

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Fakulta rybářství a ochrany vod
Ústav akvakultury

Bakalářská práce
Biodegradace environmentálních polutantů

Strukturní charakterizace nového typu
halogenalkandehalogenasy LinB32 ze *Sphingobium*
japonicum UT26

Autor: Pavel Němec

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

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

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: III.

České Budějovice, 2013

Prohlášení:

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

Datum:

Podpis:

Poděkování:

Děkuji svému vedoucímu Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. i konzultantovi Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce.

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta rybářství a ochrany vod
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel NĚMEC**
Osobní číslo: **V10B042P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Biodegradace environmentálních polutantů - strukturální studie dehalogenačního enzymu**
Zadávající katedra: **Ústav komplexních systémů**

Zásady pro vypracování:

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

V rámci studie vztahů mezi strukturou a funkcí haloalkan dehalogenas byly mutagenézí zkonstruovány nové varianty enzymu LinB z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26 lišící se pouze jednou nebo dvěma mutacemi. Tyto enzymy byly použity ke krystalizačním studiím. Cílem práce bude pokus o krystalizaci vybrané mutantní varianty haloalkan dehalogenasy LinB a popis krystalizačního protokolu. V další fázi projektu budou naměřena difrakční data použita k upřesnění struktury studovaného enzymu. Student zvládne metodiku přípravy proteinových krystalů, manipulaci s krystalami, seznámí se se základním softwarem pro řešení proteinových struktur. Bude připraven pokračovat na řešení obdobných projektů na pracovišti školitele.

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

Oksana Degtjarik, Radka Chaloupkova, Pavlina Rezacova, Michal Kutý, Jiri Damborsky and Ivana Kuta Smatanova: Differences in crystallization of two LinB variants from *Sphingobium japonicum* UT26. *Acta Cryst F69, Part 3, 284-287* (2013)

Jiří Emmer: Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, in English.

University of South Bohemia, Faculty of Science, Č. Budějovice, (2007).
Brezovský, J.: Computer modeling of enzymes. Ph.D. Thesis, in English.
Masaryk university, Faculty of Science, Brno (2011).

Vedoucí bakalářské práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.
Ústav komplexních systémů

Konzultant bakalářské práce: doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Ústav komplexních systémů

Datum zadání bakalářské práce: 2. prosince 2011

Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2013


V. z.
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


Ing. Petr Císar, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

Obsah

1. Úvod	7
2. Literární přehled	9
2.1. Krystalizace nízkomolekulových látek	9
2.2. Krystalizace makromolekul.....	10
2.3. Krystalizace proteinů	11
2.4. Standardní krystalizační techniky	12
2.5. Pokročilé metody krystalizace	14
2.6. Alternativní krystalizační metody	15
2.7. Mikrobiální enzymy – <i>Halogenalkandehalogenasy</i>	18
3. Materiál a metodika	19
3.1. Experimentální pracoviště	20
3.2. Postup přípravy srážecích roztoků.....	20
3.3. Postup experimentu gelové elektroforézy (SDS-PAGE).....	21
3.4. Metoda visící kapky (podle T.M. Bergfors, 1999)	23
3.5. Metoda sedící kapky (podle T.M. Bergfors, 1999).....	24
3.6. Design krystalizace pod silikonovým olejem	25
3.7. Design krystalizace v kapilárách	26
3.8. Metody testování krystalů.....	27
3.9. Modelování struktury LinB32	29
4. Výsledky	30
4.1. Gelová elektroforéza	30
4.2. Výsledky krystalizace <i>Thaumatococcus</i>	30
4.3. Výsledky krystalizace LinB32	34
4.4. Výsledky z molekulárního modelování LinB32	36
4.5. Schéma dehalogenační reakce LinB32	39
5. Diskuze	40
6. Závěr	43
7. Použitá literatura	44
8. Seznam příloh	46
9. Přílohy	47
10. Abstrakt	50
11. Abstract	51

1. Úvod

V poslední době mnohé vědecké týmy řeší otázku ochrany životního prostředí, která se v mnohých výzkumech stává prioritním předmětem. Využití bakteriálních a mikrobiálních organismů k čištění kontaminovaných lokalit je jedním z možných způsobů, jak životní prostředí upravit. Na druhé straně jeden z možných nástrojů je využití halogenalkandehalogenas. Jejich vysoká detoxikační schopnost se používá pro čištění kontaminovaných vod a území halogenovanými organickými polutanty.

Halogenalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení vazby mezi halogenem a uhlíkem. Výsledkem dehalogenační reakce je tvorba primárního alkoholu a halogenidového iontu. Halogenalkandehalogenasy se vyznačují poměrně vysokou detoxikační schopností. Nové technologie pro čištění kontaminovaných vod a území zamořenými halogenovanými organickými polutanty jsou založeny na enzymatickém odbourávání za pomoci halogenalkandehalogenas. Aktivita těchto enzymů s halogenovanými substráty není často dostatečná pro jejich využití v praktických aplikacích. Pro objasnění strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkandehalogenas se úspěšně používají metody proteinové krystalografie.

V rámci studie vztahů mezi strukturou a funkcí halogenalkandehalogenas byly mutagenézí zkonstruovány nové varianty enzymu LinB izolovaného z půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26 lišící se pouze jednou nebo dvěma mutacemi. Tyto enzymy byly použity ke krystalizačním studiím.

Krystalizační studie biologických makromolekul představují jeden z nejefektivnějších nástrojů, který se používá ve strukturní biologii a fyzikální biochemii. Poznání struktury makromolekulárních látek je důležité pro objasnění strukturně-funkčních vztahů a poskytuje důležité informace pro modifikace makromolekul pro potřeby zemědělského, medicínského, farmaceutického a jiných odvětví.

Cílem práce bude seznámit se s proteinovou krystalografií a konkrétně s metodami krystalizace proteinů, pomocí kterých bude krystalizován modelový protein *Thaumatococcus* a dále nově připravená mutantní varianta halogenalkandehalogenasy LinB32, která je izolována z gramnegativní půdní bakterie *Sphingobium japonicum* UT26. V další fázi projektu budou naměřená difrakční data použita k upřesnění struktury studovaného enzymu a vytvoření jeho strukturního modelu. Ve finální fázi bude navržena dehalogenační reakce proteinu.

2. Literární přehled

2.1. Krystalizace nízkomolekulových látek

Podstata krystalizace spočívá v pomalém přivedení systému do stavu snížené rozpustnosti a dosažení limitního stupně přesycení postupným modifikováním vlastností systému jakými jsou například teplota, pH, koncentrace nebo vlastnosti jednotlivých komponent roztoku (Glusker, 1994).

Vznik krystalů ovlivňují mnohé termodynamické a kinetické faktory (Kutá Smatanová, 2008). Mezi termodynamické faktory patří rozpustnost látky a mezi faktory kinetické nukleace a následný růst krystalů. Glusker a kol. (1994) popisuje, že proces tvorby krystalů tvoří 3 fáze – fáze nukleace, růstu a ukončení růstu krystalů.

Ve fázi nukleace dochází ke kontaktu vhodně orientovaných iontů nebo molekul, které po překročení limitu nasycení začínají tvořit stabilní seskupení. Tvorbou stabilních seskupení vzniká sraženina nebo submikroskopická krystalická jádra (Kutá Smatanová, 1999).

Ve druhé fázi, která se označuje jako růst krystalů, dochází ke kontaktu vhodně orientovaných molekul nebo iontů s povrchem jádra a k jejich uspořádání na tomto povrchu. Růst krystalů je ovlivňován stupněm difúzním a depozičním. Difúzní stupeň označuje rychlost difúze molekul v oblasti růstu krystalu, zatímco depoziční stupeň označuje rychlost odčerpání pevné fáze z roztoku. Pokud je depoziční stupeň nízký, nedochází k tvorbě růstových center a růst krystalů je velmi pomalý, nebo dokonce žádný (Kutá Smatanová, 1999). Jestliže je depoziční stupeň vysoký, vzniká velké množství drobných krystalických jader a krystaly rostou extrémní rychlostí. Při takovéto extrémní rychlosti jsou velmi malé a vykazují defekty (tzn. kazy a dislokace). Ideální krystaly tedy vznikají z malého množství krystalických jader, která rostou volnou rychlostí a jsou bez defektů.

Ve třetí fázi, kterou Glusker a kol. (1994) označuje jako fázi finální, dochází k zastavení růstové schopnosti krystalů. Menší krystaly mohou růst pomalou rychlostí a poté zvětšovat svůj objem. Tyto krystaly jsou poté vhodné pro rentgenovou strukturní

analýzu. Alternativně také může vznikat velké množství drobných mikrokystalů nebo velká krystalická seskupení. Velkým krystalickým seskupením rozumíme různé větvičkovité útvary podobné sněhovým vločkám či tenkým jehlicovitým útvarům, nebo dojde ke vzniku hydrofobních olejovitých seskupení. Přítomnost uvedených seskupení naznačuje, že i nepatrná změna experimentálních podmínek může vést ke vzniku monokrystalů, nebo v opačném případě se mohou vytvořit nekystalické gely či amorfni pudry, nebo nedochází ke změně a roztok zůstává čirý (Kutá Smatanová, 1999).

2.2. Krystalizace makromolekul

Krystalizace makromolekul zahrnuje krystalizaci proteinů, nukleových kyselin a velkých makromolekulárních komplexů (viry, ribozomy). Založena je na poměrně nespécifickém souboru zásad, zkušeností a nápadů. Lze říci, že neexistuje žádná jednotná teorie jako vodítko tohoto úsilí přesto, že se v současné době tyto teorie množí. Růst makromolekulárních krystalů je v přírodě velmi empirický proces a vyžaduje trpělivost, vytrvalost a intuici (McPherson, 2004).

Věda stále označuje krystalizaci proteinů jako nedostatečně rozvinutou oblast, v posledních letech je ale její vývoj pobídnutý zejména mikrogravitačními experimenty v kosmu (McPherson a kol., 1990). Krystalizace proteinů je převážně založena na metodě pokusu a omylu, kdy je protein pomalu vysrážen pomocí srážecího roztoku. V procesu krystalizace proteinů hrají důležitou roli přítomnosti nečistot a jiných neznámých faktorů. Obecně lze říci, že platí pravidlo čím čistější protein je, tím je větší šance, že dojde k růstu krystalů (Kutá Smatanová, 2008). Z pohledu biochemiků je kladen požadavek na vysokou katalytickou aktivitu enzymů. Na druhé straně, aby došlo ke krystalizaci proteinů, musí být kladen důraz na to, aby nebyly přítomny žádné jiné sloučeniny. Všechny molekuly proteinů by také měly mít stejné povrchové vlastnosti, zejména rozložení náboje na povrchu, protože toto ovlivňuje uspořádání molekul v krystalu. Pro krystalizaci proteinů je jako cenný nástroj označována hmotností spektrometrie (MS), například, při kontrole exprese rekombinantního proteinu, čistoty vzorku, přípravě těžkých atomových derivátů a konstrukci proteinu (Chen a kol., 1994).

2.3. Krystalizace proteinů

Nejpoužívanější metodou určování struktury biomakromolekulárních látek je v současnosti rentgenová strukturní analýza, díky které bylo vyřešeno 85% všech makromolekulárních struktur deponovaných v proteinové databance (PDB), (Li a Chang, 2009). Nejobtížnějším, ale zásadním krokem při použití rentgenové strukturní analýzy je vedle řešení fázového problému získání krystalů dostatečné velikosti a kvality vhodné k difrakčnímu měření. Krystaly proteinů se od krystalů nízkomolekulárních látek liší tím, že jsou malé, měkké, náchylné k rozbití, citlivé na teplotu a radiaci a hůře difraktují (McPherson, 2004).

K tvorbě krystalů proteinů dochází jen tehdy, když se systém nachází v přesyceném stavu a jednotlivé molekuly proteinu spolu agregují podle určitého řádu. Li a Chang (2009) uvádějí, že proces krystalizace sestává z procesu nukleace, kdy se tvoří krystalizační jádra a z procesu samotného růstu krystalů. V poslední fázi je růst krystalu ukončen.

Oblast supersaturace je ve fázovém diagramu rozdělena do tří oblastí. Jedná se o oblast metastabilní, kde dochází k růstu krystalů; o oblast labilní, ve které může probíhat nukleace i růst; a oblast precipitační, ve které vzniká amorfni sraženina (Li a Chang, 2009). V nejideálnějších případech se systém nachází v labilní oblasti supersaturace a tvoří se krystalizační jádra. V případě, že dojde ke tvorbě několika krystalizačních jader, klesne koncentrace proteinu v roztoku a systém se přesune do metastabilní oblasti, kde krystaly rostou, ale už se zde nemohou tvořit další jádra. Výsledkem je tak jeden nebo několik málo dostatečně velkých krystalů (Li a Chang, 2009).

