je také možné použít směs těchto olejů v poměru 1:1, známé také jako Al's oil (D'Arcy a kol., 1996). V tomto poměru bylo zjištěno, že krystaly mají tendenci se objevit v kratším čase (Chayen, 1999).

Dialýza (Dialysis)

Dialýza je založena na manipulaci s iontovými silami, tam kde není možná práce pomocí difúze par. Dialýzu lze provádět různými způsoby: dialyzační sáčky, kolódiové náprstky, Zeppeauerovy komůrky nebo dialyzační knoflíky. Membrány u dialýzi jsou semipermeabilní (polopropustné). Princip metody je založen na umístění vzorku proteinu uvnitř knoflíku (komerčmě dostupné objemy od 5 μ l do 350 μ l), který je ponořen do roztoku srážecího činidla, obě složky jsou odděleny semipermeabilní membránou. Schéma je vyobrazeno na Obr. 10. Membrána umožňuje látkám s malou molekulovou hmotností (pufry, soli, ionty) pronikat do roztoku srážedla a zároveň brání proteinu v difundaci ven (Bergfors, 1999). Koncetrace roztoku makromolekul je konstantní. Tím, že látky s malou molekulovou hmotností mohou pronikat ven, vzniká koncentrační gradient. Dialýza se používá pro látky s nízkou iontovou silou a za přítomnosti těkavých činidel, jako jsou např.: alkoholy (Messerschmidt, 2007).



Obr. 10: Dialýza (Podle podkladů Hampton Research (2015) vytvořila Ivana Berková).

Pokročilé metody

Metoda volné difúze (Free interface Diffusion Method)

Metoda, kdy roztok proteinu a roztok srážecího činidla jsou umístěny do skleněné kapiláry. Zpočátku je znatelné rozhraní mezi těmito roztoky a posléze dochází k promíchávání těchto roztoků. V místě rozhraní, kde se roztok proteinu a roztok rozpouštědla dotýkaly, dochází k postupné krystalizaci. Metoda, která je vhodná k testování různých koncentrací vzorku proteinu a srážecího činidla (García-Ruiz a kol., 1994).

Metoda difúze přes překážku (Counter Diffusion Method)

Metoda krystalizace prováděná ve skleněné kapiláře, kdy jsou roztoky vzorku proteinu a srážecího činidla odděleny propustnou gelovou vrstvou. V době kdy se roztoky míchají, dochází k protisměrnému pronikání, které vede v časoprostorovém gradientu k přesycení podél délky kapiláry. Během tohoto postupu se vytváří amorfni sraženiny, nebo vznikají mikrokristaly. Poté se snižuje přesycení a vzniká menší množství krystalů, ale získají větší kvalitu a velikost (García-Ruiz a kol., 1993).

Alternativní metody

Za alternativní krystalografické metody lze považovat očkovací techniky (*seeding*). Očkovací metody jsou používány zejména pro optimalizaci krystalizačních podmínek, které vedou k získání větších a kvalitnějších krystalů. Mezi očkovací techniky patří očkování s příbuzným krystalem (*cross-seeding*), dále vlasové očkování (*streak seeding*), nebo získávání krystalů různých velikostí (*microseeding a macroseeding*) (Kutá Smatanová, 1999). Přehled těchto metod je uveden v Tab. II.

Tab. II: Očkovací metody (*seeding*) (Podle podkladů Kutá Smatanová (1999) vytvořila Ivana Berková).

Typ očkování	Název metody	Charakteristika
Homogenní	„microseeding“	Přenos mikrokristalu z očkovacího roztoku do proteinového roztoku bez zárodku krystalů
	„macroseeding“	Omyté krystaly jsou přeneseny do předem ekvilibrovaného proteinového roztoku
Heterogenní	„cross-seeding“	Forma očkování, kdy očkované krystaly pocházejí z podobného proteinu
	„epitaxial nucleation“	Př.: nukleace proteinového krystalu na celulózním vlákne

2.5. Krystalizační testy

I když získáme krystal vhodný k difrakčnímu měření, ne vždy to musí znamenat, že daný krystal je protein. Někdy se může jednat také o anorganické krystaly (soli). Konečná povaha krystalu může být zjištěna několika testy, za nejspolehlivější se však považuje rentgenová strukturní analýza.

Krystal proteinu

Krystaly proteinů vykazují 3D uspořádání a vyznačující se pravidelnou strukturou. Se svou základní jednotkou tzv. elementární buňkou tvoří krystalové mřížky. Vyznačují se slabými ne vazebnými interakcemi, které mají za následek nízkou mechanickou odolnost a citlivost k vnějším změnám prostředí. Krystaly obsahují solventní kanály s obsahem rozpouštědla 20-80%. Přítomnost těchto kanálů umožňuje difúzi ligandů. Díky těmto vlastnostem, jimiž se proteiny vyznačují, lze aplikovat níže uvedené testy, které zjistí povahu krystalu (McPherson, 2004). Podle Kuté Smatanové (2003) existuje rostoucí polehlivost jednotlivých testů, která je vyobrazena na Obr. 11.

Dehydratace (*Dehydratio*)

Poměrně jednoduchá metoda, při níž je krystal vyjmut z roztoku a je ponechán na vzduchu. Pokud dochází k postupné degradaci, způsobené odpařováním rozpouštědla, jedná se o krystal proteinu. Tento jev je způsoben významným obsahem rozpouštědla ve struktuře krystalu proteinu. Anorganické soli solventní kanály postrádají (menší množství rozpouštědla) a tudíž nedochází k degradaci krystalu (Hampton Research, 2015).

Fyzická manipulace (*Crush test*)

Jedná se o invazivní metodu, která spočívá v rozbití krystalu. Další rozdíl mezi krystalem proteinu a krystalem soli je v jeho křehkosti, protože krystal proteinu je velmi křehký a i při slabém nárazu skleněnou kapilárou se rozpadá na menší fragmenty. Kdežto krystaly soli jsou mnohem odolnější a je zapotřebí vynaložit více síly k jejich rozbití. Tento jev je způsoben především přítomností slabých nevalebných interakcí a významným podílem rozpouštědla ve struktuře krystalu proteinu (Hampton Research, 2015; Chirgadze, 2001).

Barvicí test (*Dye binding test*)

K identifikaci proteinových krystalů se také používá barvicí test, jako barvivo se používá komerčně dostupný roztok „Izit“ (methylenová modř). Tato látka se přímo umísťuje do krystalizačního roztoku. Pokud se jedná o krystal proteinu, dochází k jeho obarvení, z důvodu přítomnosti solventních kanálů, kterými mohou malé molekuly barviva pronikat do proteinu. (Hampton Research, 2015).

SDS – PAGE elektroforéza (*SDS – PAGE electrophoretic*)

Metoda, která je schopna určit původ krystalu. Separační metoda založená na identifikaci makromolekul podle náboje a na jejich velikosti (Hampton Research, 2015).

Vzorek, který bude použit pro elektroforézu, musí být nejdříve sesbírán, opláchnut, rozpuštěn a umístěn v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS - PAGE) (Hampton Research, 2015).

Elektroforéza se provádí spolu se vzorkem vypořifikovaného proteinu použitého pro krystalizaci. Pokud se vytvoří proužek totožný s kontrolním proužkem, jedná se o krystal proteinu (Hampton Research, 2015).

Metody založené na fluorescenci (*Methods of fluorescence*)

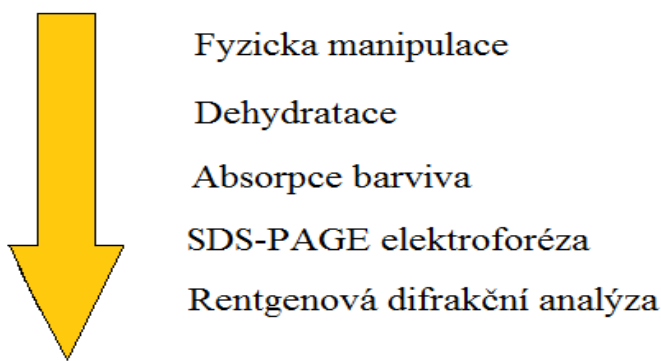
Existují tři základní přístupy použití fluorescence. První a nejjednodušší způsob je využití fluorescence aromatických aminokyselin a to zejména tryptofanu. Přístup založený na ultrafialové fluorescenci, sloužící k identifikaci a rozlišování proteinových krystalů. Krystaly proteinu po ozáření UV zářením jasně září. Druhým přístupem je jiskrová fluorescence, která využívá nekovalentní barvivo pro identifikaci proteinového krystalu. Třetím a posledním přístupem je fluorescence, využívající stopových hladin kovalentně vázaných barviv. Krystaly proteinů, které jsou označené těmito barvivy jasně září a je tedy velmi jednoduché je odlišit od neproteinových krystalů (Meyer a kol., 2015).

Rentgenová difrakční analýza (*X-ray diffraction*)

Definitivní test, který zjistí, zda zkoumaný krystal je krystalem proteinu nebo anorganické soli. K difrakční analýze se používá svazek monochromatického RTG záření, kterým je krystal ozařován. Dopadající rentgenové záření se rozptyluje na elektronech měřeného krystalu, elektrony se tak stávají zdrojem sekundárního záření, jejichž vlnová délka je shodná s vlnovou délkou rentgenového záření. Interference sekundárního záření, která v určitých směrech může být pozitivní (světlé skvrny) nebo negativní (tmavé skvrny), dává vzniku viditelného difrakčního obrazce (Waseda a kol., 2011).

Podle Ochi a kol. (2009), při využití této metody je velmi důležité vhodně vybrat krystal, neboť v mnoha případech je kvalita difrakčního obrazce závislá na kvalitě proteinového krystalu. Velké krystaly se občas vyznačují vysokým podílem vody a vykazují nižší rozlišení, a tudíž jsou nevhodné pro rentgenovou difrakční analýzu. Existuje tedy vztah mezi maximálním rozlišením a rozpouštědlem a to tedy, čím nižší je obsah rozpouštědla, tím vyšší je rozlišení.

Malkin a kol. (2004) uvádí, že kvalita a rozlišení difrakčního obrazce ovlivňují další proměnné, jako je kvalita a jiné nedokonalosti (nečistoty, mosaicita a další) krystalů proteinů.



Obr. 11: Rostoucí spolehlivost testů k rozlišení povahy krystalů (Podle podkladů Ivana Kutá Smatanová (2003), vypracovala Ivana Berková).

2.6. Makromolekulární databáze

Makromolekulární databáze RCSB PDB (The Protein Data Bank) byla založena před více než 45 lety, v roce 1971, a stala se jednou z nejpoužívanějších databází ve strukturní biologii (RCSB PDB, 2016).

Databáze obsahuje struktury biologických makromolekul, jejich krystalografické informace a rentgenová difrakční data (Henderson a kol., 2012; Berman a kol., 2014). Tato databáze obsahuje celosvětové informace o 3D strukturách biologických makromolekul (proteiny, proteinové komplexy, nukleové kyseliny a další). Pro všechny její uživatele je databáze dostupná zcela zdarma a její obsah je každý týden aktualizován. Dne 4. 12. 2016 obsahovala 124 726 struktur biologických makromolekul. Tyto struktury nebyly objasněny pouze RTG analýzou, ale na objasnění struktur se také podílely NMR (nukleární magnetická resonance), elektronová mikroskopie a další. V Tab. III je uvedeno, která metoda byla pro popis struktury použita. (RCSB PDB, 2016).

Podle Bermana a kol. (2014) databáze RCSB PDB způsobila rozvoj dalších databází zaměřených na malé molekuly a ligandy (ChEMBL, DrugBank, BindingDB a další), databáze které obsahují klasifikaci proteinových struktur (Cath, SCOP, PDBsum) a databáze speciálně zaměřené (PDBTM – transmembránové proteiny, ArchDB – funkční smyčky ve struktuře a další).

Tab. III: Přehled biologických makromolekul objasněných různými metodami ke dni 4.12.2016 (Podle podkladů RCSB PDB (2016) vytvořila Ivana Berková).

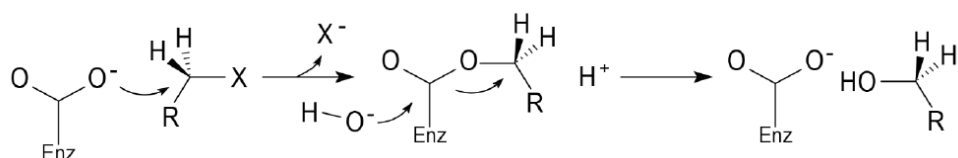
Metoda	Protein	Nuk. Kyselina	Proteinové komplexy	Ostatní	Celkově
RTG - analýza	104 358	1 786	5 356	4	111 504
NMR	10 215	1 184	237	8	11 644
El. mikroskopie	925	30	319	0	1 274
Hybridizace	96	3	2	1	102
Ostatní	179	4	6	13	202
Celkově	115 773	3 007	5 920	26	124 726

2.7. Halogenalkandehalogenasy

Halogenalkandehalogenasy (HLDs) byly objeveny u anaerobně žijící gramnegativní bakterie *Xanthobacter autothrophicus* kmene GJ10, která halogenové sloučeniny využívá jako jediný zdroj energie a uhlíku. Jedná se o bakterii, která se přirozeně vyskytuje ve znečištěné půdě a ve vodě. (Janssen, 1985; Janssen a kol., 1988; Janssen a kol., 1989).

Mnohé z těchto enzymů byly objeveny v půdních bakteriích (např.: *Xanthobacter autothrophicus*) (Janssen a kol., 1985, 1988 a 1989) nebo také u patogenních bakterií (*Mycobacterium tuberculosis* 5033/66 a *M. Bovi* N85), u nich v současné době není známá jejich funkce ani objasněn původ (Jesenská a kol., 2005). Některé enzymy byly experimentálně připraveny ze symbiotických bakterií (*Bradirizobium japonicum* USDA110, *Bradirizobium elkani* USDA94), produkujících dusík pro bobovité rostliny (Sato a kol., 2005). Jiné enzymy byly získány z rostlinných patogenních bakterií (*Agrobacterium tumefaciens* C58), způsobujících nádory v rostlinných pletivech (Hasan a kol., 2011). V neposlední řadě byly izolovány z eukaryotických organismů (*Strongylocentrotus purpuratus*), kde je jejich funkce stále nejasná (Fortová a kol., 2013; Novák a kol., 2014).

HLDs jsou řazeny mezi mikrobiální enzymy, schopné hydrolyticky štěpit vazbu uhlík-halogen. V této reakci, uvedené na Obr. 12, vzniká příslušný primární alkohol (ROH), halogenidový aniont (X^-) a proton (H^+). (Janssen, 2004).



