

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Krystalizační experimenty DbeA z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94
a její mutantní formy DbeA3**

Bakalářská práce

Vendula Flanderová

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

Konzultant: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

České Budějovice 2018

Flanderová, V., 2018: Krystalizační experimenty DbeA z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 a její mutantní formy DbeA3. [Crystallization experiments of DbeA from *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 and its mutant form DbeA3. Bc. Thesis, in Czech.] – 58 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis is based on crystallization experiments of the newly discovered haloalkane dehalogenase DbeA from *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 and its mutant form DbeA3. Main aim of this work is finding of crystallization conditions to prepare suitable protein crystals, which will be used for X-ray structural analysis. Diffraction data will be used for description of protein structures and for further research.

Prohlášení

Prohlašuji, že svojí 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 v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 17. 4. 2018

.....
Vendula Flanderová

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za příkladné vedení bakalářské práce, odborné a cenné rady a připomínky. Také bych chtěla poděkovat konzultantce Mgr. Tatyane Prudnikové, Ph.D. za ochotné a trpělivé vedení celé praktické části.

1. ÚVOD	1
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	2
2.1. ÚVOD DO PROTEINOVÉ KRYSTALIZACE	2
2.2. PRINCIP KRYSTALIZACE	3
2.3. TEST PŘED KRYSTALIZACÍ.....	4
2.4. KRYSTALIZAČNÍ METODY.....	4
2.4.1. Hanging drop	4
2.4.2. Sitting drop	5
2.4.3. Sandwich drop	6
2.4.4. Mikrokrystalizace pod olejem.....	7
2.4.5. Dialýza	8
2.4.5. Pokročilé krystalizační metody	9
2.4.6. Alternativní krystalizační metody	10
2.5. FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KRYSTALIZACI	14
2.6. TESTOVÁNÍ KRYSTALŮ.....	15
2.7. HALOGENALKANDEHALOGENASY	17
2.7.1. Charakteristika halogenalkandehalogenas.....	17
2.7.2. Struktura halogenalkandehalogenas	18
2.7.3. Reakční mechanismus halogenalkandehalogenas	20
2.8. PROTEIN DBEAWT A DBEA3	21
3. MATERIÁLY A METODY.....	23

3.1. SDS-PAGE ELEKTROFORÉZA.....	23
3.2. KRYSTALIZACE DBEAWT	24
3.2.1. Příprava krystalizačního roztoku	24
3.2.2. Naředění proteinu DbeAwt	25
3.2.3. Vlastní krystalizace proteinu DbeAwt.....	25
3.3. KRYSTALIZACE DBEA3	29
3.3.1. Příprava krystalizačního roztoku	29
3.3.2. Naředění proteinu DbeA3.....	29
3.3.3. Vlastní krystalizace DbeA3	30
3.4. TESTOVÁNÍ VZNIKLÝCH KRYSTALŮ	33
3.4.1. Test drcením	33
3.4.2. Barvicí test	33
3.5. DIFRAKČNÍ DATA	34
4. VÝSLEDKY.....	35
4.1. VÝSLEDKY SDS-PAGE ELEKTROFORÉZY.....	35
4.2. VÝSLEDKY KRYSTALIZACE PROTEINU DBEAWT	37
4.3. VÝSLEDKY KRYSTALIZACE PROTEINU DBEA3	42
4.5. VÝSLEDKY RENTGENOVÉ DIFRAKČNÍ ANALÝZY	49
4.6. POROVNÁNÍ KRYSTALIZAČNÍCH PODMÍNEK PŘI KRYSTALIZACI PROTEINU DBEAWT A DBEA3.	50
5. DISKUZE.....	51
6. ZÁVĚR.....	53
7. SEZNAM LITERATURY.....	54
8. SEZNAM ZKRATEK	58

1. Úvod

Proteinová krystalografie je jeden z klíčových oborů strukturní biologie. Zaměřuje se na určování prostorové struktury proteinů s využitím rentgenového (RTG) záření. Proteiny slouží v těle živých organismů jako funkční nebo strukturní jednotky, proto je tedy znalost jejich struktury velmi důležitá a vede k pochopení způsobu, jakou funkci plní v tělech těchto organismů. Také existují možnosti jejich následné úpravy s cílem změnit či ovlivnit činnost daných proteinů. Informace získané pomocí rentgenové krystalografie slouží také k boji proti nemocem, jako jsou rakovina nebo AIDS.

Krystalizace proteinů se zabývá nalezením nejvhodnějších podmínek pro růst monokrystalů. Aby mohly být krystaly použity pro RTG difrakci, musí být vhodně připraveny. Nutnou podmínkou je, aby byly kvalitní a neobsahovaly žádné defekty. Jelikož je krystalizace ovlivněna mnoha faktory, je získání vhodných krystalů velmi dlouhá a náročná část v procesu určení struktury proteinů.

Teoretická část práce popisuje princip krystalizace; faktory, které tento proces ovlivňují; stručný přehled metod využívaných pro krystalizaci; základní informace o halogenalkandehalogenasach a o studované halogenalkandehalogenase DbeAwt z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 a její mutantní formě DbeA3.

Praktická část práce se zabývá základními krystalizačními metodami aplikovanými na proteiny DbeAwt a DbeA3.

V závěrečné fázi jsou zpracována difrakční data proteinů DbeAwt a DbeA3, která umožní určení struktury, výsledky krystalizace, výsledky testování připravených krystalů a porovnání podmínek pro krystalizaci proteinů DbeAwt a DbeA3.

Cílem práce bylo

- Osvojit si základní a pokročilé krystalizační metody pro krystalizace proteinů
- Nalézt a optimalizovat krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů
- Připravit krystaly studovaných proteinů DbeAwt a DbeA3 v difrakční kvalitě
- Porovnat krystalizační podmínky pro vznik krystalů DbeAwt a DbeA3
- Otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

2. Literární přehled

2.1. Úvod do proteinové krystalizace

Krystalizace je proces, který se skládá z hledání podmínek a parametrů, které ovlivňují vznik krystalů. Následná optimalizace vede k získání dostatečně kvalitních monokrystalů vhodných pro rentgenovou strukturní analýzu.

Vznik krystalů je však ovlivňován mnoha faktory. Těmi jsou například pH, teplota, koncentrace jednotlivých složek roztoků. Nalezení optimálních podmínek je velmi náročný a zdoluhavý proces, jelikož malá změna v podmínkách může velmi výrazně ovlivnit růst krystalů. Může dojít k denaturaci proteinu či k degradaci krystalu.

Za růst krystalů označujeme proces, při kterém dochází k fázové změně kapaliny resp. plynu na pevnou látku. Nutnými podmínkami pro růst krystalů jsou přesycení roztoku a teplotní gradient. Přesycení roztoku zodpovídá za precipitaci a vytvoření stabilních jader, teplotní gradient má vliv na kondenzaci kapaliny či na kondenzaci molekul z plynu.

Tvorba krystalů se skládá ze tří fází, těmi jsou nukleace, růst krystalů a poslední fází je ukončení růstu krystalů.

Při nukleaci dochází ke kontaktu molekul, iontů. Aby mohlo dojít ke kontaktu, musí být částice vhodně orientovány. Poté musí molekuly překonat energetickou bariéru, aby vytvořili periodicky uspořádaný agregát dostatečné velikosti, který je dostatečně stabilní. Tím vzniká precipitát nebo submikroskopické krystalické jádro.

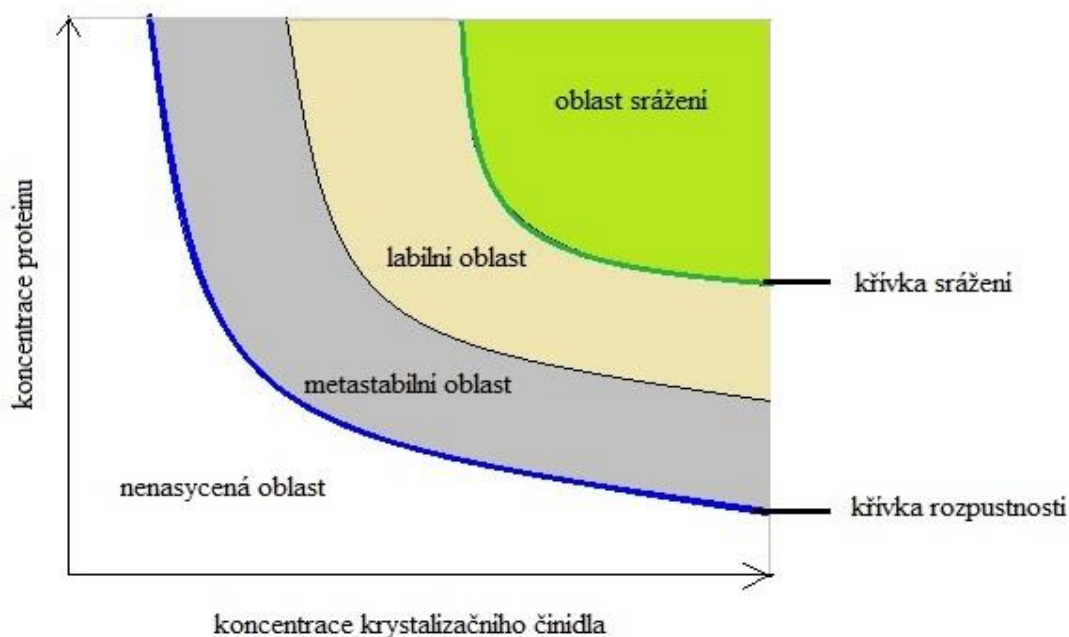
V průběhu druhé fáze, tedy růstu krystalů, dochází k interakci molekul, iontů s povrchem jádra, kde dojde k jejich uspořádání. Růst krystalů závisí na rychlosti difúze molekul v oblasti, kde roste krystal a rychlostí, kterou se odčerpává pevná fáze z roztoku. Pokud je rychlost odčerpávání pevné fáze z roztoku nízká, nedochází k tvorbě krystalických jader. Krystaly tedy vůbec nerostou nebo rostou příliš pomalu. V opačném případě, kdy je rychlost odčerpávání vysoká, dochází ke vzniku mnoha malých krystalických jader a růst krystalů je extrémně rychlý. Takové krystaly jsou však velmi malé s mnoha defekty. V ideálním případě vzniká menší množství stabilních krystalických jader, z kterých poté rostou krystaly volnou rychlostí. Takovéto krystaly jsou dostatečně velké a bez defektů.

Poslední fází je zastavení růstu krystalů. Zde dochází k zvětšování malých krystalů až do zastavení jejich růstu, kdy mohou vzniknout vhodné „vzorky“ pro rentgenovou strukturní

analýzu. Může však docházet i ke vzniku obrovského množství malých mikrokrystalů nebo ke vzniku velkých multikrystalických agregátů. Pokud dojde k vytvoření nekystalického gelu, amorfního pudru nebo roztok zůstane čirý, nemohou být získána žádná data (Kutá Smatanová, 2003).

2.2. Princip krystalizace

Pro lepší objasnění způsobu vzniku krystalických jader a jejich následného růstu lze použít fázový diagram, znázorněný na Obr. 1. Diagram je v podstatě 2D graf, který znázorňuje rozpustnost proteinu v závislosti na parametru roztoku, například na koncentraci srážecího činidla. Diagram lze rozdělit na dvě oblasti pomocí křivky rozpustnosti. Jednou z oblastí je nenasycený stav, kdy je všechen protein rozpuštěn v roztoku a tedy nemůže dojít ke krystalizaci. Druhá oblast se skládá z dalších tří podoblastí, které jsou od sebe odděleny na základě supersaturace (= přesycení roztoku). V metastabilní oblasti neboli oblasti nižšího přesycení, dochází k podpoře růstu krystalů, bohužel nedochází ke spontánní nukleaci. K nukleaci by docházelo pouze při zavedení částic do vzorku nebo pokud by byla indukována vibracemi. Velikost této zóny závisí na rozpustnosti proteinu, pokud je rozpustnost proteinu nižší, je zóna větší. Další oblastí je labilní oblast, oblast středního přesycení. V této části dochází k nukleaci a růstu krystalů. Ve třetí oblasti, tedy v precipitační oblasti (oblast velkého přesycení), se vytváří amorfní agregáty (Asherie, 2004).



Obr. 1: Fázový diagram.

2.3. Test před krystalizací

Před započítím krystalizace je vhodné provést pre-krystalizační test. Cílem testu je stanovení vhodné koncentrace proteinového vzorku. Pro krystalizaci je velmi důležité, aby byla hodnota koncentrace vzorku co nejvyšší, a tím mohlo dojít ke vzniku sraženin. V případě nízké koncentrace proteinu ke vzniku sraženin nedojde, zůstanou jen čiré kapky. Uskutečněním testu před krystalizací dochází k minimalizaci výskytu čirých kapek, čímž se zvyšuje procento úspěšnosti při vzniku vhodných krystalů pro následnou rentgenovou difrakční analýzu (katalog Hampton Research, 2015).

Společnost Hampton Research (USA) poskytuje sadu 4 unikátních činidel nazvanou PCT. Pomocí této sady lze určit vhodné podmínky pro daný protein. Nejprve se pomocí prvních dvou činidel zjistí, zda je protein ve vyhovující koncentraci a vhodný pro krystalizaci. Zbývající dvě činidla se využívají, pokud je protein citlivý na koncentraci soli a polymeru. Po výsledku tohoto testu může být potřeba využít další testy, kterými jsou např. dynamický rozptyl světla nebo gelová elektroforéza (katalog Hampton Research, 2015).

2.4. Krystalizační metody

Pro krystalizaci proteinu lze využít mnoho různých krystalizačních technik. Nejvíce využívaná technika je založena na difúzi par. Při této technice se malé množství proteinu (obvykle 2-10 μl) smíchá se stejným nebo podobným množstvím krystalizačního činidla (sůl, srážecí činidlo, pufr) a nanese se na krycí sklíčko. Sklíčkem se poté přikryje reservoár, který obsahuje 500-1000 μl krystalizačního roztoku. Rozdíl mezi koncentrací kapky a roztokem v reservoáru vede celý systém k dosažení rovnováhy pomocí difúze.

V ideálním případě, kdy je proteinový roztok přesycený, se krystaly začnou tvořit ihned, jak jsou proteinový i srážecí roztok v reservoáru blízko dosažení rovnováhy (Bergfors, 1999).

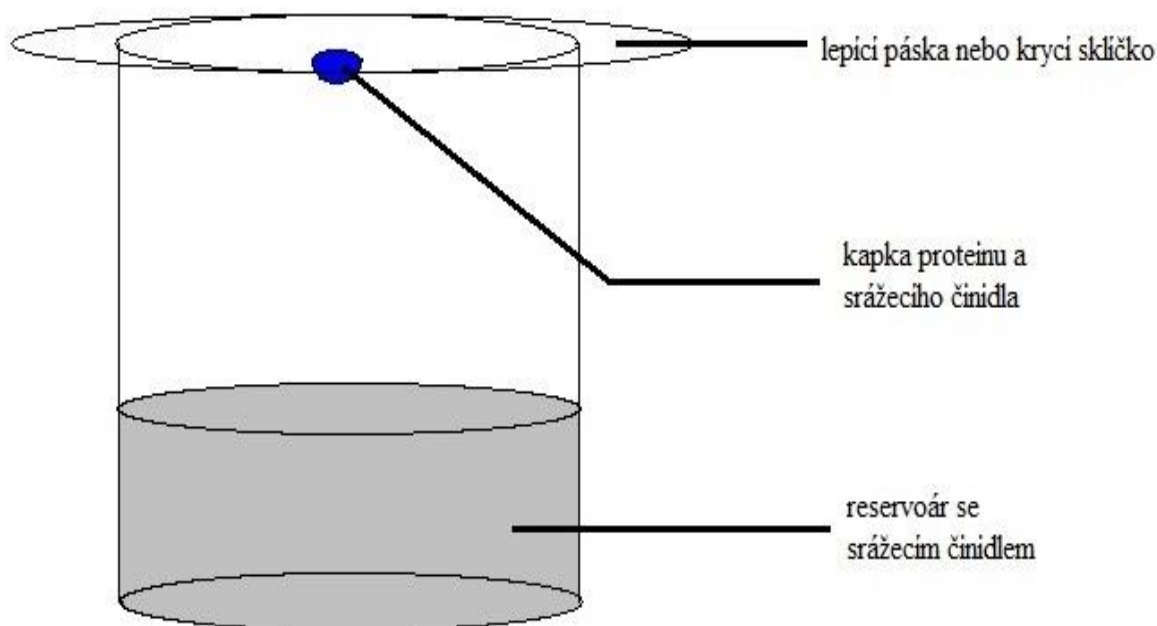
Tuto techniku lze rozdělit na další metody a to podle umístění kapky.

2.4.1. Hanging drop

Metoda „hanging drop“, neboli metoda visící kapky, je využívána především pro menší objemová množství. Kapka je tvořena roztokem od několika μl až do 20 μl . Tvar kapky velmi ovlivňuje míru formování jádra a následný tvar krystalu, je tedy velmi důležité, jak je kapka nanášena.

Principem metody je, že se na krycí sklíčko nanese malé množství proteinového roztoku, které se smíchá s podobným množstvím krystalizačního činidla. Takto připraveným sklíčkem se zakryje reservoár s daným množstvím krystalizačního činidla (Bergfors, 1999). Poté dochází ke krystalizaci.

Na obrázku č. 2 je znázorněno schéma metody hanging drop.



Obr. 2: Schéma metody hanging drop.

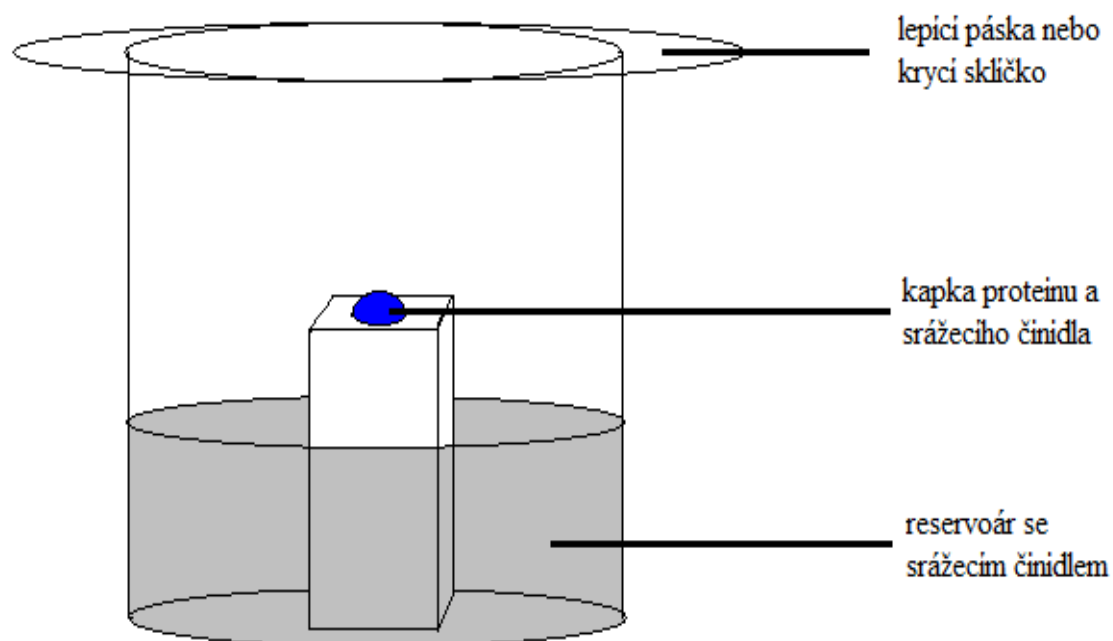
2.4.2. Sitting drop

Metoda „sitting drop“, neboli metoda sedící kapky, je využívána, pokud je objem větší než 20 μl nebo v případě, že se v roztocích v kapce vyskytují detergenty nebo organická rozpouštědla. Jejich přítomnost snižuje povrchové napětí. Kapka může „sedět“ na plastovém mikromůstku nebo na skleněné tyčince.