V procesu krystalizace hraje důležitou roli výběr krystalizačního činidla. Jako krystalizační činidla se používají různé typy sloučenin (polyethylenglykoly, anorganické soli, organická rozpouštědla), které nutí systém přejít do přesyceného stavu. Přítomny jsou také pufrы, které udržují stálé pH, případně další aditiva, která usnadňují vhodné uspořádání molekul proteinu do krystalu. Vedle typu a koncentrace srážedla krystalizaci výrazně ovlivňuje čistota a koncentrace proteinu, pH, teplota, viskozita média, použité metody a řada dalších faktorů (McPherson, 2004).

Krystalizace proteinů je empirický proces, který je založen na hledání vhodných činidel a fyzikálně-chemických parametrů (McPherson, 2004). V průběhu počátečního testování se hledají krystalizační podmínky, které by mohly vést k vytvoření krystalických jader. Tyto podmínky jsou pak následně optimalizovány tak, aby byly získány co nejkvalitnější monokrystaly použitelné pro rentgenovou difrakci (Kundrot, 2004).

2.4. Standardní krystalizační techniky

Mezi standardní krystalizační techniky patří dialýza (*dialysis*) nebo metoda mikrodávek (*microbatch*). Největší popularitu ovšem mají techniky založené na difúzi par - metody sedící a visící kapky (*sitting a hanging drop*). Tyto metody jsou založeny na difúzi par rozpouštědla (nejčastěji voda) z kapky obsahující roztok proteinu do rezervoáru, ve kterém je ve vyšší koncentraci přítomno srážecí činidlo (precipitating agent nebo precipitant). Důsledkem zmenšování objemu kapky se zvyšuje koncentrace proteinu v dané kapce a systém přechází do přesyceného stavu (Li a Chang, 2009).

K uvedenému jevu dochází buď “destilací” vody z kapky do rezervoáru (roztok v rezervoáru má vyšší koncentraci než kapka - dochází ke změně objemu kapky a zakonzentrování všech jejích komponent) nebo naopak z rezervoáru do kapky. Migrace molekul závisí na koncentraci a rozpustnosti proteinu, koncentraci srážecího činidla a případně vede ke vzniku krystalů (Kutá Smatanová, 1999).

2.4.1. Metoda visící kapky

Při této metodě krystalizace, která probíhá v krystalizační destičce, kapka visí na vnitřní straně krycího sklíčka, které je umístěno nad rezervoárem se srážecím roztokem. Krycí sklíčko je k otvoru, kde se nachází krystalizační roztok v krystalizační destičce, pevně připevněno a utěsněno pomocí silikonového oleje (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.2. Metoda sedící kapky

Při této metodě krystalizace, která rovněž probíhá v krystalizační destičce, je kapka umístěna ve stojánku, který se nachází uprostřed otvoru určeného pro srážecí činidlo. Jako těsnící prvek je zde použit plastový kryt krystalizační destičky, který je

upevněn a utěsněn buď silikonovým olejem, nebo pomocí samolepící pásky (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.3 Použití metod

Výše uvedené metody jsou nejvíce používány pro svoji jednoduchost a lehkou manipulovatelnost. Slouží jak k optimalizaci krystalizačních podmínek, tak i k samostatnému pěstování krystalů (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.3. Metoda krystalizace pod olejem

Tato metoda je také známa jako *Microbatch crystallization*.

Krystalizace proteinů pod tenkou vrstvou parafínového oleje byla původně popsána Chayen a kol. (1992). Tato technika spočívá ve smíchání vzorku proteinu a daného srážecího činidla a tato směs je poté pomocí pipety napipetována pod tenkou vrstvou parafínového oleje (Chayen a kol., 1992). Při této metodě se používá minerální olej s rozvětvenými parafíny, který umožňuje jen velmi malou difúzi vody přes olejovou vrstvu. Všechna činidla, která jsou zapojena do krystalizačního procesu, jsou přítomna v určité koncentraci a pomalý růst krystalů je ovlivněn nulovým nebo jen minimálním odpařováním vody z kapky.

2.4.4. Modifikace metody

D'Arcy a kol. (1996) popisuje modifikaci metody smísením parafínového oleje a silikonového oleje. Silikonový olej je polymerní sloučenina, která se skládá z opakujících se jednotek dimethylsiloxane $-(\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{-O})_n-$. Parafínový a silikonový olej je smíchán v poměru 1:1 a pod tuto tenkou vrstvu olejů je poté přidána směs roztoku proteinu a srážecího činidla. Tímto dochází k odpařování vody z kapky přes vrstvu oleje a v kapce se tím zvyšuje koncentrace proteinu a srážecího činidla, což vede k přesycení roztoku a tvorbě krystalů. V této modifikované metodě je tvorba krystalů rychlejší, což je způsobeno rychlejším odpařováním vody z kapky (D'Arcy a kol., 1996).

Při použití této metody je možné měnit poměry parafínového a silikonového oleje a tím měnit rychlost odpařování vody z kapky.

2.5. Pokročilé metody krystalizace

2.5.1. Metoda volné difúze (Free interface diffusion method)

V této metodě je roztok vzorku proteinu umístěn do skleněné kapiláry, ve které je v kontaktu s roztokem srážecího činidla. V kapiláře je možno zřetelně pozorovat rozhraní mezi roztokem vzorku proteinu a roztokem srážecího činidla. Postupem času se roztok vzorku proteinu a srážecího činidla promíchávají a v místě, kde se oba roztoky dotýkaly, tedy v místě rozhraní, dochází k postupné krystalizaci. Touto technikou je možné testování různých koncentrací vzorku a srážecího činidla uvnitř malých skleněných kapilár (Garcia-Ruiz a Moreno, 1994). Tato metoda krystalizace je méně často používána, ale Lorber a kol. (1999) uvádí, že je jednou z metod, kterou používá NASA pro krystalizaci v mikrogravitaci.

2.5.2. Metoda difúze přes přepážku (Counter diffusion method)

Metoda krystalizace přes přepážku se provádí v kapiláře a je označována jako jednoduchá, nákladově efektivní a praktická technika, která je vhodná k získávání krystalů proteinů, které jsou vhodné pro pozdější *X-ray* analýzu dat (Garcia-Ruiz, 1993).

V této metodě krystalizace jsou roztoky vzorku proteinu a srážecího činidla umístěny na sobě ve skleněné kapiláře, buď tak, že jsou oba roztoky v přímém kontaktu, nebo jsou od sebe odděleny propustnou gelovou vrstvou. V průběhu smíchání roztoků dochází k jejich protisměrnému pronikání, které později vede v časoprostorovém gradientu k přesycení podél celé délky kapiláry. Bylo popsáno, že pokud dojde k přesycení podél délky kapiláry, začínají se tvořit amorfní sraženiny, nebo mikrokristaly (Garcia-Ruiz a kol., 1993). Poté, co dochází ke snížení přesycení, je získáno méně krystalů, ale tyto krystaly mají lepší kvalitu a větší velikost.

Garcia-Ruiz a kol. (2001) popisuje, že krystaly, které jsou tvořeny po celé délce kapiláry, jsou tvořeny na základě postupných změn přesycení v kapiláře. Krystalizační testy prováděné ve skleněné kapiláře *counter-diffusion* technikou představují jednotnou směs proteinu a srážecího činidla. Sraženina se obvykle vyskytuje na rozhraní, kde se setkává roztok proteinu a srážecího činidla. Pokud byl zvolen správný poměr

koncentrací roztoku a srážecího činidla, v celé délce kapiláry se začnou tvořit krystaly proteinu.

2.5.3. Gel acupuncture method (GAME)

GAME metoda je v podstatě *counter-diffusion* technika, která je prováděna v krystalizačním boxu (*Granada Crystallization Box Domino (GCBD®)*). V této technice jsou roztoky vzorku proteinu a srážecího činidla umístěny tak, aby docházelo k jejich protisměrnému pronikání (Garcia-Ruiz a Moreno, 1994). Roztok proteinu je umístěn v úzké části kapiláry, zatímco druhý rozšířený konec kapiláry je uzavřen. Užší otevřený konec je zasunutý do gelu, kterým je naplněný krystalizační box (*GCBD®*). Gely jsou zde používány jako médium „hromadné dopravy“ pro srážedlo a také drží kapiláry, které obsahují roztok proteinu, ve svislé poloze. Krystalizační box je uzavřen, aby se zabránilo odpařování srážecího činidla. Rozsah přesycení roztoku je vytvořen v roztoku proteinu. Vysoké přesycení je vytvořeno na spodní části kapiláry a nízké na jejím horním konci (Garcia-Ruiz a Moreno, 1994). Tato metoda je s úspěchem používána při hledání krystalizačních podmínek proteinů.

2.6. Alternativní krystalizační metody

2.6.1. Očkovací metody (*seeding*)

Očkovací techniky jsou aplikovány při testování krystalizačních podmínek a také se používají v případech, kdy chceme získat větší a kvalitnější krystaly daných proteinů (Bergfors, 2003). Během očkování jsou procesy vedoucí ke spontánní nukleaci odděleny od těch, které umožňují růst jader krystalů (Kutá Smatanová, 2008). V praxi se očkování provádí tak, že do předem vyváženého roztoku proteinu jsou přidány zárodky krystalů. Vyvážený roztok proteinu byl připraven podle předchozích krystalizačních experimentů nebo jen při mírně změněných krystalizačních podmínkách pro daný protein (Bergfors, 2003).

Kutá Smatanová (2008) popisuje další výhody, které lze zahrnout k očkovacím technikám: 1. Oddělení nukleace od růstu krystalů a vynechání spontánní nukleace, 2. Zvýšení velikosti krystalů a kontrola počtu krystalů, 3. Získání konzistentních výsledků pro daný protein, když se krystaly ne vždy objeví ve známých podmínkách, 4. Použití menšího množství proteinů, 5. Urychlení výsledků, pokud je malá spontánní nukleace, a

6. Získání širší škály krystalových soustav očkováním do naprosto odlišných srážecích roztoků.

2.6.2. Pre-očkovací metoda (*Pre-seeding method*)

Krystalizační metody používané ve spojitosti s očkovacími metodami se mohou částečně odlišovat od samostatně prováděných krystalizací. Krystalizační experimenty totiž musí při očkování roztoku danými krystaly připouštět určitý rovnovážný stupeň. Pro zabezpečení rovnovážného stupně je používána difúze, která zabezpečuje pomalou a kontrolovanou metodu pomocí přenosu těkavé látky mezi roztokem proteinu a srážecím roztokem (Kutá Smatanová, 1999). Vhodné variace metod vypařování využívají metody sedící a visící kapky, které jsou uvedeny v paragrafu 2.2.1.

Stura a Wilson, 1992 uvádí, že *pre-seeding* je podstatný pro očkování stejným a reprodukovatelným způsobem. Mezi nejvýznamnější faktory, které ovlivňují uvedenou metodu, patří: 1. Prostředí a nutná opatrnost při očkování, 2. Získání rovnovážného stavu proteinového roztoku, který je určen pro očkování, 3. Stanovení nejvhodnější úrovně přesycení roztoku určeného k očkování.

2.6.3. Vlasové očkování (*Streak seeding method*)

Vlasové očkování je užitečná technika, pokud vykazovaly krystaly, které byly vytvořeny při počátečních krystalizačních metodách, nízkou kvalitu nebo dosahovaly malých rozměrů. Lze tedy konstatovat, že je tato technika použita k efektivnějšímu růstu krystalů (Stura a Wilson, 1992).

Při této technice očkování se pracuje s vlasem upevněným v kapiláře, který je nutno dezinfikovat etanolem, opláchnout destilovanou vodou a vysušit pomocí filtračního papíru (Kutá Smatanová, 1999). Místo vlasů je možno použít i kočičí chlup. Je důležité, aby čas mezi zachycením zrnka krystalu na vlas, či kočičí chlup, a vytvořením pruhu v nově vytvořené kapce, nepřesahoval více než 30 sekund. Používá se zde vhodně vyvážený proteinový roztok z toho důvodu, aby nedošlo k rozpuštění zrnka krystalu po jejich přesunu do kapky.