Obr. 12: Obecné schéma reakčního mechanismu halogenalkandehalogenáz (Převzato z Janssen, 2004).

Dehalogenační reakce se skládá ze dvou následujících kroků: 1. bimolekulární, nukleofilní substituce (S_N2) při níž vzniká alky-enzym esterový intermediát, 2. jeho následná hydrolyza, která je aktivována molekulou vody za vzniku protonu, alkoholu a halogenidového aniontu. (Převzato z Damborský a kol., 2010).

Bylo zjištěno, že HLDs jsou jedinými enzymy, které jsou schopné přímé hydrolytické dehalogenace chlorovaných a bromovaných uhlovodíků, bez přítomnosti koenzymu a kyslíku (Janssen a kol., 1989).

Některé HLDs sloučeniny, zejména s obsahem bromu nebo chloru, jsou syntetizovány mořskými organismy (mořské řasy, bakterie, houby, pláštěnci a další) nebo mohou vznikat pomocí abiotických procesů, jako jsou lesní požáry, sopky a geotermální procesy (Gribble, 2003). Nicméně většina těchto sloučenin a jejich derivátů vzniká jako produkt chemického průmyslu (Cospley, 1998).

2.7.1. Charakteristika halogenalkandehalogenas

HLDs se strukturně řadí do superrodiny α/β hydrolas (Chovancová a kol., 2007; Gehret a kol., 2012). Podle Newman a kol., (1999) se halogenalkandehalogenasy dělí na základě typu bakterie, ze které byly izolovány. Tyto bakterie jsou *Xantobacter* a *Rhodococcus*. Podle fylogenetických analýz bylo zjištěno, že rodina HLDs je rozdělena na několik podskupin. Tyto podskupiny HLD-I, HLD-II a HLD-III jsou založené na sekvenční podobnosti, na složení katalytické pentády a strukturním složením víčkové (cap) domény. Rozdělení HLDs je uvedené v Tab. IV. Za sesterské podskupiny jsou považovány HLD-I a HLD-III z důvodu složení katalytické triády, která je tvořena dvěma zbytky kyseliny asparagové (nukleofil a kyselina) a histidinem (báze) (Chovancová, 2007).

Tab. IV: Rozdělení HLDs a jejich zastoupení v mikroorganismech (Převzato z Chovanová a kol., (2007); Hesseler a kol., (2011); Drienovská a kol., (2012); Gehret a kol., (2012); Fortová a kol., (2013); Chaloupková a kol., (2014).

Podskupina	Protein	Organismus
HLD-I	DhlA	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>
	DhmA	<i>Mycobacterium avium</i>
	DmbB	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	DppA	<i>Plesiocystis pacifica</i>
	DpcA	<i>Psychrobacter cryohalolentis</i>
HLD-II	LinB	<i>Sphingobium japonicum</i>
	DmbA	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
	DmsA	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
	DhaA	<i>Rhodococcus sp.</i>
	DbjA	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>
	DmlA	<i>Mesorhizobium loti</i>
	DatA	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
	DspA	<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>
	DbeA	<i>Bradyrhizobium elkanii</i>
	Dmma	<i>Moorea producta</i>
HLD-III	DrbA	<i>Rhodopirellula baltica</i>
	DmbC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>

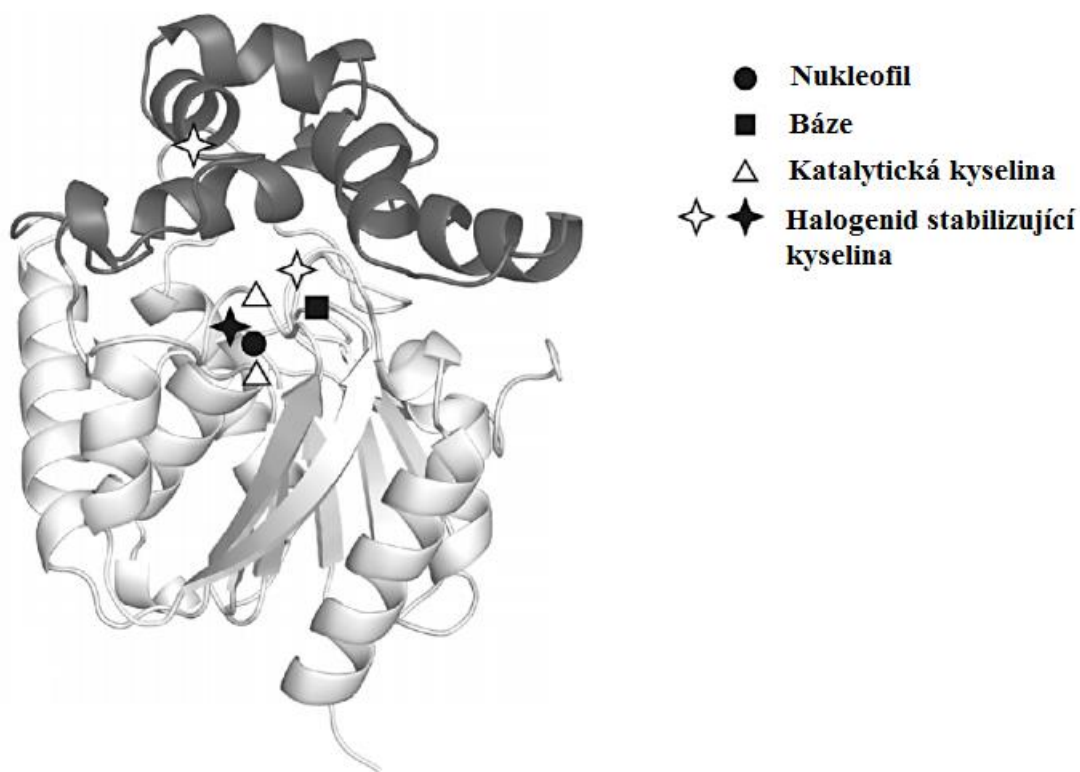
2.7.2. Struktura

První krystalová struktura HLDs byla vyřešena v roce 1988 u enzymu Dh1A. Dh1A je enzym, který je produkován anaerobní gramnegativní bakterií *Xantobacter autothrophicus* kmene GJ10 (Rozemboom a kol., 1988).

Strukturně jsou halogenalkandehalogenasy složeny ze dvou domén, z domény hlavní a na ní dosedající víčkové (tzv. „cap doména“). Mezi těmito doménami, v hydrofóbní dutině, se nachází aktivní místo (Obr. 13). Hlavní doména je složena z β -skládaných listů a to sedmi paralelních a jednoho antiparalelního. Ty jsou lemovány a po stranách spojeny šesti α -šroubovicemi. Hlavní doména je velmi konzervována, kdežto víčková doména je flexibilní a převážně tvořená α -šroubovicemi (4-5 α -šroubovic spojených smyčkami) (Damborský a kol., 2010; Otyepka a kol., 2002). Podle Verschuerena a kol. (1993) víčková doména dosedá C-koncem na β 6 list hlavní domény. Pomocí vlastností, jimiž se víčková doména vyznačuje, je možné definovat substrátovou specifitu HLDs (Damborský a kol., 2010). Víčková doména je také více náchylná k mutacím (Chovancová a kol., 2007).

Substrátovou specifitu určuje, jak je hydrofóbní dutina spojena s okolím. S vnějším okolím jí spojují tzv. tunely. Tunely mají různé tvary, velikosti, dynamiku a fyzikálně-chemické vlastnosti, které ovlivňují to, jaké substráty se mohou do aktivního místa navázat, a také ovlivňují odchod produktů, které se během dehalogenační reakce vytvoří (Damborský a kol., 2010).

Důležitým prvkem, podle kterého se dělí HLDs, je vlastnost aktivního místa. Aktivní místo se skládá z pěti aminokyselin podílejících se na katalytické reakci, tzv. katalytická pentáda. Pentáda je složena z nukleofilu, katalytické báze a katalytické kyseliny (tzv. katalytická triáda) a dále dvou halogenid - stabilizujících aminokyselin (tryptofan-tryptofan u HLD-I, asparagin-tryptofan u HLD-II a HLD-III). Katalytická pentáda je klíčové místo pro hydrolýzu HLDs (Damborský a kol., 2010). Na základě těchto vlastností, jimiž se halogenalkandehalogenasy vyznačují, jsou podle Chovancové a kol. (2007) děleny do tří podrodin, které jsou uvedeny výše v textu.

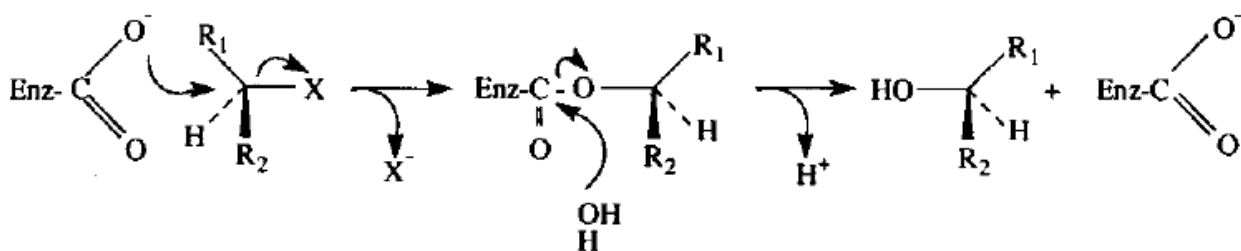


Obr. 13: Terciální struktura halogenalkandehalogenas složená z hlavní (bílé) a víčkové domény (černá). Plné symboly znázorňují konzervované aminokyseliny katalytické pentády – nukleofil, bázi a první halogenid stabilizující aminokyselinu. Prázdné symboly označují katalytickou kyselinu a druhou halogenid stabilizující aminokyselinu, které jsou variabilní mezi jednotlivými zástupci HLDs. (Převzato z Damborský a kol., 2010).

2.7.3. Reakční mechanismus

Prvně popsáný reakční mechanismus halogenalkandehalogenas byl u struktury halogenalkandehalogenasy izolované z *Xantobacter autotrophicus* kmene GJ10 (Verschueren a kol., 1993).

Podle Verschuerena a kol. (1993) a Janssen a kol. (1988) existují dva možné reakční mechanismy pro hydrolytickou dehalogenaci. Prvním mechanismem je bimolekulární nukleofilní substituce (S_N2), schéma reakčního mechanismu je uvedeno na Obr. 14. Druhým a méně známým mechanismem je bazická katalýza s molekulou vody, schéma reakčního mechanismu je uvedeno na Obr. 15. Záleží na tvaru aktivního místa, který reakční mechanismus u HLDs proběhne.



Obr. 14: Nukleofilní substitute (Převzato z Janssen a kol., (1988); Verschueren a kol. 1993).

První krok této reakce spočívá v nukleofilním ataku kyslíku karbonylové skupiny Asp124 na uhlík substrátu vázající halogen (sp^3 hybridizovaný uhlík). V druhém kroku vzniká kovalentní tetramerní alkyl-enzymový intermediát s enzymem esterovou vazbou. V dalším kroku probíhá hydrolyza tohoto intermediátu. Konečným produktem je příslušný primární alkohol, iont halogenu a iont vodíku (Verscheueren a kol., 1993, Novák a kol., 2014).



Obr. 15: Bazická katalýza (Převzato z Janssen a kol., (1988); Verschueren a kol. 1993).

Celkový mechanismus reakce je u všech HLDs podobný. Hlavní rozdíl mezi jednotlivými HLDs v reakčním mechanismu spočívá v rozdílu rychlostí v katalytickém cyklu, tedy záleží na katalytické aktivitě. Katalytická aktivita u HLDs závisí na složení katalytických zbytků, geometrii aktivního místa, geometrii a počtu přístupových tunelů spojující aktivní místo s vnějším okolím (Damborský a kol., 2010).

2.7.4. Použití HLDs

Existuje řada halogenovaných látek, které jsou nebezpečné pro životní prostředí z hlediska jejich perzistence, bioakumulace a jedovatosti (PCB, TCE, PCE a další), s nimiž se musí mikroorganismy potýkat. Několik HLDs, které jsou těmito mikroorganismy produkovány, se podílejí na biodegradaci těchto nebezpečných látek (Sato a kol., 2005; Furakawa, 2006).

Pro zvýšení aktivity HLDs v biodegradaci nebezpečných halogenových látek, byla zavedena řada genetických nástrojů, která je schopna z HLDs vytvořit mutanty (Sato a kol., 2005 a

Furakawa, 2006). Biodegradace nebezpečných látek spočívá v jejich reakčním mechanismu. HLDs jsou schopné nahradit toxický atom halogenu za atom vodíku nebo hydroxylové skupiny (Janssen a kol., 1994). Z hlediska těchto vlastností byly navrženy HLDs jako biokatalizátory (Hasan a kol., 2011) nebo se používají pro detekci halogenových sloučenin (Bidmanová a kol., 2010).

Jedna z nejdůležitějších vlastností, jimiž se halogenalkandehalogenasy vyznačují, je široká substrátová specifita, která umožňuje degradaci více než stovky chlorovaných, bromovaných nebo alifatických substrátů, zahrnujících halogenované alkany, cykloalkany, alkeny, ethery, estery, acetamidy, nitrily, alkoholy nebo halogenhydriny (Damborský a kol., 2001; Koudeláková a kol., 2011). Z hlediska těchto vlastností se HLDs využívají při bioremediaci toxických polutantů, které se používají v průmyslu jako organická rozpouštědla či pesticidy a touto cestou se dostaly do životního prostředí, kde perzistují. Významné polutanty řadící se do této skupiny jsou např.: 1,2 - dichlorethan, 1 - chlorhexan nebo hexachlorcyklohexan (Koudeláková a kol., 2012). Některé enzymy z HLDs jako DhaA, DmbA a LinB našly své uplatnění ve vojenském průmyslu při degradaci, kde jsou schopny degradovat bojové otravné látky, např.: bis(2-chlorethyl)sulfid a jeho dusíkaté analogy (Prokop a kol., 2006).

2.8. *Glaciecola agarilitica* NO₂

2.8.1. *Glaciecola*

V době psaní článku „Phylogenetic analyses of the genus *Glaciecola*“ (Shivaji a kol., 2014) rod *Glaciecola* obsahoval 10 druhů. Podle fylogenetických analýz se rod *Glaciecola*, obsahující sekvenci genu 16S rRNA, dělí na dvě skupiny. Obě skupiny vznikly ze společného předka (Shivaji a kol., 2014).

První skupina (*Paraglaciecola*) obsahuje druhy *G. agarilytica* (Yoong a kol., 2007), *G. aquimarina* (Park a kol., 2013), *G. artica* (Zhang a kol., 2011), *G. chathamensis* (Matsuyama a kol., 2006), *G. mesophila* (Romanenko a kol., 2003), *G. polaris* (Van Trappen a kol., 2004) a *G. psychrophila* (Zhang a kol., 2006). Druhá skupina (*Glaciecola*) obsahuje druhy *G. nitratireducens* (Baik a kol., 2006), *G. pallidula* a *G. punicea* (Bowman a kol., 1998).