Principem metody je, že se kapka proteinového roztoku s krystalizačním činidlem nanese na skleněnou tyčinku v reservoáru a reservoár se naplní daným množstvím krystalizačního činidla. Soustava se poté přikryje krycím sklíčkem nebo lepicí páskou, aby nedocházelo k vypařování vzorků nebo k jejich znehodnocení

Nevýhodou této metody je, že za některých podmínek např.: při dlouhodobém trvání experimentu může dojít k pokrytí povrchu kapky filmem, tvořeným denaturovaným proteinem. U metody visící kapky není běžné, aby došlo k pokrytí kapky tímto filmem. Tento problém lze vyřešit využitím metody sandwich drop (Bergfors, 1999).

Na obrázku č. 3 je znázorněno schéma metody sitting drop.



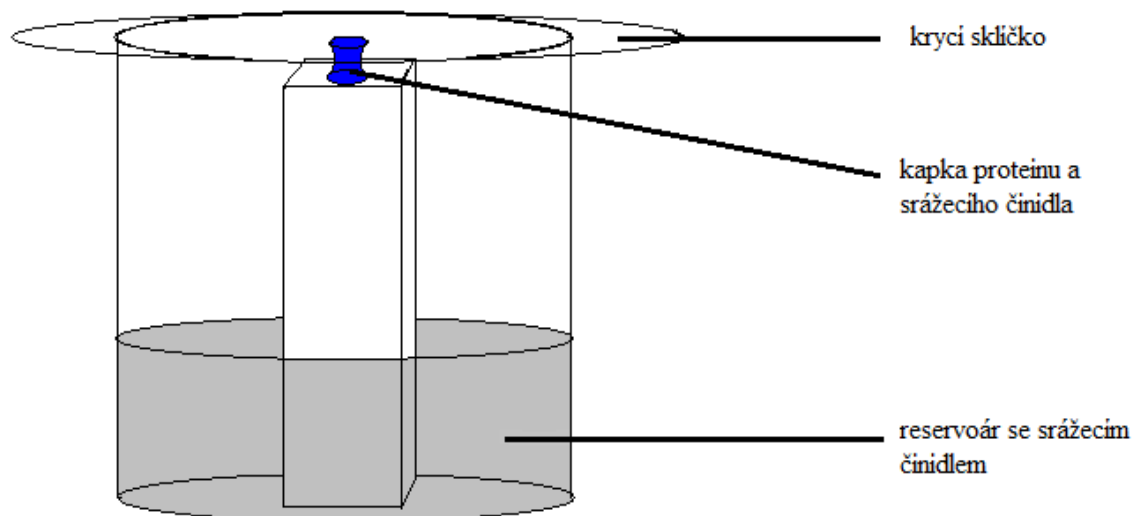
Obr. 3: Schéma metody sitting drop.

2.4.3. Sandwich drop

Metoda „sandwich drop“, neboli metoda sendvičové kapky, je založena na principu sevření kapky proteinového roztoku a krystalizačního činidla mezi 2 sklíčka.

Tato metoda je využívána jen zřídka, ale je výhodná, jelikož nedochází k vysoké expozici na vzduchu. To má za následek pomalejší difúzi, čímž je zajištěno stabilnější prostředí pro růst krystalů, než je u metody visící nebo sedící kapky (Bergfors, 1999).

Tato metoda je více časově náročná než předešlé metody, což lze považovat za nevýhodu. Na obrázku č. 4 je znázorněna metoda sandwich drop.



Obr. 4: Schéma sandwich drop.

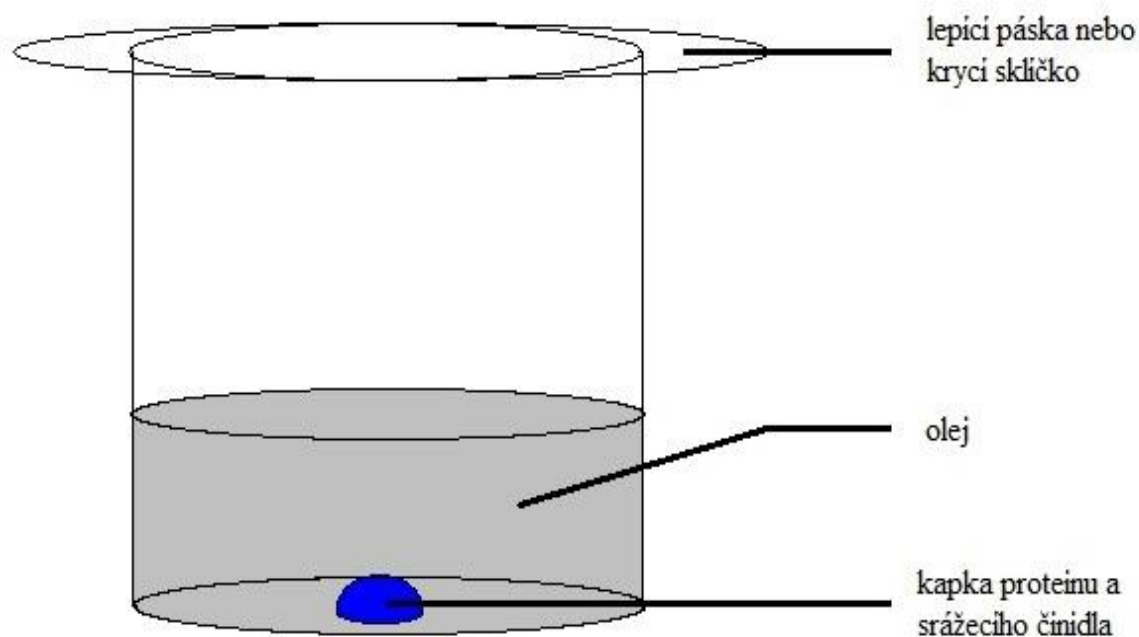
Dalším způsobem jak krystalizovat protein je využít krystalizace pod olejem.

2.4.4. Mikrokrystalizace pod olejem

Výhodou této metody je nižší spotřeba vzorků, omezení vypařování nebo vysychání vzorku a nepřesnost rozdělování vzorku. Při této metodě se nejprve destička rovnoměrně pokryje malou vrstvou parafinového a/nebo silikonového oleje, do jamek se pak aplikují kapky se vzorkem. Před aplikací kapky se smíchá proteinový roztok s krystalizačním činidlem.

Další výhodou krystalizace pod olejem je, že vzorek může obsahovat detergenty a že olej nereaguje s běžnými krystalizačními činidly, např.: se solemi, ethylenglykolem, atd.

Mezi nevýhody možno zařadit obtížnou manipulaci s krystaly (Bergfors, 1999). Na obrázku č. 5 je znázorněna metoda mikrokrystalizace pod olejem.



Obr. 5: Mikrokrystalizace pod olejem.

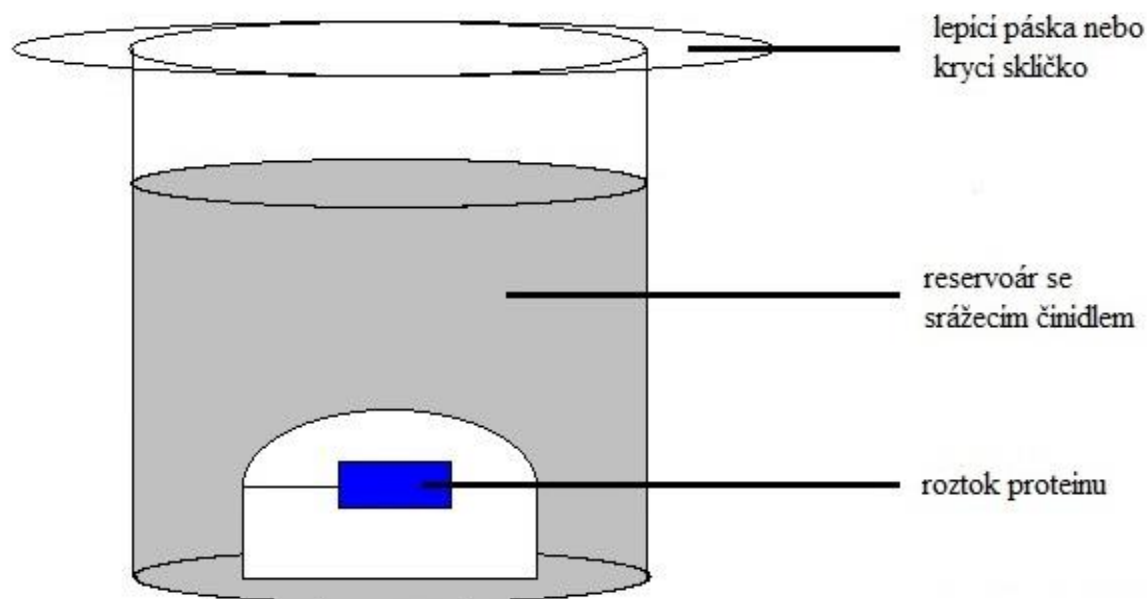
2.4.5. Dialýza

Velmi podobnou metodou založenou na difúzi par je dialýza. Tato metoda využívá dialyzační polopropustnou membránu, která rozděluje roztok proteinu a roztok srážecího činidla. Dialyzační polopropustná membrána, tzv. semi-permeabilní membrána umožňuje průchod malých molekul (ionty, soli, aditiva, krystalizační činidla), ale neumožňuje průchod biologickým makromolekulám. Koncentrace proteinu se při průběhu krystalizace nemění, jelikož dochází k pronikání srážecího činidla do vzorku.

Pro krystalizaci se využívá dialyzační knoflík, do kterého se nanese vzorek proteinu. Dialyzační knoflík je ponořený do roztoku srážecího činidla a s využitím dialyzační polopropustné membrány, se dovnitř dostává krystalizační činidlo nebo jiné látky s malou molekulovou hmotností (katalog Hampton Research, 2015).

Tato metoda je nejvhodnější pro krystalizaci makromolekul, které mají nízkou iontovou sílu, nebo v přítomnosti těkavých činidel, např. při použití alkoholů (Bergfors, 1999; Messerschmidt, 2007).

Na obr. 6 je znázorněno schéma dialýzy.



Obr. 6: Schéma metody dialýza.

2.4.5. Pokročilé krystalizační metody

K pokročilým krystalizačním metodám se řadí metoda volné difúze.

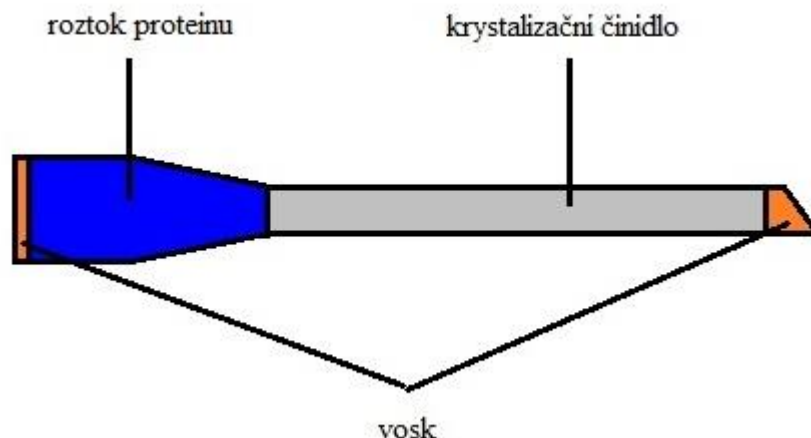
Metoda volné difúze

Metoda volné difúze je založena na volné difúzi mezi roztokem krystalizačního činidla a koncentrovaným roztokem proteinu. Při této metodě se využívají skleněné kapiláry, ve kterých dochází k difúzi a následné krystalizaci. Nejprve dojde k vytvoření rozhraní mezi roztoky, dále do sebe roztoky difundují. Na rozhraní vzniká vysoká supernaturace a začíná tvorba nukleačních jader. Po ustálení rovnováhy se začnou formovat krystaly (Salemme, 1972).

Principem metody je, že se kapilára naplní roztokem krystalizačního činidla. Konec se zalepí voskem, aby nedocházelo k úniku roztoku. Druhým koncem se nanese roztok proteinu a i ten se poté zalepí voskem.

Nevýhodou této metody je velká náročnost.

Na obrázku č. 7 je znázorněno schéma metody volné difúze v kapiláře.

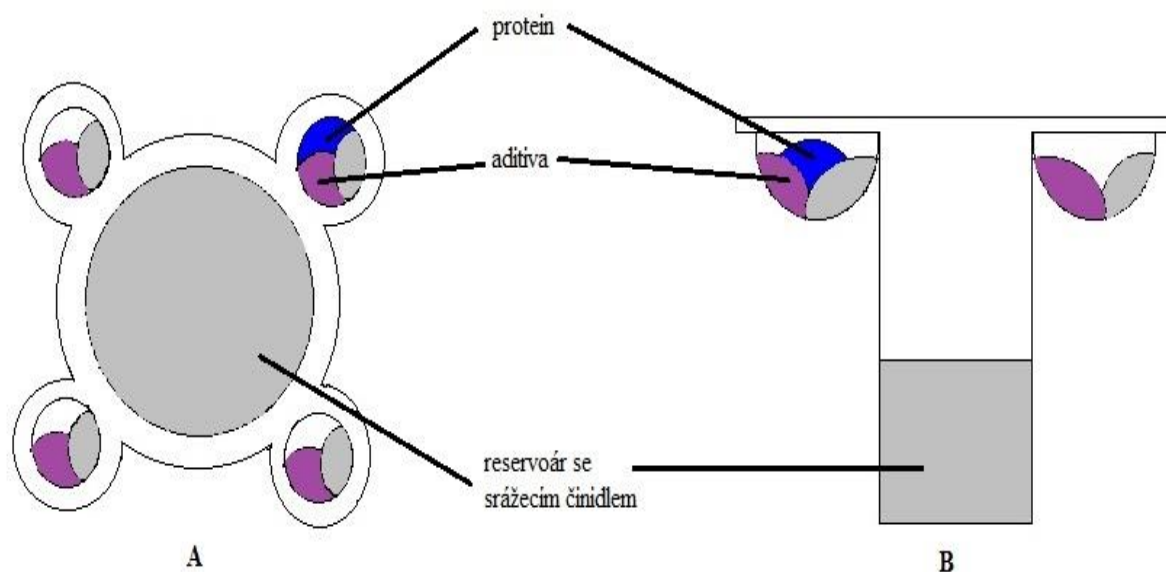


Obr. 7: Schéma metody volné difúze v kapiláře.

2.4.6. Alternativní krystalizační metody

U alternativních krystalizačních metod hrají důležitou roli různá aditiva, která se přidávají k roztokům s cílem zlepšit mezimolekulární interakce mezi makromolekulami, stabilizovat konformaci proteinu a zredukovat mezimolekulární interakce mezi rozpouštědlem a makromolekulami. Jednotlivými aditivami mohou být kofaktory, inhibitory, prostetické skupiny, ionty kovů, substrátové skupiny nebo detergenty, ovlivňující rozpustnost proteinu (McPherson a kol., 2011). Mezi alternativní krystalizační metody využívající aditiva patří metoda křížové krystalizace. Tato metoda byla popsána Tomčovou a Kutou Smatanovou (2006) a spočívá ve využití aditiv, která jsou umístěna ve čtyřech jamkách. V každé jamce se nachází nejen aditivum, ale také krystalizační činidlo. V jedné jamce je navíc přidán i roztok proteinu. Metodu lze využít jak pro krystalizaci formou sedící kapky, tak pro krystalizaci formou visící kapky (Nemčovičová a Kutá Smatanová, 2012).

Schéma metody křížové krystalizace využívající metody sedící kapky je na Obr. 8.



Obr. 8: Schéma metody křížové krystalizace. Pohled ze shora (A) a pohled z boku (B).