Po aplikaci techniky vlasového očkování dochází poblíž vytvořeného pruhu ke vzniku krystalů. Pokud je koncentrace srážecího roztoku vysoká a jeho koncentrace

v rezervoáru nízka, krystaly se budou nejprve objevovat podél vytvořeného pruhu, později se budou objevovat i dále od pruhu. Vhodný stupeň koncentrace použitého srážecího roztoku, který odpovídá za vznik krystalů poblíž vytvořeného pruhu, se určuje z experimentálních podmínek (Kutá Smatanová, 1999).

2.6.4. Makro- a Mikroočkování (*Macroseeding a macroseeding methods*)

Tyto očkovací techniky se od sebe odlišují tím, že v technice *microseedingu* jsou využívány jako krystalizační zrna mikrokryštaly a v technice *macroseedingu* jsou pro očkování používány krystaly větší označované jako makrozrna (Kutá Smatanová, 1999).

2.6.4.1. *Microseeding method*

Metoda *microseedingu*, kde se mikroskopické krystalické fragmenty proteinu vkládají do předem připraveného proteinového roztoku, se rozděluje do tří fází. První fází je příprava očkovacího roztoku, která zahrnuje omývání několika malých krystalů v roztoku, ve kterém dochází k jejich částečnému rozpuštění. Částečné rozpuštění je dobré pro to, aby se z povrchu krystalek odstranily vady popřípadě amorfní sraženiny. Poté co jsou krystaly stabilizovány, jsou přeneseny do homogenizátoru, kde dojde k jejich rozdrčení. Pak jsou převedeny do kapek se zvyšující se koncentrací srážecího činidla a po několika hodinách či dnech se začínají objevovat krystaly (Kutá Smatanová, 1999).

Druhá fáze spočívá v rozdrčení krystalů, které byly vytvořeny v první fázi, pomocí homogenizátoru a několik mikrolitrů očkovacího roztoku je pipetováno do připravených ampulí se stabilizačním roztokem. Roztok, který zde obsahuje zrnka mikrokrytalů je dále ředěn tak, že každá následující ampulka obsahuje méně mikrokrytalů. Optimální počet ředění je 10-20x (Kutá Smatanová, 1999). Je důležité, aby před vlastním očkování byl srážecí roztok rovnovážný z toho důvodu, aby nedošlo k rozpuštění zrn mikrokrytalů.

Při třetí fázi, vlastním očkování, se odebere z každé ampulky několik mikrolitrů očkovacího roztoku, který je zaveden do předem připravených rovnovážných kapek. Pokud jsou mikrokryštaly stabilní, tak po několika dnech dochází k nárůstu nových a větších krystalů (Kutá Smatanová, 1999).

2.6.4.2. *Macroseeding method*

Při této metodě se jeden krystal zavádí do vhodného předem připraveného rovnovážného roztoku. Krystal je separován z krystalizačního roztoku a nasán do skleněné kapiláry. Poté je krystal opakovaně omýván ve stabilizačním roztoku, aby se odstranily mikročástice, které jsou zachycené na povrchu proteinu. V posledním kroku je krystal přenesen do předem připravené rovnovážné kapky proteinu, a pokud jsou vytvořeny optimální podmínky, je možno po několika dnech sledovat nárůst tohoto krystalu (Kutá Smatanová, 1999).

2.7. Mikrobiální enzymy – *Halogenalkandehalogenasy*

Halogenalkandehalogenasy patří mezi mikrobiální enzymy, které přeměňují širokou řadu halogenových alifatických sloučenin na odpovídající alkoholy pomocí hydrolytického mechanismu. Výsledkem tohoto procesu je tvorba primárního alkoholu a halogenidového iontu. Tyto enzymy hrají důležitou roli v biodegradaci různých látek znečišťujících životní prostředí, a vyznačují se poměrně vysokou detoxikační schopností (Degtjarik a kol., 2013).

2.7.1. *Thaumatín*

Thaumatín je přírodní $\alpha + \beta$ protein, který byl syntetizován z ovoce katamfe, které roste v západní Africe. Dobře charakterizované jsou *Thaumatín I* a *II*, které se liší pouze v jedné aminokyselině nacházející se na pozici 46 v řetězci proteinu. *Thaumatín I* má na pozici 46 asparagin a *Thaumatín II* lysin. Uvádí se, že obě varianty jsou zhruba 2000x sladší než sacharóza (Edens a kol., 1984).

Thaumatín je složen pouze z jediného řetězce, který obsahuje 207 aminokyselin, 8 disulfidových vazeb a jeho molekulová hmotnost je 22,2 kDa. Je velice dobře rozpustný ve vodě, stabilní při ohřevu a v kyselém prostředí (Edens a kol., 1984).

2.7.2. Mikrobiální enzym – *LinB*

Enzym *LinB*, který patří do výše zmíněných *halogenalkandehalogenas*, byl izolován z gramnegativní půdní bakterie *Sphingobium japonicum UT26*. Lze říci, že má poměrně širokou substrátovou specifitu a mohl by být aplikován v biodegradaci a v biosenzorování environmentálních populantů (Degtjarik a kol., 2013).

Enzym LinB se skládá ze dvou domén. První doménou je jádro (alfa/beta hydrolasa) a druhá doména je tvořena spirálovou čepicí, která leží na vrcholu domény jádra. Aktivní místo se nalézá v hydrofobní dutině mezi dvěma oblastmi a k povrchu proteinu je připojeno několika tunely (Marek a kol., 2000). Velikost, tvar, fyzikálně-chemické vlastnosti a dynamika tunelů jsou považovány za faktory, které mají vliv na substrátovou specifitu a enzymatickou aktivitu halogenalkandehalogenas (Koudeláková a kol., 2011).

2.7.3. Varianta LinB32

Varianta LinB32, která nese mutaci L177W, obsahuje objemný zbytek tryptofanu, který blokuje hlavní tunel enzymu. Tato varianta vykazuje změny v substrátové specifitě a limituje odchod iontu halogenidu (Chaloupková a kol., 2003; Biedermannová a kol., 2012.)

2.7.4. Varianta LinB70

Varianta LinB70, která obsahuje dvě mutace L44I a H107Q, se vyznačuje tím, že vazebné místo pro halogenid má v obdobné pozici, jako podobná dehalogenasa DbeA izolována z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94. Tato varianta vykazuje rozdíly v katalytické aktivitě (Degtjarik a kol., 2013).

3. Materiál a metodika

3.1. Experimentální pracoviště

Všechny krystalizační experimenty byly prováděné v Ústavu komplexních systémů FROV JU v laboratořích makromolekulární struktury a dynamiky v Nových Hradech. K testování proteinů byla použita metoda SDS-PAGE (gelová elektroforéza) a ke krystalizaci proteinů byly použity základní krystalizační metody visící a sedící kapky, metoda založená na krystalizaci pod silikonovým olejem a pokročilá metoda krystalizace v kapilárách. Charakter krystalů byl v poslední fázi testován pomocí dvou testů – CRUSH testu a DYE testu.

Poté byla ještě modelována struktura proteinů pomocí vizualizačních programů WinCoot pracujícího s mapou elektronové hustoty a VMD určeném pro zobrazování struktury proteinu.

3.2. Postup přípravy srážecích roztoků

Nejprve byly připraveny srážecí (precipitační) roztoky, které byly použity ke krystalizaci proteinů. Pro modelový protein *Thaumatococcus* byl použit jako srážecí činidlo roztok 1,5M vlnan sodno-draselný (*Sodium potassium tartrate*) a pro zkoumaný protein halogenalkandehalogenasu LinB32 izolovanou ze *Sphingobium japonicum* UT26 bylo použito srážecí činidlo obsahující 0,2M dusičnan draselný a 20% PEG 3350 (polyethylénglykol).

3.2.1. Srážecí roztok pro *Thaumatococcus*

Příprava srážecího roztoku pro *Thaumatococcus*, kterého bylo připraveno celkem 100ml, sestávala z několika kroků. Prvním krokem přípravy byl výpočet, kterým se zjistilo, že na přípravu 100 ml roztoku budeme potřebovat 42,33g vlnanu sodno-draselného. Druhým krokem přípravy bylo smíchání jednotlivých komponent. Bylo použito 100ml destilované vody a 42,33g vlnanu sodno-draselného, které se následně postupně přidávalo do destilované vody a za neustálého míchání skleněnou tyčinkou bylo ve vodě rozpuštěno. Tímto krokem byl srážecí roztok připraven k použití.

3.2.2. Srážecí roztok pro LinB32

Příprava srážecího činidla pro LinB32, kterého bylo připraveno rovněž 100ml, sestávala ze stejných kroků, jako u již výše zmíněného srážecího roztoku pro

Thaumatococcus. Výpočtem bylo zjištěno, že na přípravu 100ml roztoku bylo potřeba navážit 2,022g 0,2M dusičnanu draselného a 20g PEG 3350. Smíchalo se tedy 100ml destilované vody s 2,022g 0,2M dusičnanem draselným a 20g PEG 3350. Jednotlivé komponenty se do destilované vody přidávaly jednotlivě a za stálého míchání se ve vodě rozpustily.

3.3. Postup experimentu gelové elektroforézy (SDS-PAGE)

Gelová elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného je technika používaná k separaci proteinů na základě jejich odlišné elektroforetické pohyblivosti v gelu. Pohyblivost v gelu závisí na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti proteinu, denuraci proteinu (stupni rozbalení) a na dalších faktorech.

3.3.1. Příprava separačního gelu

Příprava separačního gelu spočívala ve smíchání 3,3ml destilované vody, 4ml 30% akrylamidu, 2,5ml 1,5M Tris, 0,1ml 10% SDS, 0,1ml 10% persulfátu amonného a 0,004ml TEMEDu. TEMEDu se přidalo 2x větší množství, kvůli urychlení polymerace. Takto připravený roztok gelu byl pomocí mikropipety nalit mezi sklíčka, která byla utěsněná po stranách a na dolní straně pomocí gumového těsnění. Roztok gelu byl přidán zhruba do dvou třetin výšky sklíček. Dalším krokem bylo převrstvení etanolem, který napomohl k vyrovnání hladiny gelu. Takto připravené sklíčko s roztokem gelu se nechalo 30 minut odstát, aby došlo ke ztuhnutí gelu.

3.3.2. Příprava svrchního (koncentrovaného) gelu

Příprava svrchního gelu byla obdobná, jako již u výše popsaného separačního gelu. Spočívala tedy ve smíchání 2,7ml destilované vody, 0,67ml 30% akrylamidu, 0,5ml 1M Tris, 0,04ml 10% SDS, 0,04ml 10% persulfátu amonného a 0,004ml TEMEDu, kterého bylo opět přidáno 2x větší množství pro urychlení polymerizace. Takto připravený roztok gelu se pomocí pipety přidal mezi sklíčka na separační gel. Před přidáním svrchního gelu byl nejprve vylit etanol a poté přidán roztok svrchního gelu. Posledním krokem přípravy bylo přidání hřebínku mezi sklíčka, kde byl roztok svrchního gelu. Hřebínek byl přidán proto, aby se vytvořili ve svrchním gelu komůrky, kam se bude pipetovat roztok proteinu k následné elektroforéze.

3.3.3. Design gelové elektroforézy

Výše uvedený připravený gel i se sklíčky, mezi nimiž ztuhnul, byl umístěn do drážek elektroforetické komory. Poté byl přidán předem připravený pufr (25mM Tris-HCl, 200mM Glycinu a 0,15% SDS), kterým se naplnila elektroforetická komora. Následně byly přidány vzorky proteinů a ke každému specifický sample buffer (modrá barvička, která se skládá z 10% SDS, 10 mM beta-marcapto-ethanol, 20 % Glycerol, 0.2 M Tris-HCl, pH6.8, 0.05% Bromophenolblue). V gelu bylo vytvořeno 12 komůrek, postupovalo se tím způsobem, že vždy byly vzorky pipetovány ob jednu komůrku, kvůli lepší orientaci a přehlednosti.

Do první komůrky byl aplikován pomocí pipety kontrolní marker. Jako marker byl použitý Biorad marker-unstained, který je složen z 10 rekombinantních proteinů (10-250 kDa). Do třetí komůrky byl aplikován LinB32 a sample buffer, došlo ke smísení, v koncentraci 1:5 (1 μ l roztoku proteinu a 5 μ l sample buffer), do páté komůrky byl aplikován Thaumatin a příslušný sample buffer v koncentračním poměru 1:1 (5 μ l proteinu a 5 μ l sample buffer), do sedmé komůrky byl aplikován opět Thaumatin a sample buffer v poměru 1:5 (1 μ l proteinu a 5 μ l sample buffer), do deváté byl aplikován LinB32 a sample buffer v poměru 1:1 (5 μ l proteinu a 5 μ l sample buffer) a do poslední jedenácté komůrky byl aplikován kontrolní marker. Po tomto kroku byly ke vzorkům přidány 2 μ l metylenové modře, pro viditelnost výsledků elektroforézy. Elektroforetická komora byla dolita po okraj výše zmíněným předem připraveným pufrem. Komora byla zakryta krytem a následně připojena na zdroj, který vytváří stejnosměrný elektrický proud. Bylo dbáno, aby se nezaměnila polarita. Byl použit stejnosměrný elektrický proud o napětí 21mA, po dobu 1,5hod.