Rod *Glaciecola* byl prvně popsán Bowmanem a kol. (1998). Buňky tohoto rodu jsou gram-negativní, pohyblivé a mají tyčinkovitý, zakřivený nebo spirálovitý tvar. Rod je anaerobní,

psychrofilní, mírně halofilní a pro svůj růst buňky vyžadují mořskou vodu. Z tohoto důvodu byly všechny druhy izolovány z mořského prostředí, Tab. V uvádí přehled vzorků izolovaných z rodu *Glaciecola*. (Shivaji a kol., 2014).

Většina druhů z rodu *Glaciecola* byla izolována z chladného prostředí. Nízké teploty, které zde panovaly, vyžadovaly přizpůsobení těchto bakterií, proto se u tohoto bakteriálního rodu vyvinula strategie chladové adaptace. Strategie chladové adaptace vysvětluje, proč je schopen rod *Glaciecola* přežít nízké teploty. Pro přežití v těchto podmínkách je velice důležité si zachovat fluiditu buněčné membrány a řešením se stala syntéza vícenasycených kyselin. Dále bylo zjištěno, že nízká teplota může ovlivňovat skládání proteinů, které může být pro bakterie letální, z tohoto důvodu bakterie obsahují tzv. „cold-shock“ proteiny, které fungují jako chaperony a brání špatnému sbalení proteinů (Qin a kol., 2013; Methé a kol., 2005).

Dalším problémem byl způsob, jak zabránit svému zmražení. Bakterie tento problém vyřešily syntézou extracelulárních polysacharidů (Nichols a kol., 2005).

Tab. V: Přehled vzorků izolovaných z rodu *Glaciecola* (Bowman a kol. (1998); Romanenko a kol., (2003); Van Trappen a kol., (2004); Zhang a kol., (2006); Matsuyama a kol., (2006); Baik a kol., (2006); Yoong a kol., (2007); Zhang a kol., (2011); Park a kol., (2013) a Shivaji a kol., (2014).

Druh bakterie	Vzorek izolátu
<i>G.aguimarina</i>	Izolována z mořské vody
<i>G.artica</i>	Izolována z mořského sedimentu
<i>G.chathamensis</i>	Izolována z mořského sedimentu
<i>G.psychrophila</i>	Izolována z mořského ledu
<i>G.mesophila</i>	Izolována z mořských bezobratlých
<i>G.polaris</i>	Izolována z mořské vody
<i>G.nitratireducens</i>	Izolována z povrchu mořské vody
<i>G.pallidula</i>	Izolována z mořského ledu
<i>G.punicena</i>	Izolována z mořského ledu
<i>G.agarilitica</i>	Izolována z mořského sedimentu

2.8.2. *Glaciecola agarilitica* NO2

Glaciecola agarilitica NO2 podle taxonomické studie byla izolována z mořského sedimentu, východního moře v Korei. Srovnávací studie 16S rRNA sekvence genů ukázaly, že tento kmen náleží k *Grammaproteobacteria* (Yoong a kol., 2007).

Studovaná *Glaciecola agarilitica* je mírně halofilní a aerobní bakterie. Buňky této bakterie jsou mírně zakřiveny a mají polární bičík. Kolonie jsou bílé, kulaté a konvexní s pravidelnými okraji o průměru 2-3 mm. Pěstování této bakterie bylo úspěšné v 2-8% roztoku NaCl a bylo zjištěno, že pro růst potřebují Na⁺ (Yoong a kol., 2007).

Halogenalkandehalogenasa DgaA

Enzym DgaA je izolovaný z gram-negativního bakteriálního rodu *Glacieocola* NO2, jak vyplývá z výše uvedeného textu.

Informace o proteinu DgaA, které jsou v současné době známy, zahrnují pouze aminokyselinovou a genetickou sekvenci, molekulovou hmotnost, počet aminokyselin, teoretický izoelektrický bod a organismus, ze kterého byl tento protein získán. Veškeré tyto informace jsou uvedené v Přílohách.

III. Materiál a metody

Cílem bakalářské práce bylo nalézt vhodné krystalizační podmínky pro nově objevený protein DgaA, náležející do skupiny halogenalkandehalogenas, a pomocí těchto podmínek jej vykryštalizovat.

Práce dále zahrnuje krystalizaci modelového proteinu lysozymu, u kterého jsou krystalizační podmínky dobře známé. Lysozym byl vybrán za účelem seznámení a zvládnutí základních a pokročilých krystalizačních metod, které byly později aplikovány na protein DgaA. Ze základních metod byla vyzkoušena metoda sedící a visící kapky a mikrokrystalizace pod olejem. Z pokročilých metod byla vybrána metoda volné difúze v kapilárách. Následujícím krokem bylo hledání vhodných krystalizačních podmínek pro protein DgaA z *Glaciecola agarilitica* NO2, k tomuto účelu byla vybrána metoda sedící kapky. Posléze krystaly proteinu DgaA byly podrobeny testům na proteinový původ. Veškeré výsledky byly zaznamenány a vyfografovány, aby došlo k vyhodnocení.

3.1. Krystalizace lysozymu

Příprava krystalizačních roztoků

Pro krystalizaci lysozymu bylo nejprve připraveno příslušné srážecí činidlo a to 10% roztok chloridu sodného. Tato látka byla rozpuštěna v 0,1 M roztoku octanu sodného o pH 4,7. Ze vzniklého srážecího činidla byla připravena sada roztoků (3%, 4%, 5%, 6%, 7% a 8%) přidáním vhodného množství destilované vody. Jako další srážecí činidla byla zvolena, komerčně dostupné, 20% PEG 3350 a 14,4% PEG 8000.

Naředění lysozymu

Původní koncentrace lysozymu činila 100 mg/ml. Tato koncentrace byla naředěna octanovým puforem o pH 4,7 na hodnoty: 75 mg/ml, 50 mg/ml a 25 mg/ml. Z těchto připravených hodnot bylo důležité zjistit, která by vytvářela nejvhodnější krystaly modelového proteinu.

Vlastní krystalizace

Při krystalizaci lysozymu byla použita metoda sedící a visící kapky, mikrokrystalizace pod olejem a metoda volné difúze v kapiláře. Pro experiment byly použity připravené krystalizační roztoky, naředěný lysozym, krystalizační destičky a automatické mikropipety. Veškeré pokusy byly prováděny při teplotě 20°C.

Metoda sedící kapky

Krystalizační destička pro metodu sedící kapky obsahuje 24 jamek s rezervoárem. Touto metodou byly provedeny dva experimenty a v obou případech byly rezervoáry naplněny 200 μ l srážecího činidla a do jednotlivých jamek byly pipetovány kapky 2 μ l roztoku proteinu a 2 μ l roztoku z rezervoáru. Pro první experiment byly testovány čtyři různé koncentrace roztoku lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml a 100 mg/ml) a šest koncentrací srážecího činidla chloridu sodného (3%, 4%, 5%, 6%, 7% a 8%). Pro druhý experiment byl použit lysozym o koncentraci 50 mg/ml a tři různá srážecí činidla (10% NaCl, 20% PEG 3350 a 14,4% PEG 8000). V Tab. VI pro první pokus a v Tab. VII pro druhý pokus je uvedeno, jak byly roztoky proteinu a krystalizačních činidel připraveny do krystalizačních destiček. Takto připravená destička se zalepila lepicí páskou a zakryla víkem, aby nedošlo k přístupu vzduchu.

Tab. VI: První pokus metody sedící kapky pro lysozym.

	Krystalizační roztok NaCl					
Lysozym	3%	4%	5%	6%	7%	8%
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl

Tab. VII: Druhý pokus metody sedící kapky pro lysozym.

	Krystalizační roztok		
Lysozym	10% NaCl	20% PEG 3350	14,4% PEG 8000
50 mg/ml	2 µl lysozym + 2 µl NaCl	2 µl lysozym + 2 µl NaCl	2 µl lysozym + 2 µl NaCl

Metoda visící kapky

Krystalizace metodou visící kapky patří mezi nejvíce využívané metody. Destička obsahuje 24 rezervoárů a stejný počet krycích sklíček, které slouží k napipetování kapky proteinu a jsou umístěna na rezervoár se srážecím činidlem pomocí silikonového tuku, sloužící k přilepení sklíčka s kapkou proteinu. Pomocí této metody byl rezervoár naplněn 200 µl krystalizačního činidla a každá kapka obsahovala 2 µl lysozymu a 2 µl činidla z rezervoáru. Při testování byla použita tři různá srážecí činidla (10% NaCl, 20% PEG 3300, 14,4% PEG 8000) a lysozym o koncentraci 50 mg/ml. V Tab. VIII je zaznamenáno, jak byly roztoky proteinu a srážecích činidel naneseny do krystalizačních destiček.

Tab. VIII: Pokus metodou visící kapky pro lysozym.

Krystalizační roztok	Lysozym 50 mg/ml
10% NaCl	2 µl lysozym + 2 µl NaCl
20% PEG 3350	2 µl lysozym + 2 µl PEG
14,4% PEG 8000	2 µl lysozym + 2 µl PEG

Mikrokrystalizace pod olejem

Krystalizace pomocí této metody využívá Teresakiho destiček obsahující 72 jamek. Dříve než je nanesena kapka proteinu a kapka srážecího činidla, je destička zalita parafínovým nebo silikonovým olejem, nebo směsí těchto dvou olejů. V našem případě byl využit silikonový olej, čtyři různé koncentrace lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml a 100 mg/ml) a jako

krystalizační činidlo byl použit roztok chloridu sodného (3% a 8%). Poté bylo pomocí automatické pipety napipetovány kapky s obsahem 2 μl lysozymu a 2 μl činidla. V Tab. IX je zaznamenáno, jak byly roztoky proteinu a krystalizačních činidel napipetovány

Tab. IX: Pokus mikrokrytalizace pod olejem pro lysozym.

Lysozym	Krystalizační roztok	
	3% NaCl	8% NaCl
25 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
50 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
75 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
100 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl

Volná difúze v kapilárách

Pokročilá metoda využívající skleněné kapiláry, v našem případě kapiláry o průměrech: 0,2 mm, 0,5 mm, 1,0 mm, kdy každá z kapilár má jeden konec užší a druhý konec postupně se rozšiřující. Úzký konec byl naplněn proteinem lysozymu o koncentraci 75mg/ml pomocí samovolného vztlínání a poté zatavena voskem. Širší část byla naplněna 30 μl krystalizačního činidla (4% NaCl) a druhý konec byl také utěsněn voskem. V Tab. X je znázorněno zaplnění kapilár.

Tab. X: Metoda volné difúze v kapilárách pro lysozym.

Průměr kapiláry [mm]		
0,2	0,5	1,0
30 μl 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml	30 μl 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml	30 μl 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml

3.2. Krystalizace DgaA

Vzorek proteinu DgaA

Vzorek proteinu DgaA byl připraven v Bio Basic Inc. (Markham, Ontario, Canada).

Syntéza genu a manipulace DNA

Gen kódující sekvenci DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 byl optimalizován pro expresi v *Escherichia coli* a komerčně syntetizován v Bio Basic Inc. (Kanada). Rekombinantní gen byl subklonován do expresního vektoru pET21b (Novagen, USA) pomocí restričních míst NdeI / XhoI. Kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5a byly transformovány za použití metod tepelného šoku pro šíření plasmidu.

Nadměrná exprese v E. coli BL21 (DE3)

K expresi byl použit, bakteriální kmen pro expresi proteinu s T7 RNA polymerázou na bázi expresních systémů, *E. coli* BL21 (DE3). *E. coli* BL21 (DE3) kompetentní buňky byly transformovány s pET21b: DgaA metodou tepelného šoku (42°C po dobu 2 minut), naneseny na agarové plotny s ampicilinem (100 µg/ml) a kultivovány přes noc při 37°C. Jednotlivé kolonie byly použity k naočkování 10 ml LB (Luria-Bertani media) (Sigma-Aldrich, USA) s ampicilinem (100 µg/ml), a buňky byly kultivovány přes noc při 37°C. Noční kultura byla použita k inokulaci 1000 ml média LB s ampicilinem (100 µg/ml). Buňky byly kultivovány při 37°C za třepání (110 rpm). Nadměrná exprese byla indukována izopropyl-p-D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) (Sigma-Aldrich, USA) na konečnou koncentraci 0,5 mM. Buňky pak byly kultivovány 24 hodin při 20°C za stálého míchání (105 otáček za minutu). Biomasa se sklídila odstředěním 3700 g při teplotě 4°C po dobu 10 minut a na konci kultivace byla promyta čistícím pufrům A (20 mM draselný hydrogenfosforečnan a dihydrogenfosforečnan draselný, pH 7,5, 0,5 M NaCl, 10 mM imidazolu) a resuspendovány v 10 ml pufru A na 1 g vlhké biomasy. Sklizená biomasa byla zmrazena při 80°C. DNáza I (New England Biolabs, USA) byla přidána do konečné koncentrace 1,25 µg/ml buněčné suspenze pro odstranění DNA ze vzorku. Buňky v suspenzi byly narušeny pomocí buněčného homogenizátoru (Constant System Ltd., Velká Británie) za použití 1,5 kbar tlaku s 1 cyklem. Buněčný lyzát byl centrifugován po dobu 1 hodiny 21.000 g při 4°C. Surový extrakt se dekantoval a celková koncentrace proteinu byla stanovena metodou podle Bradforda (Sigma-Aldrich, USA). Procentuální obsah jednotlivých proteinů byl zjištěn kalibrovaným denzitometrem GS-800 (Bio-Rad, USA).

Čištění proteinů

Histidinem značený protein DgaA byl vyčištěn ze surového extraktu za použití jediného kroku, niklové afinitní chromatografie. Bez buněk byl extrakt nanesen s 5 ml kyselinou Ni-nitrilotriacetovou (Ni-NTA) na sloupec Superflow nabitý Ni²⁺ ionty (Qiagen, Německo) do rovnováhy s pufrům (20 mM pufru fosforečnanu draselného, pH 7,5 obsahující 10 mM imidazolu, a 0,5 M chloridu sodného). Nestmelené a slabě navázané proteiny byly vymyty pufrům obsahujícím 10 mM imidazolu. Cílový protein byl eluován pufrům obsahujícím 300 mM imidazolu. Eluovaný protein byl dialyzován přes noc proti 50 mM fosfátového pufru s pH 7,5 při 4°C. Přítomnost DgaA ve frakci píku byla prokázána pomocí SDS-PAGE na 15% polyakrylamidový gelu obarveným barvivem Coomassie Brilliant Blue R-250 (Fluka, Švýcarsko). Molekulová hmotnost byla ověřena pomocí unstained Protein marker (Genetika, Česká republika). Koncentrace celkového proteinu byla stanovena metodou Bradford (Sigma-Aldrich, USA) a čisté proteiny byly skladovány při teplotě 4°C).