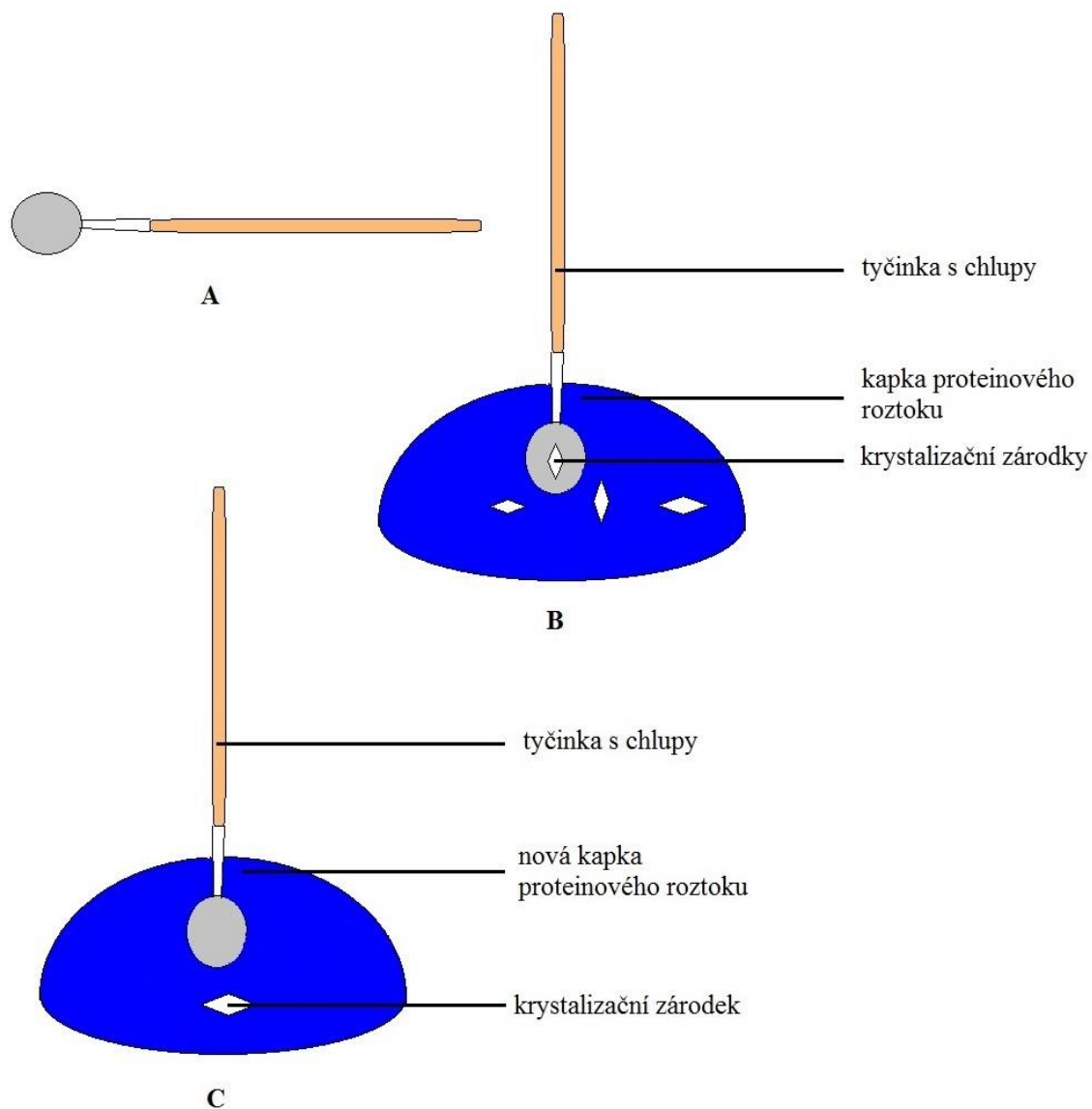
Lze sem také zařadit očkovací techniky, které vedou k získání kvalitnějších a větších krystalů. Tato metoda je založena na oddělení nukleační fáze od fáze růstu krystalů. Dochází k vyjmutí již vzniklých jader krystalů, které jsou poté jako krystalizační zárodky vloženy do nové kapky proteinového roztoku. Nový roztok není přesycený a tím dochází k pomalejšímu a uspořádanému růstu velkých krystalů (Bergfors, 1999).

Mezi očkovací techniky patří vlasové očkování, očkování příbuzným krystalem a homogenní očkování, které se dělí na makroočkování a mikroočkování,

Vlasové očkování

Při této technice se využívají chlupy nebo vousy (např. kočičí), které slouží k zachycení krystalizačních zárodků. Krystalizační zárodky zachycené ve vousech se přenesou do jiného proteinového roztoku. K uvolnění zárodku dojde po přejetí roztoku nové kapky vousem. Jedním vousem je možné naočkovat 3-6 kapek (Bergfors, 1999).

Princip vlasového očkování je znázorněn na Obr. 9.



Obr. 9: Princip vlasového očkování. Tyčinka s chlupy (A), zachycení zárodků v chlupcích (B) a uvolnění zárodků v nové kapce (C).

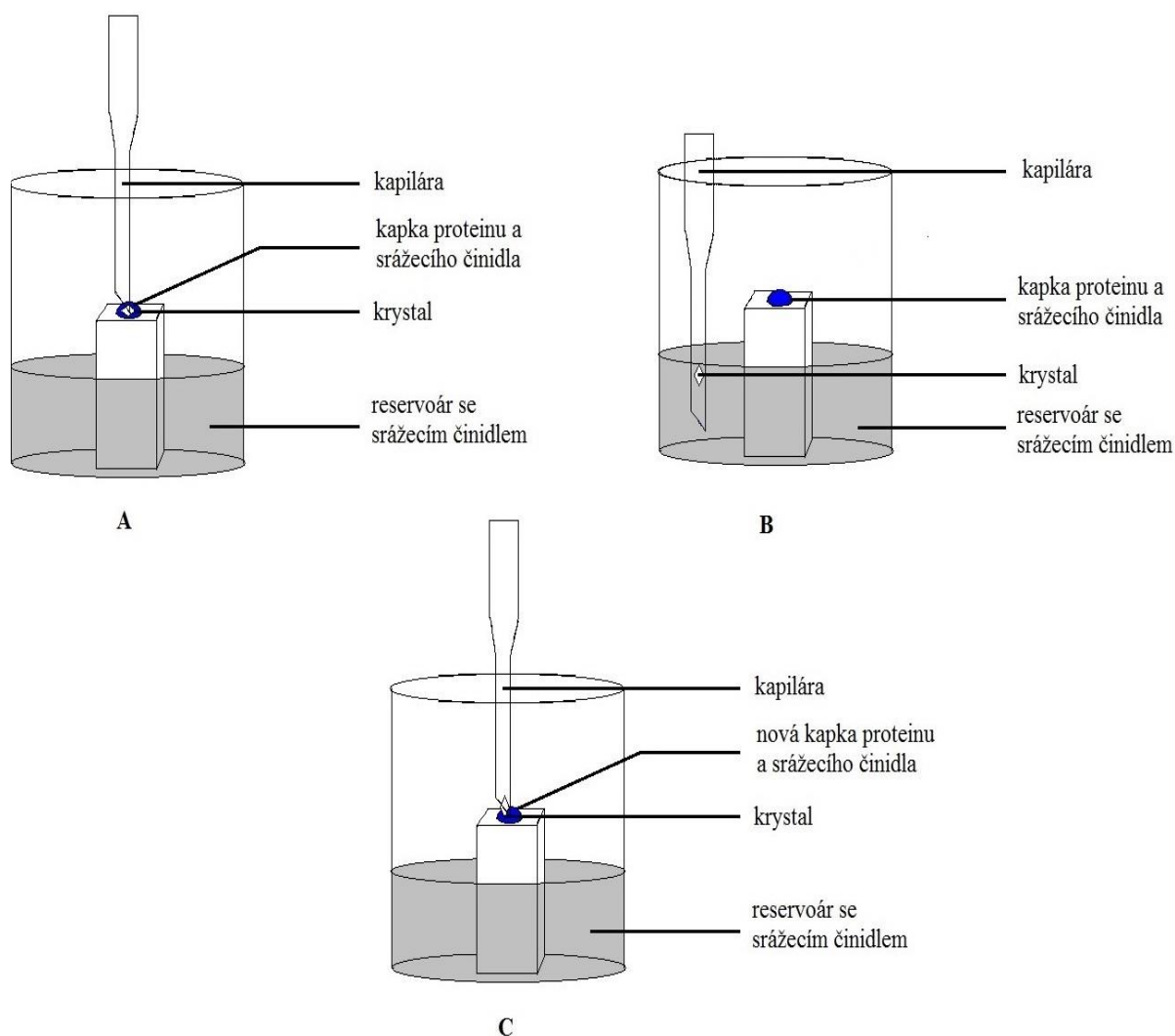
Očkování příbuzným krystalem

V této technice dojde k přenesení krystalizačních zárodků proteinu do nového roztoku podobného proteinu. Jelikož mají proteiny podobné vlastnosti, je hledání krystalizačních podmínek rychlejší (Bergfors, 1999).

Makroočkování

Technika makroočkování spočívá v přenosu krystalů do nového proteinového roztoku. Přenášené krystaly mají velikost od 5 do 50 μm , nejprve jsou vyjmuty z původní kapky a poté opakovaně omývány ve stabilizujících roztocích, nejčastěji v krystalizačním roztoku

z reservoáru. Takto omyté krystaly se následně vkládají do nového roztoku, aby došlo k růstu kvalitního krystalu. Princip makroočkování je znázorněn na Obr. 10.



Obr. 10: Princip makroočkování. Vyjmutí krystalu z původní kapky (A), promývání krystalu v krystalizačním roztoku v reservoáru (B) a vložení krystalu do nového roztoku (C).

Nevýhodou makroočkování je vysoká náročnost (Bergfors, 1999).

Mikroočkování

Stejně jako u makroočkování dochází k přenosu krystalů do nového proteinového roztoku. Zde jsou však krystaly rozdrčeny a dochází ke vzniku ředící sady očkovacích roztoků. Různé koncentrace roztoku jsou napipetovány do nového roztoku proteinu. Výsledkem vhodné koncentrace očkovacího roztoku je vznik menšího počtu velkých krystalů (McPherson, 1999).

K nevýhodám lze zařadit nekontrolovatelnost počtu přenesených mikrokrystalů (Bergfors, 1999).

2.5. Faktory ovlivňující krystalizaci

Faktorů, které ovlivňují průběh krystalizace, existuje velké množství. Tyto faktory ovlivňují nejen tvar a velikost krystalů, ale také jejich kvalitu, rychlost růstu či množství vzniklých krystalů. Již malá změna podmínek může vést k velké změně vlastností budoucího krystalu. Jelikož je každý protein jedinečný, dochází u něj k odlišným reakcím. To je důvodem hledání vhodných podmínek pro každý protein zvlášť, nelze tedy použít jeden postup na všechny proteiny, což je v mnoha případech velmi časově náročné (Kutá Smatanová, 2003).

Krystalizační činidlo

Výběr krystalizačního činidla je velmi důležitý a musí být vybírán empiricky. Jednotlivá činidla lze rozdělit do 4 skupin, podle mechanismu působení: soli (NaCl, MgCl₂), organická rozpouštědla (ethanol, terc-butanol, glukosa, aceton, methanol), organická rozpouštědla tvořící polymery (polyethylenglykol) a povrchově aktivní látky (Grilliland a kol., 1994). Hlavní funkcí krystalizačního činidla je narušení vazeb v proteinu a vznik uspořádaných krystalů. Volba činidla také závisí na izoelektrickém bodu (pI) nebo na jeho koncentraci (Bergfors, 1999).

Mezi nejvyužívanější krystalizační činidla patří podle Biological Macromolecule Crystallization Database (1995) síran amonný a polyethylenglykoly (PEG) 4000-8000 (Grilliland a kol., 1994). Využití PEGů je výhodné především proto, že krystalizace probíhá kratší čas než při použití jiných netěkavých činidel (např. soli) a může být použit nižší rozsah koncentrace krystalizačního činidla (4-18 %) (Kutá Smatanová, 2003).

Teplota

Nelze přesně určit, jaká teplota je pro krystalizaci proteinů tou nejlepší. Ke krystalizaci dochází v teplotním rozmezí od 0°C až do 60°C, nejčastěji se uvádí pokojová teplota nebo teplota 4°C. Nižší teploty jsou vhodné pro tepelně labilní proteiny, které jsou díky nižší teplotě stabilizovány. Nízká teplota také zajišťuje zastavení růstu mikroorganismů (Bergfors, 1999). Krystalizace při pokojové teplotě je velmi výhodná proto, že nedochází ke změně hodnoty pH vlivem teplotních rozdílů (Kutá Smatanová, 2003).

Teplota v průběhu krystalizace ovlivňuje především rozpustnost proteinu. V přítomnosti činidla s nízkou iontovou silou (např. PEG) roste rozpustnost se zvyšující se teplotou. V opačném případě, tedy v přítomnosti krystalizačního činidla s vysokou iontovou

silou, se proteiny rozpouští lépe při nižších teplotách (4°C) než při pokojové teplotě (Bergfors, 1999).

Koncentrace a pH pufru

Pufr se využívá k udržení konstantního pH roztoku a definuje se jako směs kyseliny a její konjugované báze (Bollag a kol., 1996).

Hodnota pH pufru ovlivňuje hlavně počet a kvalitu krystalů. Počet krystalů klesá při snížení hodnoty pH nebo při zvýšení hodnoty pH. Jelikož mohou některé krystaly vznikat při hodnotách pH pod 5,0 nebo nad 9,0, používají se v počátcích široké rozsahy pH v kombinaci roztoků protein-krystalizační činidlo. Nejčastěji však proteiny krystalizují při hodnotě pH 7,0 (Kutá Smatanová, 2003).

V případě, že nejsou známe podmínky, za kterých lze protein vykrystalizovat, lze využít 10 mM HEPES s hodnotou pH 7,0 nebo Tris s hodnotou pH 8,0 (Bergfors, 1999).

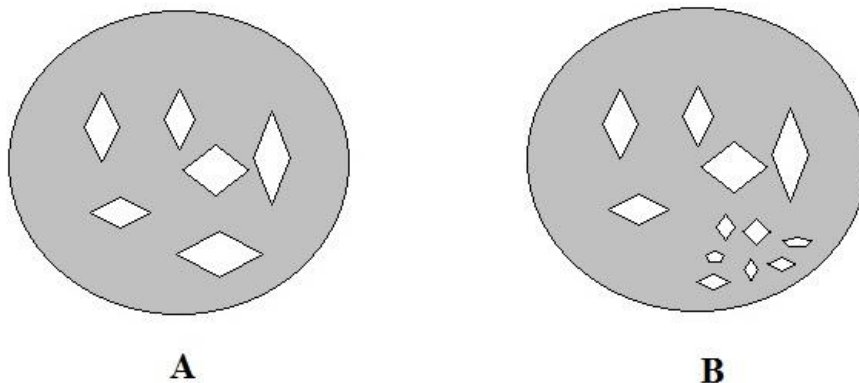
2.6. Testování krystalů

Při krystalizaci proteinů může docházet i ke vzniku nežádoucích krystalů soli. Ke krystalizaci soli může docházet zejména tehdy, když jsou soli smíchány s iontovými pufrů, které obsahují vápenaté ionty, nebo jsou smíchány s organickými molekulami, které mají schopnost změnit rozpustnost jednotlivých složek krystalizačního roztoku. Aby nedocházelo k záměně krystalů, využívá se mnoho testů. Většinou jde o destruktivní metody, které lze tedy využít v případech dostatečného množství krystalů (Kutá Smatanová, 2003).

Test drcením

Při testu drcením dochází k tomu, že se krycí sklíčko, na němž se nachází krystal, umístí pod stereomikroskop a poté se pomocí skleněné kapiláry krystal rozbije. Pokud dojde již po slabém dotyku krystalu k jeho rozpadu na malé kousky, jedná se o krystal proteinu. V případě, že se krystal nerozpadne ani po vynaložení větší síly, či se rozpadne na málo kousků, jedná se o krystal soli (Kutá Smatanová, 2003).

Na Obr. 11 je znázorněn test drcením.



Obr. 11: Test drcením. Krystaly před testem (A) a krystaly po testu (B).

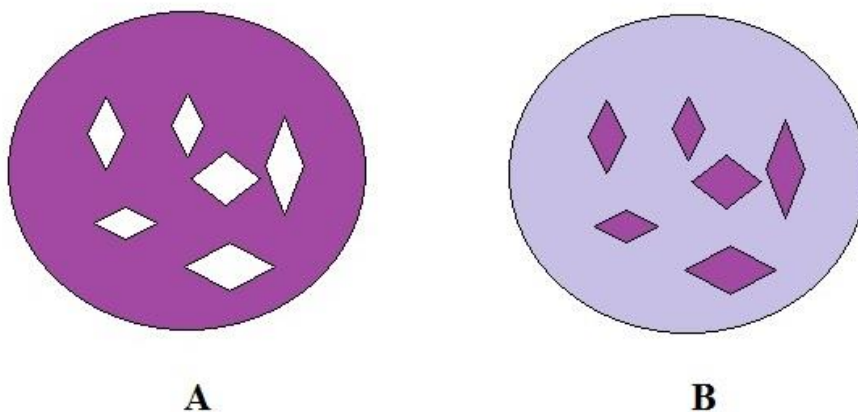
Dehydratační test

Při využití tohoto testu se krystal vyjme pomocí kapiláry z kapky a ponechá se na vzduchu. Pokud dojde po krátké době k jeho rozpadu, jedná se o krystal proteinu. V případě, že se krystal nerozpadne a zůstane neporušen, jedná se o krystal soli (Kutá Smatanová, 2003).

Barvicí test

V případě použití barvicího testu se využívá schopnost barviva *Izit* (Hampton Research, USA) difundovat do krystalu a obarvit ho. Do kapky s krystaly se přidá barvivo a nechá se působit. Pokud dojde k obarvení krystalu, jedná se o krystal proteinu. V případě, že se krystal neobarví, jedná se o krystal soli (Kutá Smatanová, 2003).

Na Obr. 12 je znázorněn barvicí test.



Obr. 12: Barvicí test. Krystaly před testem (A) a krystaly po testu (B).

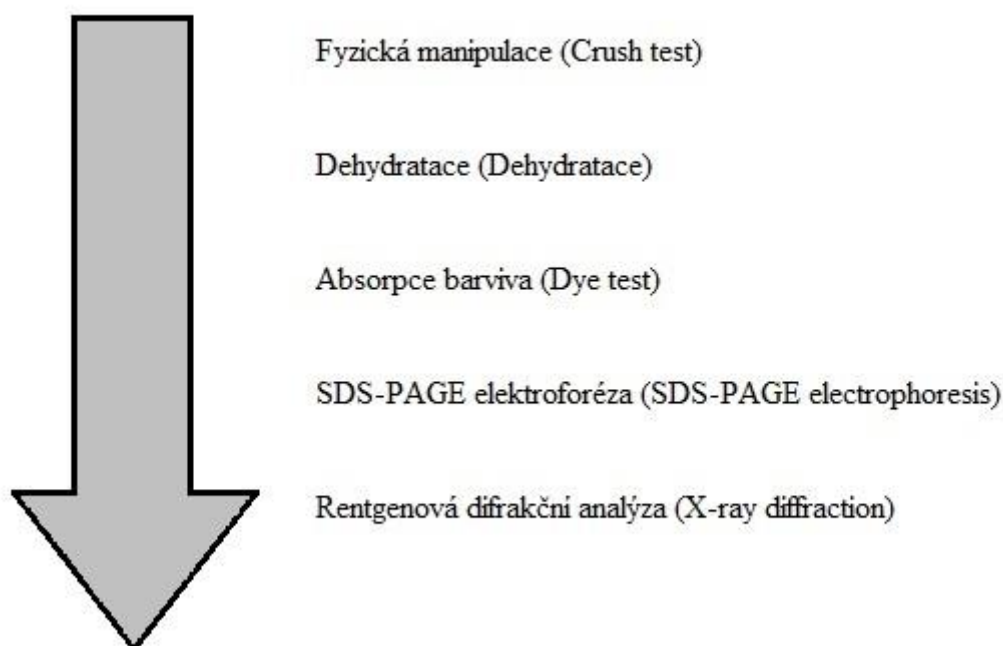
Gelová elektroforéza

Zde dochází k analýze rozpuštěných krystalů. Pomocí tohoto testu lze zjistit i kvalitu proteinu (Kutá Smatanová, 2003). Dojde k rozpuštění získaných krystalů a následně se provede SDS-PAGE elektroforéza. Krystaly proteinu se zachytí na gelu v úrovni molekulové hmotnosti příslušného proteinu. Jedná-li se o krystaly soli, nedojde k zachycení a roztok projde celým gelem (katalog Hampton Research, 2015).