Po uplynutí doporučené doby elektroforézy se opatrně vyjmuly z elektroforetického boxu skleněné destičky s gelem. Dalším krokem bylo opatrné vyjmutí gelu z destiček, což bylo provedeno pomocí skalpelu. Po vyjmutí gelu bylo možno pozorovat výsledek elektroforézy.

3.4. Metoda visící kapky (podle T.M. Bergfors, 1999)

3.4.1. Design metody v Petriho misce

První způsob byl proveden v Petriho misce následujícím způsobem. Na dno Petriho misky byl přidán srážecí roztok, který dosahoval výšky ode dna Petriho misky cca. 3mm. Poté byly na víčko Petriho misky umístěny 3 kapky (1 kapka 8 μ l) srážecího roztoku a do těchto kapek byl přidán roztok proteinu, došlo tedy ke smíšení precipitačního činidla a roztoku proteinu. V každé kapce přitom byla jiná koncentrace proteinu a srážecího roztoku. V první kapce byl poměr proteinu a srážecího činidla 1:1 (4 μ l proteinu a 4 μ l srážecího roztoku), ve druhé kapce byl poměr 1:3 (2 μ l proteinu a 6 μ l srážecího roztoku) a ve třetí kapce byl poměr 3:1 (6 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku). Poté se opatrně víčkem miska zavřela a oblepila parafilmem, který zajistil, aby do Petriho misky nepronikal vzduch. Tímto způsobem byla metoda provedena pro oba výše uvedené testované proteiny s jejich srážecími roztoky.

3.4.2. Design metody v krystalizační destičce

Druhý způsob krystalizace byl proveden v krystalizační destičce Limbro plate (Obrázek 1) pro visící kapky [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Destička měla 24 otvorů, ale pro tento experiment bylo použito pouze prvních 12 otvorů. Kolem každého otvoru byl silikonový olej resp. silikonový tuk, který slouží k přilepení krycího sklíčka s kapkou proteinu a srážecího roztoku (1 kapka měla objem 4 μ l). Do každého otvoru destičky se přidalo 800 μ l srážecího roztoku, bez roztoku proteinu. Dále se postupovalo tak, že první 4 otvory byly zakryty krycími sklíčky, která obsahovala kapky se stejnými koncentracemi proteinu a srážecího roztoku v poměru 2:2 (2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku). Do 5 a 6 otvoru byla použita koncentrace v poměru 1:3 (1 μ l proteinu a 3 μ l srážecího roztoku), do otvoru 7 a 8 byla použita koncentrace v poměru 3:1 (3 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku). Do 9 a 10 byla použita snížená koncentrace v poměru 1:2 (1 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku) a do 11 a 12 otvoru koncentrace 2:1 (2 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku). Tento způsob byl použit pro oba výše uvedené testované proteiny s jejich srážecími roztoky.



Obrázek 1. *Krystalizační destička (Limbro plate) – použitá pro metodu visící kapky (foto autor)*

3.5. Metoda sedící kapky (podle T.M. Bergfors, 1999)

3.5.1. Design metody v Petriho misce

První způsob byl proveden v Petriho misce, kde na rozdíl od předešlé metody visící kapky na dno nebyl přidán srážecí roztok. Na dno byly umístěny 3 kapky (1 kapka o objemu 8 μ l), každou tvořil roztok proteinu a srážecího roztoku, došlo tedy opět k jejich smísení. Každá kapka obsahovala jinou koncentraci proteinu a srážecího roztoku. První kapka byla v poměru 1:1 (4 μ l proteinu a 4 μ l srážecího roztoku), druhá kapka byla v poměru 1:3 (2 μ l proteinu a 6 μ l srážecího roztoku) a třetí kapka byla v poměru 3:1 (6 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku). Miska s kapkami byla zakryta víčkem a oblepena parafilmem, který zabraňoval vstupu vzduchu do misky. Takto byly připraveny oba výše uvedené testované proteiny s jejich srážecími roztoky.

3.5.2. Design metody v krystalizační destičce

Druhý způsob byl proveden v krystalizačních destičkách (Obrázek 2) pro sedící kapky CrysChem plates [Hampton Research, CA, USA]. Destička byla vybavena dvanácti otvory a uprostřed každého otvoru měla podpůrný stojánek, který vyčníval z rezervoáru pro precipitační činidlo. Do každého otvoru (rezervoáru) bylo přidáno 800 μ l srážecího roztoku a na vrchol každého podpůrného stojánku kapka, která byla

vytvořena smísením roztoku proteinu a srážecího roztoku. První 4 stojánky obsahovaly kapky v poměru 2:2 (2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku), stojánky 5 a 6 obsahovaly kapky v poměru 1:3 (1 μ l proteinu a 3 μ l srážecího roztoku), stojánky 7 a 8 obsahovaly kapky v poměru 3:1 (3 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku), do stojánek 9 a 10 byl použit poměr 1:2 (1 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku) a do stojánek 11 a 12 2:1 (2 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku). Takto připravená krystalizační destička poté byla zakryta víčkem a oblepena samolepící páskou, aby nedocházelo k přístupu vzduchu.

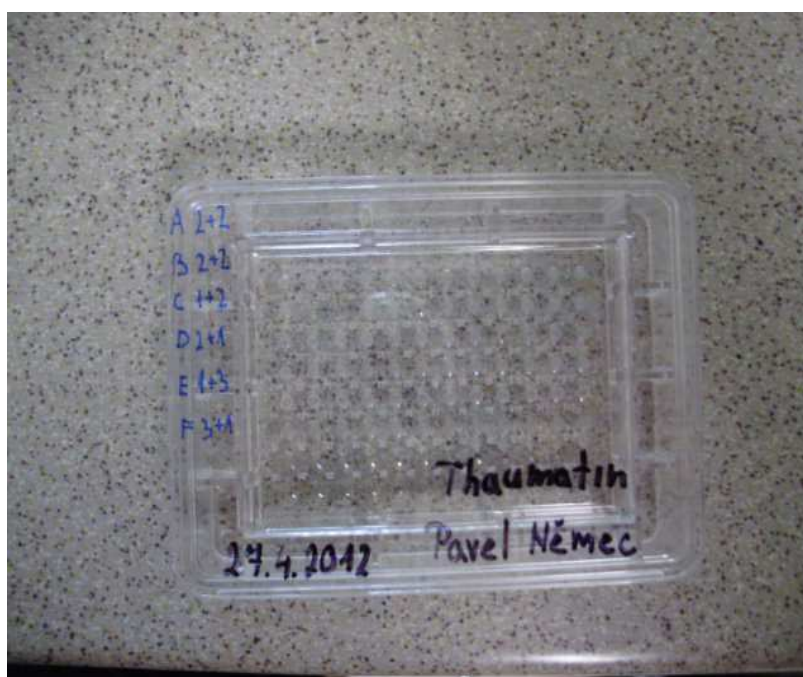


Obrázek 2. Krystalizační destička (CrysChem plate) – použitá pro metodu sedící kapky (foto autor)

3.6. Design krystalizace pod silikonovým olejem

Tato metoda krystalizace byla provedena v krystalizační destičce Terasaki plate (Obrázek 3) pro microbatch experiment [Hampton Research, CA, USA], která obsahovala 72 jamek, kam se umísťovaly kapky, které byly vytvořené smícháním roztoku proteinu a srážecího roztoku. Nejprve byla celá plocha destičky zalita 4ml směsí oleje. Směs oleje byla vytvořena smícháním 2ml parafínového oleje a 2ml silikonového oleje. Po tomto kroku se postupně do jamek, které byly zality směsí oleje, pipetovaly pomocí mikropipety jednotlivé kapky. Nejprve byly pomocí mikropipety pipetovány kapky precipitačního činidla a poté se do těchto kapek přidaly kapky roztoku proteinu, aby byla vytvořena směs pro krystalizaci. Opět bylo v destičce testováno 6 různých koncentrací roztoku proteinu a srážecího roztoku.

V první vodorovné řadě dvanácti jamek byla použita koncentrace v poměru 2:2 (2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku), ve druhé vodorovné řadě byla použita stejná koncentrace jako v první řadě. Ve třetí řadě byla použita koncentrace v poměru 1:3 (1 μ l proteinu a 3 μ l srážecího roztoku), ve čtvrté řadě 3:1 (3 μ l proteinu a 1 μ l precipitačního činidla). V posledních dvou vodorovných řadách byla použita snížená koncentrace v poměru 1:2 (1 μ l proteinu a 2 μ l srážecího roztoku) a 2:1 (2 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku). Tento pokus byl použit pro oba výše uvedené proteiny s jejich srážecími roztoky.



Obrázek 3. Krystalizační destička (Terasaki plate) – použitá pro metodu krystalizace pod olejem (foto autor)

3.7. Design krystalizace v kapilárách

Tato metoda krystalizace byla provedena ve skleněných kapilárách o průměru 0,5mm. Skleněná kapilára byla užším koncem umístěna do roztoku proteinu a pomocí kapilární síly byl roztok nasát kapilárou směrem vzhůru. Roztok proteinu byl nasát do výšky kapiláry v místě, kde docházelo k jejímu rozšíření. Poté se pomocí modelovací hmoty kapilára ve spodní části utěsnila, aby nedocházelo ke ztrátě roztoku proteinu.

Dalším krokem bylo přidání srážecího roztoku pomocí mikropipety. Důležité bylo, aby roztok srážecího roztoku byl přidán tak, aby byl v kontaktu s roztokem

proteinu. Takto připravená kapilára byla přemístěna do krystalizačního boxu GCB® [Triana Sci&Tech, Spain] (Obrázek 4) a poté došlo k utěsnění rozšířené části kapiláry. Utěsnění bylo provedeno pomocí rozeřtuté kapky vosku, aby do kapiláry s roztoky srážecího roztoku a proteinu nepronikal vzduch. Tímto způsobem byly testovány oba dva výše uvedené proteiny s jejich srážecími roztoky.



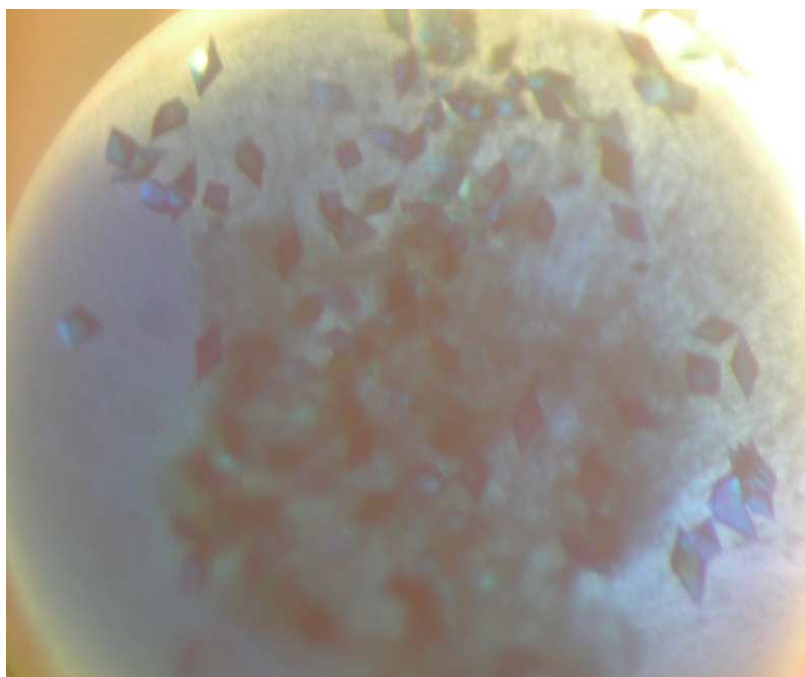
Obrázek 4. Kapiláry umístěné v krystalizačním boxu GCB® (foto autor)

3.8. Metody testování krystalů

Testování krystalů bylo provedeno pro ověření, zdali vytvořené krystaly jsou krystaly proteinů, protože se může stát, že vytvořené krystaly nemusí vykazovat vlastnosti proteinových krystalů a může se jednat o krystaly solí.