Gelová SDS-PAGE elektroforéza

Před samotnými krystalizačními experimenty je nutno zjistit čistotu daného proteinu. Tato čistota je zjištěna pomocí gelové SDS - PAGE elektroforézy. Jedná se o biochemickou separační techniku sloužící k rozdělení proteinů. Princip této metody je založen na různé pohyblivosti proteinů v elektrickém poli (na základě elektroforetické pohyblivosti v gelu). Jejich pohyblivost je závislá na délce polypeptidového řetězce, molekulové hmotnosti a v neposlední řadě na denuraci proteinu. Metoda využívající polyakrylamidového gelu a dodecylsírany sodného (SDS). Technika, která slouží k charakterizaci proteinů, ke zjištění jejich molekulové hmotnosti a určení jejich čistoty.

Příprava spodního gelu (Runin Gel Solution):

Do předem připravené aparatury mezi dvě sklíčka byl nanesen, pomocí automatické pipety, 10% roztok spodního separačního gelu. Příprava separačního gelu spočívala ve smíchání těchto složek:

- **4 ml H₂O**
- **3,3 ml 30 % akrylamidu (směs akrylamidu a N, N'-methylen-bis-akrylamidu)**
- **2,5 ml 1,5 M Tris o pH 8,8**
- **0,1 ml 10% SDS**

- **0,1 ml 10% APS**
- **0,004 ml TEMED**

Dalším krokem bylo převrstvení gelu ethanolem, z důvodu vyrovnání hladiny gelu. Takto připravený gel se nechal 30 minut odstát, aby došlo k jeho ztuhnutí a poté byl nanesen zaostřovací gel.

Příprava svrchního gelu (Stacking Gel Solution):

Příprava svrchního gelu byla obdobná, jako výše popsany spodní gel. Spodní gel byl smíchán ze složek:

- **1,4 ml H₂O**
- **0,33 ml 30% akrylamidu (Směs akrylamidu a N, N'-methylen-bis-akrylamidu)**
- **0,25 ml 1,0 M Tris o pH 6,8**
- **0,02 ml 10% SDS**
- **0,02 ml 10% APS**
- **0,002 ml Temed**

Po smíchání těchto látek, byl do gelu vložen plastový hřeben pro vytvoření jamek k nanesení vzorků. Po té se nechala souprava 60 minut odstát, aby došlo ke ztuhnutí spodního gelu a poté se vyjmul hřeben a elektroforetická komora byla naplněna elektrodoým pufrem.

Příprava elektrodoého pufru (Running Buffer):

Elektrodoý pufr byl připraven z těchto složek:

- **1000 ml H₂O**
- **15,1 g Tris**
- **72 g glycinu**
- **5 g SDS**

Příprava proteinu DgaA:

Vzorek proteinu DgaA byl po smíchání v poměru 1:1 a 5:1 se vzorkovým pufrem zahříván po dobu 15 minut při 65°C

Příprava vzorkového pufru (Sample Buffer):

Vzorkový pufr byl vytvořen z těchto složek:

- **24 ml 0,5 M Tris o pH 6,8**
- **16 ml glycerolu**
- **2 g 10% SDS**
- **10 mg 0,1% bromfenolové modři**
- **10 ml β -merkaptoethanolu**

Nanesení vzorku

Vzorek proteinu DgaA byl napipetován do první a druhé jamky v poměru 5:1 a 1:1. Do třetí jamky byl napipetován marker Unstained Protein Molecular Weight Marker [Thermo Fisher Scientific, Inc., Praha], který posloužil k určení molekulové hmotnosti proteinu DgaA. Následně byl do sestavy přiveden stejnosměrný elektrický proud o napětí 250 V.

Elektroforéza byla spuštěna 30 minut a poté ukončena. Gel byl vyjmut a uložen do nádoby s roztokem barviva Coomassie Blue (0,5 g Coomassie Blue G – 250, 200 ml kyseliny octové, 1800 ml destilované vody). Aby došlo k obarvení gelu, byl oplachován odbarvovacím roztokem (*Destaining Solution*) (5000 ml H₂O, 250 ethanolu, 350 ml kyseliny octové) a poté několik hodin byl v tomto roztoku ponechán. Posledním krokem byla fotodokumentace gelu.

Krystalizační činidla

Pro krystalizaci proteinu DgaA byla použita sada komerčně dostupných krystalizačních činidel Index HR2-144 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA). Složení všech použitých činidel je uvedeno v Přílohách.

Naředění proteinu DgaA

Původní koncentrace vzorku proteinu DgaA byla 13,6 mg/ml. Protein byl zředěn až během pokusů, neboť se objevila při této koncentraci precipitace. Roztok byl zředěn na 5 mg/ml pomocí roztoku 0,5 M TRISu SO₄ o pH 7,5.

Vlastní krystalizace

Ke krystalizaci proteinu DgaA byla využita metoda sedící kapky. Krystalizační pokusy probíhaly při laboratorní teplotě (20°C).

Metoda sedící kapky

Krystalizace proteinu DgaA metodou sedící kapky byla provedena ve 4 krystalizačních destičkách „Linbro plates“ (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) (XI – XIV), každá z těchto destiček obsahovala 24 jamek. Během krystalizace byl použit protein DgaA o koncentraci 5 mg/ml. Byla použita komerčně dostupné krystalizační činidla ze sady Index HR2-144 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) – celkem 94 činidel. Rezervoáry destiček byly naplněny 300 μ l jednotlivých krystalizačních činidel a kapky obsahovaly 1 μ l proteinu DgaA a 1 μ l činidla z rezervoáru. Poměr v jednotlivých kapkách byl 1:1. V následujících tabulkách (Tab. XI – XIV) je uvedeno schématické znázornění krystalizačních destiček 1 – 4. Krystalizační činidla jsou číselně uvedena a jejich složení je v Přílohách.

Tab. XI: Schéma krystalizační destičky 1, metoda sedící kapky pro DgaA.

		Krystalizační činidlo č.:					
DgaA 5 mg/ml	1	2	3	4	5	6	
	1 µl DgaA + 1 µl 1	1 µl DgaA + 1 µl 2	1 µl DgaA + 1 µl 3	1 µl DgaA + 1 µl 4	1 µl DgaA + 1 µl 5	1 µl DgaA + 1 µl 6	
	7	8	9	10	11	12	
	1 µl DgaA + 1 µl 7	1 µl DgaA + 1 µl 8	1 µl DgaA + 1 µl 9	1 µl DgaA + 1 µl 10	1 µl DgaA + 1 µl 11	1 µl DgaA + 1 µl 12	
	13	14	15	16	17	18	
	1 µl DgaA + 1 µl 13	1 µl DgaA + 1 µl 14	1 µl DgaA + 1 µl 15	1 µl DgaA + 1 µl 16	1 µl DgaA + 1 µl 17	1 µl DgaA + 1 µl 18	
	19	20	21	22	23	24	
	1 µl DgaA + 1 µl 19	1 µl DgaA + 1 µl 20	1 µl DgaA + 1 µl 21	1 µl DgaA + 1 µl 22	1 µl DgaA + 1 µl 23	1 µl DgaA + 1 µl 24	

Tab. XII: Schéma krystalizační destičky 2, metoda sedící kapky pro DgaA.

		Krystalizační činidlo č.:					
DgaA 5 mg/ml	25	26	27	28	29	30	
	1 µl DgaA + 1 µl 25	1 µl DgaA + 1 µl 26	1 µl DgaA + 1 µl 27	1 µl DgaA + 1 µl 28	1 µl DgaA + 1 µl 29	1 µl DgaA + 1 µl 30	
	31	32	33	34	35	36	
	1 µl DgaA + 1 µl 31	1 µl DgaA + 1 µl 32	1 µl DgaA + 1 µl 33	1 µl DgaA + 1 µl 34	1 µl DgaA + 1 µl 35	1 µl DgaA + 1 µl 36	
	37	38	39	40	41	42	
	1 µl DgaA + 1 µl 37	1 µl DgaA + 1 µl 38	1 µl DgaA + 1 µl 39	1 µl DgaA + 1 µl 40	1 µl DgaA + 1 µl 41	1 µl DgaA + 1 µl 42	
	43	44	45	46	47	48	
	1 µl DgaA + 1 µl 43	1 µl DgaA + 1 µl 44	1 µl DgaA + 1 µl 45	1 µl DgaA + 1 µl 46	1 µl DgaA + 1 µl 47	1 µl DgaA + 1 µl 48	

Tab. XIII: Schéma krystalizační destičky 3, metoda sedící kapky pro DgaA.

		Krystalizační činidlo č:					
DgaA 5 mg/ml	49	50	51	52	53	54	
	1 µl DgaA + 1 µl 49	1 µl DgaA + 1 µl 50	1 µl DgaA + 1 µl 51	1 µl DgaA + 1 µl 52	1 µl DgaA + 1 µl 53	1 µl DgaA + 1 µl 54	
	55	56	57	58	59	60	
	1 µl DgaA + 1 µl 55	1 µl DgaA + 1 µl 56	1 µl DgaA + 1 µl 57	1 µl DgaA + 1 µl 58	1 µl DgaA + 1 µl 59	1 µl DgaA + 1 µl 60	
	61	62	63	64	65	66	
	1 µl DgaA + 1 µl 61	1 µl DgaA + 1 µl 62	1 µl DgaA + 1 µl 63	1 µl DgaA + 1 µl 64	1 µl DgaA + 1 µl 65	1 µl DgaA + 1 µl 66	
	67	68	69	70	71	72	
	1 µl DgaA + 1 µl 67	1 µl DgaA + 1 µl 68	1 µl DgaA + 1 µl 69	1 µl DgaA + 1 µl 70	1 µl DgaA + 1 µl 71	1 µl DgaA + 1 µl 72	

Tab. XIV: Schéma krystalizační destičky 4, metoda sedící kapky pro DgaA.

		Krystalizační činidlo č.:					
DgaA 5 mg/ml	73	74	75	76	77	78	
	1 µl DgaA + 1 µl 73	1 µl DgaA + 1 µl 74	1 µl DgaA + 1 µl 75	1 µl DgaA + 1 µl 76	1 µl DgaA + 1 µl 77	1 µl DgaA + 1 µl 78	
	79	80	81	82	83	84	
	1 µl DgaA + 1 µl 79	1 µl DgaA + 1 µl 80	1 µl DgaA + 1 µl 81	1 µl DgaA + 1 µl 82	1 µl DgaA + 1 µl 83	1 µl DgaA + 1 µl 84	
	85	86	87	88	89	90	
	1 µl DgaA + 1 µl 85	1 µl DgaA + 1 µl 86	1 µl DgaA + 1 µl 87	1 µl DgaA + 1 µl 88	1 µl DgaA + 1 µl 89	1 µl DgaA + 1 µl 90	
	91	92	93	94	95	96	
	1 µl DgaA + 1 µl 91	1 µl DgaA + 1 µl 92	1 µl DgaA + 1 µl 93	1 µl DgaA + 1 µl 94	1 µl DgaA + 1 µl 95	1 µl DgaA + 1 µl 96	

3.3. Testování krystalů

Aby se daly získané krystaly použít pro rentgenovou difrakci, bylo nutné dokázat, že se jedná o krystaly proteinu a nejedná se o krystaly solí, které mohou vznikat z použitých krystalizačních činidel. Pro zjištění povahy krystaků, byly použity dva testy – test fyzické manipulace a test absorpce barviva.

Fyzická manipulace

Krystaly, které se nacházely v jamkách krystalizačních destiček, byly přímo pod mikroskopem podrobeny testu fyzické manipulace pomocí jehly. Je známo, že krystaly proteinů jsou velmi křehké a při dotyku jehlou se velmi snadno rozpadají na mnoho kusů, kdežto krystaly solí jsou pevné a při dotyku nedochází k jejich rozpadu, nebo pouze k nepatrnému rozpadu na malé množství částí.

Absorpce barviva

Provedení tohoto testu spočívalo v několika jednoduchých krocích. Mikropipetou bylo napietováno barvivo Izid HR4 – 710 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA], které se přidalo do kapek obsahující protein. Objem přidaného barviva byl vždy desetkrát menší než objem celé kapky. Pokud objem kapky činil 2 μl , bylo přidáno 0,2 μl barviva. Po té co bylo barvivo přidána, počkalo se hodinu. Pokud se krystal v kapce obarvil, jednalo se o krystal proteinu, v opačném případě se jednalo o krystal anorganické soli.

3.4. Získání difrakčních dat

Na vypěstovaných krystalech DgaA byla provedena rentgenová strukturní analýza na zdroji synchrotronového záření BESSY-II na vědeckém pracovišti Helmholtz Zentrum Berlin (HZB) v německém Berlíně.

IV. Experimentální výsledky

Kapitola, která zachycuje výsledky krystalizačních pokusů, výsledky testování krystalů a výsledek difrakčního záznamu pořízený z připravených krystalů proteinu DgaA.

V průběhu krystalizačních experimentů byla prováděna fotodokumentace pomocí fotoaparátu Olympus [Olympus, Praha] připevněným k stereomikroskopu SZX9 při 450x zvětšení.

Výsledky pro protein lysozym a protein DgaA jsou uvedeny pomocí tabulek, ve kterých je zelené značení těch podmínek, které vedly k úspěšné tvorbě krystalů. Následně jsou tyto výsledky doplněny fotografiemi.