Rentgenová difrakční analýza

Při tomto testu jsou krystaly definitivně otestovány a rozpoznány od krystalů solí a to podle naměřených charakteristik (Kutá Smatanová, 2003). V případě proteinu obsahuje difrakční snímek velké množství difrakcí, které jsou umístěny v soustředných kruzích. Jedná-li se o krystal soli, obsahuje snímek mnohem menší množství difrakcí (Emmer, 2007).

Na Obr. 13 je znázorněna vzrůstající spolehlivost testů.



Obr. 13: Schéma vzrůstající spolehlivosti testů krystalů.

2.7. Halogenalkandehalogenasy

2.7.1. Charakteristika halogenalkandehalogenas

Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5) patří mezi mikrobiální enzymy, které vykazují katalytickou aktivitu pro hydrolytickou přeměnu xenobiotik a toxických alifatických sloučenin na příslušné alkoholy. Jsou schopné štěpit vazbu uhlík-halogen, což je

klíčovým krokem v aerobních mineralizačních procesech mnoha halogenovaných sloučenin, které se vyskytují např. v látkách znečišťujících životní prostředí (Janssen a kol., 2005).

Tyto enzymy se vyskytují zejména v bakteriích žijících v kontaminované půdě, jako je například anaerobně žijící bakteriální kmen bakterie *Xanthobacter autotrophicus*. Tato bakterie využívá halogenové sloučeniny jako zdroj uhlíku a energie. HLDs nebyly nalezeny jen v půdních bakteriích, byly izolovány i u patogenních bakterií, či u bakterií vyskytujících se v mořské vodě (Jesenská a kol., 2005). Další enzymy byly izolovány z rostlinných bakterií, které měli za následek vznik nádorů u rostlin (Hasan a kol., 2011). Pomocí symbiotických bakterií, např. z *Bradirizobium elkanii* USDA94 byly enzymy připraveny experimentálně (Sato a kol., 2005).

Rodina halogenalkanedehalogenas je podle fylogenetické analýzy rozdělena do tří podrodin nazvaných HLD-I, HLD-II a HLD-III (Chovancová a kol., 2007). Z podrodiny HLD-II byly doposud vyřešeny tři krystalové struktury HLDs. Jde o Rv2579 izolovanou z *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mazumdar a kol., 2008), DhaA izolovanou z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (Newman a kol., 1999) a LinB z *Sphingobium japonicum* UT26 (Marek a kol., 2000).

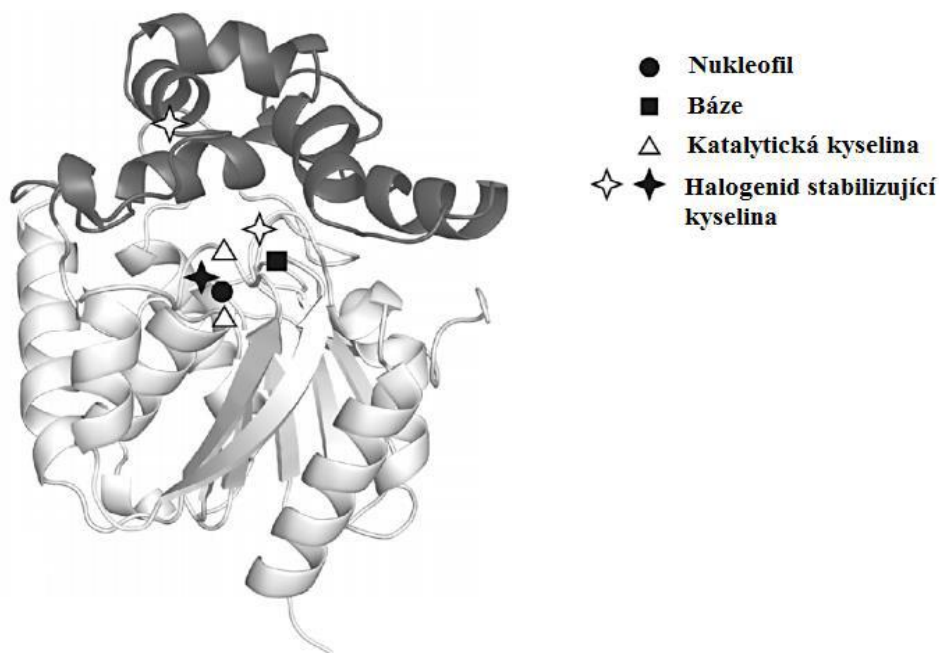
Vyřešením těchto krystalových struktur bylo ukázáno, že celkové složení všech enzymů podrodiny HLD-II se v podstatě neliší. Enzymy z této podrodiny se skládají ze dvou domén a to z hlavní domény a z vrchní cap domény, která obsahuje pentádu Asp-His-Glu+Asn-Trp. DbjA izolovaná z *Bradyrhizobium japonicum* USDA94 a další tři mutantní formy DhaA byly nedávno vykrytalizovány, a jejich krystalová struktura byla deponována do PDB a publikována (Sato a kol., 2007; Stsiapanava a kol., 2008, Stsiapanava a kol. 2010).

2.7.2. Struktura halogenalkandehalogenas

V současné době je známo 17 krystalových struktur, jejichž analýzou bylo zjištěno, že všechny HLDs mají velmi podobnou strukturu. HLDs patří svou strukturou do proteinové superrodiny α/β hydrolas (Janssen a kol., 2005). Tyto hydrolasy se skládají ze dvou domén. Z hlavní domény a z vrchní cap domény. Hlavní doména je tvořena jádrem proteinu a skládá se z osmi centrálních β -skládaných listů. Sedm z těchto listů je složených paralelně, osmý je antiparalelní. Listy jsou olemovány a po stranách spojeny šesti α -šroubovicemi. Dohromady vytváří hydrofobní aktivní místo, které plní dehalogenační funkci. Šroubovitou oblastí cap domény jsou obě domény spojeny. Cap doména je tvořena 4-5 α -šroubovicemi spojenými smyčkami a je flexibilní (Damborský a kol., 2010; Otyepka a kol., 2002).

Aktivní místo obsahuje tzv. katalytickou pentádu, sadu pěti aminokyselin, které plní katalytickou funkci v HLDs. Katalytická pentáda je tvořena katalytickou triádou (nukleofil, katalytická báze a katalytická kyselina) a dvojicí halogenid-stabilizujících aminokyselin. Složení katalytické pentády určuje rozdíl mezi jednotlivými podrodinami HLDs. Všechny podrodiny obsahují stejný základ a to triádu Asp-His-Asp. V podrodině HLD-I se nachází pětice Asp-His-Asp+Trp-Trp, u HLD-II a HLD-III je Trp nahrazen Asn, obsahují tedy Asp-His-Asp+Trp-Asn. HLD-II a HLD-III se navzájem liší pouze enzymy, které místo Tyr využívají Trp jako halogenid-stabilizující reziduum (Chovancová a kol., 2007). Hlavním významem aktivního místa je hydrolýza HLDs (Damborský a kol., 2010).

Aktivní místo je s okolím spojeno tunely, které hrají důležitou roli při substrátové specifitě. Tyto tunely vybírají substráty, které se navážou do aktivního místa a také se podílí na odchodu produktů vzniklých při dehalogenačních reakcích (Damborský a kol., 2010). Obr. 14 znázorňuje strukturu halogenalkandehalogenas.

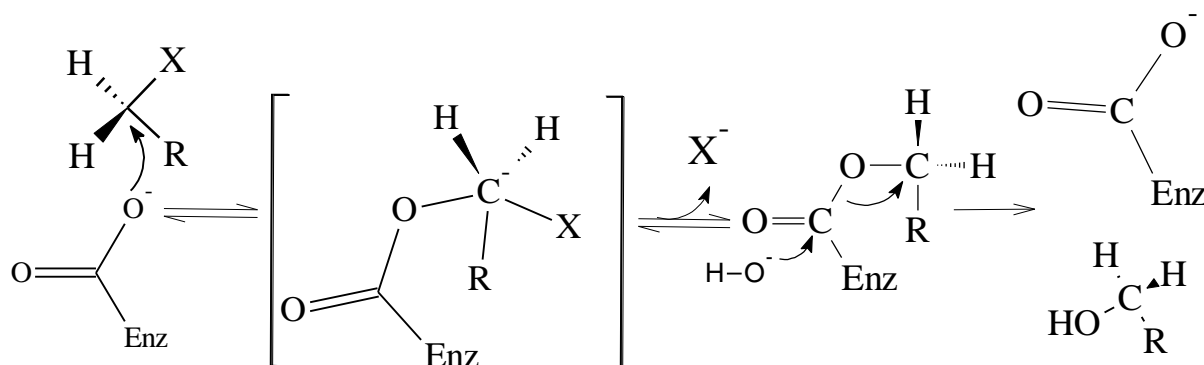


Obr. 14: Terciální struktura halogenalkandehalogenas (Převzato z Damborský a kol., 2010). Hlavní doména je znázorněna bíle, cap doména černě. Plné symboly označují aminokyseliny katalytické pentády (nukleofil, bázi a jednu halogenid-stabilizující aminokyselinu). Katalytická kyselina a druhá halogenid-stabilizující aminokyselina, která se liší v jednotlivých halogenalkandehalogenas, je označena prázdnými symboly (Damborský a kol., 2010).

2.7.3. Reakční mechanismus halogenalkandehalogenas

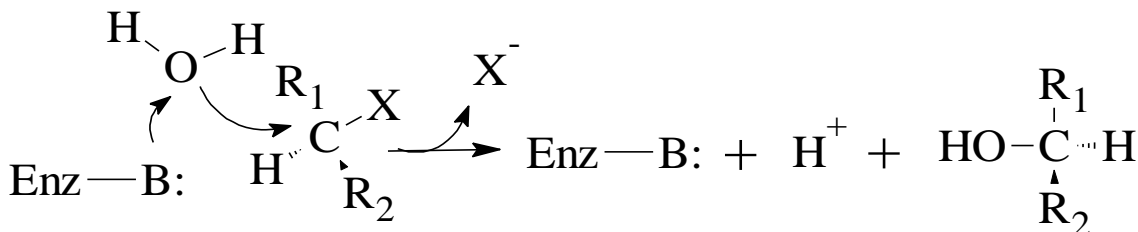
Katalytický mechanismus HLDs byl zkoumán mnoha různými technikami např. byly provedeny krystalografické studie (Prokop a kol., 2010; Marek a kol., 2000) či molekulové modelování (Banás a kol., 2006; Nergi a kol., 2007; Silberstein a kol., 2007). Díky struktuře halogenalkandehalogenasy izolované z *Xantobacter authrophicus* kmene GJ10 byl poprvé popsán reakční mechanismus HLDs (Verschueren a kol., 1993).

Hydrolytickou dehalogenaci popisují dva reakční mechanismy. Jedním z nich je bimolekulární nukleofilní substituce (S_N2). Nejprve dojde k nukleofilnímu ataku atomu uhlíku, který nese halogenový substituent, kyslíkem karboxylové skupiny Asp124. Dojde ke vzniku kovalentního meziprojektu, který je následně hydrolyzován. V posledním kroku dochází ke vzniku příslušného primárního alkoholu, iontu vodíku a iontu halogenu (Verscheueren a kol., 1993). Schéma reakčního mechanismu je znázorněno na Obr. 15.



Obr. 15: Schéma reakčního mechanismu bimolekulární nukleofilní substituce (Vytvořeno v programu ChemSketch podle Damborský a kol., 2010).

Druhým mechanismem je bazická katalýza s molekulou vody. Na Obr. 16 je znázorněno schéma reakčního mechanismu.



Obr. 16: Schéma bazické katalýzy (Vytvořeno v programu ChemSketch podle Verschueren a kol., 1993).

Reakční mechanismus HLDs probíhá v podstatě stejně, liší se pouze rychlostí v katalytickém cyklu. Rychlost závisí na katalytické aktivitě, kterou ovlivňuje geometrie

aktivního místa, složení katalytických zbytků, počet a geometrie přístupových tunelů, spojujících aktivní místo s vnějším okolím (Damborský a kol., 2010).

2.8. Protein DbeAwt a DbeA3

DbeAwt je nový enzym, který patří do rodiny halogenalkandehalogenas. Byl izolován z *Bradirhizobium elkanii* USDA94 (Ikeda-Ohtsubo a kol., 2009) a je blíže příbuzný s enzymem DbjA, který byl izolován z *Bradirhizobium japonicum* USDA110. Tyto dva enzymy se shodují v 71% sekvencí (Sato a kol., 2005), mají však rozdílné biochemické vlastnosti (Mozka a kol., 2009). DbeAwt se od DbjA liší menší aktivitou a vyšší specifitou vůči sloučeninám obsahující brom a jod. Dále se liší v teplotním i pH profilu při reakci s 1-jodohexanem (Mozka a kol., 2009).

Gen *dbeA*, izolovaný z *Bradirhizobium elkanii* USDA94 a jeho nukleotidová sekvence byla uložena v DDBJ /GenBank / EMBL pod přihláškou č. AB478942. C-konec genu *dbeA* byl fúzován se sekvencí kódující hexahistidinovou značku, což umožnilo purifikaci kovovou afinitní chromatografií. Rekombinantní gen *dbeA* Δ Cl-His₆ (I44L + Q102H) byl syntetizován uměle (Entelechon, Regensburg, Německo) podle sekvence divokého typu (wt). Syntetizovaný gen byl subklonován do expresního vektoru pET-21b (Novagen, Madison, USA) za použití restričních endonukleáz NdeI a XhoI (Fermentas, Burlington, Kanada) a T4 DNA ligázy (Promega, Madison, USA) (Chaloupková a spol., 2014).

Pro namnožení DbeAwt a DbeA3 byla využity buňky bakterie *Escherichia coli* BL21 (DE3). Odpovídající geny byly přepsány T7 RNA polymerázou, která je vyjádřena isopropyl- β -D-1-thiogalaktopyranosidem (IPTG) schopným vyvolat *lac* UV5 promotor. Buňky obsahující tyto plazmidy byly kultivovány v médiu Luria Broth při 37°C. Když kultura dosáhla optické hustoty 0,6 při vlnové délce 600 nm, byla exprese enzymu (při 20°C) indukována přidáním IPTG do konečné koncentrace 0,5 mM. Buňky byly následně sklizeny a narušeny sonikací pomocí Soniprep 150 (Sanyo Gallenkamp PLC, Loughborough, England). Po centrifugaci na 100 000g po dobu jedné hodiny byl sebrán supernatant. Surový extrakt byl dále purifikován na koloně HiTrap Chelating HP 5 ml, naplněné ionty Ni²⁺ (GE Healthcare, Uppsala, Švédsko). Enzym s označeným His byl vázán na pryskyřici v přítomnosti ekvilibračního pufru (20 mM pufru fosforečnanu draselného pH 7,5; 0,5 M chloridu sodného; 10 mM imidazolu). Nevázané a nespecificky vázané proteiny byly vymyty pufrům obsahujícím 37,5 mM imidazolu. Cílový enzym byl eluován pufrům obsahujícím 300

mM imidazolu. Aktivní frakce byly shromážděny a dialyzovány přes 50 mM fosfátový pufr pH 7,5 přes noc. Enzymy, z nichž oba obsahovaly C-koncový hexahistidylový konec, byly před analýzou skladovány při teplotě 4° C v 50 mM pufru fosforečnanu draselného (Chaloupková a kol., 2014).

3. Materiály a metody

Cílem bakalářské práce bylo nalézt krystalizační podmínky a vykristalizovat protein DbeAwt a jeho mutantní formu DbeA3, patřící mezi halogenalkandehalogenasy.

Pro nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro krystalizaci těchto proteinů byla vybrána metoda sedící a visící kapky. Nalezené krystalizační podmínky byly porovnány a vyhodnoceny. Následně byly krystaly proteinů testovány krystalizačními testy a zaznamenám fázový diagram. Všechny výsledky byly vyfotografovány pro pozdější vyhodnocení.

3.1. SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza patří mezi biochemické metody. Využívá se k separaci proteinů na základě jejich molekulární hmotnosti. Lze ji využít také k zjištění, zda je protein dostatečně čistý a vhodný pro krystalizaci.

Před zahájením krystalizace byla provedena SDS-PAGE elektroforéza DbeAwt a DbeA3, s cílem zjistit, zdali jsou dostatečně čisté pro následnou krystalizaci.

Spodní separační gel byl připraven smícháním chemikálií: 4 ml 30% roztoku akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu; 2,5 ml 1,5 M Tris HCl o pH 8,8; 3,3 ml H₂O; 0,1 ml 10% APS; 0,1 ml 10% SDS a 0,004 ml TEMED. Takto vzniklý roztok se poté pomocí automatické pipety nanese mezi 2 sklíčka v sestavené aparatuře pro SDS-PAGE elektroforézu a nechal 30 minut polymerizovat.

Po polymerizaci spodního gelu byl připraven roztok zaostřovacího gelu a to smícháním těchto chemikálií: 0,33 ml 30% roztoku akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu; 0,25 ml 0,1 M Tris HCl o pH 6,8; 1,4 ml H₂O; 0,02 ml 10% APS, 0,02 ml 10% SDS a 0,002 ml TEMED. Takto vzniklý roztok byl nanesen na spodní gel a do něj byl vložen plastový hřeben, který po polymerizaci gelu vytváří jamky, do kterých se nanáší vzorky proteinů. Po hodině byl gel polymerizovaný a hřeben mohl být vyjmut. Do jamek se poté nanese vzorky proteinů, které se se vzorkovým pufrem smíchaly takto:

- 1, DbeAwt: 6,5 µl destilované vody; 2,5 µl vzorkového pufru; 1 µl DbeAwt
- 2, DbeA3: 6,5 µl destilované vody; 2,5 µl vzorkového pufru; 1 µl DbeA3

Vzorkový pufr byl připraven z těchto chemikálií: 16 ml glycerolu; 2 g 10% SDS; 24 ml 0,5 M Tris HCl o pH 6,8; 0,1% bromfenolové modři a 10 ml β -merkaptoethanolu.

Následovně byla naplněna elektroforetická komora elektrodovým pufrem. Pufr byl připraven smícháním 15,1 g Tris HCl; 72 g glycinu; 5g SDS a 1000 ml H₂O.

Proteiny smíchané se vzorkovým pufrem se zahřívaly při teplotě 65°C po dobu 15 minut.