3.8.1. Design DYE testu (barvení krystalů)

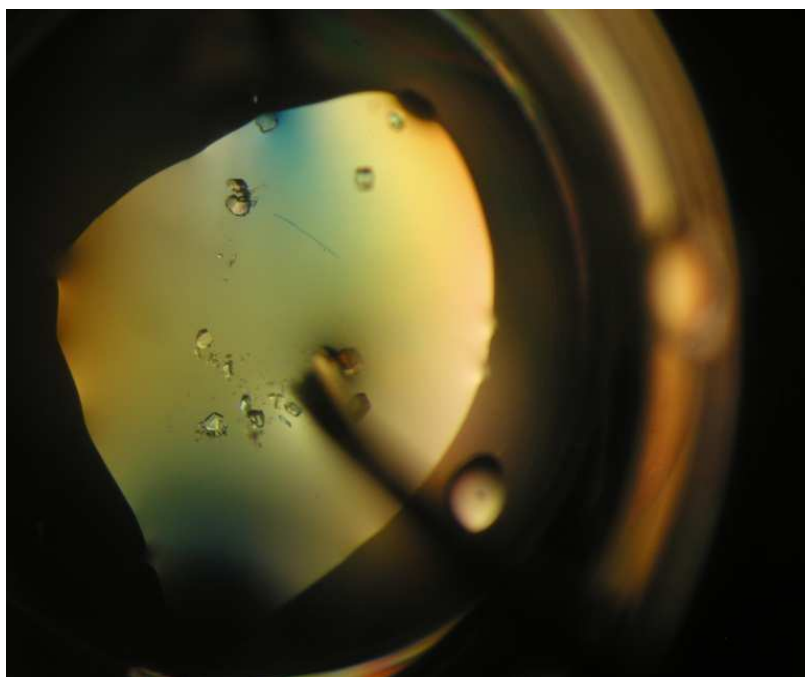
Test barvení krystalů byl proveden tak, že do kapky (smíšené roztoky proteinu a srážecího roztoku), kde byly vytvořené krystaly, se pomocí mikropipety opatrně přidala modrá barva IzIt [Hampton Research, CA, USA]. Po 30 minutách se pod mikroskopem kontrolovalo zbarvení krystalů. Pokud se krystaly zbarví modře (Obrázek 5), tak se jedná o proteinové krystaly, pokud by krystaly byly neproteinového původu (krystaly soli), tak by k zbarvení krystalů nedošlo.



Obrázek 5. *Metoda barvení krystalů (foto autor)*

3.8.2. Design CRUSH testu (rozbití krystalů)

Test rozbití krystalů byl prováděn pod mikroskopem, kam se umístila destička s vytvořenými krystaly, a pomocí jehličky se pod mikroskopem krystaly rozbíjely. Pokud se krystalová struktura po doteku jehličkou okamžitě rozpadla (Obrázek 6), tak se jednalo o krystal proteinového původu. Pokud by se jednalo o krystaly neproteinového původu (krystaly solí), tak po doteku by se jejich struktura nerozpadla, protože jsou mnohem odolnější, než proteinové krystaly.



Obrázek 6. *Metoda rozbíjení krystalů (foto autor)*

3.9. Modelování struktury LinB32

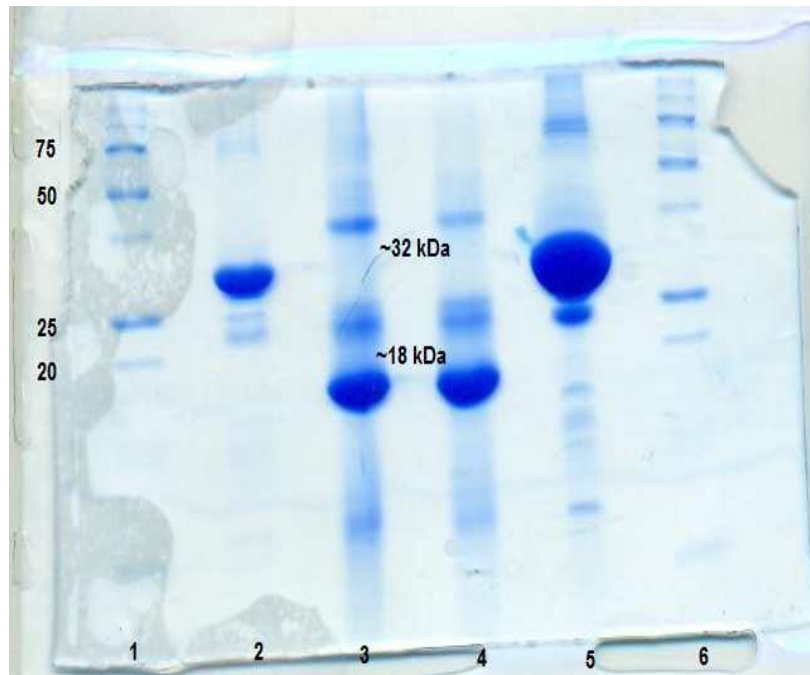
Z internetového serveru University v Leicesteru, byla stažena volně dostupná verze programu na modelování proteinu – WinCoot. V programu byla otevřena struktura mapy elektronové hustoty a upravena tak, aby uspořádání aminokyselin odpovídalo skutečnosti, ve které jsou aminokyseliny v dehalogenase uspořádány.

Po úpravě mapy elektronové hustoty v programu WinCoot, který lze nalézt na odkazu <http://www.ysbl.york.ac.uk/~lohkamp/cool/wincoot-download.html>, byl ještě stažen volně dostupný program pro řešení struktur proteinů a vytvoření skutečného 3D obrazu – VMD, který lze nalézt na odkazu <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Následně byla řešena struktura halogenalkandehalogenasy LinB32.

4. Výsledky

4.1. Gelová elektroforéza

Výsledkem metody gelové elektroforézy je gel, který ukazuje jakou velikost a čistotu mají modelový protein *Thaumatococcus* a testovaná halogenalkandehalogenasa *LinB32*. Z obrázku je patrné, že modelový protein *Thaumatococcus* má větší velikost než testovaná halogenalkandehalogenasa *LinB32* (Obrázek 7).



Obrázek 7. Gelová elektroforéza – modelový protein *Thaumatococcus* a testovaného proteinu *LinB32*. Čísla sloupců 1 a 6 - marker a jeho velikosti, čísla sloupců 2 a 5 - modelový protein *Thaumatococcus* a jeho velikost na úrovni 32 kDa a čísla sloupců 3 a 4 - velikost testovaného proteinu *LinB32* na úrovni 18 kDa. kDa – kilo Daltony (foto autor)

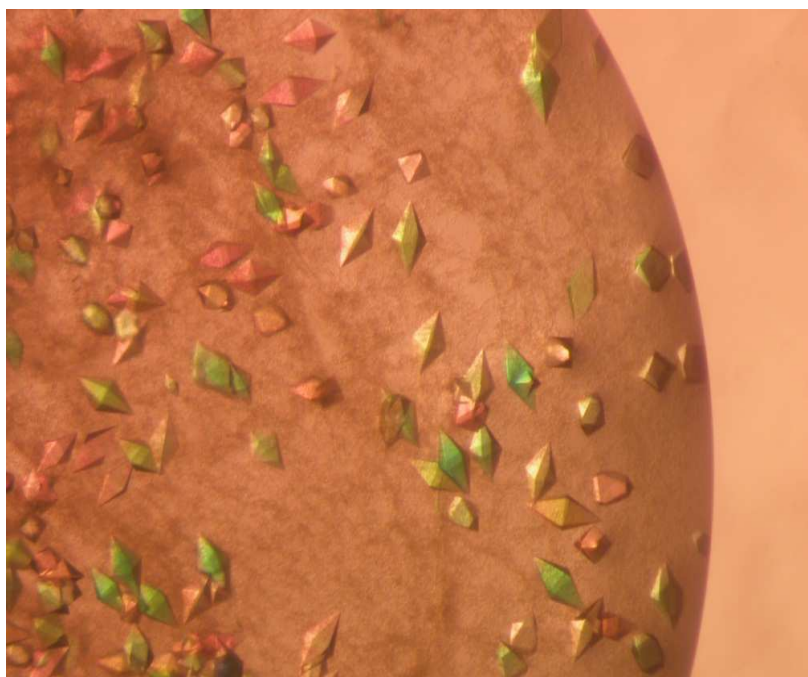
4.2. Výsledky krystalizace *Thaumatococcus*

V krystalizační destičce při použití metody sedící kapky došlo v některých kapkách k nárůstu mikrokrytalů a monokrytalů. V této metodě bylo použito více koncentračních poměrů – 1:1 (stejný poměr roztoku proteinu a srážecího roztoku), 1:3 a 1:2 (poměr ve prospěch roztoku srážecího činidla), 3:1 a 2:1 (poměr ve prospěch roztoku proteinu). Tyto použité poměry, jsou spolu s výsledky krystalizace, vyobrazeny v tabulce 1.

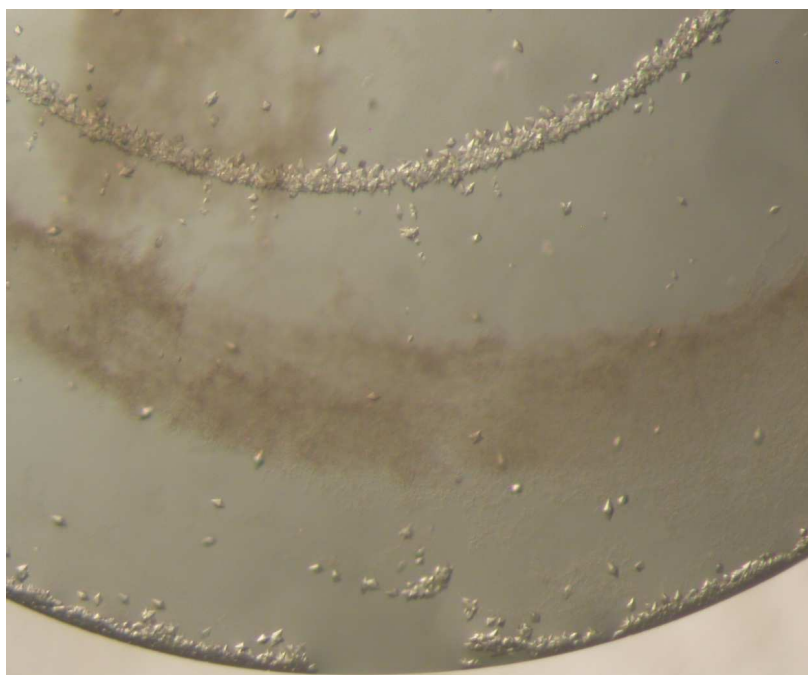
Z výsledků je tedy patrné, že k nárůstu větších a kvalitnějších monokrystalů (Obrázek 8) dochází, když je poměr koncentrací 1:1, 3:1 a 2:1. Je to tehdy, když je koncentrace roztoku proteinu větší, než koncentrace srážecího roztoku. A naopak při koncentracích 1:3 a 1:2, když je koncentrace srážecího roztoku větší, než koncentrace roztoku proteinu, dochází k nárůstu mikrokystalů (Obrázek 9), které jsou méně kvalitní a nedají se použít k měření difrakčních dat. Po krystalizaci byla ještě pomocí vizualizačního programu VMD vyhotovena struktura halogenalkandehalogenasy *Thaumatinu* (Obrázek 10).

Tabulka 1. Metoda sedící kapky v krystalizační destičce pro *Thaumatinu* – šedá barva (krystalizační destička), bílá barva (použité poměry koncentrace), zelená barva (nárůst monokrystalů), žlutá barva (nárůst mikrokystalů).