4.1. Výsledky krystalizace lysozymu

Výsledky metody sedící kapky

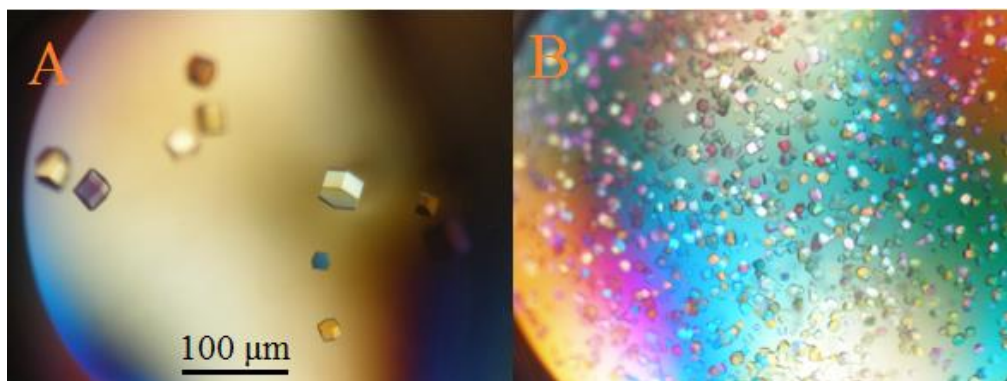
Krystalizace modelového proteinu byla metodou sedící kapky úspěšná, neboť došlo ke krystalizacím ve všech podmínkách. Krystaly vznikaly za použití všech koncentrací lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml a 100 mg/ml) a všech koncentrací krystalizačního roztoku chloridu sodného (3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% a 10%). Velikost a kvalita krystalů se lišila v závislosti na zvolených poměrech proteinu a srážecího činidla. Menší množství větších krystalů vznikalo za použití lysozymu o koncentraci 25 mg/ml. Se zvyšující se koncentrací lysozymu se velikost krystalů zmenšila, ale množství vzrostlo. Roztoky PEGů 3350 a 8000 nevedly k tvorbě krystalů proteinu. Výsledky obou experimentů pro lysozym jsou zaznamenány v Tab. XV, XVI a na pořízených fotografiích na obr. 16.

Tab. XV: Výsledky prvního pokusu metody sedící kapky pro lysozym. Zelené značení = růst krystalů.

	Krystalizační roztok NaCl					
Lysozym	3%	4%	5%	6%	7%	8%
25 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
50 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
75 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl
100 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl NaCl

Tab. XVI: Výsledky druhého pokusu sedící kapky pro lysozym. Zelené značení = růst krystalů.

	Krystalizační roztok		
Lysozym	10% NaCl	20% PEG 3350	14,4% PEG 8000
50 mg/ml	2 μl lysozym + 2 μl NaCl	2 μl lysozym + 2 μl PEG	2 μl lysozym + 2 μl PEG



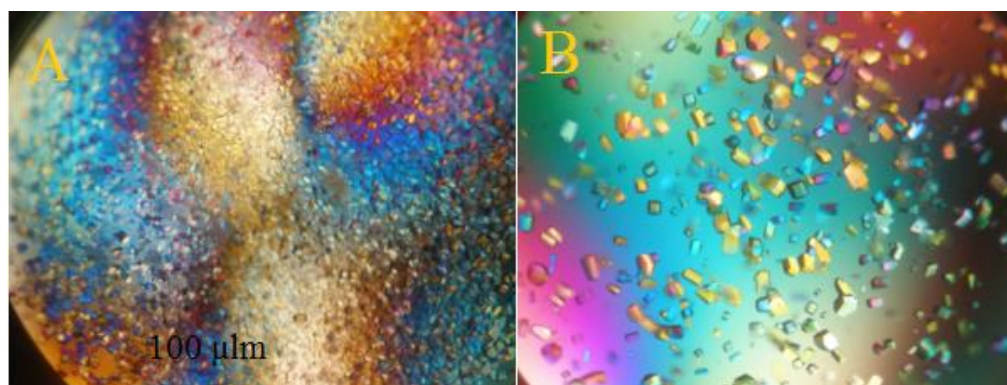
Obr. 16: Krystaly lysozemu, sedící kapka, 2 μ l lysozemu (25 mg/ml) + 2 μ l 8% NaCl (A), 2 μ l lysozemu (75 mg/ml) + 2 μ l 6% NaCl (B).

Výsledky visící kapky

Pro metodu visící kapky byla použita koncentrace lysozemu 50 mg/ml a tři různá srážecí činidla. Krystalizace byla úspěšná u koncentrací 10% roztoku NaCl a 20% PEG 3350. Výsledky pokusu jsou zaznamenány v Tab. XVII a Obr. 17.

Tab. XVII: Výsledky pokusu metody visící kapky pro lysozym. Zelené značení = růst krystalů.

Krystalizační roztok	Lysozym 50 mg/ml
10% NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
20% PEG 3350	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG
14,4% PEG 8000	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG



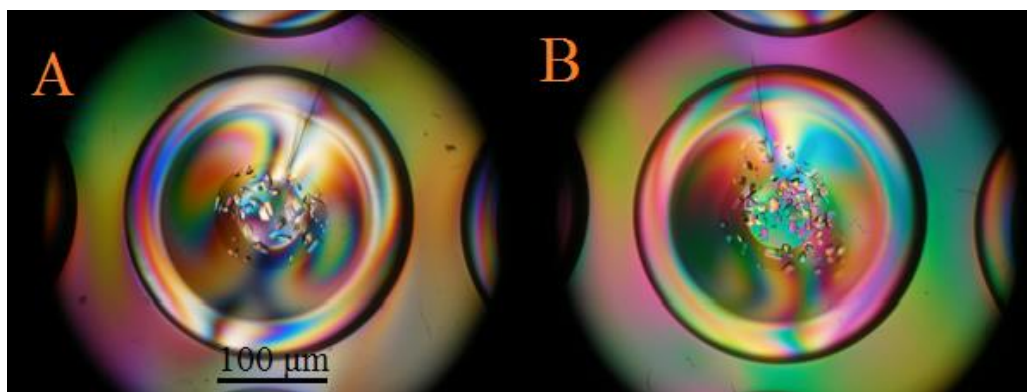
Obr. 17: Krystaly lysozemu, visící kapka, 2 μ l lysozym (50 mg/ml) + 2 μ l 10% NaCl (A), 2 μ l lysozym (100 mg/ml) + 2 μ l PEG 3350 (B).

Výsledky mikrokrystalizace pod olejem

Při provádění pokusů mikrokrystalizace pod olejem byl jako nejvhodnější krystalizační činidlo zaznamenán 8% roztok NaCl. Byly použity čtyři koncentrace lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml a 100 mg/ml), pouze u jedné koncentrace krystaly nevznikly (25 mg/ml). Velikost krystalů a jejich množství korelovalo s koncentrací lysozymu. Velikost krystalů se zmenšovala se zvyšující se koncentrací lysozymu, ale množství se zvyšovalo. Zobrazeno na Obr.18. U 3% roztoku NaCl nedošlo ke vzniku krystalů u žádné ze čtyř koncentrací lysozymu. Výsledky jsou zaznamenány v Tab.XVIII.

Tab. XVIII: Výsledky pokusu metody krystalizace pod olejem pro lysozym. Zelené značení = růst krystalů.

Lysozym	Krystalizační roztok	
	3% NaCl	8% NaCl
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl



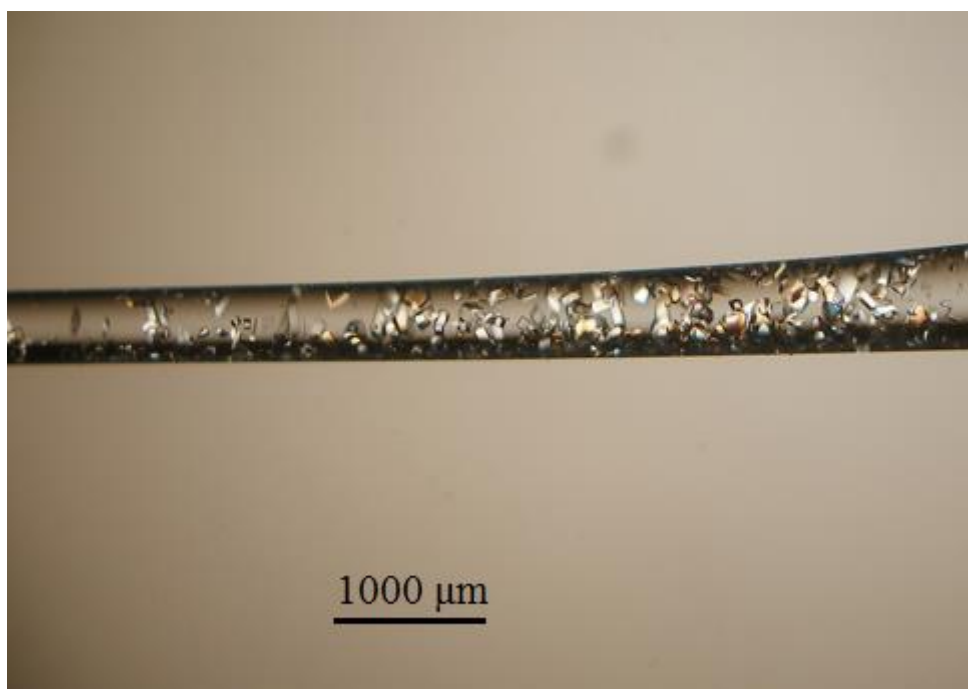
Obr. 18: Krystaly lysozymu, mikrokrystalizace pod olejem, 2 μ l lysozymu (75 mg/ml) + 2 μ l 8% NaCl (A), 2 μ l lysozymu (100 mg/ml) + 2 μ l 8% NaCl (B).

Výsledky volné difúze v kapilárách

Pro metodu volné difúze v kapilárách o různých průměrech (0,2 mm, 0,5 mm a 1,0 mm) byla použita stejná koncentrace lysozymu (75 mg/ml) a stejné krystalizační činidlo (4% NaCl). Krystaly proteinu vznikly ve všech třech kapilárách. Výsledky jsou zaznamenány v Tab. XIX. a na obrázku 19.

Tab. č XIX: Výsledky pokusu metodou volné difúze v kapilárách pro lysozym. Zelené značení = růst krystalů.

Průměr kapiláry [mm]		
0,2	0,5	1,0
30 μ l 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml	30 μ l 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml	30 μ l 4% NaCl + lysozym 50 mg/ml

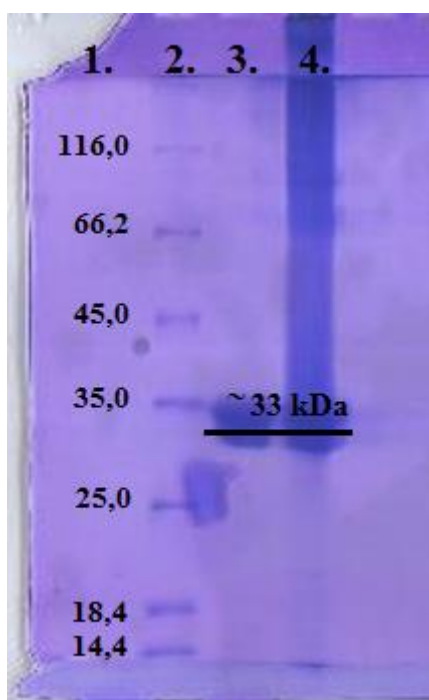


Obr. 19: Krystaly lysozymu, volná difúze v kapilárách o průměru 1,0 mm, lysozym (75 mg/ml) + 30 μ l 4% NaCl.

4.2. Výsledky krystalizace DgaA

Výsledky SDS-PAGE elektroforézy

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla zjištěna molekulární hmotnost a čistota proteinu DgaA. Podle výsledku byl vzorek proteinu DgaA čistý a tudíž vhodný pro krystalizační pokusy. Srovnáním se známými molekulárními hmotnostmi jednotlivých složek standardu byla zjištěna molekulární hmotnost proteinu DgaA a to přibližně 33 kDa (Obr. 20).



Obr. 20: Gelová SDS – PAGE elektroforéza: Sloupce 3 a 4 – protein DgaA (1:1 a 5:1), sloupec 2 standard, sloupec 1 – stupnice standardu v jednotkách kDa.

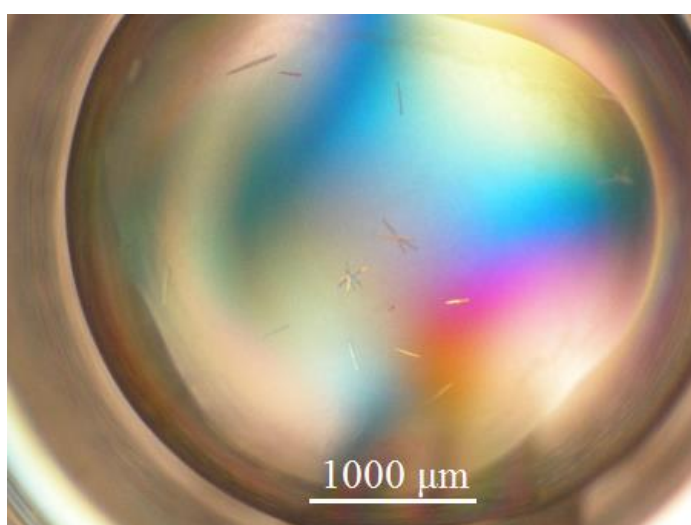
Výsledky metody sedící kapky

Krystalizace proteinu DgaA touto metodou byla provedena ve 4 krystalizačních destičkách XI - XIV. Během krystalizace byla použita koncentrace proteinu DgaA 5 mg/ml.

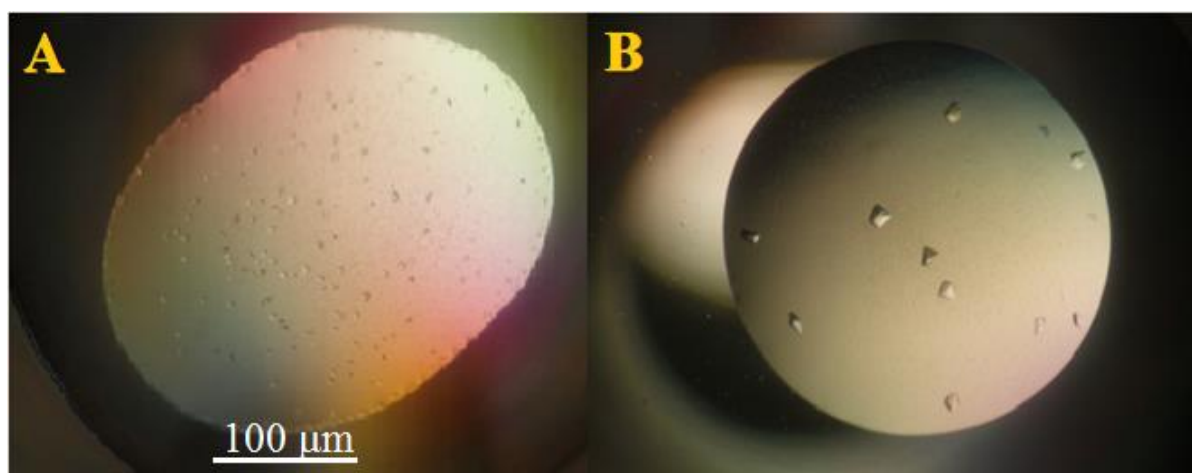
Nejlepších výsledků (= krystaly vhodné pro rentgenovou difrakci) bylo dosaženo v krystalizačních destičkách XII, XIII a XIV za krystalizačních podmínek IN 48, IN 49 a IN 50, vše shrnuto v Tab. XX a na fotografiích 21, 22. V ostatních destičkách vznikaly sraženiny nebo byl roztok čirý.