Do první jamky bylo napipetováno 10 μ l standardu Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific). Standard se využívá jako ukazatel molekulové hmotnosti proteinů v rozmezí od 14,4 kDa do 116 kDa. Vzorky dalších proteinů se vždy pipetovali o objemu 10 μ l a to takto:

První jamka: 10 μ l Standard

Druhá jamka: 6,5 μ l destilované vody; 2,5 μ l vzorkového pufru; 1 μ l DbeAwt

Třetí jamka: 6,5 μ l destilované vody; 2,5 μ l vzorkového pufru; 1 μ l DbeA3

Poté, co byly vzorky naneseny na gel, byla aparatura připojena ke stejnosměrnému elektrickému proudu o napětí 250 V po dobu 30 minut. Následně se gel vyjmul a byl ponechán v nádobě s roztokem barviva Coomassie Brilliant Blue po celou noc. Další den byl gel promyt a poté vložen do odbarvovacího roztoku, který byl připraven z těchto chemikálií: 250 ml ethanolu, 350 ml kyseliny octové a 5000 ml H₂O. Gel byl po několika hodinách vyjmut a poté vyfotografován pro vyhodnocení.

3.2. Krystalizace DbeAwt

3.2.1. Příprava krystalizačního roztoku

Pro krystalizaci proteinu DbeAwt byly pro přípravu 100 ml krystalizačního roztoku využity tyto chemikálie: 1,576 g 100 mM Tris HCl pH 7,5; 20 g 20% PEG 4000 a 2,373 g 150 mM octanu vápenatého. Jednotlivé navážky byly předem vypočteny využitím molárních hmotností jednotlivých látek.

1,576 g 100 mM Tris HCl bylo rozpuštěno v 70 ml destilované vody, pH bylo upraveno pomocí roztoku NaOH na hodnotu 7,5. Nakonec byl roztok doplněn destilovanou vodou do 100 ml. Následně bylo naváženo 2,373 g 150 mM octanu vápenatého. Ten byl rozpuštěn v části vzniklého roztoku Tris HCl. K tomuto roztoku bylo přidáno 20 g 20%

PEG 4000 a vše bylo následně mícháno na elektrické míchače. Po rozpuštění byl roztok doplněn Tris HCl do 100 ml.

3.2.2. Naředění proteinu DbeAwt

Koncentrace roztoku proteinu byla při hledání optimálních podmínek několikrát změněna. Roztok proteinu o původní koncentraci 10,45 mg/ml, byl ředěn roztokem pufru 100 mM Tris HCl pH 7,5.

Protein DbeAwt byl naředěn pro metodu sedící kapky na tyto koncentrace: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l; 7 mg/l a 8 mg/l.

Pro krystalizaci metodou visící kapky byl protein naředěn na: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 8 mg/l; 9 mg/l a 10 mg/l.

3.2.3. Vlastní krystalizace proteinu DbeAwt

Pro krystalizaci proteinu byly využity 2 metody. Metoda visící kapky a metoda sedící kapky. Obě metody byly použity pro krystalizaci při pokojové teplotě 20°C.

Metoda visící kapky

Při této metodě byl protein naředěn na koncentrace: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 8 mg/l; 9 mg/l a 10 mg/l a dále bylo použito předem namíchané krystalizační činidlo (100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM octan vápenatý a 20% PEG 4000).

Poměr množství roztoku krystalizačního činidla a roztoku proteinu byl měněn s cílem nalezení optimálních podmínek pro růst krystalů. V tabulce je uveden poměr množství roztoku proteinu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci metodou visící kapky byla použita jedna destička.

Schéma krystalizační destičky je uvedeno v Tab. 1, reservoár byl naplněn 500 μ l krystalizačního činidla.

	2 mg/ml	3 mg/ml	5 mg/ml	8 mg/ml	9 mg/ml	10 mg/ml
DbeAwt	3 : 2	3 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 2
DbeAwt	4 : 1	4 : 1	4 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1
DbeAwt	2 : 3	2 : 3	2 : 1	2 : 1	2 : 1	2 : 1
DbeAwt	1 : 4	1 : 4	1 : 4	1 : 3	1 : 3	1 : 3

Tab. 1: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda visící kapky.

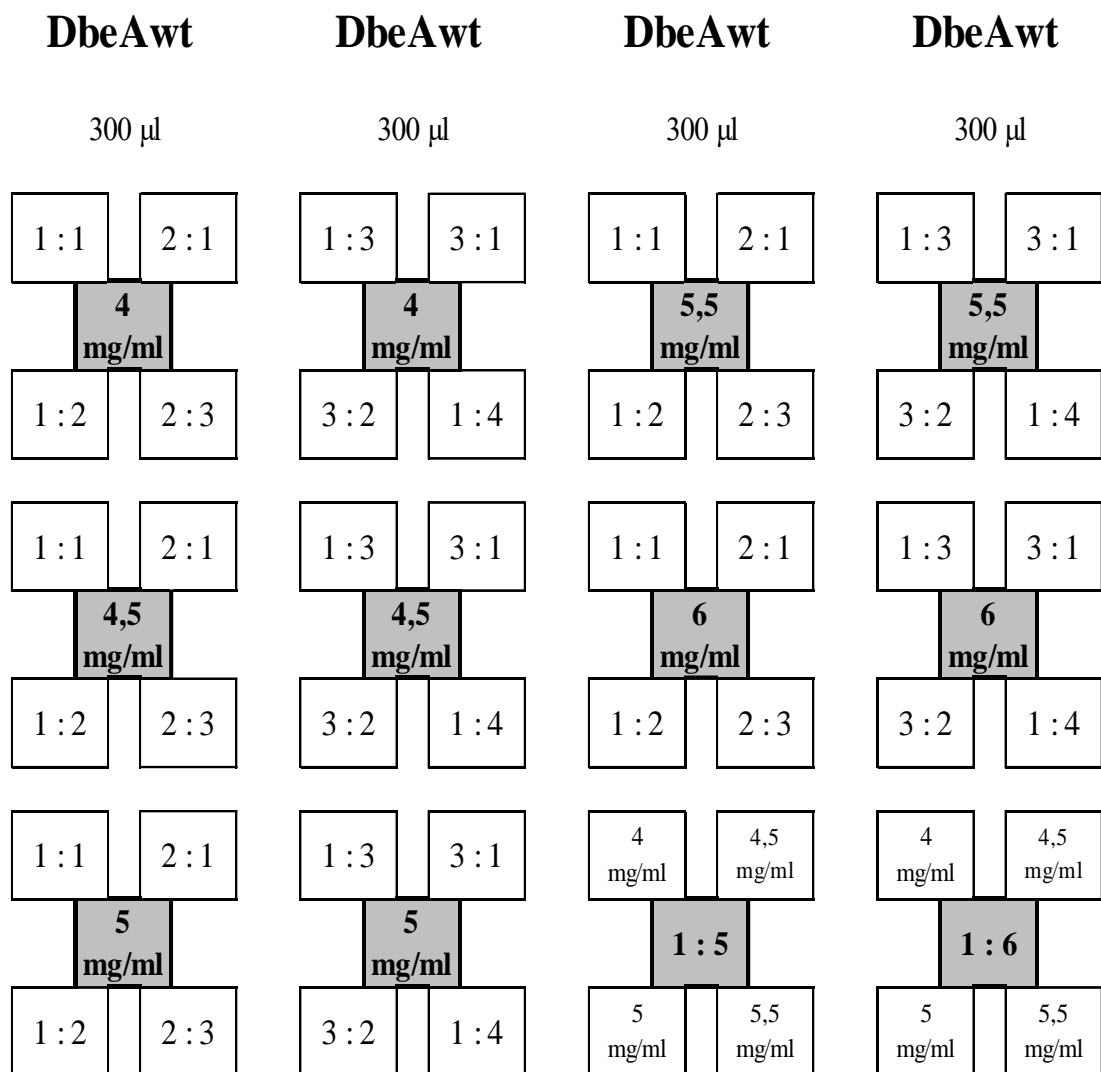
Metoda sedící kapky

Při této metodě byl protein naředěn na koncentrace: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l; 7 mg/l a 8 mg/l a bylo použito předem namíchané krystalizační činidlo (100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM octan vápenatý a 20% PEG 4000).

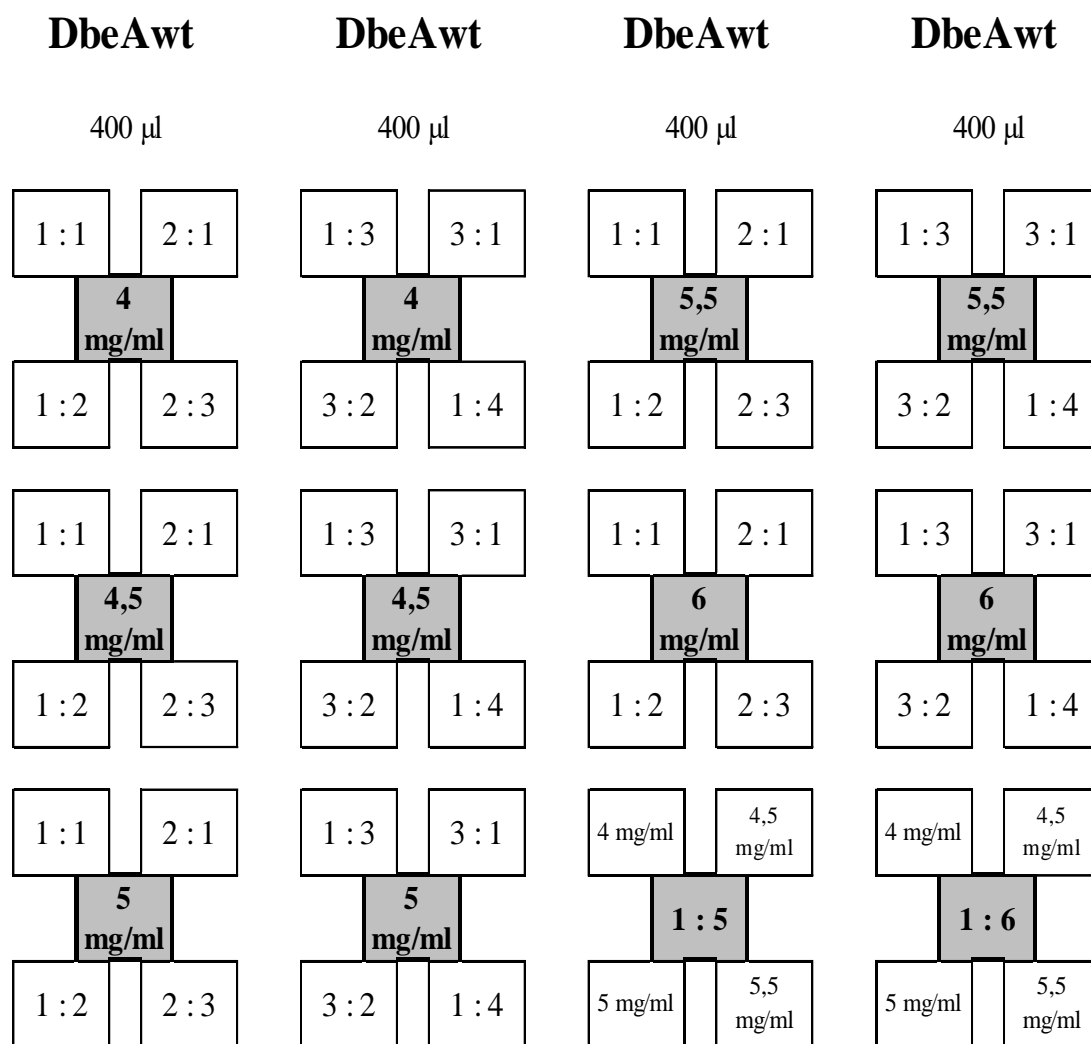
Poměr množství roztoku krystalizačního činidla a roztoku proteinu byl měněn s cílem nalezení optimálních podmínek pro růst krystalů. V tabulkách je uváděn poměr množství roztoku proteinu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci metodou sedící kapky byly použity tři destičky.

Množství krystalizačního činidla a schéma krystalizační destičky je uvedeno v Tab. 2, 3, 4.



Tab. 2: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.



Tab. 3: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.

DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt	
300 μ l		300 μ l		300 μ l		300 μ l	
4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1
2 mg/ml		3,5 mg/ml		5 mg/ml		6,5 mg/ml	
6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1
4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	2 : 1	2 : 1
2,5 mg/ml		4 mg/ml		5,5 mg/ml		7 mg/ml	
6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	3 : 1	3 : 1
4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	4 : 1	5 : 1	2 : 1	2 : 1
3 mg/ml		4,5 mg/ml		6 mg/ml		8 mg/ml	
6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	6 : 1	7 : 1	3 : 1	3 : 1

Tab. 4: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.

3.3. Krystalizace DbeA3

3.3.1. Příprava krystalizačního roztoku

Pro krystalizaci mutantní formy proteinu DbeA3 bylo použito stejné krystalizační činidlo jako v případě krystalizace proteinu DbeAwt. Roztok byl připraven z 1,576 g 100 mM Tris HCl pH 7,5; 20 g 20% PEG 4000 a 2,373 g 150 mM octanu vápenatého.

3.3.2. Naředění proteinu DbeA3

Koncentrace roztoku byla při hledání optimálních podmínek několikrát změněna. Roztok proteinu o původní koncentraci 13,2 mg/ml, byl ředěn roztokem 100 mM Tris HCl pH 7,5. Jednotlivé koncentrace proteinu jsou uvedeny v tabulkách vlastní krystalizace proteinu.

Protein DbeA3 byl naředěn pro metodu sedící kapky na tyto koncentrace: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l a 6,5 mg/l.

Pro krystalizaci metodou visící kapky byl protein naředěn takto: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 10 mg/l; 12 mg/l a 13 mg/l.

3.3.3. Vlastní krystalizace DbeA3

Pro krystalizaci proteinu DbeA3 byla použita metoda visící a metoda sedící kapky. Obě metody byly použity pro krystalizaci při pokojové teplotě 20°C.

Metoda visící kapky

Pro krystalizaci metodou visící kapky byly použity tyto koncentrace proteinu: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 10 mg/l; 12 mg/l a 13 mg/l. Dále bylo použito namíchané krystalizační činidlo (100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM octan vápenatý a 20% PEG 4000).

Poměr množství roztoku krystalizačního činidla a roztoku proteinu byl měněn s cílem nalezení optimálních podmínek pro růst krystalů. V tabulkách je uváděn poměr množství roztoku proteinu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci využívající tuto metodu byla použita jedna destička.

Schéma krystalizační destičky je uvedeno v Tab. 5, reservoár obsahoval 500 μ l krystalizačního činidla.

	2 mg/ml	3 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	12 mg/ml	13 mg/ml
DbeA3	3 : 2	3 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 2	1 : 2
DbeA3	5 : 1	5 : 1	4 : 1	3 : 1	3 : 1	3 : 1
DbeA3	2 : 3	2 : 3	2 : 1	2 : 1	2 : 1	2 : 1
DbeA3	1 : 5	1 : 5	1 : 4	1 : 3	1 : 3	1 : 3

Tab. 5: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda visící kapky.

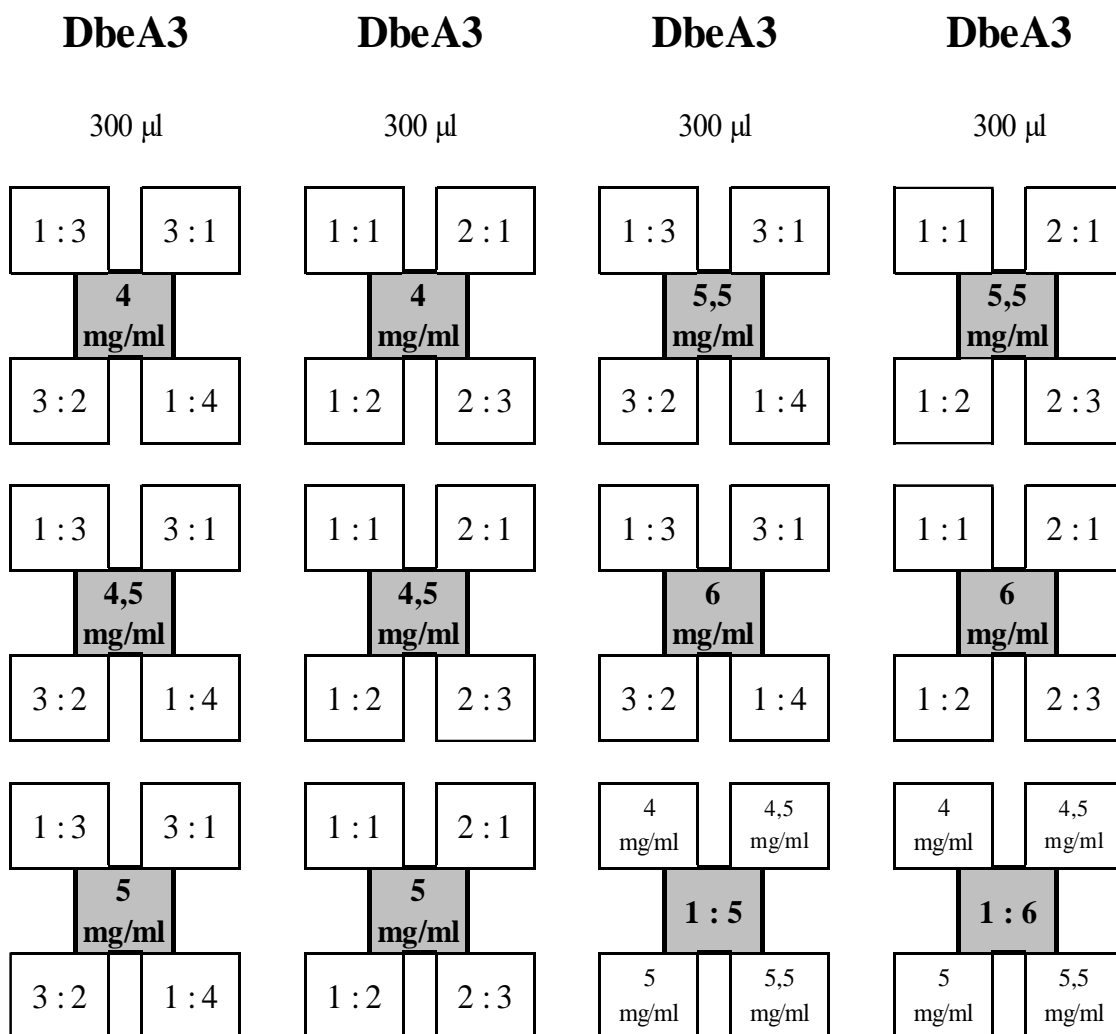
Metoda sedící kapky

Pro krystalizaci metodou sedící kapky byly použity tyto koncentrace proteinu: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l a 6,5 mg/l a bylo použito namíchané krystalizační činidlo (100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM octan vápenatý a 20% PEG 4000).