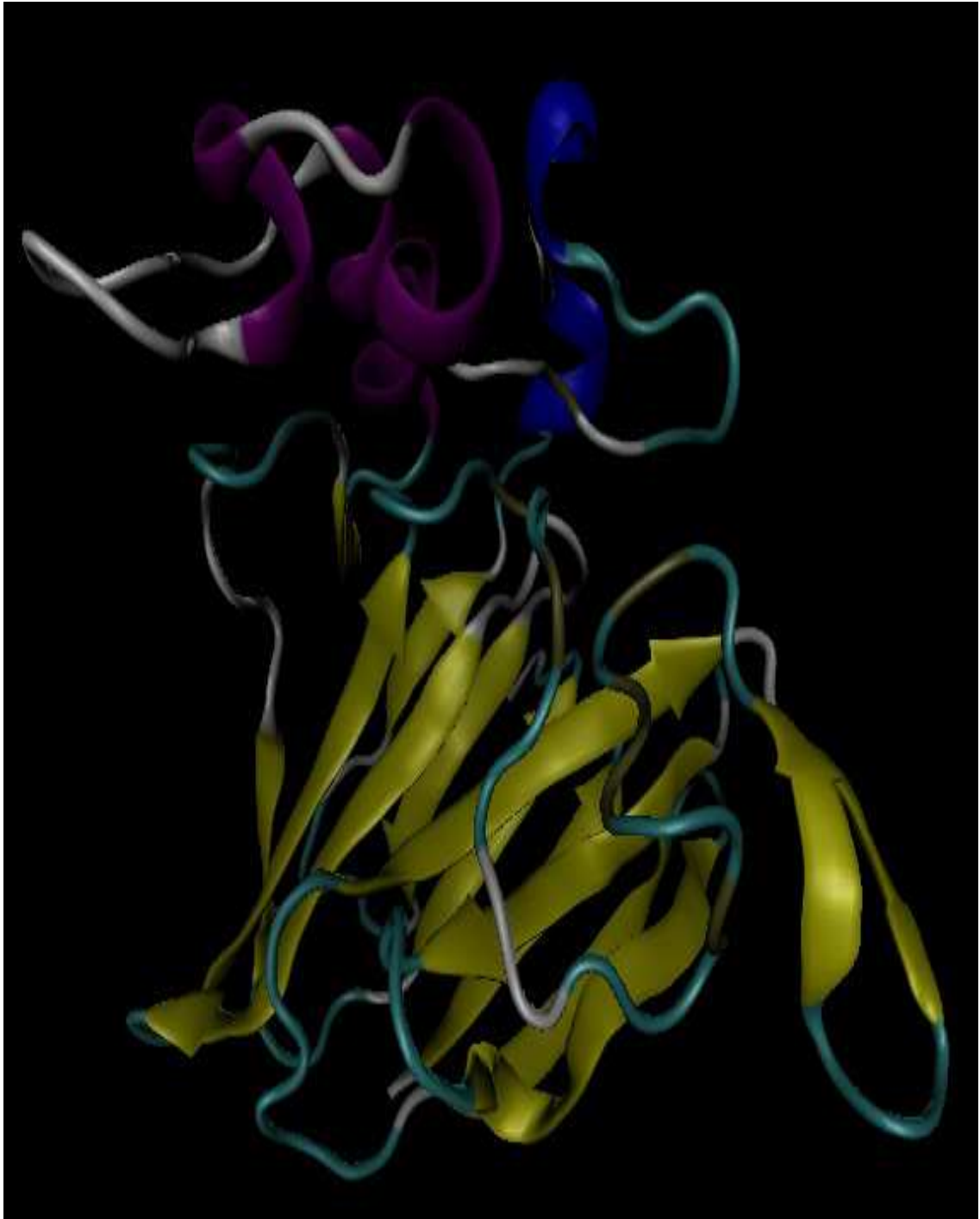
	1	2	3	4	5	6
	1:1	1:1	1:3	3:1	1:2	2:1
A	50% <i>Thaumatinu</i>	50% <i>Thaumatinu</i>	25% <i>Thaumatinu</i>	75% <i>Thaumatinu</i>	33,3% <i>Thaumatinu</i>	66,6% <i>Thaumatinu</i>
	1:1	1:1	1:3	3:1	1:2	2:1
B	50% <i>Thaumatinu</i>	50% <i>Thaumatinu</i>	25% <i>Thaumatinu</i>	75% <i>Thaumatinu</i>	33,3% <i>Thaumatinu</i>	66,6% <i>Thaumatinu</i>
Je použit roztok proteinu, který obsahuje 500 μ l destilované vody a 12,5mg <i>Thaumatinu</i> a roztok srážecí, který obsahuje 42,33g <i>vinanu sodno-draselného</i> ve 100ml destilované vody						



Obrázek 8. Monokrystaly Thaumatinu – monokrystaly narostlé při krystalizačních podmínkách za použití 1,5M vlnanu sodno-draselného za použití metody sedící kapky (foto autor)



Obrázek 9. Mikrokrystaly Thaumatinu - krystaly narostlé při krystalizačních podmínkách za použití 1,5M vlnanu sodno-draselného za použití metody sedící kapky (foto autor)



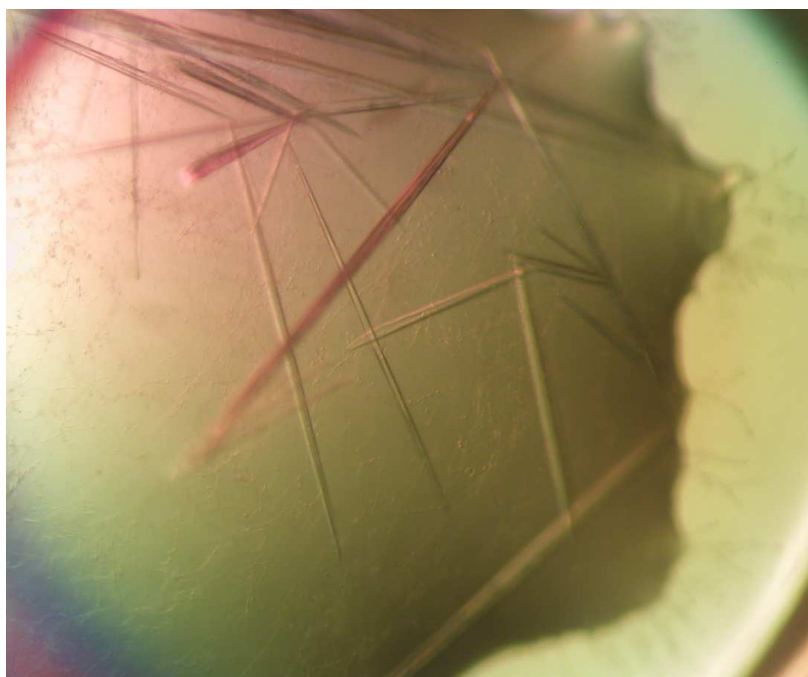
Obrázek 10. *Struktura Thaumatinu*

4.3. Výsledky krystalizace LinB32

V metodě sedící kapky v krystalizační destičce (Tabulka 2) je výsledkem krystalizace nárůst jehlicovitých krystalů (Obrázek 11) a menších monokrystalů (Obrázek 12). K nárůstu jehlicovitých krystalů dochází v poměru 1:1 (poměr roztoku proteinu a srážecího roztoku je ve stejném poměru), zatímco v koncentračních poměrech 3:1 a 2:1 dochází k růstu menších monokrystalů (zde je koncentrace roztoku proteinu větší, než koncentrace srážecího roztoku). V posledních použitých koncentračních poměrech 1:2 a 1:3 vůbec k růstu krystalů nedošlo (koncentrace roztoku srážecího činidla je větší, než koncentrace roztoku proteinu).

Tabulka 2. Metoda sedící kapky v krystalizační destičce pro LinB32 – šedá barva (krystalizační destička), bílá barva (použité poměry koncentrací), žlutá barva (jehlicovité krystaly), zelená barva (menší monokrystaly) a červená barva (bez krystalů).

	1	2	3	4	5	6
	1:1	1:1	1:3	3:1	1:2	2:1
A	50% LinB32	50% LinB32	25% LinB32	75% LinB32	33,3% LinB32	66,6% LinB32
	1:1	1:1	1:3	3:1	1:2	2:1
B	50% LinB32	50% LinB32	25% LinB32	75% LinB32	33,3% LinB32	66,6% LinB32
Použit je roztok proteinu, který obsahuje 500 μ l destilované vody a 12,5mg LinB32 a roztok srážecí, který obsahuje 100ml destilované vody, 2,022g 0,2M dusičnanu draselného a 20g PEG 3350						



Obrázek 11. Jehlicovité krystaly LinB32 – krystaly narostlé při krystalizačních podmínkách 0.1M MES, pH 5.6–5.8, 0.2M MgCl₂, 25% PEG 3350 použitím metody sedící kapky (foto autor)



Obrázek 12. Menší monokrystaly LinB32 – krystaly narostlé při krystalizačních podmínkách 0.2 M KNO₃, 25% PEG 3350 za použití metody sedící kapky (foto autor)

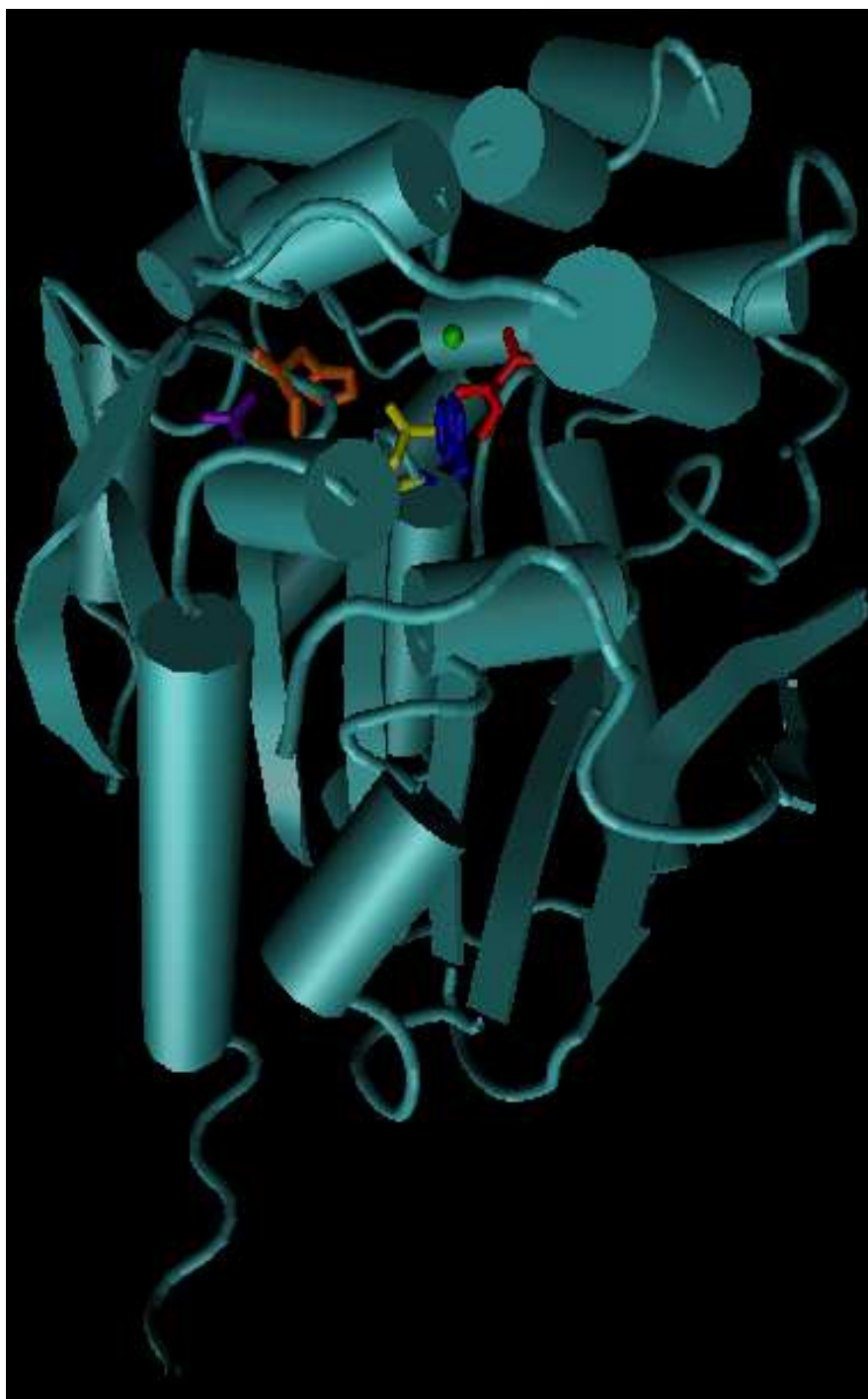
4.4. Výsledky z molekulárního modelování LinB32

Výsledek modelování v programu *VMD* je konečná struktura halogenalkandehalogenasy *LinB32* (Obrázek 13). Ve struktuře je patrné pozorovat to, že se tato halogenalkandehalogenasa skládá ze dvou domén, a to z domény jádra a druhá doména je vytvořená ze spirálové (cap) domény, která dosedá na doménu jádra.