Tab. XX: Podmínky, při níž vznikaly krystaly proteinu DgaA vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu, krystalizace pomocí metody sedící kapky.

Krystalizační destička	Koncentrace DgaA	Krystalizační činidlo	Poměr v kapce	Fotografie
XII	5 mg/ml	IN 48	1:1	21
XIII	5 mg/ml	IN 49	1:1	22 A
XIV	5 mg/ml	IN 74	1:1	22 B



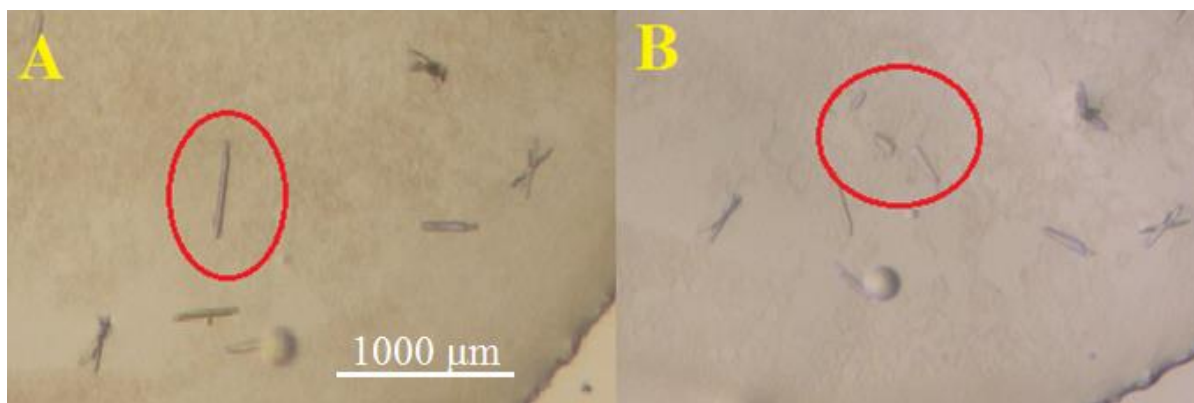
Obr. 21: Krystaly DgaA narostlé v sedící kapce.



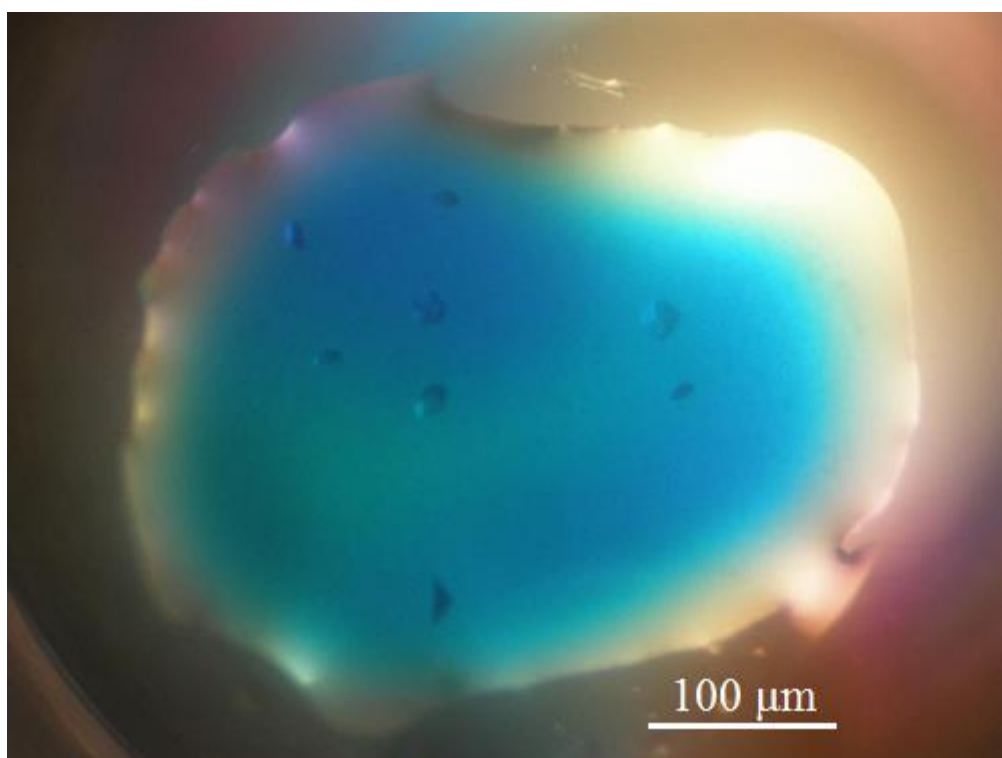
Obr. 22: Krystaly DgaA narostlé v sedící kapce, A (IN 49) a B (IN 74).

4.1. Výsledky testování krystalů

Výsledky těchto testů určily povahu krystalu. Byl proveden test fyzické manipulace (*Crush test*) a test absorpce barviva (*Dye test*), výsledky ukázaly, že se skutečně jedná o krystaly proteinu DgaA. Výsledky jsou zobrazeny na následujících fotografiích 23 a 24.



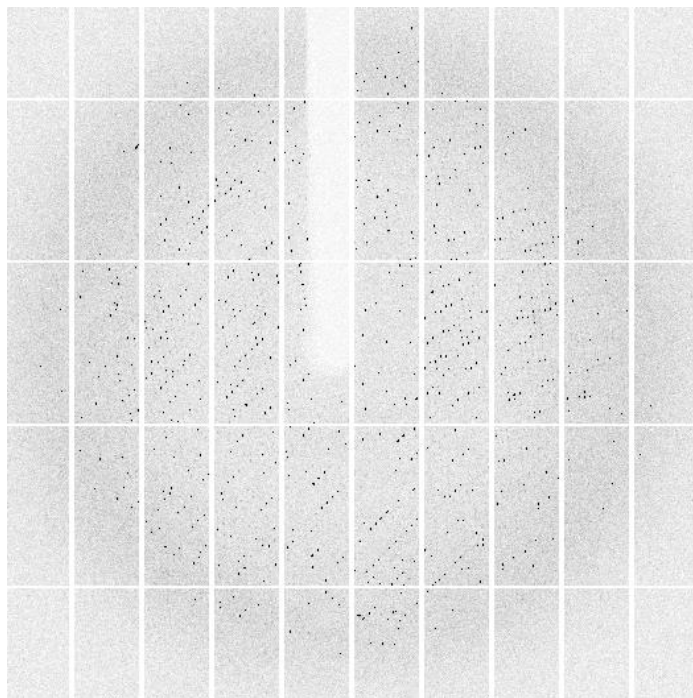
Obr. 23: Krystaly proteinu DgaA před (A) a po (B) testu fyzické manipulace.



Obr. 24: Krystaly proteinu DgaA po testu absorpce barviva.

4.1. Difrakční záznam

Pomocí měření monokrystalu na zdroji synchrotronového záření se podařilo získat difrakční snímky proteinu DgaA s rozlišením do 2.5 Å (Obr. 25).



Obr. 26: Difrakční záznam proteinu DgaA.

V. Diskuze

Získání vhodných proteinových monokrystalů pro rentgenovou strukturní analýzu není vždy jednoduché, neboť získané krystaly se nemusí vyznačovat kvalitou a čistotou, některé obsahují vysoký podíl vody a jiné nedokonalosti, které vykazují nižší rozlišení (Ochi a kol., 2009).

Vypěstování vhodných krystalů proteinů je také ovlivněno celou řadou krystalizačních faktorů, výběrem správné krystalizační strategie a v neposlední řadě trpělivostí samotného vědeckého pracovníka. K neúspěšné krystalizaci také může dojít, pokud se jen nepatrně odchýlíme od přípravy daného proteinu nebo krystalizaci provedeme v jiném časovém sledu (Kutá Smanová, 2008).

V neposlední řadě významnou roli hraje množství vzorku, který je k dispozici a také stav studovaného proteinu. Z toho tedy plyne, pokud je protein schopný tvořit krystaly, tak pravděpodobně vzniknou a v opačném případě nedojde ke krystalizaci i po vyzkoušení celé řady krystalizačních strategií (Bergfors, 1999).

DgaA

Pomocí gelové SDS-PAGE elektroforézy bylo zjištěno, že vzorek proteinu DgaA je dostatečně čistý pro krystalizační pokusy. Vzorek byl testován ve dvou různých koncentracích (20 mg/ml a 8 mg/ml), což je zřejmé na výsledném gelu (Obr. 20, sloupce 1 a 2). Na gelu je dobře vidět, že čím vyšší je koncentrace proteinu, tím tmavší je zbarvení sloupce.

Pro krystalizaci proteinu DgaA byla vybrána komerčně dostupná sada krystalizačních činidel označených Index HR2-144 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA USA) a to z důvodu, že se jedná o nově připravený protein, u něhož zatím nejsou známy krystalizační podmínky. Sada Index obsahuje 96 činidel s různým obsahem solí, pufrů a srážedel v rozmezí pH 3,0 – 9,0. Z důvodu omezeného množství vzorku proteinu DgaA byla pro krystalizaci vybrána jedna metoda – metoda sedící kapky, která je jednoduchá a časově nenáročná.

Bylo testováno 96 různých krystalizačních podmínek. Ve dvou případech vznikly krystaly o dostatečné velikosti vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu a v jednom případě vznikly krystaly jehličkovitého tvaru nevhodné pro strukturní analýzu, viz Tab. XX.

Nejvhodnější krystaly byly získány metodou sedící kapky, v kombinaci s krystalizačními činidly pod označením IN 49 a IN 74, přičemž IN 48 vznikaly krystaly jehličkovitého tvaru. Zbylé jamky obsahovaly čiré kapky nebo fázové rozhraní.

Halogenalkandehalogenasy v RCSB PDB

Jak bylo uvedeno v teoretické části, mnohé z halogenalkandehalogenas byly objeveny v půdních bakteriích (Janssen a kol., 1985, 1988 a 1989), v patogenních bakteriích (Jesenská a kol., 2005), jiné byly experimentálně připraveny ze symbiotických bakterií (Sato a kol., 2005), některé byly získány z rostlinných patogenních bakterií (Hasan a kol., 2011) a v neposlední řadě získány z eukaryotických organismů (Fortová a kol., 2013; Novák a kol., 2014).

PDB databáze obsahovala dne 4. 12. 2016 43 struktur pod názvem „halogenase“, z nichž 41 struktur bylo vyřešeno pomocí strukturní analýzy a 2 pomocí NMR (RCSB PDB, 2016).

DppA

Při porovnání proteinové sekvence z RCSB PDB (The Protein Data Bank) s proteinem DgaA, byla zjištěna 52% shoda s proteinovou sekvencí proteinu DppA (RCSB PDB, 2016).

Jedná se o protein, který byl získán z bakterie *Plesiocystis pacifica* SIR-1. Tato bakterie patří do gramnegativní *Marine myxobacterium* a byla izolována z japonského pobřeží v tichém subtropickém pásmu (Hessler a kol., 2011).

Podle Tab. IV, bakterie *Plesiocystis pacifica* SIR-1, ze které byl poprvé protein DppA získán, spadá do podrodiny HLD – I. Podle shody proteinové sekvence DppA a DgaA, která činila 52% se domnívám, že by protein DgaA mohl spadat do stejné podrodiny HLD – I nebo do sesterské podrodiny HLD – III, jak uvádí Damborský a kol., (2010).

Aktivní místo proteinu DppA je tvořeno aminokyselinami Asp123, His278, Asp249, Trp124 a Trp163. Molekulová hmotnost činí 32.6 kDa (Hessler a kol., 2011).

VI. Závěr

Teoretická část bakalářské práce je věnována principu krystalizace a faktorům, které ovlivňují růst krystalů. Dále popisuje základní, pokročilé a alternativní metody a zabývá se krystalizačními testy, které slouží k určení povahy krystalů. V neposlední řadě jsou uvedeny základní informace o RCSB PDB databáze. V závěru teoretické části jsou sepsány poznatky o rodině halogenalkandehalogenas a nově izolovaném proteinu DgaA z bakterie *Glacieocola agarilytica* NO2.

V praktické části je popsáno seznámení se a zvládnutí základních a pokročilých krystalizačních metod. Pro tento účel byl použit modelový protein lysozym a jeho krystaly byly získány metodou sedící a visící kapky, mikrokrytalizací pod olejem a volnou difúzí v kapilárách.

Hlavním cílem práce byla krystalizace proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2. Nejprve byla ověřena čistota vzorku DgaA pomocí gelové SDS-PAGE elektroforézy a pomocí této metody byla stanovena přibližná molekulová hmotnost, která odpovídala 33 kDa. Bylo prokázáno, že čistota vzorku je vhodná pro další experimenty. Byla provedena krystalizace pomocí metody sedící kapky, při teplotě 20°C, s použitím 96 různých krystalizačních činidel. Bylo testováno 96 různých krystalizačních podmínek a byly nalezeny podmínky vhodné pro krystalizaci studovaného proteinu.

Získané krystaly DgaA metodou sedící kapky byly testovány pomocí fyzické manipulace a metodou absorpce barviva. Výsledky potvrdily, že se jedná o krystaly proteinu a ne o krystaly soli. Optimální podmínky, které vedly ke tvorbě dostatečně velkých krystalů pro rentgenovou strukturní analýzu, byly shrnuty v Tab. XX. Kvalita krystalů byla poté potvrzena pomocí rentgenové difrakce v průběhu měření krystalů na zdroji synchrotronového záření, kdy se podařilo získat difrakční data vhodná k vyřešení struktury proteinu.

Naměřená difrakční data povedou k dalšímu výzkumu, který bude zaměřen na objasnění trojrozměrné struktury proteinu DgaA. Zároveň by mělo být prokázáno, zda protein DgaA patří do rodiny halogenalkandehalogenas.