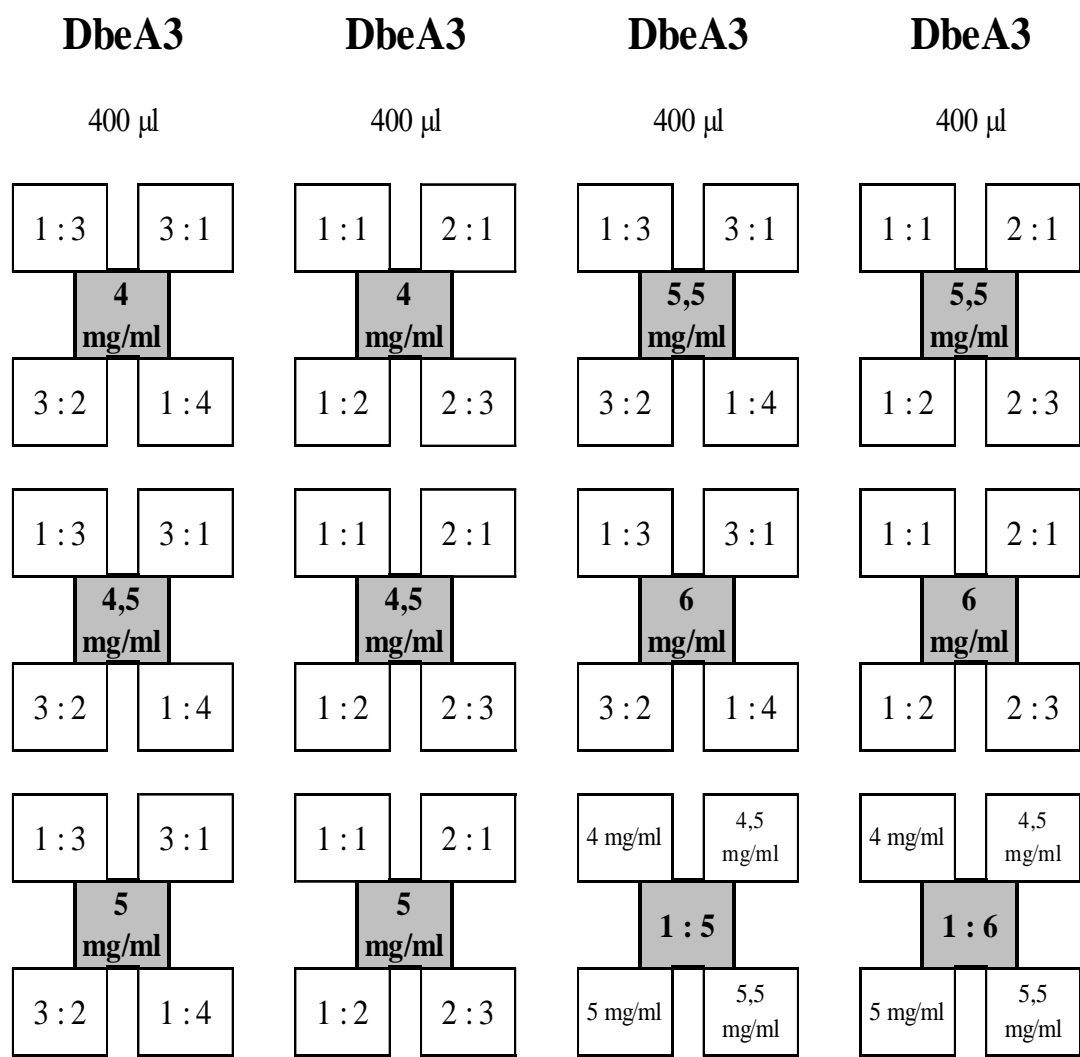
Poměr množství roztoku krystalizačního činidla a roztoku proteinu byl měněn s cílem nalezení optimálních podmínek pro růst krystalů. V tabulkách je uváděn poměr množství roztoku proteinu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci využívající tuto metodu byly použity tři krystalizační destičky.

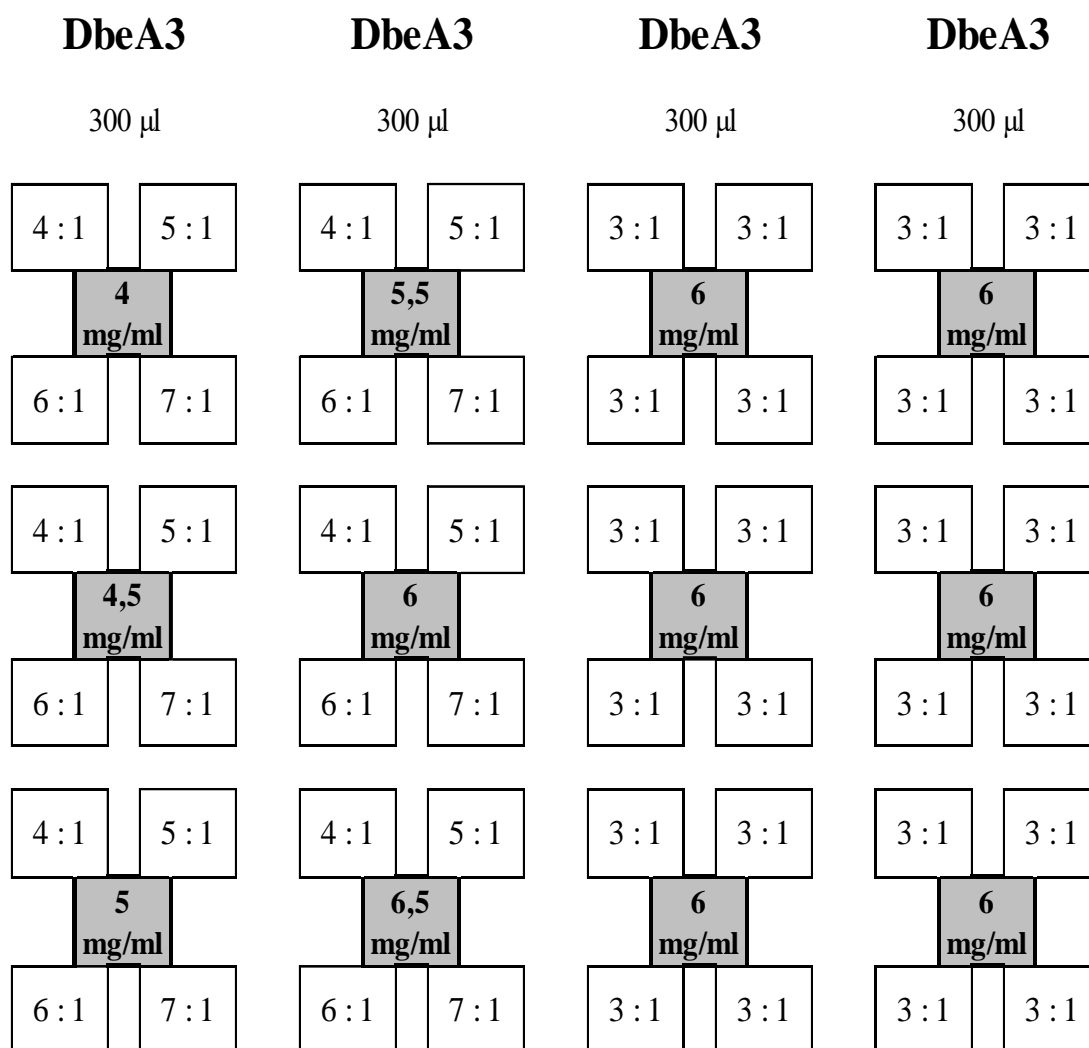
Množství krystalizačního roztoku v reservoáru a schéma krystalizační destičky je uvedeno v Tab. 6, 7, 8.



Tab. 6: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda sedící kapky.



Tab. 7: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda sedící kapky.



Tab. 8: Schéma krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda sedící kapky.

3.4. Testování vzniklých krystalů

Vzniklé krystaly byly testovány s cílem ověřit, že se jedná o krystaly příslušného proteinu a že nedošlo ke vzniku krystalů soli.

3.4.1. Test drcením

Vzniklé krystaly byly testovány drcením pod mikroskopem. V případě přítomnosti krystalů proteinu dojde k rozpadu krystalu již po slabém dotyku. Pokud by byl přítomen krystal soli, nedošlo by k rozpadnutí krystalu, musela by být vynaložena větší síla. Výsledek testu drcením byl vyfotografován pro následující vyhodnocení.

3.4.2. Barvicí test

Pro barvicí test bylo použito barvivo JBS Deep Purple (Hampton Research, USA).

Do destičky s krystaly byl přidán 1 μl barviva. Barvivo se nechalo hodinu působit, aby došlo k obarvení krystalů. V případě, že by se krystaly neobarvily, jednalo by se o krystaly soli. Výsledek barvicího testu byl vyfotografován pro následující vyhodnocení.

3.5. Difrakční data

Vzniklé krystaly proteinů DbeAwt a DbeA3 byly otestovány rentgenovou difrakční analýzou na synchrotronu BESSY-II, který je provozovaný Helmholtz-Zentrum Berlin (Berlin-Adlershof, Německo).

4. Výsledky

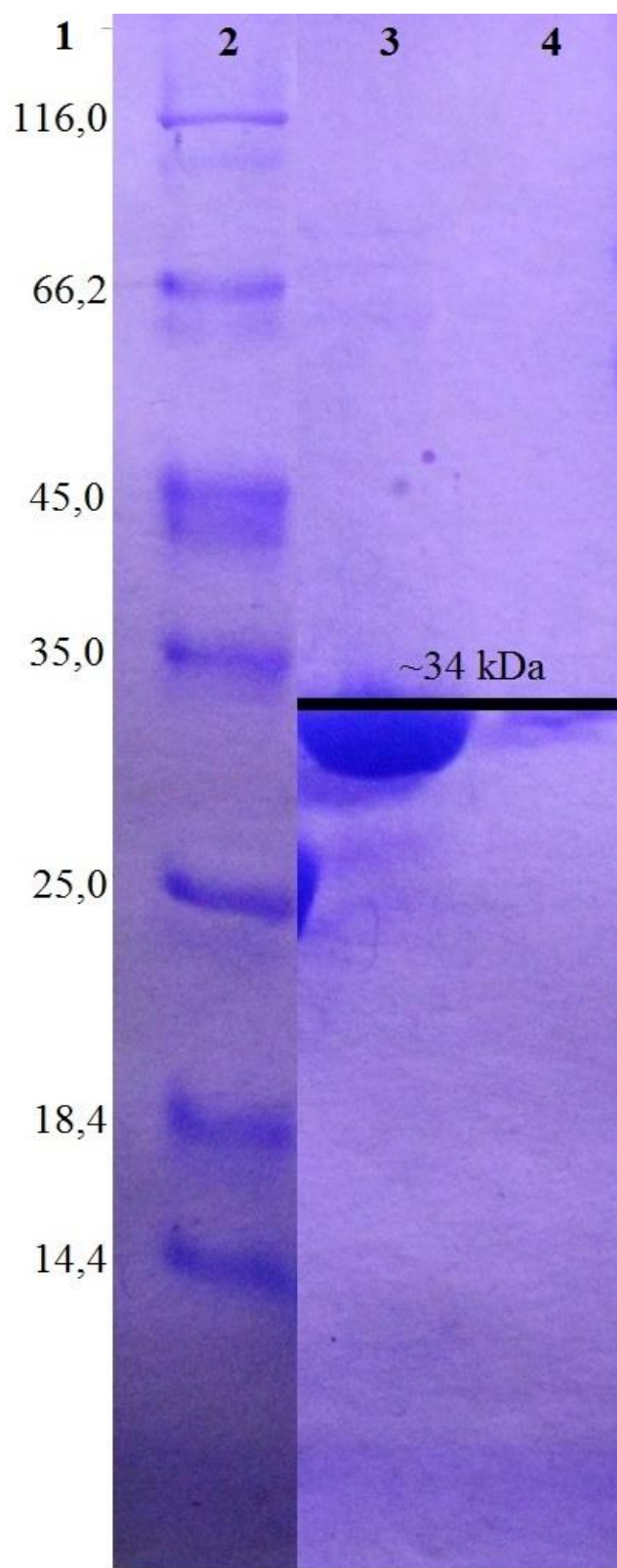
V této části bakalářské práce jsou shrnuty výsledky provedených experimentů, konkrétně: SDS-PAGE elektroforéza, krystalizační experimenty, srovnání podmínek pro krystalizaci proteinů DbeAwt a DbeA3, testování vzniklých krystalů a RTG difrakce proteinů.

Průběh práce a výsledky byly zaznamenávány fotodokumentací pomocí fotoaparátu Olympus (Olympus, Praha), který byl připevněn na mikroskop SZX9 se zvětšením 450x.

4.1. Výsledky SDS-PAGE elektroforézy

Pomocí SDS-PAGE elektroforézy bylo prokázáno, že studované proteiny jsou dostatečně čisté a lze je použít pro následné krystalizační experimenty.

Současně došlo ke stanovení jejich molekulární hmotnosti a to pomocí srovnání hodnot se standardem. Hodnota molekulární hmotnosti DbeAwt byla přibližně 34 kDa a hodnota molekulární hmotnosti DbeA3 byla přibližně 34 kDa. Výsledek SDS-PAGE elektroforézy je na Obr. 17.



Obr. 17: Výsledek SDS-PAGE elektroforézy (sloupec 1: stupnice pro standard v jednotkách kDa, sloupec 2: standard, sloupec 3: vzorek DbeAwt, sloupec 4: vzorek DbeA3).

4.2. Výsledky krystalizace proteinu DbeAwt

Výsledky metody visící kapky

Ke krystalizaci proteinu metodou visící kapky byla využita jedna krystalizační destička. Při této metodě byl roztok proteinu DbeAwt naředěn na koncentrace: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 8 mg/l; 9 mg/l a 10 mg/l, avšak ani v jednom případě nedošlo ke vzniku krystalů. V případě vysoké koncentrace 9 mg/l a 10 mg/l došlo k precipitaci vzorku. Aby nedošlo k další precipitaci, byl roztok proteinu dále ředěn na nižší hodnoty koncentrace.

V případě využití metody visící kapky nebyly získány krystaly pro následnou rentgenovou difrakci.

Výsledky metody sedící kapky

Pro krystalizaci proteinu DbeAwt metodou sedící kapky byly použity tři krystalizační destičky. Při této metodě byl roztok proteinu naředěn na koncentrace: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l; 7 mg/l a 8 mg/l.

Krystaly, které byly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu, vznikly za podmínek zvýrazněných žlutě v Tab. 9, 10, 11

DbeAwt	DbeAwt	DbeAwt	DbeAwt																								
300 μ l	300 μ l	300 μ l	300 μ l																								
<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	4 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	4 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	5,5 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	5,5 mg/ml		3:2	1:4
1:1	2:1																										
4 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
4 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
5,5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
5,5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	4,5 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	4,5 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">6 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	6 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">6 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	6 mg/ml		3:2	1:4
1:1	2:1																										
4,5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
4,5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
6 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
6 mg/ml																											
3:2	1:4																										
<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	5 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	5 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>4 mg/ml</td><td>4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td colspan="2">1:5</td></tr> <tr><td>5 mg/ml</td><td>5,5 mg/ml</td></tr> </table>	4 mg/ml	4,5 mg/ml	1:5		5 mg/ml	5,5 mg/ml	<table border="1"> <tr><td>4 mg/ml</td><td>4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td colspan="2">1:6</td></tr> <tr><td>5 mg/ml</td><td>5,5 mg/ml</td></tr> </table>	4 mg/ml	4,5 mg/ml	1:6		5 mg/ml	5,5 mg/ml
1:1	2:1																										
5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
4 mg/ml	4,5 mg/ml																										
1:5																											
5 mg/ml	5,5 mg/ml																										
4 mg/ml	4,5 mg/ml																										
1:6																											
5 mg/ml	5,5 mg/ml																										

Tab. 9: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.

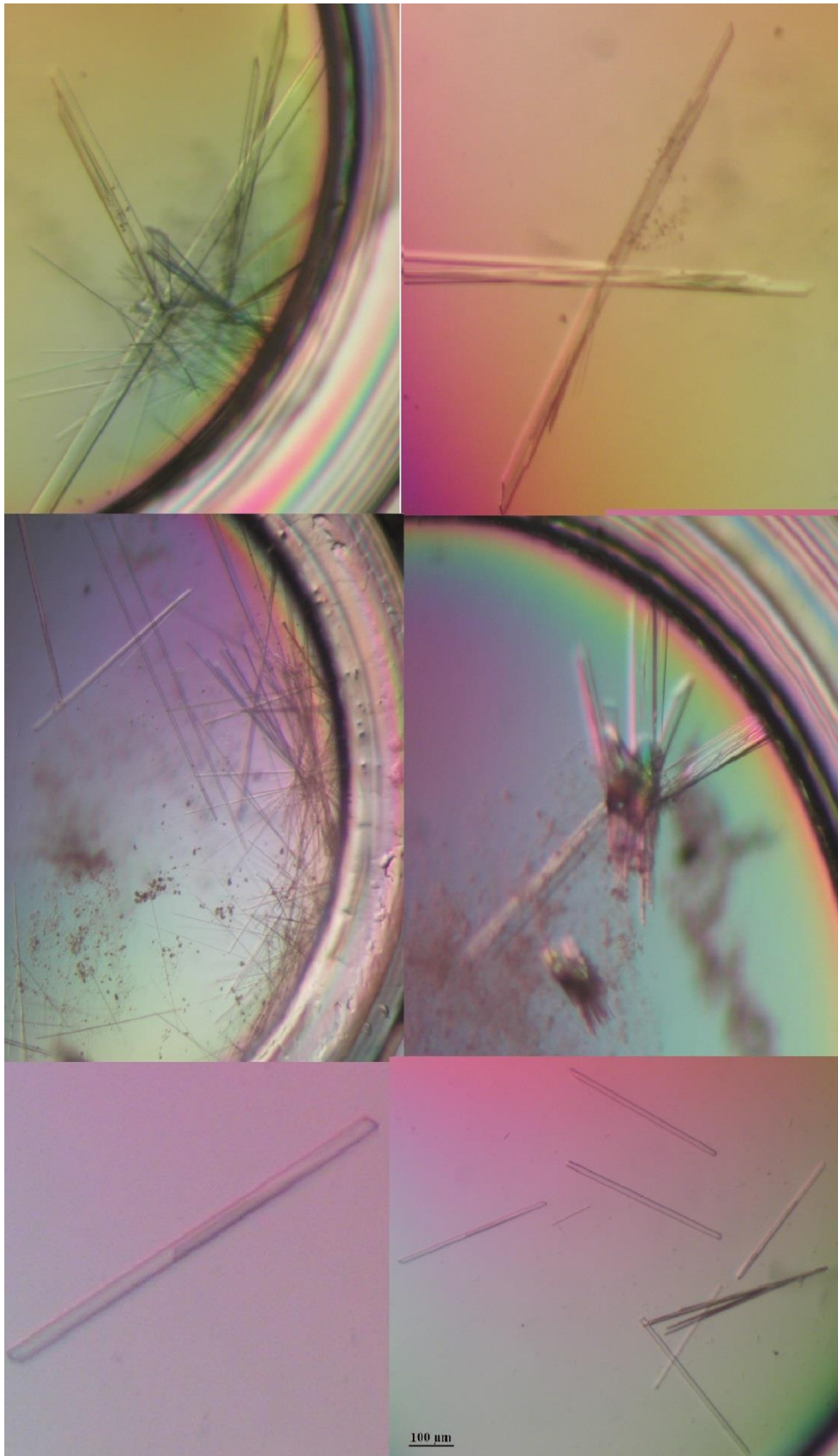
DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt	
400 μ l		400 μ l		400 μ l		400 μ l	
1:1	2:1	1:3	3:1	1:1	2:1	1:3	3:1
4 mg/ml		4 mg/ml		5,5 mg/ml		5,5 mg/ml	
1:2	2:3	3:2	1:4	1:2	2:3	3:2	1:4
1:1	2:1	1:3	3:1	1:1	2:1	1:3	3:1
4,5 mg/ml		4,5 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml	
1:2	2:3	3:2	1:4	1:2	2:3	3:2	1:4
1:1	2:1	1:3	3:1	4 mg/ml	4,5 mg/ml	4 mg/ml	4,5 mg/ml
5 mg/ml		5 mg/ml		1:5		1:6	
1:2	2:3	3:2	1:4	5 mg/ml	5,5 mg/ml	5 mg/ml	5,5 mg/ml

Tab. 10: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.

DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt		DbeAwt	
300 μ l		300 μ l		300 μ l		300 μ l	
4:1	5:1	4:1	5:1	4:1	5:1	4:1	5:1
2 mg/ml		3,5 mg/ml		5 mg/ml		6,5 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	6:1	7:1	6:1	7:1
4:1	5:1	4:1	5:1	4:1	5:1	2:1	2:1
2,5 mg/ml		4 mg/ml		5,5 mg/ml		7 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	6:1	7:1	3:1	3:1
4:1	5:1	4:1	5:1	4:1	5:1	2:1	2:1
3 mg/ml		4,5 mg/ml		6 mg/ml		8 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	6:1	7:1	3:1	3:1

Tab. 11: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbeAwt, metoda sedící kapky.

V případě ostatních podmínek došlo ke vzniku monokrystalů, které nebyly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu nebo krystaly vůbec nevznikly. Obrázky vzniklých vhodných krystalů jsou uvedeny na Obr. 18



Obr. 18: Krystaly proteinu DbeAwt.

4.3. Výsledky krystalizace proteinu DbeA3

Výsledky metody visící kapky

Ke krystalizaci proteinu metodou visící kapky byla použita jedna krystalizační destička. Při této metodě byl roztok proteinu DbeA3 naředěn na koncentrace: 2 mg/l; 3 mg/l; 5 mg/l; 10 mg/l; 12 mg/l a 13 mg/l. Bohužel ani v jednom případě nedošlo ke vzniku krystalů. V případě vysoké koncentrace 10 mg/l, 12 mg/l a 13 mg/l došlo k precipitaci vzorku. Aby nedocházelo k další precipitaci, byl roztok proteinu dále ředěn na nižší hodnoty koncentrace.

V případě použití metody visící kapky nebyly získány žádné krystaly pro následnou rentgenovou difrakční analýzu.

Výsledky metody sedící kapky

Pro krystalizaci proteinu DbeA3 metodou sedící kapky byly použity tři krystalizační destičky. Při této metodě byl roztok proteinu naředěn na koncentrace: 4 mg/l; 4,5 mg/l; 5 mg/l; 5,5 mg/l; 6 mg/l a 6,5 mg/l.

Krystaly, které byly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu, vznikly za podmínek zvýrazněných žlutě v Tab. 12, 13, 14.

DbеA3	DbеA3	DbеA3	DbеA3																								
300 µl	300 µl	300 µl	300 µl																								
<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	4 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	4 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	5,5 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	5,5 mg/ml		1:2	2:3
1:3	3:1																										
4 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
4 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
5,5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
5,5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	4,5 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	4,5 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">6 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	6 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">6 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	6 mg/ml		1:2	2:3
1:3	3:1																										
4,5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
4,5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
1:3	3:1																										
6 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
6 mg/ml																											
1:2	2:3																										
<table border="1"> <tr><td>1:3</td><td>3:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5 mg/ml</td></tr> <tr><td>3:2</td><td>1:4</td></tr> </table>	1:3	3:1	5 mg/ml		3:2	1:4	<table border="1"> <tr><td>1:1</td><td>2:1</td></tr> <tr><td colspan="2">5 mg/ml</td></tr> <tr><td>1:2</td><td>2:3</td></tr> </table>	1:1	2:1	5 mg/ml		1:2	2:3	<table border="1"> <tr><td>4 mg/ml</td><td>4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td colspan="2">1:5</td></tr> <tr><td>5 mg/ml</td><td>5,5 mg/ml</td></tr> </table>	4 mg/ml	4,5 mg/ml	1:5		5 mg/ml	5,5 mg/ml	<table border="1"> <tr><td>4 mg/ml</td><td>4,5 mg/ml</td></tr> <tr><td colspan="2">1:6</td></tr> <tr><td>5 mg/ml</td><td>5,5 mg/ml</td></tr> </table>	4 mg/ml	4,5 mg/ml	1:6		5 mg/ml	5,5 mg/ml
1:3	3:1																										
5 mg/ml																											
3:2	1:4																										
1:1	2:1																										
5 mg/ml																											
1:2	2:3																										
4 mg/ml	4,5 mg/ml																										
1:5																											
5 mg/ml	5,5 mg/ml																										
4 mg/ml	4,5 mg/ml																										
1:6																											
5 mg/ml	5,5 mg/ml																										

Tab. 12: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbеA3, metoda sedící kapky.

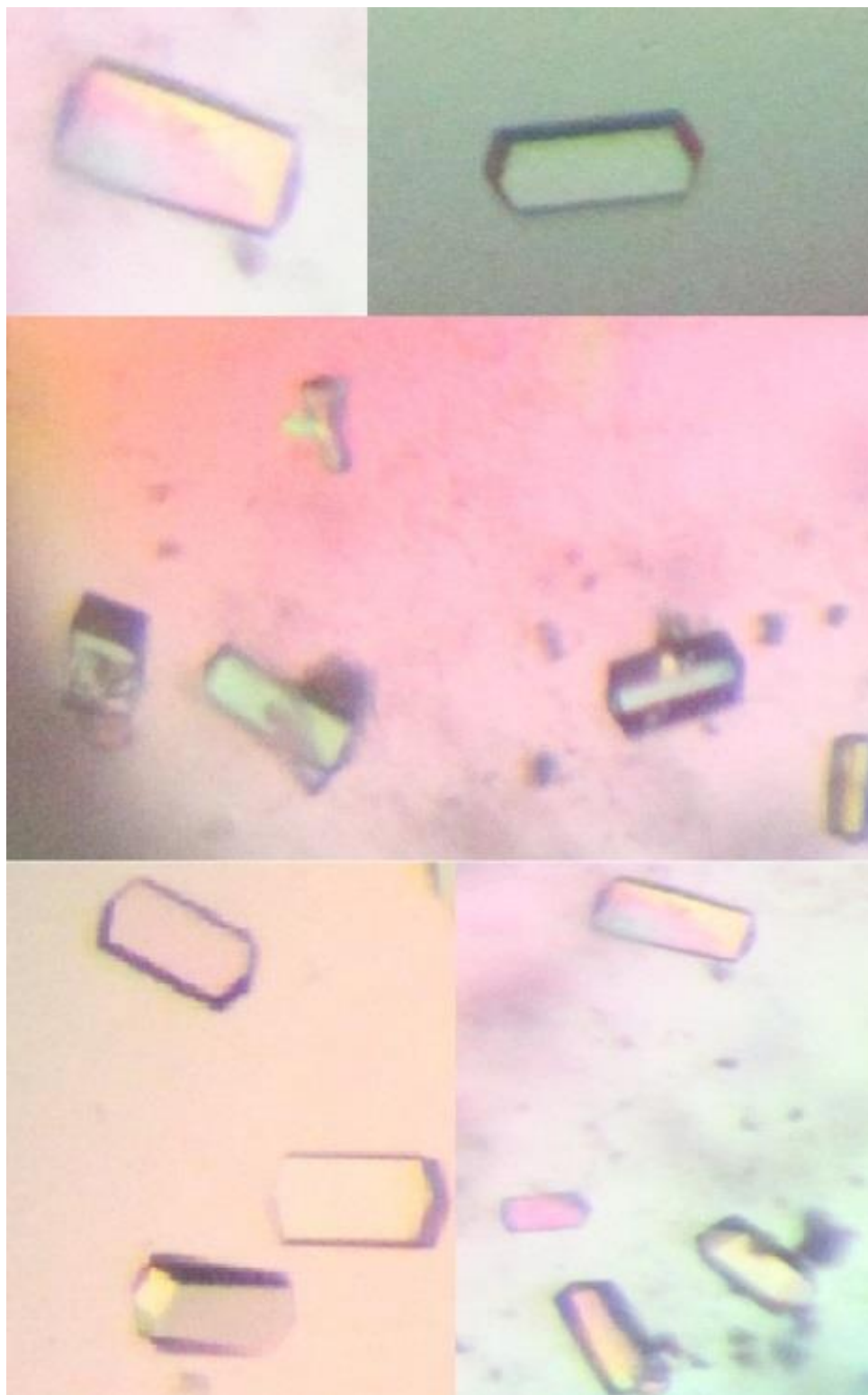
DbeA3		DbeA3		DbeA3		DbeA3	
400 μ l		400 μ l		400 μ l		400 μ l	
1:3	3:1	1:1	2:1	1:3	3:1	1:1	2:1
4 mg/ml		4 mg/ml		5,5 mg/ml		5,5 mg/ml	
3:2	1:4	1:2	2:3	3:2	1:4	1:2	2:3
1:3	3:1	1:1	2:1	1:3	3:1	1:1	2:1
4,5 mg/ml		4,5 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml	
3:2	1:4	1:2	2:3	3:2	1:4	1:2	2:3
1:3	3:1	1:1	2:1	4 mg/ml	4,5 mg/ml	4 mg/ml	4,5 mg/ml
5 mg/ml		5 mg/ml		1:5		1:6	
3:2	1:4	1:2	2:3	5 mg/ml	5,5 mg/ml	5 mg/ml	5,5 mg/ml

Tab. 13: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda sedící kapky.

DbeA3		DbeA3		DbeA3		DbeA3	
300 μ l		300 μ l		300 μ l		300 μ l	
4:1	5:1	4:1	5:1	3:1	3:1	3:1	3:1
4 mg/ml		5,5 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	3:1	3:1	3:1	3:1
4:1	5:1	4:1	5:1	3:1	3:1	3:1	3:1
4,5 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	3:1	3:1	3:1	3:1
4:1	5:1	4:1	5:1	3:1	3:1	3:1	3:1
5 mg/ml		6,5 mg/ml		6 mg/ml		6 mg/ml	
6:1	7:1	6:1	7:1	3:1	3:1	3:1	3:1

Tab. 14: Výsledky krystalizační destičky pro protein DbeA3, metoda sedící kapky.

V případě ostatních podmínek došlo ke vzniku monokrystalů, které nebyly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu nebo krystaly vůbec nevznikly. Obrázky vzniklých vhodných krystalů jsou uvedeny na Obr. 19.

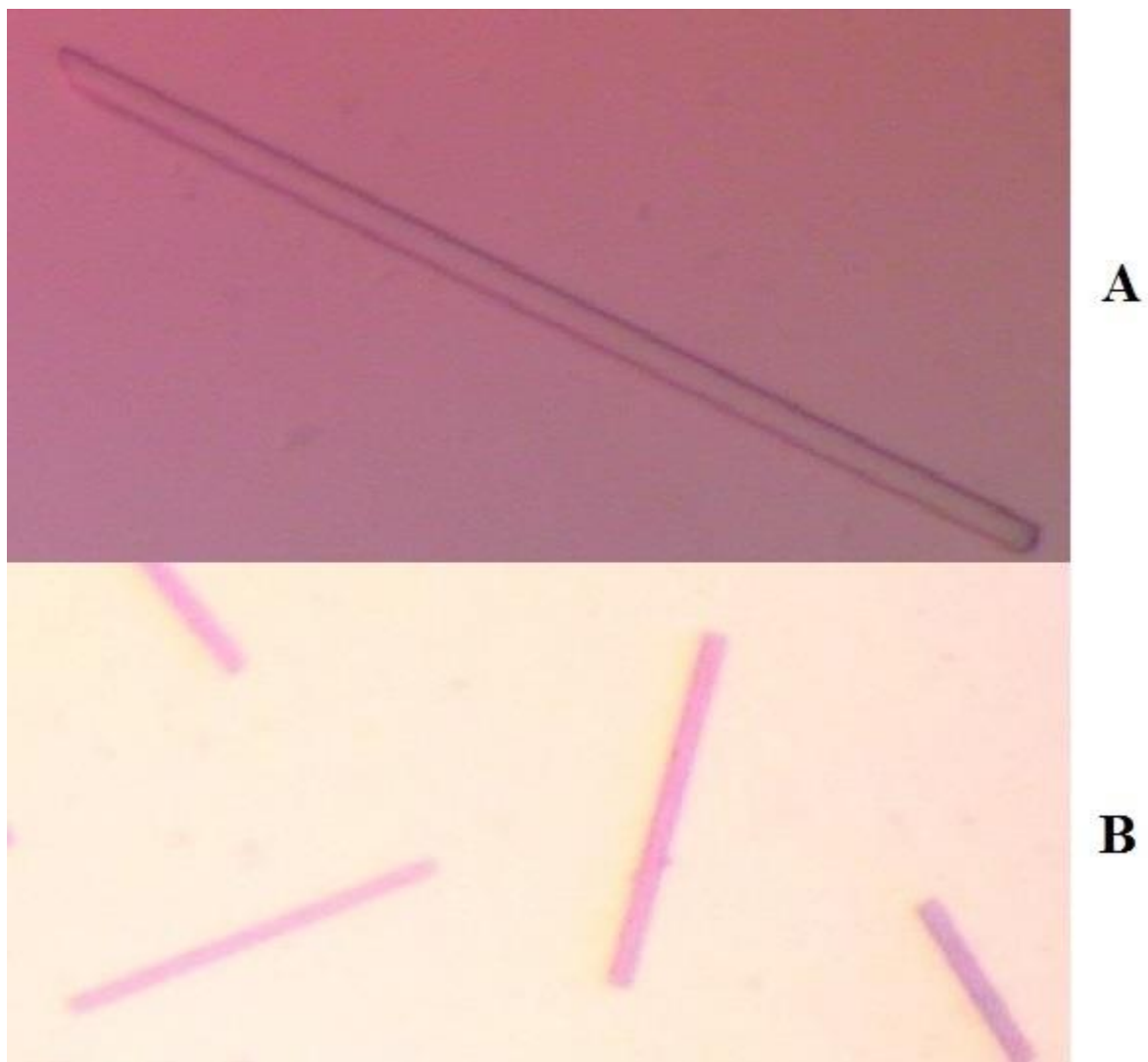


Obr. 19: Krystaly proteinu DbeA3.

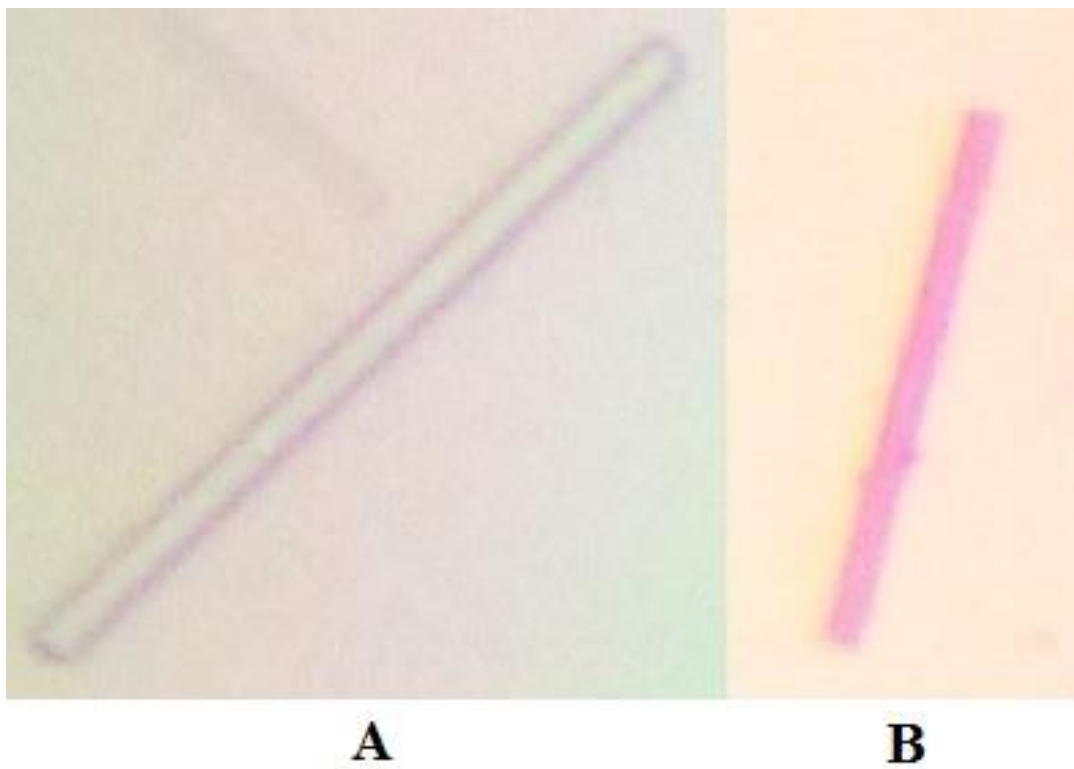
4.4. Výsledky testování krystalů

Po testu krystalů bylo prokázáno, že vzniklé krystaly jsou skutečně krystaly proteinu DbeAwt a DbeA3. K testování byl použit test drcením a barvicí test. Při testu drcením došlo

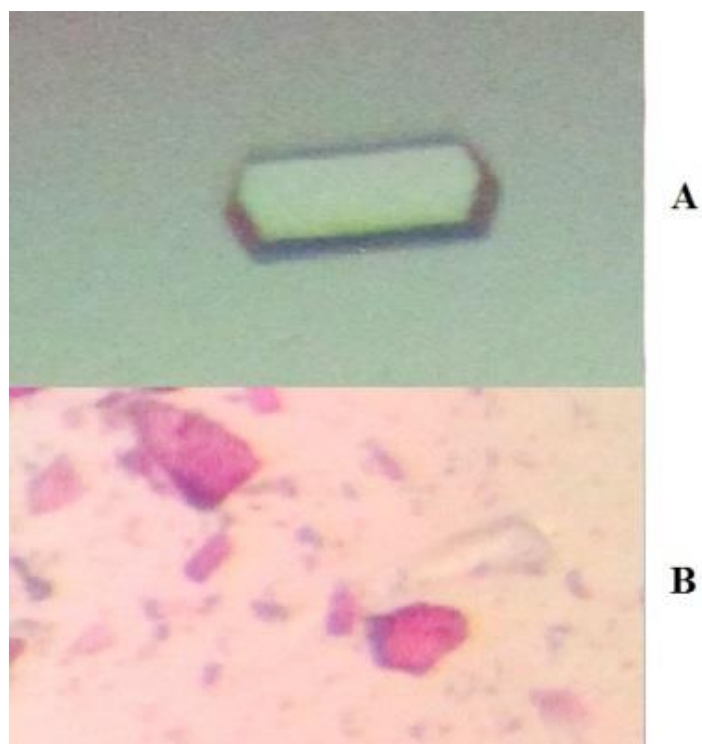
k rozdrčení krystalů a při barvicím testu došlo k obarvení krystalů. Výsledky testování proteinu DbeAwt jsou znázorněny na Obr. 20 a 21. Výsledky testování proteinu DbeA3 jsou znázorněny na Obr. 22 a 23.