Dalším výsledkem je nalezení aktivního místa halogenalkandehalogenasy *LinB32*. V aktivním místě se nachází molekula chloru, na který je navázána pentáda aminokyselin (Obrázek 14). Pentádu tvoří asparagin, tryptofan, kyselina asparagová, histidin a kyselina glutamová. Aktivní místo leží v hydrofobní dutině, která se nachází mezi dvěma doménami *LinB32*.



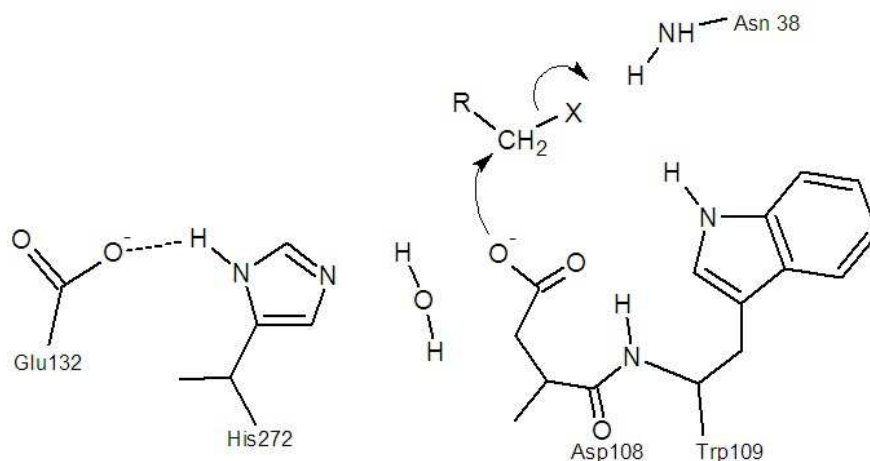
Obrázek 13. *Struktura halogenalkandehalogenasy LinB32*



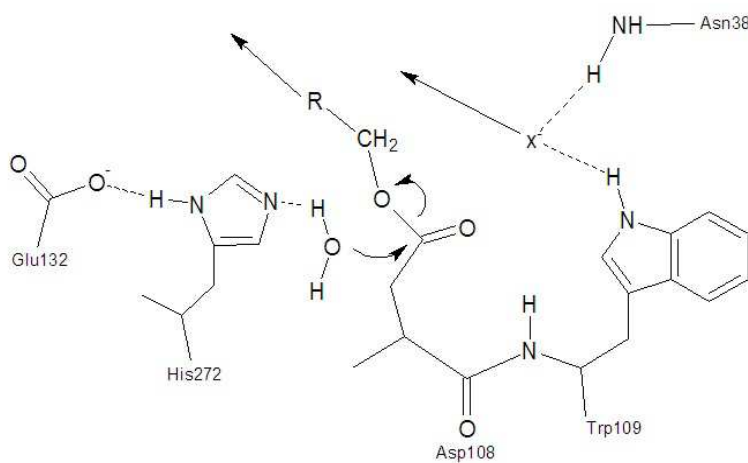
Obrázek 14. Aktivní místo *LinB32* – zeleně chlór, červeně *Asp108*, modře *Trp109*, žlutě *Asn38*, oranžově *His272* a fialově *Glu132*

4.5. Schéma dehalogenační reakce LinB32

Dehalogenační reakce LinB32 se skládá ze dvou kroků. První krok je S_{N2} substituce zobrazena Obrázku 15 a druhým je hydrolýza meziprojektu (Obrázek 16).



Obrázek 15. První krok reakce S_{N2} substituce – dochází k tvorbě kovalentního meziprojektu



Obrázek 16. Druhý krok reakce hydrolýza – dochází k hydrolýze vzniklého kovalentního meziprojektu

5. Diskuze

Postup samotných krystalizačních experimentů vycházel z prací D'Arcy a kol. (1996), Chayen a kol. (1992), McPherson (2004), Garcia-Ruiz and Moreno (1994), Garcia-Ruiz a kol. (2001), Stura a Wilson (1992), kdy ve všech případech byly experimenty podobné. Pouze u krystalizačních technik sedící a visící kapky, kterou ve své práci popsala například Kutá Smananová (2008), byla vyzkoušena modifikace těchto metod v Petriho miskách. Tato modifikace byla neúspěšná z toho důvodu, že nedošlo k důkladnému utěsnění Petriho misky. Doporučení tedy je, vždy pořádně provést utěsnění a kontrolu, která by tak zabránila neúspěchu krystalizace. Toto pravidlo platí i pro ostatní použité metody, které jsou prováděny v krystalizačních destičkách. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při použití standardní metody sedící kapky u obou studovaných halogenalkandehalogenas. V pokročilých a alternativních metodách, které byly následně vyzkoušeny, došlo k nárůstu méně kvalitních krystalů, nebo krystaly vůbec nevznikly.

Ve standardní krystalizační metodě formou sedící kapky, která byla použita pro krystalizaci modelového proteinu *Thaumatococcus*, došlo k nárůstu mikrokystalů a větších monokystalů. Obě tvarové varianty krystalů narostly při krystalizačních podmínkách za použití 1,5M vlnanu draselného, při pokojové teplotě (18 °C). K nárůstu mikrokystalů docházelo tehdy, když byl poměr koncentrací roztoků protein : srážecí roztok 1:3 a 1:2. Bezbarvé krystaly *Thaumatococcus* měly tvar tetragonální dipyramidy a velikost 0,25×0,1×0,04 micrometru (Obrázek 8). V případě, že byl použit poměr koncentrací 1:1, 3:1 a 2:1, který byl ve prospěch roztoku proteinu, došlo k nárůstu větších monokystalů, které je možné použít pro měření difrakčních dat. Tyto krystaly v polarizovaném světle vykazovaly zbarvení tmavšími odstíny zelené, žluté nebo fialové barvy. Z výsledků tedy vyplývá, že pokud je použita 50%, 75% a 66,6% koncentrace *Thaumatococcus*, tak dochází k nárůstu kvalitnějších krystalů.

Při krystalizaci halogenalkandehalogenasy LinB32 při použití standardní krystalizační metody založené na krystalizaci v sedící kapce došlo k nárůstu jehlicovitých krystalů, menších monokystalů a v některých případech nedošlo k vykrytalizování proteinu. V poměrech koncentrací 1:3 a 1:2, kde bylo použito méně

roztoku proteinu, nedošlo k vytvoření krystalů. K tvorbě krystalů nedošlo zřejmě nízkou koncentrací LinB32 v použitých koncentračních poměrech. V poměrech koncentrací 3:1 a 2:1, kde bylo použito větší množství roztoku proteinu než srážecího roztoku, došlo k nárůstu větších jehlicovitých krystalů. Tyto jehlicovité krystaly narostly při krystalizačních podmínkách za použití srážecího roztoku složeného z 0,1M MES, 0,2M chloridu hořečnatého a 25% PEG 3350 při pokojové teplotě (18°C). Krystaly byly průhledné a měly velikost 0,6×0,03×0,03 micrometru (Obrázek 11). V poměru koncentrace 1:1, kde bylo použito stejné množství roztoku proteinu a srážecího roztoku došlo k nárůstu menších monokrystalů. Tyto menší monokrystaly narostly při krystalizačních podmínkách ze srážecího roztoku obsahujícího 0,2M dusičnan draselný a 25% PEG 3350 při pokojové teplotě (18°C). Tyto krystaly byly bezbarvé a měly velikost 0,2×0,2×0,05 micrometru (Obrázek 12). Z výsledků je tedy patrné, že při použití stejné nebo větší koncentrace LinB32 dochází k vytvoření krystalů. V tomto případě by bylo možné ještě optimalizovat krystalizační podmínky, které by vedly k vytvoření kvalitnějších krystalů, které by bylo možné použít pro difrakční analýzu. Krystaly LinB32 byly měřeny na synchrotronech BESSY HZB v Berlíně a EMBL DESY v Hamburku (Degtjarik a kol, 2013).

Z výsledků vyřešené struktury halogenalkandehalogenasy LinB32 lze vyčíst, že díky vysokému rozlišení je struktura dobře přehledná. Ve struktuře je možné zřetelně rozeznat domény, ze kterých je tato halogenalkandehalogenasa tvořena. Zřetelně je vidět první doména jádra, na kterou dosedá druhá spirálová cap doména. Mezi těmito dvěma doménami je možno zřetelně rozeznat hydrofobní dutinu, která tvoří menší prostor mezi oběma doménami a obsahuje aktivní místo halogenalkandehalogenasy. vyřešeném struktuře LinB32 je patrné, že v aktivním místě se nachází molekula chloru a na něj je navázána pentáda aminokyselin. Tuto pentádu (Obrázek 14) tvoří asparagin, tryptofan, kyselina asparagová, histidin a kyselina glutamová. Aktivní místo i pentáda aminokyselin se ve vyřešené struktuře daly zřetelně najít a rozpoznat. Ve struktuře byla pozorována ještě jedna molekula chloru, která je produktem hydrolýzy při dehalogenační reakci, ale nacházela se mimo strukturu. Tato struktura mimo jiné obsahovala i molekuly vody.

Mechanismus dehalogenační reakce (HLD) se skládá ze dvou fyzikálních a chemických kroků. Mezi fyzikální kroky lze zařadit navázání substrátu a uvolňování produktů a mezi kroky chemické SN2 substituci (Obrázek 15) a hydrolýzu (Obrázek 16). Molekula substrátu je vázána na konformaci, ve které ji opouští atom halogenu. Tento atom halogenu je přitom stabilizovaný pomocí dvou halogenid-stabilizujících zbytků. Atom uhlíku, který nese halogenový substituent je napaden jedním z kyslíků nukleofilu (Asp) a uvolňování halogenidu od molekuly substrátu je zajištěno prostřednictvím jeho stabilizace v halogenid-stabilizujících zbytcích. Tento krok vede ke vzniku kovalentního enzym-substrát meziprojektu a halogenidového iontu. Poté je meziprojekt hydrolyzován pomocí katalytické vody, která aktivuje katalytickou bázi (His). Na katalytické základně se během hydrolýzy vytváří náboj, který je stabilizován pomocí katalytické kyseliny. Po tomto kroku hydrolýzy dochází k uvolnění produktu alkoholu a halogenidového iontu z aktivního místa. Celý cyklus je zakončen regenerací enzymu, při které je navázán proton ze zbývající katalytické vody a voda doplněna.

Standardní, pokročilé a alternativní krystalizační techniky se prokázaly jako efektivní prostředek pro produkci krystalů *halogenalkandehalogenas*. Tyto krystaly byly vhodné k difrakčním experimentům a získána difrakční data byla poté použita k vytvoření modelů jejich struktury. Dalším vývojem a optimalizací připravených strukturních modelů je možno získávat důležité informace o strukturách *halogenalkandehalogenas*, o jejich substrátové specifitě či katalytické aktivitě, kterou tyto enzymy vykazují.

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo naučit se na vybraných systémech používat metody proteinové krystalografie a pokusit se o krystalizaci modelového proteinu Thaumatinu a nově připravené mutantní varianty halogenalkandehalogenasy LinB32 ze *Sphingobium japonicum* UT26 ve snaze popsat krystalizační protokol obsahující podmínky, při kterých dochází k růstu krystalů. Dalším krokem bylo na základě zpracovaných difrakčních dat popsat strukturu této halogenalkandehalogenasy. Experimenty byly provedeny v průběhu roku 2012. Z výsledků práce je patrné, že za pomoci krystalizačních metod je možné zkoumanou halogenalkandehalogenasu vykrystalizovat a popsat krystalizační protokol. Dále se z kvalitně vypěstovaných krystalů dají naměřit difrakční data a použít k zobrazení celkové struktury proteinu. Se strukturou je možné pracovat pomocí různých dostupných zobrazovacích programů a na základě detailního studia je možné strukturu dále upravovat a navrhopvat její modifikace. Je jen otázkou času a dalšího výzkumu, aby se uvedený typ halogenalkandehalogenasy dal využít k čištění povrchových vod, které jsou znečištěny různými halogenovanými organickými polutanty.

7. Použitá literatura

- Bergfors, T. M. (2003). Seeds to crystals. *J. Struct. Biol.* **142**, 66-76.
- Biedermannova, L., Prokop, Z., Gora, A., Chovancova, E., Kovacs, M., Damborsky, J., Wade, R. C. (2012). A Single Mutation in a Tunnel to the Active Site Changes the Mechanism and Kinetics of Product Release in Haloalkane Dehalogenase LinB. *Biol. Chem.* **287**, 29062–29074.
- D'Arcy, A., Elmor, C., Stihle, M. and Johnston, J. E. (1996). A novel approach to crystallizing proteins under oil. *J. Cryst. Growth* **168**, 175-180
- Degtjarik, O., Chaloupkova, R., Rezacova, P., Kutý, M., Damborsky, J. and Smatanova, I. K. (2013). Differences in crystallization of two LinB variants from *Sphingobium japonicum* UT26. *Acta Cryst* **F69**, Part 3, 284-287.
- Edens, L., Bom, I., Ledebøer, A. M., Maat, J., Toonen, M. Y., Visser, C., and Verrips, C. T. (1984). Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. *Cell*, **37**(2):629–33.
- Garcia, J. M. and Moreno, A., Viedma, C. and Coll, M. (1993). Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Mat. Res. Bull.* **28**, 541-546.
- Garcia-Ruiz, J. M. and Moreno, A. (1994). Investigation on protein crystal growth by the gel acupuncture method. *Acta Cryst.* **D50**, 484.
- Garcia-Ruiz, J. M., Fermin, O., Novella, M. L., Gavira, J. A., Sauter, C. and Vidala, O. (2001). A supersaturation wave of protein crystallization. *J. Cryst. Growth* **232**, 149-155.
- Glusker, J. P., Lewis, M. and Rossi, M. (1994). *Crystal Structure Analysis for Chemist and Biologist*, VCH Publishers, Inc., New York.
- Chaloupková, R., Sýkorová, J., Prokop, Z., Jesenská, A., Monincová, M., Pavlová, M., Tsuda, M., Nagata, Y. & Damborský, J. (2003). *J. Biol. Chem.* **278**, 52622–52628.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D. and Blow, D. M. (1992). Microbatch crystallization under oil—a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *J. Cryst. Growth* **122**, 176-180.
- Chen, Z. W., Koh, M., Van Driessche, G., Van Beeumen, J. J., Bartsch, R. G., Meyer, T. E., Cusanovich, M. A. and Mathews, F. S. (1994). The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science* **266**, 430-432.
- Koudelakova, T., Chovancova, E., Brezovsky, J., Monincova, M., Fortova, A., Jarkovsky, J. & Damborsky, J. (2011). *Biochem. J.* **435**, 345–354.
- Kundrot, C. E. (2004). Which strategy for a protein crystallization project? *Cell Mol Life Sci* **61** (5): 525-536.
- Kutá Smatanová, I. (1999). Diplomová práce, MU Brno.

- Kutá Smatanová, I. (2008). Crystallizations techniques in protein crystallography, JU České Budějovice.
- Li, M. a Chang, W. R. (2009). Protein crystallization. *Photosynth Res* **102**: 223-229.
- Lorber, B., Sauter, C., Robert, M. C., Capelle, B. and Giege, R. (1999). Crystallization within agarose gel in microgravity improves the quality of thaumatin crystals. *Acta Cryst.* **D55**, 1491-1494.
- Marek, J., Vévodová, J., Smatanová , I. K., Nagata, Y., Svensson, L. A., Newman, J., Takagi, M. & Damborský, J. (2000). *Biochemistry* **39**, 14082–14086.
- McPherson, A. and Weickmann, J. (1990). X-ray analysis of new crystal forms of the sweet protein thaumatin. *J. Biomol. Struc. Dyn.* **7**, 1053-1060.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods* **34**, 254-265.
- Stura, E. A. and Wilson, I. A. (1992). Crystallization of Nucleic Acids and Proteins. A practical Approach, edited by Ducruix, A. and Giegé, R., Oxford University Press, Oxford.

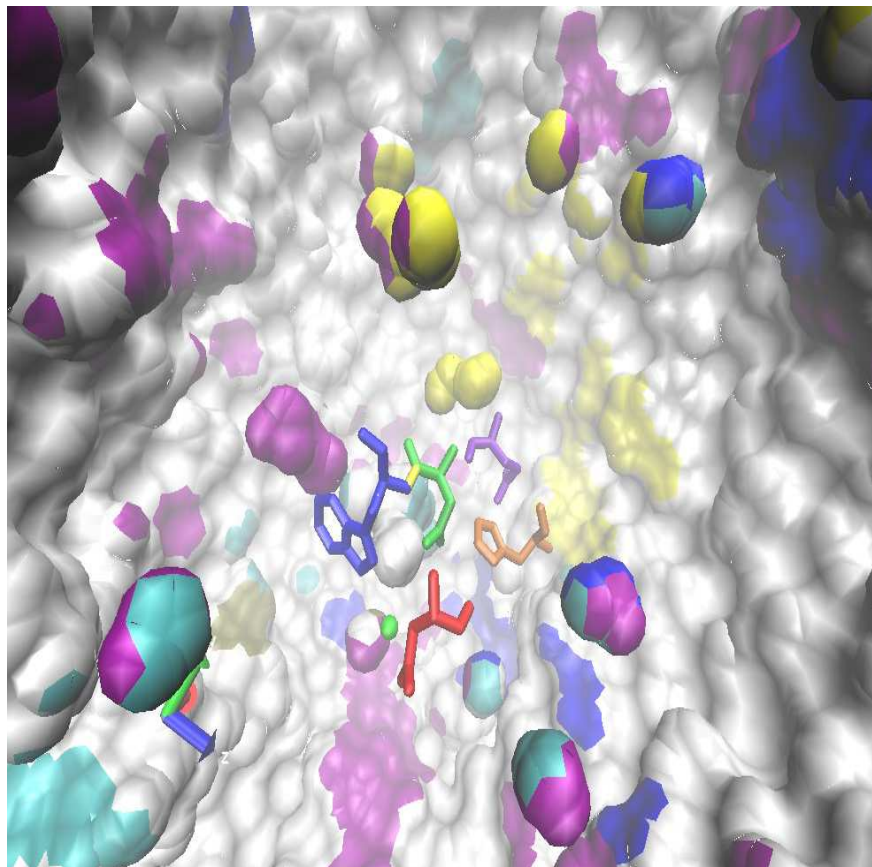
8. Seznam příloh

Příloha č. 1 - Aktivní místo uvnitř struktury LinB32

Příloha č. 2 - Certifikát o úspěšném absolvování kurzu – Krystalizace makromolekulárních látek

Příloha č. 3 – Abstrakt publikovaný v časopise Materials Structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology

9. Přílohy



Příloha č. 1 – Aktivní místo uvnitř molekuly enzymu *LinB32* - červeně *Asp108*, modře *Trp109*, zeleně *Asn38*, oranžově *His272* a fialově *Glu132*



evropský
sociální
fond v ČR



EVROPSKÁ UNIE



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



OP Vzdělávání
pro konkurenceschopnost

Certifikát

o úspěšném absolvování kurzu

Krystalizace makromolekulárních látek

pro:

Pavel Němec

Nové Hradky, 27.-29. 11. 2012


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

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



JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Škola komplexních systémů
Žatek 136, 373 33 Nové Hradky
-2-



www.xray.cz
Krystalografická společnost
 162 00 Praha 6, Heyrovského nám. 2
IČO : 18628192 (1)

Příloha č. 2 – Certifikát z krystalizačního kurzu



1. Carmona AT, Fialova P, Kren V, Ettrich R, Martinkova L, Moreno-Vargas AJ, GonzalesC, Robinal. 2006. Cyanodeoxy-glycosyl derivatives as substrates for enzymatic reactions. *Eur. J. Org. Chem.* 8:1876–1885.
2. Fialova P, Carmona AT, Robina I, Ettrich R, Sedmera P, Prikrylova V, Petraskova-Husakova L, Kren V. 2005. Glycosyl azide—a novel substrate for enzymatic transglycosylations. *Tetrahedron Letters.* 46(5): 8715–8718.
3. Ogata M, Zeng X, Usui T, Uzawa H. 2007. Substrate specificity of N-acetylhexosaminidase from *Aspergillus oryzae* to artificial glycosyl acceptors having various substituents at the reducing ends. *Carbohydr Res.* 342(1):23–30.
4. Dojarova P, Slamova K, Krenk K, Gazak R, Kulik N, Ettrich R, Pelantova H, Kuzma M, Riva S, Adamek D, Bezouska K and Kren V. 2011. Charged hexosaminides as new substrates for β -N-acetylhexosaminidase-catalyzed synthesis of immunomodulatory disaccharides. *Adv. Synthesis & Catalysis*, 353:2409–2420.

P20

PRACTICAL ASPECTS OF PROTEIN CRYSTALLOGRAPHY

Ivana Kuta Smatanova^{1,2}, Jakub Jung¹, Pavel Malcher¹, Pavel Nemeč¹, Martin Papez¹, Jan Tvaroh¹, Oksana Degtjarik¹, Jaroslava Kohoutova¹, Tatyana Prudnikova¹, Katsiaryna Tratsiak¹, and Michal Kutý^{1,2}

¹ University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, CENAKVA and Institute of Complex Systems, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

² Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Zamek 136, 373 33 Nove Hradky

The protein crystallography is one of the powerful techniques used for studying of protein structures and description their mechanism and function. This is possible only in the case of obtaining diffractable monocrystals. Different crystallization techniques such as standard, advanced and alternative methods are used to crystallize soluble and membrane proteins and protein complexes. Research projects are designed for graduate students and postgraduates who work on these projects on different levels. Finally developed methods and obtained crystallization and crystallographic data are compiled and results are published in prestigious journals.

Nowadays more than 20 proteins, protein complexes and their mutant variants are systematically studied. The

main target is focused on research of (1) soluble haloalkane dehalogenases e.g. DhaA from *Rhodococcus rhodochromus* NCIMB 13064, DbeA of *Bradyrhizobium elkanii* USDA94, LinB of *Sphingobium japonicum* UT26 or new haloalkane dehalogenases DpcA from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 and DmxA from *Marynobacter* sp ELB 17, as well as (2) membrane photosynthetic proteins isolated from different higher plants.

This research is supported by the MF CR (COST LD11011 and CZ.1.05/2.1.00/01.0024), GACR (P207/12/0775 and P207/11/0717), and by the AS CR.

P21

TOWARDS A STRUCTURE OF GREEN PLANT PHOTOSYSTEM II

Michal Kutý^{1,4}, Jaroslava Kohoutová¹, Jiří Heler^{1,2}, Marie Plevako^{1,2}, Tatsiana Holubeva¹, Daryna Kulik¹, Ondrej Šedo³, Zbyněk Zdrahal³, Ivana Kutá Smatanová^{1,4}

¹ University of South Bohemia in České Budějovice, Institute of complex systems FFPW, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

² University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Science, Branišovská 31, 37005 České Budějovice

³ Core Facility – Proteomics, CEITEC, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno

⁴ Academy of Sciences of the Czech Republic, Inst. of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Zámek 136, 373 33 Nové Hradky

Photosystem II (PSII) is a pigment-protein complex of thylakoid membrane in cyanobacteria, algae and higher plants. PSII performs series of light driven reactions resulting in charge separation and subsequently in a reduction of an electron-transport chain and water oxidation.

Primary site of the light to chemical energy conversion is located in so-called reaction center (RC).

PSII is a multisubunit complex embedded in the thylakoid membrane of plants, algae and cyanobacteria. The function of the PSII in different organisms is identical

10. Abstrakt

Cílem této práce bylo seznámit se s metodami proteinové krystalografie a pokusit se o krystalizaci modelového proteinu Thaumatinu a nově připravené halogenalkandehalogenasy LinB32 ze *Sphingobium japonicum* UT26. Krystalizace byla provedena metodami sedící a visící kapky, krystalizací pod olejem a krystalizací v kapilárách. Po změření difrakčních dat byla struktura LinB32 modelována ve volně dostupných verzích softwarových nástrojů pro vizualizaci a řešení strukturních dat WinCoot a VMD.

Klíčová slova: halogenalkandehalogenasy, proteinová krystalografie, krystalizační metody, struktura proteinu

11. Abstract

The main aim of this thesis was focused on protein crystallography and attempt to crystallize model protein Thaumatin and a new prepared haloalkane dehalogenase LinB32 of *Sphingobium japonicum* UT26. Crystallization trials were performed using the sitting and hanging drop vapour diffusion methods, crystallization under oil and crystallization in the capillaries. After measuring of diffraction data, the structure of LinB32 was modeled by the use of visualizing molecular modeling programs WinCoot and VMD.

Keys words: haloalkane dehalogenase, protein crystallography, crystallization methods, protein structure