VII. Seznam literatury

- Arakawa, T., Timashess, S. N. (1985).** *The stabilization of proteins by osmolytes.* Biophysical Journal, **47**(3). 411-141.
- Baik, K. S., Park, Y. D., Seong, Ch. N., Kim, E. M., Bae, K. S., Chun, J. (2006).** *Glaciecola nitratireducens sp. nov., isolated from seawater.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **56**(9). 2185-2188.
- Bergfors, T. M. (1999).** *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips.* La Jolla, USA: International University Line.
- Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2014).** *The Protein Data Bank archive as an open data resource.* Journal of Computer-Aided Molecular Design, **28**(10). 1009-1014.
- Berry, M. B. (1995).** *Protein Crystallization: "Theory and Practise", Structure and Dynamics of E.Coli Adenylate Kinase.* Diplomová práce. Houston, USA: Rise University.
- Bidmanová, S., Chaloupková, R., Damborský, J., Prokop, Z. (2010).** *Development of an enzymatic fiber-optic biosensor for detection of halogenated hydrocarbons.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, **398**(5). 1891-1898.
- Bolen, D. W. (2004).** *Effects of naturally occurring osmolytes on protein stability and solubility: issues important in protein crystallization.* Methods, **34**(3). 312-322.
- Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J. (1996).** *Protein Methods.* New York, USA: Wiley-Liss, Inc.
- Bowman, J. P., McCammon, S. A., Brown, J. L., McMeekin, T. A. (1998).** *Glaciecola punicea gen. nov., sp. nov. and Glaciecola pallidula gen. nov., sp. nov.: psychrophilic bacteria from Antarctic sea-ice habitats.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **48**(4). 1213-1222.
- Cospley, S. D. (1998).** *Microbial dehalogenases: enzymes recruited to convert xenobiotic substrates.* Current Opinion in Chemical Biology, **2**(5). 613-617.
- Cudney, B. (1999).** *Protein Crystallization and Dumb Luck.* The Rigaku Journal, **16**.1-7.
- Damborský, J., Rorije, E., Jesenská, A., Nagata, Y., Klopman, G., Peijnenburg, W. J. G. M. (2001).** *Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases.* Environmental Toxicology and Chemistry, **20**(12). 2681-2689.
- Damborský, J., Chaloupková, R., Pavlová, M., Chovancová, E., Brezovský, J. (2010).** *Structure-Function Relationships and Engineering of Haloalkane dehalogenases.* Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- D'Arcy, A., Elmore, C., Stihle, M., Johnston, J. E. (1996).** *A novel approach to crystallising proteins under oil.* Journal of Crystal Growth, **168**(1-4). 175-180.

Drienovská, I., Chovancová, E., Koudeláková, T., Damborský, J., Chaloupková, R. (2012). *Biochemical Characterization of a Novel Haloalkane Dehalogenase from a Cold-Adapted Bacterium.* Applied and Environmental Microbiology, **78**(14). 4995-4998.

Emmer, J. (2007). *Structural studies of the haloalkane dehalogenase mutant (DhaA12) from rhodococcus rhodochrous.* Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita.

Fortová, A., Šebestová, E., Štěpánková, V., Koudeláková, T., Pálková, L., Damborský, J., Chaloupková, R. (2013). *DspA from Strongylocentrotus purpuratus: The first biochemically characterized haloalkane dehalogenase of non-microbial origin.* Biochimie, **95**(11). 2091-2096.

Furakawa, K. (2006). *Oxygenases and Dehalogenases: Molecular Approaches to Efficient Degradation of Chlorinated Environmental Pollutants.* Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, **70**(10). 2335-2348.

García-Ruiz, J. M., Moreno, A., Viedma, C., Coll, M. (1993). *Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method.* Materials Research Bulletin, **28**(6). 541-546.

García-Ruiz, J. M., Moreno, A. (1994). *Investigation on protein crystal growth by the gel acupuncture method.* Acta Crystallographica D Biological Crystallography, **50**. 484-490.

Gehret, J. J., Liangcai, G., Geders, T. W., Brown, W. C., Gerwick, L., Gerwick, W. H., Sherman, D. H., Smith, J. L. (2012). *Structure and activity of Dmma, a marine haloalkane dehalogenase.* Protein Science, **21**(2). 239-248.

Gilliand, G.L., Tung, M., Blakeslee, D. M., Lander, J. (1994). *The biological macromole crystallization databaze, 3.0: new features, data nad the NASA archive for protein crystal growth data.* Acta Cryst, **D50**. 408-413.

Gribble, G. W. (2003). *The diversity of naturally produced organohalogenes.* Chemosphere, **52**(2). 289-297.

Hampton Research (2015). *Crystallization: Research Tools.* Aliso Viejo, USA: Hampton Research Corp.

Hasan, K., Fortová, A., Koudeláková, T., Chaloupková, R., Damborský, J., Prokop, Z., Ishitsuda, M., Nagata, Y. (2011). *Biochemical Characteristics of the Novel Haloalkane Dehalogenase Data, Isolated from the Plant Pathogen Agrobacterium tumefaciens C58.* Applied and Environmental Microbiology, **77**(5). 1881-1884.

Henderson, R., Sali, A., Banker, M. L., Carragher, B., Devkota, B., Downing, K. H, Egelman, E. H., Feng, Z., Frank, J., Grigorieff, N., Jiang, W., Ludtke, S. J., Medalia, O., Penczek, P.A., Rosenthal, P. B., Rossmann, M. G., Schmid, M. F., Shroder, G. F., Steven, A. C., Stokes, D. L., Westbrook, J. D., wriggers, W., Yang, H., Yong, J., Berman, H. M., Chiu, W., Kleywegt, G. J., & Lawson, C. L. (2012). *Outcome of the first electron microscopy validation task force meeting.* Structure, **20**(2), 205-214.

Hesseler, M., Bogdanovič, X., Hidalgo, A., Berenquer, J., Palm, G. J., Hinrichs, W., Bornscheuer, U. T. (2011). *Cloning, functional expression, biochemical characterization, and structural analysis of a haloalkane dehalogenase from Plesiocystis pacifica SIR-1.* Applied Microbiology and Biotechnol, **91**(4). 1049-1060.

Chaloupková, R., Prudniková, T., Řezáčová, P., Prokop, Z., Koudeláková, T., Daniel, L., Březovský, J., Ikeda-Ohtsubo, W., Sato, Y., Kutý, M., Nagata, Y., Kutá Smatanová, I., Damborský, J. (2014). *Structural and functional analysis of a novel haloalkane dehalogenases with two halide-binding sites.* Acta Crystallographica D Biological Crystallography, **70**. 1884-1897.

Chayen, N. E. (1997). *The role of oil in macromolecular crystallization.* Structure, **5**(10). 1269-1274.

Chayen, N. E. (1999). *Crystallization with oils: a new dimension in macromolecular crystal growth.* Journal of Crystal Growth, **196**(2-4). 434-441.

Chayen, N. E. (2005). *Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization.* Progress in Biophysics and Molecular Biology, **88**(3). 329-337.

Chernov, A. A. (2003). *Protein crystals and their growth.* Journal of Structural Biology, **142**(1). 3-21.

Chirgardze, D. (2001). *Protein crystallization in action.* The Crystallographic X-ray Facility at the Department of Biochemistry, University of Cambridge.

Dostupné: <http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/pdf/xtal-in-action.pdf> [citováno dne 10. 9. 2016].

Chovancová, E., Kosinski, J., Bujnicki, J. M., Damborský, J. (2007). *Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases.* Protein: Structure, Function, and Bioinformatics, **67**(2). 305-316.

Janssen, D. B., Scheper, A., Dijkhuizen, L., Witholt, B. (1985). *Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10.* Applied and Environmental Microbiology, **49**(3). 673-677.

Janssen, D. B., Gerritse, J., Brackman, J., Kalk, C., Jager, D., Witholt, B. (1988). *Purification and characterization of a bacterial dehalogenase with activity toward halogenated alkanes, alcohols and ethers.* The FEBS Journal, **171**(1-2). 67-72.

Janssen, D. B., Pries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P., Witholt, B. (1989). *Cloning of 1,2-dichloroethane degradation genes of Xanthobacter autotrophicus GJ10 and expression and sequencing of the dhlA gene.* Journal of Bacteriology, **171**(12). 6791-6799.

Janssen, D. B., Pries, F., Vanderpleg, J. R. (1994). *Genetics and Biochemistry of Dehalogenating Enzymes.* Annual Review of Microbiology, **48**. 163-191.

Janssen, D. B. (2004). *Evolving haloalkane dehalogenases.* Current Opinion in Chemical Biology, **8**(2). 150-159.

Jesenská, A., Pavlová, M., Strouhal, M., Chaloupková, R., Těšínská, I., Monincová, M., Prokop, Z., Damborský, J., Bartoš, M., Pavlík, I., Rychlík, I., Möbius, P., Nagata, Y. (2005). *Cloning, Biochemical Properties, and Distribution of Mycobacterial Haloalkane Dehalogenases*. Applied and Environmental Microbiology, **71**(11). 6736-6745.

Kratochvíl, B., Hušák, M., Brynda, J., Sedláček, J. (2008). *Co nabízí současná RTG strukturní analýza*. Chem.Listy, **102**. 889-901.

Koudeláková, T., Chovancová, E., Brezovský, J., Monincová, M., Fortová, A., Jarkovský, J., Damborský, J. (2011). *Substrate specificity of haloalkane dehalogenases*. Biochemical Journal, **435**(2). 345-354.

Koudeláková, T., Bidmanová, S., Dvořák, P., Pavelka, A., Chaloupková, R., Prokop, Z., Damborský, J. (2012). *Haloalkane dehalogenase: biotechnological applications*. Biotechnol Journal, **8**. 32-45.

Kutá Smatanová, I. (1999). *Štúdium štruktúry a vlastností nestabilných nízkomolekulárnych a makromolekulárnych látok metódami rentgenovej štruktúrnej analýzy*. Brno, ČR: Masarykova univerzita v Brně.

Kutá Smatanová, I. (2003). *Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi [online]*. In: Krystalografická společnost. [cit. 2016-01-45].

Dostupné z WWW: <<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>>

Kutá Smatanová, I. (2008). *Crystallization techniques in protein crystallography*. Habilitační práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

Leunissen, M. (2001). *An essay on several aspects of protein crystallization research*. Department of solid state chemistry

Li, M., Chang, W. R. (2009). *Protein crystallization*. Photosynth Res, **102**. 223-229.

Malkin, A. J., Thorne, R. E. (2004). *Growth and disorder of macromolecular crystals: insight from atomic force microscopy and X-ray diffraction studies*. Methods, **34**(3). 273-299.

Matsuyama, H., Hirabayashi, T., Kasahara, H., Minami, H., Hoshino, T., Yumoto, I. (2006). *Glaciecola chathamensis sp. nov., a novel marine polysaccharide-producing bacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **56**(12). 2883-2886.

McPherson, A. J., Malkin, Y.G., Kuznetsov. (1995). *The science of macromolecular crystallization*. Structure, **3**(8). 756-768.

McPherson, A. J. (2004). *Introduction to protein crystallization*. Methods, **34**(3). 254-265.

McPherson, A. J., Cudney, B. (2006). *Searching for silver bullets: An alternative strategy for crystallizing macromolecules*. Journal of Structural Biology, **156**(3). 387-406.

Messerchmitt, A. (2007). *X-Ray Crystallography of Biomacromolecules: A Practical Guide*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Methé, B. A., Nelson, K. E., Deming, J. W., Momen, B., Melamund, E., Zhang, X., Moulton, J., Madupu, R., Nelson, W. C., Dodson, R. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Durkin, A. S., DeBoy, R. T., Kolonay, J. F., Sullivan, S. A., Zhou, L., Davidsen, T. M., Wu, M., Huston, L. A., Lewis, M., Weaver, B., Weidman, J. F., Khouri, H., Utterback, T. R., Feldblyum, T. V., Fraser, C. M. (2005). *The psychrophilic lifestyle as revealed by the genome sequence of Collwellia psychrerythraea 34H through genomic and proteomic analyses*. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, **102**(31). 10913-10918.

Meyer, A., Betzel, Ch., Pusey, M. (2015). *Latest methods of fluorescence-based protein crystal identification*. Acta Crystallographica F Biological Crystallography, **71**. 121-131.

Nanev, C. N. (2006). *Protein crystal nucleation: Recent notions*. Crystal Research and Technology, **42**(1). 4-12.

Newman, J., Peat, T.S., Richard, R., Kan, L., Swanson, P. E., Affholter, J. A., Holmes, I. H., Schindler, J. F., Unkefer, C. J., Terwilliger, T. C. (1999). *Haloalkane dehalogenases: Structure of a Rhodococcus enzyme*. Biochemistry, **38**(49). 16105-16114.

Nichols, C. A. M., Guezennec, J., Bowman, J. P. (2005). *Bacterial Exopolysaccharides from Extreme Marine Environments with Special Consideration of the Southern Ocean, Sea Ice, and Deep-Sea Hydrothermal Vents: A Review*. Marine Biotechnology, **7**(4). 253-271.

Novák, H. R., Sayer, Ch., Isupov, M. N., Gotz, D., Spragg, A. M., Littlechild, J. A. (2014). *Biochemical and structural characterisation of a haloalkane dehalogenase from a marine Rhodobacteraceae*. FEBS Letters, **588**(9). 1616-1622.

Ochi, T., Bolanos-García, V. M., Stojanoff, V., Moreno, A. (2009). *Perspective on protein crystallisation*. Progress in Biophysics and Molecular Biology, **101**(1-3). 56-63.

Otyepka, M., Damborský, I. (2002). *Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains*. Protein Science, **11**(5). 1206-1217.

Park, S., Yoon, J. H. (2013). *Glaciecola aquimarina sp. nov., a grammaproteobacterium isolated from coastal seawater*. Journal of Microbiology, **103**(5). 1141-1148.

Prokop, Z., Opluštil, F., DeFrank, J., Damborský, J. (2006). *Enzymes fight chemical weapons*. Biotechnology Journal, **1**(12). 1370-1380

Qin, Q. L., Xie, B. B., Yu, Y., Shu, Y. L., Rong, J. Ch., J., Zhang, Y. J., Zhao, D. L., Chen, X. L., Zhang, X. Y., Chen, B., Zhou, B. Ch. (2013). *Comparative genomics of the marine bacterial genus Glaciecola reveals te high degree of genomic diverstity and genomic characteristic for cold adaptation*. Environmental microbiology, **16**(6). 1642-1653.

RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW:
< <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> >

Romanenko, L. A., Zhuková, N. V., Rohde, M., Lysenko, A. M., Mikhailov, V. V., Stackebrandt, E. (2003). *Glaciecola mesophila sp. nov., a novel marine agar-digesting bacterium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **53**(3). 647-651.

- Rozeboom, H. J., Kingma, J., Janssen, D. B., Dijkstra, B. W. (1988).** *Crystallization of haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus GJ10.* Journal of Molecular Biology, **200**(3). 611-612
- Saridakis, E., Chyen, N. E. (2009).** *Towards a 'universal' nucleant for protein crystallization.* Trends in Biotechnology, **27**(2). 99-106.
- Sato, Y., Ohtsubo, Monincová, M., Chaloupková, R., Prokop, Z., Ohtsubo, Y., Minamisawa, Y., Tsuda, M., Damborský, J., Nagata, Y.(2005).** *Two Rhizobial strains, Mesorhizobium loti MAFF303099 and Bradyrhizobium japonicum USDA110, Encode Haloalkane Dehalogenases with Novel Structures and Substrate Specificities.* Applied and Environmental Microbiology, **71**(8). 4372-4379.
- Shivaji, S., Reddy, G. S. (2014).** *Phylogenetic analyses of the genus Glaciecola: emended description of the genus Glaciecola, transfer of Glaciecola mesophila, G. agarilytica, G. aquimarina, G. artica, G. chathamensis, G. polaris and G. psychrophila to the genus Paraglaciecola gen. nov. as Paraglaciecola mecophila comb. nov., P. agarilytica comb. nov., P. aquimarina comb. nov., P. arcitica comb. nov. and P. psychrophila comb. nov., and description of Paraglaciecola oceanifecundand sp. nov., isolated from the Southern Ocean.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **64**(9). 3264-3275.
- Schein, C. H. (1990).** *Solubility as a function of protein structure and solvent components.* Biotechnology (N.Y.), **8**(4). 308-317.
- Trankhanov, S., Quioco, F. A. (1995).** *Influence of divalent cations in protein crystallization.* Protein Science, **4**(9). 1914-1919.
- Van Trappem, S., Tjhing-Lok, T., Yang, J., Mergaert, J., Swings, J. (2004).** *Glaciecola polaris sp. nov., a novel budding and prosthecate bacterium from the Artic Ocean, and emended description of the genus Glaciecola.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **54**(5). 1765-1771.
- Verschueren, K. H. G., Seljée, F., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W. (1993).** *Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase.* Nature, **363**(24). 693-698.
- Waseda, Y., Matsubara, E., Shinoda, K. (2011).** *X-Ray Diffraction Crystallography: Introduction, Examples and Solved Problems.* Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.
- Yoong, J. J., Park, S. J., Kim, H. J., Rhee, S. K. (2007).** *Glacieoccola agarilytica sp. nov., an agar-digesting marine bacterium from the East Sea, Korea.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **57**(5). 951-953.
- Zhang, Y. J., Zhang, X. J., Mi, Z. H., Chen, Ch. X., Gao, Z. M., Chen, X. L., Yu, Y., Chen, B., Zhang, Y. Z. (2006).** *Glaciecola psychrophila sp. nov., a novel psychrophilic bacterium isolated from the Arctic.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **56**(12). 2867-2869.

Zhang, Y. J., Zhang, X. J., Mi, Z. H., Chen, Ch. X., Gao, Z. M., Chen, X. L., Yu, Y., Chen, B., Zhang, Y. Z. (2011). *Glaciecola arctica sp. nov., isolated from Arctic marine sediment.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, **61**(10). 2338-2341.

Zulauf, M., Füstenberg, U., Grabo, M., Jäggi, P., Regenass, M., Rosenbush, J. P. (1989). *Critical micellar concentrations of detergents.* Methods in Enzymology, **172**. 528-538.

Internetové odkazy:

Krystalografie proteinů. Fyzikální ústav: Akadademie věd ČR, v. v. i. [online]. Fyzikální ústav AV ČR, c 2008 – 2014 [cit. 2016-12-11].

Dostupné z: <http://www.fzu.cz/oddeleni/oddeleni-strukturni-analyzy/research-subjects/krystalografie-proteinu>

Strukturní Analýza [online]. Taraba, Richtera, 2002 [cit. 2016-12-11].

Dostupné z: <http://www.ped.muni.cz/wchem/sm/hc/labtech/pages/krystalizace.html>

VIII. Přílohy

Informace o proteinu DgaA

aminokyselinová sekvence:

MTIKALRTPEERFSVLPAPFYQPNYVDDLGGYESLRMAYIDEGDKDSEYTFLCLHGEPWTSY-
LYRKMIPVFTDAGHRVVAPDLFGFGRSDKPIEDSVYNFEFHRNSLIQLIEHLDLKNIVLVCQDWGGGL
GLTIPMDMQDRFKKLIVMNTTISNGEPLAEAAVQWMAFNETISELPVAGLVACDAGAAVN-
VMDALAYDAPFPNKNYKVGVKRFPQMIPTNADDDAVKYGLRAIEFWSNEWSGESFMAIGMKDAVL
GEAAMMQLKTVIKGCPEPMKIEEAGHFVQEYGVEVAEQALASFTMIHHHHHH

genetická sekvence:

cat **ATG**ACGATCAAGGCACTGCGTACGCCAGAAGAGCGCTTCTCTGTTCTGCCT-
GCATTCCTTATCAGCCAACTACGTCGACGACCTGGGTGGTTACGAATCTCTGCGTATGGCATA
ATCGACGAGGGTGACAAGGACTCTGAGTACACCTTCCTGTGTCTGCACGGTGAGCCAACTT-
GGTCTTACCTGTACCGTAAGATGATCCCGGTATTCACCGACGCAGGTCATCGTGTCTGTTGCACCGG
ATCTGTTCCGGTTTCGGTCTGTTCTGATAAACCGATCGAGGATTCCG-
TATATAACTTCGAATTTACCGTAACAGCCTGATCCAGCTGATCGAACACCTGGACCTGAAAAAC
ATCGTGCTGGTCTGCCAGGACTGGGGCGGTGGTCTGGGTCTGACTATCCCGATGGATAT-
GCAGGATCGTTTTCAAAAAACTGATCGTGATGAACACCACCATCAGCAACGGCGAACCGCTGGCTG
AAGCAGCTGTGCAGTGGATGGCTTTCAACGAAACCATTTCCGAACTGCCGGTGGCAGGTCT-
GGTTGCTTGTGATGCTGGTGCTGCTGTTAACGTTATGGACGCTCTGGCCTACGATGCCCCGTCCC
GAACAAAAATTACAAAGTAGGCGTTAAACGCTTCCCGCAGATGA-
TTCCGACTAACGCGGACGATGATGCGGTAATAATGGCCTGCGCGCCATTGAATTTTGGTCCAAT
GAATGGAGCGGCGAGAGCTTTATGGCGATTGGCATGAAAGACGCGGTTCT-
GGGCGAAGCGGCCATGATGCAACTGAAAACCGTTATCAAAGGCTGCCCGGAACCGATGAAAATT
GAAGAAGCGGGCCACTTTGTTTCAGGAATATGGCGTGGAAGTGGCGGAACAAGCGCTGGCG-
TCCTTTACCATGATTCATCACCATCACCACCAC **TAAGgatcc**

cat **ATG** *NdeI* restriction site

ggatcc *BamHI* restriction site

START KODON

STOP KODON

počet aminokyselin: 307

počet nukleotidů: 924

molekulová hmotnost: 34491.41Da

teoretický izoelektrický bod: 4.94

Seznam a obsah použitých krystalizačních činidel pro krystalizaci DgaA

Tube #	Salt	Tube #	Buffer \diamond	Tube #	Precipitant
1.	None	1.	0.1 M Citric acid pH 3.5	1.	2.0 M Ammonium sulfate
2.	None	2.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	2.	2.0 M Ammonium sulfate
3.	None	3.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	3.	2.0 M Ammonium sulfate
4.	None	4.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	None	5.	0.1 M HEPES pH 7.5	5.	2.0 M Ammonium sulfate
6.	None	6.	0.1 M Tris pH 8.5	6.	2.0 M Ammonium sulfate
7.	None	7.	0.1 M Citric acid pH 3.5	7.	3.0 M Sodium chloride
8.	None	8.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	8.	3.0 M Sodium chloride
9.	None	9.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	9.	3.0 M Sodium chloride
10.	None	10.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	10.	3.0 M Sodium chloride
11.	None	11.	0.1 M HEPES pH 7.5	11.	3.0 M Sodium chloride
12.	None	12.	0.1 M Tris pH 8.5	12.	3.0 M Sodium chloride
13.	None	13.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	13.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
14.	None	14.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	14.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
15.	None	15.	0.1 M HEPES pH 7.5	15.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
16.	None	16.	0.1 M Tris pH 8.5	16.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
17.	None	17.	None - pH 5.6	17.	1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.14 M Potassium phosphate dibasic
18.	None	18.	None - pH 6.9	18.	0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.91 M Potassium phosphate dibasic
19.	None	19.	None - pH 8.2	19.	0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 1.344 M Potassium phosphate dibasic
20.	None	20.	0.1 M HEPES pH 7.5	20.	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
21.	None	21.	None	21.	1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0
22.	None	22.	None	22.	0.8 M Succinic acid pH 7.0
23.	None	23.	None	23.	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
24.	None	24.	None	24.	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
25.	None	25.	None	25.	3.5 M Sodium formate pH 7.0
26.	None	26.	None	26.	1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0
27.	None	27.	None	27.	2.4 M Sodium malonate pH 7.0
28.	None	28.	None	28.	35% v/v Tacsimate™ pH 7.0
29.	None	29.	None	29.	60% v/v Tacsimate™ pH 7.0
30.	0.1 M Sodium chloride	30.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	30.	1.5 M Ammonium sulfate
31.	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	31.	0.1 M Tris pH 8.5	31.	0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32.	1.0 M Ammonium sulfate	32.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	32.	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	1.1 M Sodium malonate pH 7.0	33.	0.1 M HEPES pH 7.0	33.	0.5% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
34.	1.0 M Succinic acid pH 7.0	34.	0.1 M HEPES pH 7.0	34.	1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
35.	1.0 M Ammonium sulfate	35.	0.1 M HEPES pH 7.0	35.	0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000
36.	15% v/v Tacsimate™ pH 7.0	36.	0.1 M HEPES pH 7.0	36.	2% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	None	37.	None	37.	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.0	38.	30% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
39.	None	39.	0.1 M HEPES pH 7.0	39.	30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
40.	None	40.	0.1 M Citric acid pH 3.5	40.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	None	41.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	41.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	None	42.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	42.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	None	43.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	43.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	None	44.	0.1 M HEPES pH 7.5	44.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	None	45.	0.1 M Tris pH 8.5	45.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	None	46.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	46.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
47.	None	47.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	47.	28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
48.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	48.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	48.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

Tube #	Salt	Tube #	Buffer ◊	Tube #	Precipitant
49.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	49.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	49.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
50.	0.2 M Ammonium acetate	50.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	50.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
51.	0.2 M Ammonium acetate	51.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	51.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
52.	0.2 M Ammonium acetate	52.	0.1 M HEPES pH 7.5	52.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
53.	0.2 M Ammonium acetate	53.	0.1 M Tris pH 8.5	53.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
54.	0.05 M Calcium chloride dihydrate	54.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	54.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
55.	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	55.	0.1 M HEPES pH 7.5	55.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
56.	0.2 M Potassium chloride	56.	0.05 M HEPES pH 7.5	56.	35% v/v Pentaerythritol propoxylate (5/4 PO/OH)
57.	0.05 M Ammonium sulfate	57.	0.05 M BIS-TRIS pH 6.5	57.	30% v/v Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)
58.	None	58.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	58.	45% v/v Polypropylene glycol P 400
59.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	59.	0.1 M HEPES pH 7.5	59.	22% w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100
60.	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	60.	0.1 M Tris pH 8.5	60.	20% w/v Polyvinylpyrrolidone K 15
61.	0.2 M L-Proline	61.	0.1 M HEPES pH 7.5	61.	10% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.	0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate	62.	0.1 M Tris pH 8.5	62.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
63.	5% v/v Tacsimate™ pH 7.0	63.	0.1 M HEPES pH 7.0	63.	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
64.	0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	64.	0.1 M HEPES pH 7.5	64.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
	0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate				
	0.005 M Cadmium chloride hydrate				
	0.005 M Magnesium chloride hexahydrate				
65.	0.1 M Ammonium acetate	65.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	65.	17% w/v Polyethylene glycol 10,000
66.	0.2 M Ammonium sulfate	66.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	66.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.	0.2 M Ammonium sulfate	67.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	67.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.	0.2 M Ammonium sulfate	68.	0.1 M HEPES pH 7.5	68.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.	0.2 M Ammonium sulfate	69.	0.1 M Tris pH 8.5	69.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.	0.2 M Sodium chloride	70.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	70.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.	0.2 M Sodium chloride	71.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	71.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.	0.2 M Sodium chloride	72.	0.1 M HEPES pH 7.5	72.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.	0.2 M Sodium chloride	73.	0.1 M Tris pH 8.5	73.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	74.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	74.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	75.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	75.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	76.	0.1 M HEPES pH 7.5	76.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	77.	0.1 M Tris pH 8.5	77.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.	0.2 M Ammonium acetate	78.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	78.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.	0.2 M Ammonium acetate	79.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	79.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.	0.2 M Ammonium acetate	80.	0.1 M HEPES pH 7.5	80.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.	0.2 M Ammonium acetate	81.	0.1 M Tris pH 8.5	81.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	82.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	82.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	83.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	83.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	84.	0.1 M HEPES pH 7.5	84.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	85.	0.1 M Tris pH 8.5	85.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	86.	None	86.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	87.	None	87.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	88.	None	88.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.	0.1 M Succinic acid pH 7.0	89.	None	89.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.	0.2 M Sodium formate	90.	None	90.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	91.	None	91.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.	0.1 M Magnesium formate dihydrate	92.	None	92.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.	0.05 M Zinc acetate dihydrate	93.	None	93.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	94.	None	94.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.	0.1 M Potassium thiocyanate	95.	None	95.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
96.	0.15 M Potassium bromide	96.	None	96.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000

IX. Seznam zkratek

aminokyseliny:

Ala (A) - alanin	Lys (K) - lysin
Arg (R) - arginin	Met (M) - methionin
Asn (N) - asparagin	Phe (F) - fenylalanin
Asp (D) - kyselina asparagová	Pro (P) - prolin
Cys (C) - cystein	Ser (S) - serin
Gln (Q) - glutamin	Thr (T) - threonin
Glu (E) - kyselina glutamová	Trp (W) - tryptofan
Gly (G) - glycin	Tyr (Y) - tyroxin
His (H) - histidin	Val (V) - valin
Ile (I) - izoleucin	Pyl (O) - pyrolysin
Leu (L) - leucin	Sec (U) – selenocystein

nukleové báze:

A - adenin	G - guanin
C - cytosin	T – thymin

další zkratky:

PEG – polyethylenglykol
MPD – 2 – methyl – 2, 4 - pentandiol
BMCD – Biological Macromolecule Crystallization Database
SDS – PADE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
RCSB PDB - „Protein Data Bank“, online databáze makromolekulárních struktur
NMR – nukleární magnetická resonance
PCB – polychlorované bifenyly
TCE - 1,3,5-trichlorbenzen
SDS – dodecylsíran sodný
HEPES - 2- (4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazinyl) ethansulfonová kyselina
LB – Luria-Bertani media
IPTG – izopropyl-p-D-1-thiogalaktopyranoid
Ni-NTA – Ni-nitrilotrioctová kyselina