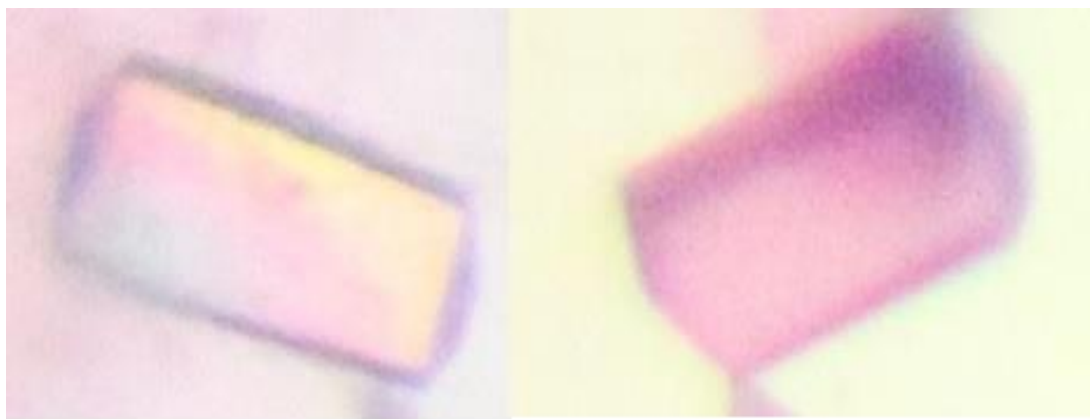
Obr. 20: Krystaly proteinu DbeAwt při testu drcením. Krystaly před testem (A) a po testu (B).



Obr. 21: Krystaly proteinu DbeAwt při barvicím testu. Krystaly před testem (A) a po testu (B).



Obr. 22: Krystaly proteinu DbeA3 při testu drcením. Krystaly před testem (A) a po testu (B).



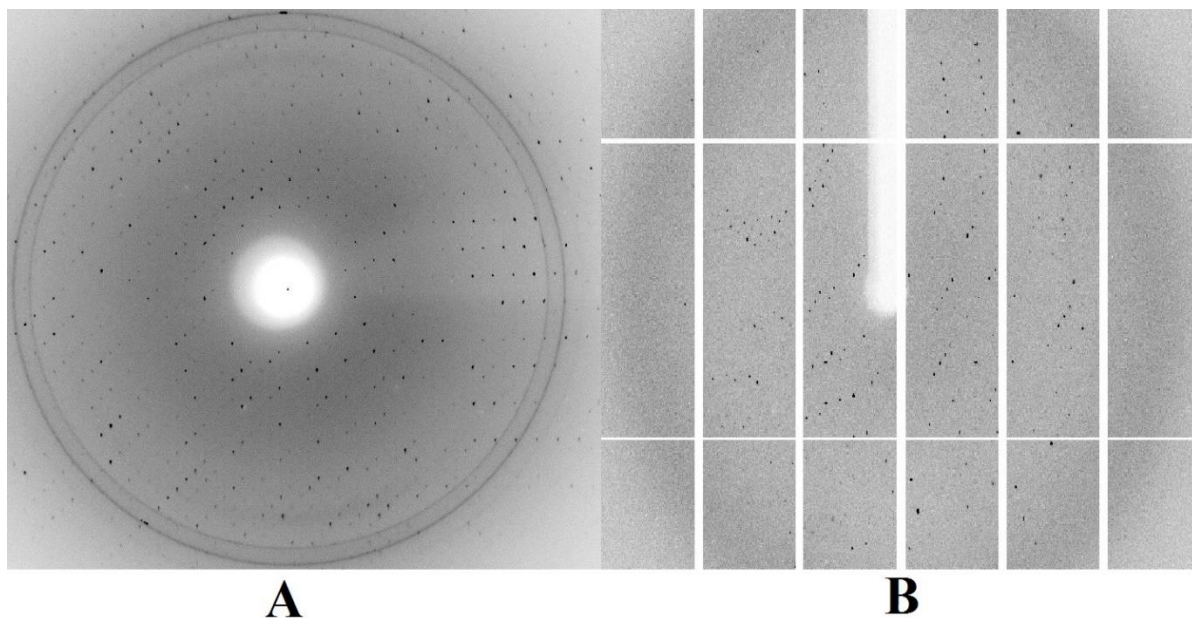
A

B

Obr. 23: Krystaly proteinu DbeA3 při barvicím testu. Krystaly před testem (A) a po testu (B).

4.5. Výsledky rentgenové difrakční analýzy

Difrakční snímek proteinů DbeAwt a DbeA3 byl získán rentgenovou difrakční analýzou. Snímky s rozlišením 2,2 Å pro protein DbeAwt a 1,4 Å pro protein DbeA3 jsou zaznamenány na Obr. 24.



A

B

Obr. 24: Difrakční snímek proteinů DbeAwt (A) a DbeA3 (B).

4.6. Porovnání krystalizačních podmínek při krystalizaci proteinu DbeAwt a DbeA3.

Výsledky krystalizace ukázaly, že oba proteiny krystalizují za podobných podmínek. Změna ve struktuře proteinů nemá zásadní vliv na jejich krystalizaci. Krystalizují při použití stejného krystalizačního činidla a podobné koncentrace roztoku proteinu.

5. Diskuze

Cíle bakalářské práce byly splněny. V průběhu řešení bakalářské práce byl vykrystalizován protein DbeAwt a jeho mutantní forma DbeA3. Oba vzorky byly krystalizovány metodou visící a sedící kapky. Ke krystalizaci bylo použito krystalizační činidlo vzniklé ze 100 mM Tris HCl pH 7,5; 150 mM octanu vápenatého a 20% PEG 4000. S využitím různých poměrů množství krystalizačního činidla a roztoku proteinu bylo vyzkoušeno 168 různých krystalizačních podmínek pro protein DbeAwt a 168 různých podmínek pro krystalizaci proteinu DbeA3. V případě proteinu DbeAwt vznikly krystaly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu v 5,4% kapek. V případě proteinu DbeA3 to bylo v 8,4% kapek.

Stsiapanava a kol. (2011) krystalizovali DhaAwt z *Rhodococcus rhodochrous* NMICB 13064 patřící mezi halogenalkandehalogenasy. Pro krystalizaci využili krystalizační činidlo připravené z: 25% (w/v) PEG 4000, 6% (v/v) 2-propanolu a 100 mM octanu sodného. Protein byl krystalizován při koncentraci 10 mg/ml, naředěn byl 50 mM Tris HCl pH 7,5. Krystalizace probíhala při 277 K, po 5 dnech byly získány krystaly o rozměru 0,17 x 0,05 x 0,03 mm. Reservoár obsahoval 700 µl krystalizačního činidla a kapky byly složeny z 1 µl roztoku proteinu a 1 µl krystalizačního činidla. Nakonec byla provedena difrakční analýza a získán difrakční záznam o rozlišení 1,75 Å.

Sato a kol. (2007) krystalizovali protein DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 patřící mezi halogenalkandehalogenasy metodou visící kapky při 293 K. Kapka vždy obsahovala 1 µl roztoku proteinu a 1 µl krystalizačního činidla, v reservoáru bylo 500 µl krystalizačního činidla. V případě použití krystalizačního činidla připraveného z: 18-20% (w/v) PEG 4000; 0,2 M octanu vápenatého; 0,1 M Tris HCl pH 7,7 – 8,1, vyrostly dvojité krystaly. Pro získání monokrystalů byla využita technika mikroočkování (Stura & Wilson, 1992). Očkovací roztok byl vytvořen rozdrčením dvojitých krystalů v 50 µl krystalizačního činidla a roztok byl desetkrát zředěn. Takto vzniklý roztok byl poté použit jako očkovací roztok. Malé množství očkovacího roztoku bylo přeneseno do kapky, která obsahovala 1 µl roztoku proteinu a 1 µl krystalizačního činidla. Nejlepší krystal vznikl za 2 týdny z kapek obsahujících 1 µl enzymu o koncentraci 15-25 mg/ml a 1 µl krystalizačního činidla vzniklého smícháním 17-19,5% (w/v) PEG 4000; 0,2 M octanu vápenatého a 0,1 M Tris HCl pH 7,7-8. Krystal byl obdélníkového tvaru s rozměry 0,4 x 0,12 x 0,1 mm. Nakonec byl získán difrakční záznam o rozlišení 1,75 Å.

Srovnáním podmínek pro krystalizaci proteinu DbeAwt resp. DbeA3 a výše uvedených proteinů lze konstatovat, že ve všech případech krystalizační roztok obsahoval PEG 4000, jehož koncentrace se pohybovala v rozmezí 15-25%. Proteinový roztok měl koncentraci 10-25mg/ml a krystaly byly připraveny pomocí metody sedící kapky. Pouze v případě DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* bylo nutné provést očkování s cílem získat kvalitní krystaly.

6. Závěr

Teoretická část bakalářské práce se zaměřuje na popis vlastní krystalizace, popis faktorů ovlivňujících její průběh, testování proteinu před krystalizací a popis konečného testování vzniklých krystalů. V práci jsou popsány jednotlivé základní, pokročilé i alternativní krystalizační metody. Závěr teoretické části obsahuje obecnou charakteristiku halogenalkandehalogenas a konkrétní informace o proteinu DbeAwt, který pochází z této rodiny.

Praktická část práce obsahuje postup pro krystalizaci proteinu DbeAwt z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 a její mutantní formy DbeA3. Nejdříve bylo ověřeno pomocí gelové SDS-PAGE elektroforézy, zda jsou oba vzorky čisté a je možné je použít pro následnou krystalizaci. Pomocí SDS-PAGE elektroforézy byla také přibližně určena molekulová hmotnost. Hodnota molekulové hmotnosti pro protein DbeAwt i DbeA3 činila 34 kDa. Čistota obou vzorků byla potvrzena a shledána vhodnou pro následnou krystalizaci. Krystalizace byla prováděna metodou visící kapky a metodou sedící kapky při pokojové teplotě 20°C. Pro protein DbeAwt i pro protein DbeA3 bylo otestováno 168 různých krystalizačních podmínek. Nejvhodnější podmínky pro krystalizaci proteinů DbeAwt a DbeA3 jsou znázorněny v Tab. 9, 10, 11, 12, 13 a 14. Po nalezení vhodných podmínek pro krystalizaci jednotlivých proteinů byly podmínky srovnány.

Jedním z cílů práce bylo ověřit, zda jsou získané krystaly skutečně krystaly proteinu a zdali se nejedná o krystaly soli. K otestování krystalů byly využity tři metody. Metoda testu drcením, metoda barvícího testu a rentgenová difrakční analýza. Všechny testy prokázaly, že vzniklé krystaly jsou krystaly proteinu a nejde o krystaly soli.

Pomocí rentgenové difrakční analýzy byl získán difrakční snímek o rozlišení 2,2 Å pro protein DbeAwt a 1,4 Å pro protein DbeA3. Získaná difrakční data se dále využijí na určení trojrozměrné struktury proteinů DbeAwt a DbeA3 a současně dojde k ověření, že proteiny DbeAwt a DbeA3 patří do rodiny halogenalkandehalogenas.

7. Seznam literatury

Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34 (3). 266-272.

Banas, P., Otyepka, M., Jerabek, P., Petrek, M., Damborsky, J. (2006). Mechanism of enhanced conversion of 1,2,3-trichloropropane by mutant haloalkane dehalogenase revealed by molecular modeling. *J. Comput.-Aided Mol. Des.*, 20(6). 375-383.

Bergfors, T. M. (1999). Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips. La Jolla, USA: International University Line.

Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J. (1996). *Protein Methods*. New York, USA: Wiley-Liss, Inc.

Chaloupkova, R., Prudnikova, T., Rezacova, P., Prokop, Z., Koudelakova, T., Daniel, L., Brezovsky, J., Ikeda-Ohtsubo, W., Sato, Y., Kutý, M., Nagata, Y., Kuta Smatanova, I., Damborsky, J. (2014). Structural and functional analysis of novel haloalkane dehalogenase with two halide-binding sites. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 15. 1884-1897.

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

Damborsky, J., Chaloupkova, R., Pavlova, M., Chovancova, E., Brezovsky, J. (2010). *Structure-Function Relationships and Engineering of Haloalkane dehalogenases*. Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Emmer, J. (2007). *Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, University of South Bohemia.

Grilliand, G.L., Tung, M., Blakeslee, D. M., Lander, J. (1994). The biological macromole crystallization database, 3.0: new features, data nad the NASA archive for protein crystal growth data. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 50. 408-413.

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

Hasan, K., Fortova, A., Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Damborsky, J., Prokop, Z., Ishitsuda, M., Nagata, Y. (2011). Biochemical Characteristics of the Novel Haloalkane De-

halogenase DatA, Isolated from the Plant Pathogen *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5). 1881-1884.

Ikeda-Ohtsubo, W., Goto, Y., Sato, Y., Ohtsubo, Y., Minamisawa, K., Tsuda, M., Damborsky, J., Nagata, Y. (2009). In preparation.

Janssen, D. B., Dinkla, I. J. T., Poelarends, G. J., Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology*, 7(12). 1868-1882.

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.

Kutá Smatanová, I. (2003). Krystalizace biologických makromolekul [online]. In: Krystalografická společnost. [citováno dne 16. 2. 2018]

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

Marek, J., Vevodova J., Smatanova, I. K., Nagata Y., Svensson L. A., Newman J., Takagi M., Damborsky, J. (2000). Crystal Structure of Haloalkane Dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry*, 39. 14082-14086.

Mazumdar P. A., Hulecki J. C., Cherney M. M., Garen C. R., James M. N. G. (2008). X-ray crystal structure of Mycobacterium tuberculosis haloalkane dehalogenase Rv2579. *Biochim. Biophys. Acta V.*, 1784. 351 -362.

McPherson, A. (1999). Crystallization of Biological Macromolecules. New York, Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

McPherson, A., Nguyen, C., Cudney, R. & Larson, S. B. (2011). The role of small molecule additives and chemical modification in protein crystallization. *Crystal Growth & Design*, 11 (5). 1469-1474.

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

Mozka, T., Sato, Y., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Nagata, Y., Damborsky, J. (2009). In preparation.

- Negri, A., Marco, E., Damborsky, J., Gago, F. (2007). Stepwise dissection and visualization of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase LinB using molecular dynamics simulations and computer graphics. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 26. 643-651.
- Nemcovicova, I., Kuta Smatanova, I. (2012). Alternative Protein Crystallization Technique: Cross-Influence Procedure (CIP). In: E. Borisenko (Ed.), *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals*, 249-276. Rijeka, Chorvatsko: InTech.
- 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. 16105-16114.
- Otyepka, M., Damborsky, I. (2002). Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains. *Protein Science*, 11(5). 1206-1217.
- Prokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Stepankova, V., Natsume, R., van Leeuwen, J. G. E., Janssen, D. B., Florian, J., Nagata, Y., Senda, T., Damborsky, J. (2010). Enantioselectivity of Haloalkane Dehalogenases and its Modulation by Surface Loop Engineering. *Angewandte Chemie International Edition*, 49. 1-6.
- Prudnikova, T., Mozga, T., Rezacova, P., Chaloupkova, R., Sato, Y., Nagata, Y., Brynda, J., Kutý, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2009). Crystallization and preliminary X-ray analysis of novel haloalkane dehalogenase DbeA from *Bradyrhizobium elkani* USDA94. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 65. 353-356.
- Salemme, F.R. (1972). A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151 (2). 533-539.
- Sato, Y., Ohtsubo S., Monincová, M., Chaloupková, R., Prokop, Z., Ohtsubo, Y., Minami-sawa, 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.
- Sato, Y., Natsume, R., Tsuda, M., Damborsky, J., Nagata, Y., Senda, T. (2007). Crystallization and preliminary crystallographic analysis of a haloalkane dehalogenase,

DbjA, from *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization*, 63. 294-296.

Silberstein, M., Damborsky, J., Vajda, S. (2007). Exploring the binding sites of the haloalkane dehalogenase Dh1A from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Biochemistry*, 46 (32). 9239-9249.

Stsiapanava, A., Koudelakova, T., Lapkouski, M., Pavlova, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova I. (2008). Crystals of DhaH mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultrahigh resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization*, 64, 137-140.

Stsiapanava, A., Dohnalek, J., Gavira, J. A., Kuty, M., Koudelakova, T., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2010). Atomic resolution studies of haloalkane dehalogenases DhaA04, DhaA14 and DhaA15 with engineered access tunnels. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66. 962-969.

Stsiapanava, A., Chaloupkova, R., Fortova, A., Brynda, J., Weiss, M. S., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2011). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild-type haloalkane dehalogenase DhaA and its variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 67. 253-257.

Stura, E. A., Wilson, I. A. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*, edited by A. Ducruix & R. Giegé', 99–125. Oxford University Press.

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.

8. Seznam zkratek

Aminokyseliny:

Aps – peroxidisíran amonný

Asn – asparagin

Asp – kyselina asparagová

Glu – kyselina glutamová

His – histidin

Trp – tryptofan

Tyr – tyrosin

Další zkratky:

DNA – deoxyribonukleová kyselina

HEPES – 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethansulfonová kyselina

PEG – polyethylenglykol

PDB – Protein Data Bank

SDS – dodecylsíran sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného

Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan

Tris HCl - tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid