

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

Bakalářská práce
**Biodegradace environmentálních polutantů
- strukturní charakterizace nového typu
halogenalkandehalogenasy DbeA z *Bradyrhizobium
elkanii* USDA94**

Autor: Martin Papež, DiS.

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

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

Studijní program a obor: Zootechnika, Rybářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: III.

České Budějovice, 2013

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 (diplomové) 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

Martin Papež

Děkuji své školitelce doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. i Mgr. Tatyň Prudnikové, Ph.D., za metodické vedení, odbornou pomoc, poskytnuté rady a cenné připomínky při vypracování této bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval konzultantovi panu Mgr. Michalovi Kutému, Ph.D. za pomoc při modelování proteinů.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Martin PAPEŽ**
Osobní číslo: **V10B044P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Biodegradace environmentálních polutantů - krystalizace a
strukturní charakterizace halogenalkan dehalogenasy**
Zadávající katedra: **Škola komplexních systémů**

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

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 strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkan dehalogenas se úspěšně používají metody proteinové krystalografie.

Na pracovišti školitele byly zahájeny krystalizační studie nového typu halogenalkan dehalogenasy DbeA izolované z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94. Tato halogenalkan dehalogenasa je podobná enzymu DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (71 % identita sekvence), ale vykazuje odlišné biochemické vlastnosti. K porozumění pozměněné aktivity a specificity enzymu DbeA byla konstruována jeho mutantní verze DbeA1 obsahující unikátní sekvenci enzymu DbjA. Krystalizační protokoly týkající se přípravy proteinových krystalů uvedených enzymů byly publikovány v časopise *Crystal Growth and Design* (2011).

Cílem práce bude verifikovat krystalizační experimenty podle uvedených protokolů a pokusit se vypěstovat krystaly halogenalkan dehalogenasy DbeA. V další fázi projektu budou naměřená difrakční data použita k určení a upřesnění struktury enzymu. Ve finální fázi bude struktura deponovaná do proteinové databáze PDB.

Student zvládne metodiku přípravy proteinových krystalů, manipulaci s krystaly, 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:

Prudnikova, Tatyana; Chaloupkova, Radka; Sato, Yukari; Nagata, Yuji; Degtjarik, Oksana; Kutý, Michal; Rezacova, Pavlina; Damborsky, Jiri; Kuta Smatanova, Ivana: Development of a Crystallization Protocol for the DbeA1 Variant of Novel Haloalkane Dehalogenase from *Bradyrhizobium elkani* USDA94. *Crystal Growth and Design* 11, 516-519 (2011).

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: **doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.**

Škola komplexních systémů

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

Škola komplexních systémů

Ostatní konzultanti: **MSc. Tatyana Prudnikova, Ph.D.**

Škola komplexních systémů

Datum zadání bakalářské práce: **2. prosince 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2013**


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

L.S.


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

Obsah

1. Úvod	7
2. Literární část	9
2.1. Krystalizace proteinu.....	9
2.1.1. Krystalizační experimenty.....	12
2.1.2. Krystalizační techniky.....	12
2.2. Testování krystalů.....	14
2.3. Difrakční experiment.....	14
2.4. Zpracování difrakčních dat.....	15
2.5. WinCoot.....	15
2.5.1. Zobrazení atomů.....	15
2.6. Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5; HLD).....	16
2.6.1. Původ halogenalkandehalogenas (HLD).....	17
2.6.2. Struktura halogenalkandehalogenas.....	17
2.6.3. Reakční mechanismus halogenalkandehalogenas.....	18
2.7. Enzym DbeA.....	19
2.8. Xylanasa.....	20
3. Materiál a metodika	21
3.1. Experimentální pracoviště a provedené experimenty.....	21
3.2. SDS PAGE.....	21
3.2.1. Příprava gelů SDS PAGE.....	21
3.2.2. Elektroforéza.....	22
3.3. Příprava srážecích roztoků.....	22
3.3.1. Srážecí roztok pro Xylanasu.....	23
3.3.2. Srážecí roztok pro DbeA.....	23
3.4. Metoda visící kapky.....	23
3.4.1. Krystalizace v Petriho misce.....	23
3.4.2. Krystalizace v krystalizační destičce.....	24
3.5. Metody sedící kapky.....	24
3.5.1. Krystalizace v Petriho misce.....	24

3.5.2. Krystalizace v krystalizační destičce	24
3.6. Krystalizace pod olejem	25
3.7. Krystalizace v kapilárách.....	25
3.8. Testování krystalů	26
3.8.1. DYE Test	26
3.8.2. CRUSH Test	26
3.9. Modelování struktury DbeA.....	26
4. Výsledky	27
4.1. Gelová elektroforéza	27
4.2. Výsledky krystalizace Xylanasy.....	27
4.3. Výsledky krystalizace DbeA	28
4.4. Testování krystalů – DYE Test	29
4.5. Testování krystalů – Crush Test	29
4.6. Modelování v programu WinCoot.....	30
4.7. Modelování v programu VMD	30
4.8. Schéma dehalogenační reakce	33
5. Diskuze.....	35
5.1. Krystalizace provedena v Petriho miskách.....	35
5.2. Krystalizace provedena v krystalizačních destičkách.....	35
5.3. Krystalizace pod olejem	36
5.4. Krystalizace v kapilárách.....	36
5.5. Struktura DbeA.....	36
5.6. Dehalogenační reakce.....	37
6. Závěr	38
7. Použitá literatura.....	39
8. Seznam příloh	42
9. Přílohy	43
10. Abstrakt.....	44
11. Abstract	46

1. Úvod

Proteiny jsou jedny ze základních látek v živých organismech, kde mají důležitou funkci například při transportu látek, řízení chemických reakcí, komunikace buněk nebo stavbě tkání a pletiv. Proteiny jsou makromolekulární látky tvořené řetězci aminokyselin. Pořadí aminokyselin určuje primární strukturu proteinu. Pro znalost funkce proteinu je nutné znát i vyšší struktury. Jednou z metod jejich zjišťování je proteinová krystalografie.

Krystalizace biologických makromolekul, mezi které zařazujeme proteiny, nukleové kyseliny, polysacharidy, lipidy a ostatní makromolekulární komplexy, představuje jeden z nejefektivnějších nástrojů pro studium struktury látek ve strukturní biologii či fyzikální biochemii. Poznání struktury makromolekulárních látek je nutným předpokladem pro objasnění strukturně-funkčních vztahů a také poskytuje podklady pro další modifikace makromolekul podle potřeby farmaceutického, medicínského, zemědělského a jiných odvětví průmyslu.

Halogenalkandehalogenasy (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. Halogenalkandehalogenasy se vyznačují poměrně vysokou detoxifikační schopností. Nové technologie pro čištění kontaminovaných vod a území halogenovanými organickými polutanty jsou založeny na enzymatickém odbourávání za pomoci halogenalkandehalogenas. Aktivita těchto enzymů s halogenovanými substráty však často není dostatečná pro jejich využití v praktických aplikacích. Možné řešení nabízí proteinové inženýrství a jeho moderní přístup cílené řízené evoluce. Pro objasnění strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkandehalogenas se úspěšně používají metody proteinové krystalografie.

Cíle

Teoretická část bakalářské práce je věnována stručnému popisu parametrů, které mají vliv na krystalizovatelnost proteinů, následuje stručná charakteristika nejběžnějších krystalizačních metod, metody testování krystalů a popis difrakčního experimentu. V závěru teoretické části je stručně popsán grafický software používaný k zobrazování molekul.

Praktickým cílem bakalářské práce je provést krystalizační experimenty různými krystalizačními metodami u modelového proteinu Xylanasy a pokusit se vypěstovat krystaly nového typu halogenalkandehalogenasy DbeA podle krystalizačního protokolu.

Tato halogenalkandehalogenasa DbeA izolovaná z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 je podobná enzymu DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 (71 % identita sekvence), ale vykazuje odlišné biochemické vlastnosti. K porozumění pozměněné aktivity a specificity enzymu DbeA byla konstruována jeho mutantní verze DbeA1 obsahující unikátní sekvenci enzymu DbjA. Divoký typ halogenalkandehalogenasy DbeA bude krystalizován pomocí standardních a pokročilých krystalizačních metod a pomocí nástrojů pro řešení struktur a modelování proteinů bude popsána struktura proteinu.

2. Literární část

2.1. Krystalizace proteinu

Nutnou podmínkou pro získání struktury proteinu pomocí rentgenové difrakční analýzy je vypěstování difraktujícího monokrystalu. Ve srovnání s anorganickými sloučeninami, proteiny potřebují velmi specifické podmínky pro růst krystalů (McPherson, 1999, Ducruix a Giege, 1999). Existuje několik metod, které lze použít k určení krystalizačních podmínek, ale do dnešní doby nebyl popsán žádný obecný teoretický způsob, jak podmínky zjistit bez opakovaného hledání a zkoušení.

Úspěch krystalizace závisí na několika faktorech (Drenth, 1999):

1. čistota proteinu. Ke krystalizačním experimentům je nutné mít velmi čistý protein, protože jinak by nečistoty mohly narušit původní krystalové buňky. I když v některých případech mohou skutečně pomoci protein krystalizovat, ale za cenu nižšího rozlišení naměřených dat

2. vhodný precipitant (obvykle rozpustný ve vodě). Často používaná srážedla jsou anorganické a organické sloučeniny, jako je síran amonný, chlorid sodný, 2-methyl-2 ,4-pentan (MPD), atd., nebo makromolekulární sloučeniny - polyethylen glykol (PEG) různých molekulových hmotností. Srážedlo se přidává pouze do takové koncentrace, která nezpůsobí vysrážení nebo denaturaci proteinu. Hydrofobní membránové proteiny vyžadují přidání detergentu.

3. různé podmínky ovlivňující růst krystalu, jako je teplota, pH, přítomnost jiných roztoků. V průběhu experimentů je snaha přivést protein do stavu přesycení, kdy je koncentrace proteinu těsně nad jeho limitem rozpustnosti. V tomto bodě, protein začne krystalizovat.

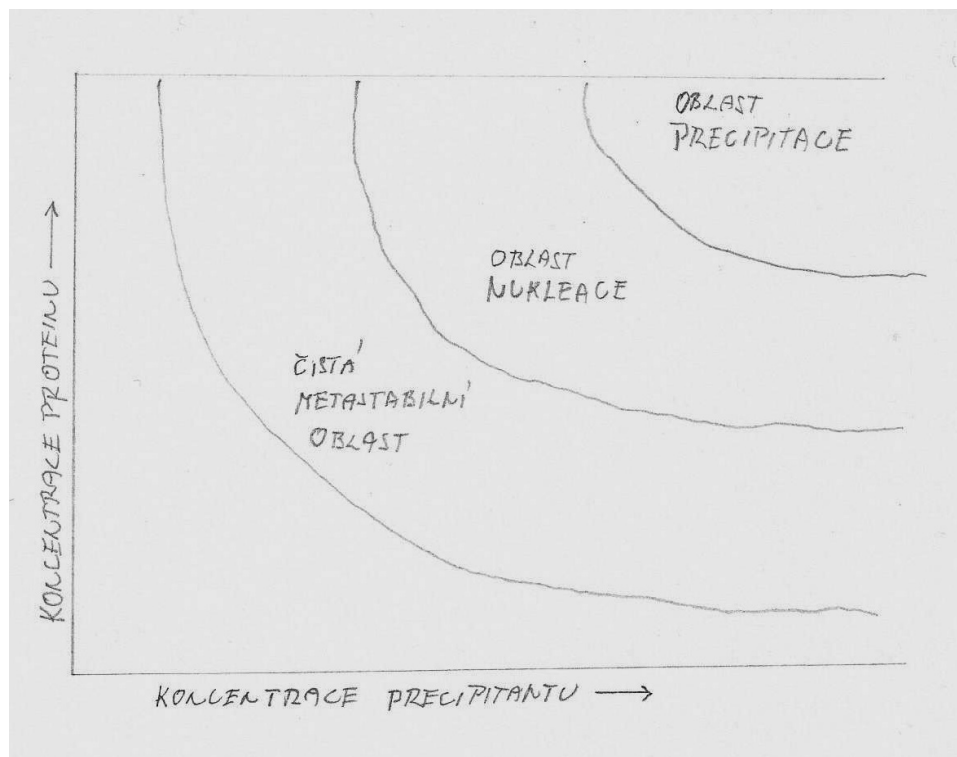
Tabulka 1: Faktory ovlivňující růst krystalů makromolekul (*převzato z* Smatanová, I., Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi, Učební text (2003))

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

Krystalizační postup může být popsán v následujících krocích (McPherson, 1999):

1. Prvním krokem před skutečným růstem krystalů je nukleace, kdy jsou vytvořena krystalizační jádra, malé amorfni stabilní proteinové shluky. Vzhledem k tomu, že k agregaci dochází snadněji než k růstu krystalů, musíme zajistit, aby nebyl protein přiveden k přesycení příliš rychle, jinak se vysráží.

2. Druhý krok je skutečný růst krystalů. Jak krystaly rostou, koncentrace proteinu v roztoku se sníží stejně jako přesycení. Je nutné, aby bylo dosaženo pomalého růstu, aby se vytvořily velké a dobře uspořádané krystaly. Chceme-li dosáhnout pomalého růstu, obvykle se sníží teplota nebo koncentrace bílkovin. Vztah mezi koncentrací bílkovin a krystalizačního činidla (nejčastěji srážecí), lze popsat pomocí fázového diagramu (Obrázek 1).



Obrázek č. 1: Fázový diagram (převzato z

<http://www.structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Crystals/Theory/phases.html>)

K dosažení růstu krystalů, musí být sníženo přesycení na nižší úroveň, jinak by vysoké přesycení (srážení plocha diagramu) mělo za následek vznik mnoha malých jader nebo malých krystalů. Ideální způsob, jak na to, je dosažení takové koncentrace proteinu a koncentrace srážedla, které leží v nukleační oblasti fázového diagramu. Krystaly pak rostou pomalu a dosáhnou maximálního stupně uspořádání své struktury. K tomu dochází v metastabilní oblasti, kde není nukleace, ale je možný pouze růst krystalů. Nejjednodušší způsob, jak změnit přesycení je změna teploty. Nicméně problémem fázového diagramu je to, že není snadné určit linie, které přesně oddělují jednotlivé regiony v diagramu. Tento přístup je především teoretický, ale stále užitečný.

Dalším způsobem, jak dosáhnout precipitaci proteinů je experiment "vysolování" (salting-out), který spočívá ve zvýšení účinné koncentrace proteinu přidáním soli, jako je např. síran amonný. Naproti tomu metoda "zasolení" (salting-in) se používá, pokud je protein špatně rozpustný ve vodě. Přidáním malého množství soli se zlepšuje jeho rozpustnost. Po odstranění soli se protein vysráží.

2.1.1. Krystalizační experimenty

Postup krystalizace bílkovin lze rozdělit do dvou kroků (Bergfors, 1999):

1. Testování různých krystalizačních podmínek. Obvykle se používají komerční soupravy vyvinuté k tomuto účelu. Pokud podobný protein již krystalizoval, lze také testovat podmínky používané pro tento protein.

2. Druhým krokem je stav optimalizace krystalizace, která se ukázala být alespoň částečně vhodná. Optimalizace se provádí systematickou změnou různých podmínek, jako je pH, koncentrace precipitantu, koncentrace proteinu nebo jiných činidel a také změnou teploty. Snížení teploty vede ke zpomalení růstu krystalů. Nejběžnější pufrů mají být účinné v pH v rozmezí od 6,0 do 8,0, protože nejvíce fyziologicky důležité účinky proteinů se vyskytují v blízkosti neutrálního pH.

2.1.2. Krystalizační techniky

Existuje mnoho způsobů, jak krystalizovat biologické makromolekuly. Cílem všech z nich je, aby se roztok makromolekul přivedl pomalou modifikací podmínek do přesyceného stavu (Bergfors, 1999).

Metody založené na difúzi par (Smatanová, 2003)

Při těchto metodách se přesycení dosahuje odpařováním par rozpouštědla (nejčastěji vody). Jelikož stav, při kterém za určitých podmínek dochází k vyloučení krystalů z rozpouštědla, je závislý na dosažení minimální povrchové energie pro daný objem krystalu, je neefektivnější pracovat s malými kapkami. Molekuly nacházející se uvnitř kapky mají nižší energii než molekuly ležící na jejím povrchu. Za jistých podmínek může mít pevná fáze sklon k vyloučení se a v kapce vznikne krystal. Metody, při kterých se dosahuje přesycení v mikrokapkách, jsou založeny na difúzi par (Obrázek 2).

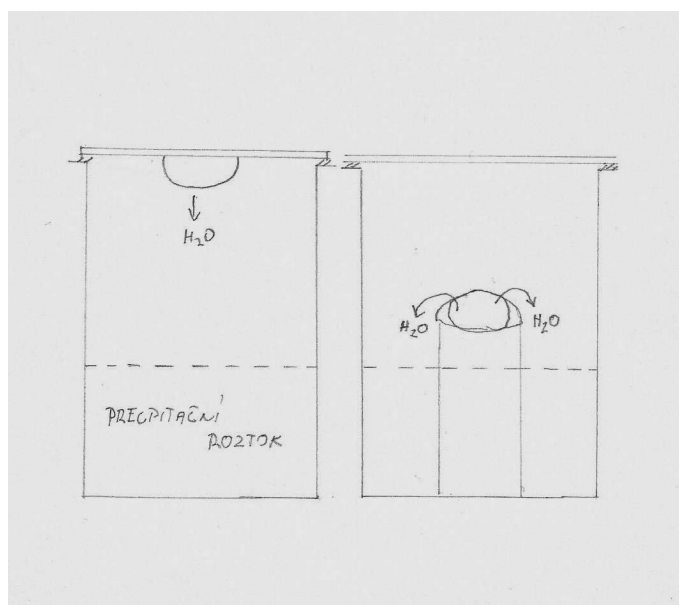
Uvedená technika je založena na transportu rozpouštědla (vody, jiné těkavé látky) mezi kapkou obsahující protein, pufr, precipitant, aditivum (objem 2-25 μ l) a velkým objemem roztoku v rezervoáru (objem 0,75-25ml) sestávajícím ze stejných komponent jako kapka kromě roztoku proteinu. V důsledku rozdílné koncentrace roztoků v kapce a rezervoáru dochází vlivem vypařování těkavých látek (vody) provázenému kondenzací k postupnému vyrovnání osmolarity a ustálení rovnováhy. K uvedenému jevu dochází buď "destilací" vody

z kapky do rezervoáru precipitační roztok v rezervoáru má vyšší koncentraci než kapka - dochází ke změně objemu kapky a zvýšení koncentrace všech jejích komponent) nebo naopak z rezervoáru do kapky. Migrace molekul závisí na koncentraci a rozpustnosti proteinu, koncentraci precipitačního činidla a případně vede ke vzniku krystalů.

Krystalizaci založenou na difúzi par je možné aplikovat pro kapky visící ("hanging drops"), sedící ("sitting drops") nebo sendvičové ("sandwich drops").

Mezi nejvíce používané a nejméně náročné metody patří krystalizace ve visící kapce. Při tomto způsobu krystalizace kapka "visí" na vnitřní straně mikroskopického krycího sklíčka umístěného nad rezervoárem s precipitačním roztokem. Sklíčko je k rezervoáru připevněno a utěsněno pomocí silikonového oleje. Princip další metody - sedící kapky - spočívá v tom, že kapka "sedí" ve stojánku umístěném v otvoru krystalizační destičky pro precipitační roztok.

I když metody visící a sedící kapky patří mezi nejjednodušší, vyžadují optimalizaci množství fyzikálních a chemických parametrů, důsledkem čehož se mohou počáteční zdlouhavé pokusy stát odrazujícími. Z tohoto důvodu je výhodné pro počáteční experimenty (tzv. screening krystalizačních podmínek) použít komerčně dostupné sady krystalizačních činidel ("screening kits"), které rychle poskytují hmatatelné ukazatele pro další krystalizace a odstraňují především časově náročnou přípravu mnoha krystalizačních roztoků.



Obrázek 2: Schéma krystalizace ve visící a sedící kapce (převzato z Hampton Research: *Crystallization: Research Tools*, Vol. 11, No. 1 (2001) 152-165)

Uvedené metody slouží jak ke screeningu a optimalizaci krystalizačních podmínek, tak i k samotnému pěstování krystalů pro difrakční měření.

2.2. Testování krystalů

Pro testování charakteru krystalů je k dispozici několik metod (Emmer, 2007):

- Crush test - pokud budeme mít dostatek krystalů, můžeme jednoduše rozdrtit krystal jehlou. Pokud se krystal poškodí snadno, jde o protein, v opačném případě je to sůl.
- Dehydratační test – jestliže máme k dispozici dostatek krystalů, odstraníme kryt destičky a necháme krystaly vyschnout. Jestliže se krystal rozpadne, jedná se o protein. Pokud krystal zůstává stejný, je to sůl.
- Izit (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) barvicí test je založen na difúzi molekul barviva do krystalu. Pokud barvivo proniká do krystalu a krystal se stává barevným, jde o protein. Barvivo nemůže do pevné struktury soli a proto, krystal soli zůstává nezbarvený.
- SDS PAGE elektroforéza - krystaly znovu rozpustíme a uděláme elektroforézu. Protein poznáme podle pásu na gelu, který odpovídá jeho molekulové hmotnosti.
- rentgenové difrakce – pokud jde o sůl, dostaneme difrakční záznam s malým množstvím silných difrakcí, ale v případě, že je krystal proteinového charakteru, dostaneme difrakční záznam typický pro protein - mnoho skvrn v několika soustředných kruzích. Toto je nejpřesnější způsob testování krystalů a používá se i tehdy, když máme nedostatečné množství krystalů, které nelze testovat destrukčními metodami.

2.3. Difrakční experiment

Pro získání struktur proteinových monokrystalů, se provádí měření neboli sběr difrakčních dat. K tomu se používají synchrotrony nebo proteinové difraktometry (Emmer, 2007).

Proteinový difraktometr je měřicí přístroj, který se skládá ze zdroje X-paprsků, fixačního zařízení umístěného na goniometru a desky detektoru obrazu. Paprsek prochází krystalem namontovaným na čep hlavy goniometru, který se chladí, obvykle proudem dusíku nízké teploty. To je důležité bezpečnostní opatření, protože než byl uveden do praxe, mnoho

proteinových krystalů bylo brzy poškozeno cíleným vysokoenergetickým rentgenovým zářením a zpravidla bylo zapotřebí více krystalů pro difrakční záznam v rozsahu celého úhlu. Goniometr, kde je umístěna hlava s krystalem, umožňuje rotaci krystalu v různých polohách v paprsku. Difrakční X-paprsky jsou zaznamenány na desku detektoru obrazu.

2.4. Zpracování difrakčních dat

Hlavní program pro zpracování naměřených dat je "MOSFLM". Tento program je součástí sady programů CCP4, nebo je také distribuován samostatně, ve formě předkompilovaných programových souborů (Emmer, 2007).

Výstupem programu je soubor MTZ, který obsahuje mapu elektronové hustoty.

2.5. WinCoot

Coot je interaktivní trojrozměrný molekulární modelovací program, určený zejména pro modelování a validaci struktury proteinů. Makromolekulární stavba modelů pomocí X-ray dat je interaktivní úkol, který zahrnuje opakující se uplatňování různých optimalizačních algoritmů s hodnocením modelu a interpretaci elektronové hustoty (Emsley a kol. 2009).

Počáteční modelování proteinových struktur z experimentálního fázování je obvykle dosaženo pomocí automatických metod jako ARP / WARP, RESOLVE (Wang a kol., 2004) a Buccaneer (Cowtan, 2006). Většina z těchto metod však spoléhá na rozlišení lepší než 2,5 Å. Proto hlavním zaměřením Cootu je dokončení počátečních modelů vytvořených buď molekulárním nahrazením, automatizovaným modelováním nebo modelování struktur s nízkým rozlišením.

2.5.1. Zobrazení atomů

Coot zobrazuje atomy atomových modelů jako body na trojrozměrné plátno. Jestliže jsou vzdálené body spojené, pak spojnice mezi atomovými body symbolizuje vazbu, jinak jsou atomy zobrazeny jako křížky. Výchozí atomy jsou zbarveny podle prvků - uhlík žlutě, kyslík červeně, dusík modře, síra zeleně a vodík bíle. Vazba má dvě barvy, s jednou polovinou odpovídající každému navázanému atomu. Další atomové modely se rozlišují různými barevnými symboly. Barvy prvků je možné upravovat. Je zde možnost i stanovit barvy pro

neuhlíkové prvky a pro každou molekulu individuálně (Emsley a kol., 2009). Kromě toho, Coot umožňuje uživateli obarvit řetězce, sekundární struktury, B faktory a obsazenost modelu molekuly. Coot může také zobrazovat pouze C^α řetězce. Model může být barevný v různých režimech jako např. řetězcích, sekundární struktury nebo měnit barvu od N-konce k C-konci.

Informace o jednotlivých atomech mohou být zobrazeny ve formě štítků. Z nich je možné vyčíst jméno atomu, číslo aminokyseliny, identifikátor řetězce.

2.6. Halogenalkandehalogenasy (EC 3.8.1.5; HLD)

Haloalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolytické přeměny halogenovaných alifatických sloučenin na odpovídající alkoholy. Tyto enzymy hrají klíčovou roli v aerobní mineralizaci mnoha halogenovaných sloučenin, které jsou označovány jako látky znečišťující životní prostředí (Janssen a kol., 2005). HLD jsou rovněž použitelné v bioremediaci, dekontaminaci a průmyslové biokatalýze (Swanson, 1999; Prokop a kol., 2004, 2005).

Fylogenetická analýza ukázala, že rodina halogenalkandehalogenas je rozdělena do tří podrodin označených HLD-I, HLD-II a HLD-III (Chovancová a kol., 2007). K dnešnímu dni byly vyřešeny krystalové struktury šesti HLD z podrodiny HLD-II. Jedná se o DhaA izolované z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (Newman a kol., 1999, Stsiapanava a kol., 2010), LinB z *Sphingobium japonicum* UT26 (Marek a kol., 2000), a Rv2579 z *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mazumdar a kol., 2008).

Tyto krystalové struktury ukázaly, že enzymy z podrodiny HLD-II mají v podstatě stejné celkové složení a skládají se ze dvou domén: hlavní domény a vrchní cap domény obsahující zachovanou katalytickou pětici (pentádu) Asp-His-Glu + Asn-Trp. V posledních letech byly vykrytalizovány další nové halogenalkandehalogenasy DpcA, DmxA a mutantní formy DhaA a LinB, ale jejich struktura nebyla doposud zveřejněna (Stsiapanava a kol., 2011, Lahoda a kol., 2011, Degtjarik a kol., 2013).

V současné době je známo více než 200 možných členů rodiny HLD (Koudelakova a kol., 2002) a z těchto enzymů bylo 14 experimentálně charakterizováno (Jesenská a kol., 2002, Jesenská a kol., 2005, Jesenská a kol., 2009, Keuning a kol., 1985, Kulakova a kol., 1997, Nagata a kol., 1997, Sato a kol., 2005, Hasan a kol., 2011, Hessler a kol., 2011). Struktury šesti divokých typů byly uloženy v databázi PDB (Prokop a kol., 2010, Hessler a

kol., 2011, Franken a kol., 1991, Newman., 1999, Marek a kol., 2000, Mazumdar a kol., 2008) a další struktury jsou zpracovávány.

2.6.1. Původ halogenalkandehalogenas (HLD)

Hlavními zdroji HLD jsou bakteriální kmeny nacházející se v půdě kontaminované halogenovanými sloučeninami (Keuning a kol., 1985, Kulakova a kol., 1997, Nagata a kol., 1993, Curragh a kol., 1994). HLD byly izolovány také z bakterií pocházejících z mořské vody (Jesenská a kol., 2009, Chan a kol., 2010), nebo bakterií působících jako živočišné patogeny (Jesenská a kol., 2002, 2005), nebo z rostlinných parazitů (Hasan a kol., 2011).

Některé bakterie produkující HLD jsou schopny růst na halogenovaných sloučeninách a jediným zdrojem energie je pro ně uhlík. U těchto bakterií jsou HLD zapojeny do počátečních kroků metabolických procesů (Janssen, 2004). Biologická úloha HLD pocházejících z patogenních, symbiotických nebo parazitárních organismů je v současné době neznámá.

2.6.2. Struktura halogenalkandehalogenas

HLD strukturálně patří do superrodiny α/β - hydrolas (Janssen, 2004). K dnešnímu dni je k dispozici několik desítek krystalových struktur HLD. Analýzou těchto struktur bylo zjištěno, že všechny známé HLD mají velmi podobné složení a skládají se ze dvou domén - hlavní a vrchní cap domény. Hlavní doménou je typická α/β -hydrolasa, skládající se z vysoce konzervované centrální oblasti osmi skládaných beta-listů obklopených šesti alfa-šroubovicemi (Ollis a kol., 1992). Hlavní doména je připojena k vedlejší výhradně šroubovitou oblastí cap domény, která je velmi variabilní, pokud jde o množství a uspořádání α -šroubovic.

Nedokonalé balení na rozhraní mezi těmito dvěma doménami vytváří dutinu, která je zodpovědná za dehalogenační funkci. Toto aktivní místo dutiny se skládá z aminokyselinových zbytků pocházejících z obou domén. Zatímco hlavní doména přispívá zejména zachovanými zbytky, zbytky z aktivního místa pocházející z oblasti cap domény jsou variabilní (Chovancová a kol., 2007).

Aktivní místo dutiny pojme sadu pěti zbytků, tzv. katalytické pětice, odpovědné za katalytické funkce HLD. Katalytická pětice se skládá z katalytické triády (nukleofilní,

katalytické kyseliny a báze) a dvojice halogenid-stabilizujících zbytků. Katalytická pětice a jeden z halogenid-stabilizujících zbytků jsou nesené hlavní doménou, zatímco druhý halogenid-stabilizující zbytek může být umístěn jak na cap doméně (HLD-I), tak na hlavní doméně (HLD-II a HLD-III). Přesné složení katalytické pentády je jeden z hlavních rozdílů mezi různými podrodinami HLD (Chovancová a kol., 2007). Pětice Asp-His-Asp + Trp-Trp se nachází v HLD-I podrodině, zatímco enzymy z HLD-III podrodiny obsahují konzervované Asp-His-Asp + Trp-Asn. Pentáda v HLD-II podrodině je většinou složena z Asp-His-Asp + Trp-Asn podobně jako u HLD-III podrodiny s výjimkou enzymů, které využívají jako halogenid-stabilizující reziduum Tyr místo Trp.

Aktivní místo HLD je dutina hluboko v jádře enzymu. Je tvořeno především hydrofobními zbytky s výjimkou polárních zbytků katalytické pětice. Velikost a geometrie aktivního místa dutin se významně liší mezi jednotlivými HLD. Nejmenší dutinu mezi HLD vlastní enzym DhIA, který je aktivní při přeměně 1,2-dichlorethanu (Chovancová a kol., 2007). Na druhé straně, jedna z největších dutin se nachází v enzymu DbjA.

Dutina aktivního místa poskytuje prostředí pro dehalogenační reakci a její dostupnost pro substrát a molekuly rozpouštědla je usnadněna tunely spojujícími dutinu s okolním prostředím. Tunely hrají důležitou roli v katalytickém cyklu HLD během vázání substrátu a uvolňování produktů (Petrek a kol., 2006) hlavním tunelem a vedlejším tunelem. U většiny HLD jsou hlavní tunely výrazně širší a kratší, než vedlejší tunely, což je ve shodě s jejich primární rolí v transportních procesech (Chaloupková a kol., 2003, Pavlova a kol., 2009).

2.6.3. Reakční mechanismus halogenalkandehalogenas

Celkový katalytický mechanismus v HLD byl studován různými technikami od krystalografických studií (Prokop a kol., 2010, Marek a kol., 2000) až po molekulové modelování (Banás a kol., 2006, Negri a kol., 2007, Silberstein a kol., 2007). Navíc byly role jednotlivých katalytických zbytků potvrzeny cílenou mutagenezí (Pries a kol., 1994, 1995).

Mechanismus dehalogenační reakce HLD se skládá ze dvou fyzikálních kroků a dvou chemických kroků: navázání substrátu, S_N2 substituce, hydrolýzy a uvolňování produktů. Molekula substrátu je vázána na konformaci, ve které ji opouští atom halogenu stabilizovaný dvěma halogenid-stabilizujícími zbytky. V prvním chemickém kroku, je atom uhlíku nesoucí halogenový substituent napaden jedním z kyslíků nukleofilu (Asp), zatímco

uvolňování halogenidu od substrátu je možné prostřednictvím jeho stabilizace v halogenid-stabilizujících zbytcích. Výsledkem prvního chemického kroku je vznik kovalentního enzym-substrát meziprojektu a halogenidového iontu vázaného mezi halogenid-stabilizujícími rezidui. V důsledku toho je kovalentní meziprojekt hydrolyzován molekulou katalytické vody, která aktivuje katalytickou bázi (His). Náboj vytvořený na katalytické základně během hydrolyzy je stabilizován katalytickou kyselinou (Asp nebo Glu). Hydrolytický krok následuje uvolněním produktu alkoholu a iontu halogenidu z aktivního místa. Katalytický cyklus je zakončen regenerací enzymu, při které je navázán proton zbývající z použité katalytické vody a voda doplněna.

Zatímco reakční mechanismus HLD postupuje stejným způsobem, jednotlivé HLD se liší v nejpomalejším reakčním kroku jejich katalytického cyklu. V současné době byla pro tři různé HLD identifikována čtyři různá omezení rychlosti jednotlivých kroků. Pozorovaná omezení DhlA pomalým uvolňováním halogenidu lze přičíst jeho méně přístupnému aktivnímu místu dutiny a silnější stabilizaci odchodu halogenidové skupiny dvěma zbytky Trp (Krooshof a kol., 1998, Prokop a kol., 2003). Strukturální původ omezení rychlosti u LinB a DhaA je třeba ještě vysvětlit.

2.7. Enzym DbeA

Nová HLD, pojmenovaná DbeA, byla nedávno izolována z *Bradyrhizobium elkanii* USDA94 (Ikeda-Ohtsubo a kol., v přípravě) a biochemicky charakterizována (Mozga a kol., v přípravě). Tento nový člen podrodiny HLD-II úzce souvisí s DbjA (Sato a kol., 2005), který vykazuje jedinečnou inserci na N-konci cap domény, která není přítomna v jiných HLD. DbeA sdílí nejvyšší sekvenční identitu (71%) s DbjA (Sato a kol., 2005). Tyto sekvenční identity s ostatními HLD-II členy jsou: 60% DmlA (Sato a kol., 2005.), 47% DhaA (Kulakova a kol., 1997.), 41% LinB (Nagata a kol, 1997.) s 39 % DmbA (Jesenská a kol., 2005). DbeA je méně aktivní a má vyšší specifitu vůči bromovaným a jodovaným sloučeninám ve srovnání s DbjA. Tyto dva enzymy se liší také v teplotním a pH profilu v reakci s 1-iodohexane (Mozga a kol., v přípravě).

Mutant DbeA, označený DbeA1, obsahuje na N-konci cap domény fragment 143VAEEQDHAE151, který je ekvivalentní k jedinečné sekvenci DbjA a není přítomen v DbeA a jiných HLDS (Ikeda-Ohtsubo a kol., v přípravě). Tento fragment 9 aminokyselin byl vložen mezi D142 a A143 z DbeA. Krystalografické analýzy DbeA a DbeA1 jsou

prováděny s cílem pochopit strukturně-funkční vztahy divokého typu enzymu a mutanta obsahujícího inzerci podobné DbjA dehalogenasy.

2.8. Xylanasa

Tato třída enzymů našla několik biotechnologických aplikací, konkrétně při zpracování papíru. V průmyslovém využití mohou být použity jako bělicí činidla. Xylanasa přispívá ke snížení množství chemikálií potřebné pro dosažení vhodné úrovně bílé barvy papíru tím, že degraduje Xylan v rostlinných buňkách (Shmidt a kol., 1998).

3. Materiál a metodika

3.1. Experimentální pracoviště a provedené experimenty

Všechny experimenty v rámci projektu byly prováděny na Fakultě rybářství a ochrany vod v Ústavu komplexních systémů v laboratořích makromolekulární struktury a dynamiky v Nových Hradech.

Byla provedena metoda gelové elektroforézy SDS-PAGE (= sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) pro separaci proteinů podle jejich velikosti a dále připraveny srážecí roztoky, které byly použity pro krystalizační experimenty provedeny metodami sedící a visící kapky, pro krystalizaci pod olejem a krystalizaci v kapilárách. Vzniklé krystaly byly testovány, zda jde opravdu o krystaly proteinu pomocí DYE a CRUSH testů.

V závěru práce byla pomocí vizualizačních programů WinCoot a VMD modelována struktura proteinu z mapy elektronové hustoty získané z difrakčních dat zaznamenaných v průběhu difrakčního měření krystalů a struktura byla detailně popsána.

3.2. SDS PAGE

Metoda SDS-PAGE (= sodium dodecylsulphate-polyacrylamide gel electrophoresis) je technika používaná k separaci proteinů na základě jejich odlišné elektroforetické pohyblivosti v gelu, která závisí na délce polypeptidového řetězce, molekulární hmotnosti proteinu, denaturaci proteinu (stupni rozbalení) a na dalších faktorech.

3.2.1. Příprava gelů SDS PAGE

3.2.1.1. Příprava separačního gelu

Separací gel byl připraven smícháním 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. Byla sestavena elektroforézní sendvičová kazeta pro nalévání gelu. Tato byla složena ze dvou skel, mezi které bylo umístěno gumové těsnění, a skla byla fixována klipsami. Připravený roztok separačního gelu byl pipetován mezi skla sendvičové kazety do 2/3 výšky skel tak, aby se v něm nevytvořily bublinky. Zbytek prostoru mezi skly byl zaplněn etanolem a takto připravená kazeta s roztokem gelu se nechala 30 minut stát, aby došlo k reakci a vytvoření separačního gelu.

3.2.1.2. Příprava svrchního (koncentrovaného) gelu

Koncentrovaný gel byl připraven smícháním 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. Ze sendvičové kazety byl vylit etanol a místo něj byl nalit roztok koncentrovaného gelu. Do tohoto roztoku byl mezi skla zasunut hřebínek, který po ztuhnutí gelu vytvoří komůrky pro pipetování roztoku proteinu.

3.2.2. Elektroforéza

Z kazety se ztuhlým gelem byl vyjmut hřebínek a kazeta byla zasunuta do drážek elektroforetické komory. Komora byla zalita pufrem, který se skládal z 25 mM Tris-HCl, 200 mM Glycinu a 0.1% SDS. Do komůrek v gelu, vytvořených zasunutým hřebínkem, byly pipetovány roztoky proteinu se specifickým pufrem a standardní marker Unstained Biorad pro srovnání. Pro lepší přehlednost byly roztoky pipetovány do lichých komůrek.

Do první komůrky byl pipetován standardní marker, do třetí komůrky byl pipetován roztok proteinu DbeA a pufr v poměru 1:5 (1 μ l roztoku proteinu a 5 μ l pufru) a došlo ke smísení, do páté komůrky byl pipetován opět roztok proteinu DbeA a příslušný pufr v poměru 1:1 (5 μ l roztoku proteinu a 5 μ l pufru), do sedmé komůrky byl pipetován roztok proteinu Xylanasy a příslušný pufr v poměru 1:5 (1 μ l proteinu a 5 μ l pufru), do deváté komůrky pak roztok proteinu Xylanasy a příslušný pufr v poměru 1:1 (5 μ l roztoku proteinu a 5 μ l pufru) a do poslední jedenácté komůrky byl opět pipetován standardní marker pro srovnání.

Po napipetování roztoků byla do komůrek přidána metylenová modř, která zvýrazní výsledek elektroforézy. Poté byla komora po okraj dolita pufrem a uzavřena krycím sklem. Pomocí kabelů byla komora připojena ke zdroji napětí, vytvářejícímu stejnosměrný elektrický proud o napětí 25 mA. Čas procesu elektroforézy byl nastaven na 1,5 hodiny.

Po dokončení procesu elektroforézy byla kazeta s gelem vyjmuta z elektroforetického boxu, opatrně pomocí skalpelu byla rozdělena skla kazety a byl vyjmut gel. Vyjmutý gel byl umístěn na míchačku do roztoku dusičnanu stříbrného, kterým byl gel obarven. Po obarvení byl gel vyjmut a opláchnut destilovanou vodou. Následně bylo možné hodnotit výsledek elektroforézy.

3.3. Příprava srážecích roztoků

Srážecí roztoky byly připraveny pro vyvolání srážecí reakce s roztokem proteinu. Srážecí roztok modelového proteinu Xylanasy byl připraven z 1,9 M (NH₄)₂SO₄ a 0,1 M Tris HCl

pH 8,4. Srážecí roztok pro protein DbeA byl připraven z 20 % PEG 3350, 150 mM octanu vápenatého (calcium acetate) a 0,2 M Tris HCl pH 7,5.

3.3.1. Srážecí roztok pro Xylanasu

Pro přípravu roztoku bylo třeba nejprve vypočítat navážky chemikálií. Pomocí molárních hmotností bylo vypočítáno, že na přípravu 100 ml srážecího roztoku bude potřeba 1,576 g 0,1 M Tris HCl a 25,10 g 1,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Ve 100 ml destilované vody bylo rozpuštěno 1,576 g 0,1 M Tris HCl, pomocí NaOH upraveno pH na 8,4 a následně bylo postupně přidáno 25,1 g 1,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a za neustálého míchání rozpuštěno v roztoku.

3.3.2. Srážecí roztok pro DbeA

Pro přípravu srážecího roztoku bylo stejně jako u roztoku pro modelový protein nutné vypočítat navážky pomocí molárních hmotností. Bylo vypočítáno, že pro přípravu 100 ml srážecího roztoku je třeba navážít 20 g 20 % PEG 3350, 2,373 g 150 mM octanu vápenatého a 1,540 g 0,2 M Tris HCl.

V destilované vodě bylo rozpuštěno 1,540 g 0,2 M Tris HCl, 2,373 g 150 mM octanu vápenatého, přidáním NaOH bylo upraveno pH na 7,5 a následně za stálého míchání na elektrické míchačce rozpuštěno 20 g 20 % PEG 3350.

3.4. Metoda visící kapky

3.4.1. Krystalizace v Petriho misce

Na dno Petriho misky byl pipetován srážecí roztok. Hladina roztoku byla asi 3mm ode dna Petriho misky. Na víčko Petriho misky byly pipetovány 3 kapky srážecího činidla pro Xylanasu (1 kapka 3 μl) a do těchto kapek byly přidány 3 μl roztoku proteinu Xylanasy. Do každé kapky byl pipetován roztok proteinu o jiné koncentraci – do první kapky srážecího činidla byl pipetován 4,25% roztok Xylanasy, do druhé kapky 8,5% roztok Xylanasy a do třetí kapky 17% roztok Xylanasy. Pipetováním roztoku proteinu do srážecího roztoku tedy došlo ke smísení, přičemž bylo velmi důležité pipetovat kapky do sebe opatrně, aby nedošlo k vytvoření bublinek v roztoku. Nakonec bylo přiklopeno víčko s kapkami na misku a oblepeno parafilmem pro zabránění přístupu vzduchu. Stejným způsobem bylo postupováno i v případě DbeA. V tomto případě byly koncentrace proteinu v první kapce 10,45%, ve druhé kapce 5,225% a ve třetí kapce 7%.

3.4.2. Krystalizace v krystalizační destičce

Krystalizační destička Linbro plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] měla 4 řady po 6 otvorech, tak byla pro přehlednost použita první a třetí řada otvorů. Pro roztok Xylanasy byla použita první řada. Do prvního otvoru bylo pipetováno 50 μ l srážecího roztoku, do druhého otvoru 100 μ l srážecího roztoku, do třetího otvoru 200 μ l srážecího roztoku, do čtvrtého otvoru 500 μ l srážecího roztoku, do pátého otvoru 800 μ l srážecího roztoku a do šestého otvoru 1000 μ l srážecího roztoku. V dalším kroku byl pipetován roztok proteinu a srážecího činidla (2 μ l + 2 μ l) na sklíčka, kterými byly otvory uzavírány zamáčknutím do silikonového gelu na hraně otvoru. Na první a druhé sklíčko byl pipetován roztok proteinu 4,25%, na třetí a čtvrté víčko byl pipetován roztok proteinu 8,5% a na čtvrté a páté víčko byl pipetován roztok proteinu 17%.

Stejným způsobem bylo postupováno i v případě DbeA. Objemy srážecího činidla ve třetí řadě zůstaly stejné, na první a druhé sklíčko byl pipetován roztok proteinu 10,45%, na třetí a čtvrté byl pipetován roztok proteinu 5,225% a na páté a šesté sklíčko byl pipetován roztok proteinu 7%.

3.5. Metody sedící kapky

3.5.1. Krystalizace v Petriho misce

Na dno Petriho misky byly pipetovány tři kapky srážecího činidla (1 kapka 3 μ l) a do nich byl pipetován roztok proteinu také po 3 μ l. U Xylanasy byl pipetován do první kapky 3 μ l 4,25% roztoku proteinu, do druhé kapky 8,5% roztok a do třetí kapky 17% roztok. Miska s kapkami stejně jako v případě visící kapky byla zakryta víčkem a oblepena parafilmem, který zabraňoval vstupu vzduchu do misky.

Stejné objemy byly pipetovány i v případě DbeA, pouze koncentrace roztoku proteinu se lišily. V první kapce 10,45% roztok proteinu, druhá kapka 5,225% a třetí kapka 7%.

3.5.2. Krystalizace v krystalizační destičce

Na rozdíl od metody visící kapky se krystalizační destička CrysChem plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] skládala z rezervoáru srážecího činidla a uprostřed rezervoáru z ostrůvku pro pipetování roztoku proteinu. Prvních šest rezervoárů první řady bylo použito pro roztok DbeA. Do prvního rezervoáru bylo pipetováno 50 μ l srážecího

roztoku, do druhého rezervoáru 100 μl srážecího roztoku, do třetího rezervoáru 500 μl srážecího roztoku, do čtvrtého rezervoáru 800 μl srážecího roztoku, do pátého rezervoáru 1000 μl srážecího roztoku a do šestého rezervoáru 200 μl srážecího roztoku. V dalším kroku byl pipetován roztok proteinu na ostrůvky uprostřed rezervoáru v poměru 2 μl roztoku proteinu a 2 μl srážecího činidla. Na první a druhý ostrůvek byl pipetován 10,45% roztok proteinu, na třetí a čtvrtý ostrůvek byl pipetován 5,225% roztok proteinu a na čtvrtý a pátý ostrůvek byl pipetován 7% roztok proteinu o objemu.

Stejným způsobem bylo postupováno i v případě Xylanasy. Objemy srážecího činidla ve třetí řadě destičky zůstaly stejné. Na první a druhý ostrůvek byl pipetován 4,25% roztok proteinu, na třetí a čtvrtý byl pipetován 8,5% roztok proteinu a na pátý a šestý ostrůvek byl pipetován 17% roztok proteinu.

Nakonec byla destička uzavřena krytem a oblepena lepicí páskou pro zamezení přístupu vzduchu.

3.6. Krystalizace pod olejem

Krystalizační destička pro krystalizaci pod olejem Terasaki plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] se skládala ze šesti řad po dvanácti jamkách. Na destičku byly pipetovány 4 ml směsi olejů (2 ml silikonového oleje + 2 ml parafinového oleje) a pohyby destičkou byl olej rovnoměrně rozprostřen po celé ploše destičky.

Do jamek zaplněných olejem byl následně pipetován roztok proteinu a srážecí roztok v následujících poměrech: do první vodorovné řady jamek byly pipetovány roztoky v poměru 1:1 (2 μl proteinu a 2 μl precipitačního činidla), ve druhé vodorovné řadě byl použit stejný poměr, ve třetí řadě byl použit poměr 1:2 (1 μl proteinu a 2 μl precipitačního činidla), ve čtvrté řadě 2:1 (2 μl proteinu a 1 μl precipitačního činidla), v páté řadě 1:3 (1 μl proteinu a 3 μl precipitačního činidla) a v poslední šesté řadě 3:1 (3 μl proteinu a 1 μl precipitačního činidla). Takto bylo postupováno se 17% Xylanasou a 10,45% DbeA.

3.7. Krystalizace v kapilárách

Pro tento způsob krystalizace byly použity skleněné kapiláry o průměru 0,5 mm. Kapilára byla užším koncem ponořena do roztoku proteinu a vztláním naplněna po rozšířené hrdlo a následně na užším konci zalepena modelovací hmotou. Kapilára byla

postavena do stojánku a do rozšířené části byl pipetován srážecí roztok nad okraj kapiláry. Naplněné kapiláry byly ihned uzavírány horkým voskem.

Do krystalizačního boxu GCB® (Triana Sci&Tech, Španělsko) bylo možno umístit šest kapilár. Pro Xylanasu byla pro první a druhou kapiláru použita koncentrace 17%, pro druhou a třetí 8,5% a pro pátou a šestou kapiláru 4,25%. Pro DbeA byly použity následující koncentrace: první a druhá kapilára 10,45%, pro třetí a čtvrtou kapiláru 7% a pro pátou a šestou 5,225 μ l.

Boxy s kapilárami byly uzavřeny víčky a umístěny do krystalizačního stojánku.

3.8. Testování krystalů

Testování krystalů bylo provedeno za účelem ověření, jestli se skutečně jedná o krystaly proteinu nebo pouze o krystaly soli vzniklé ze srážecího roztoku.

3.8.1. DYE Test

Do kapky s vytvořenými krystaly byla pipetována modrá barva IzIt [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Po 30 minutách bylo pod mikroskopem kontrolováno, zda byly krystaly obarveny. V případě obarvení krystalů se jednalo o krystal proteinu, pokud krystal nebyl obarven, jednalo se o krystal soli.

3.8.2. CRUSH Test

Vzniklé krystaly byly přímo v destičkách testovány rozbitím jehlou pod mikroskopem. Pokud bylo možné krystaly snadno rozbít jehlou, jednalo se o krystaly proteinu. Pokud ne, jednalo se krystaly jiného původu, pravděpodobně krystaly soli.

3.9. Modelování struktury DbeA

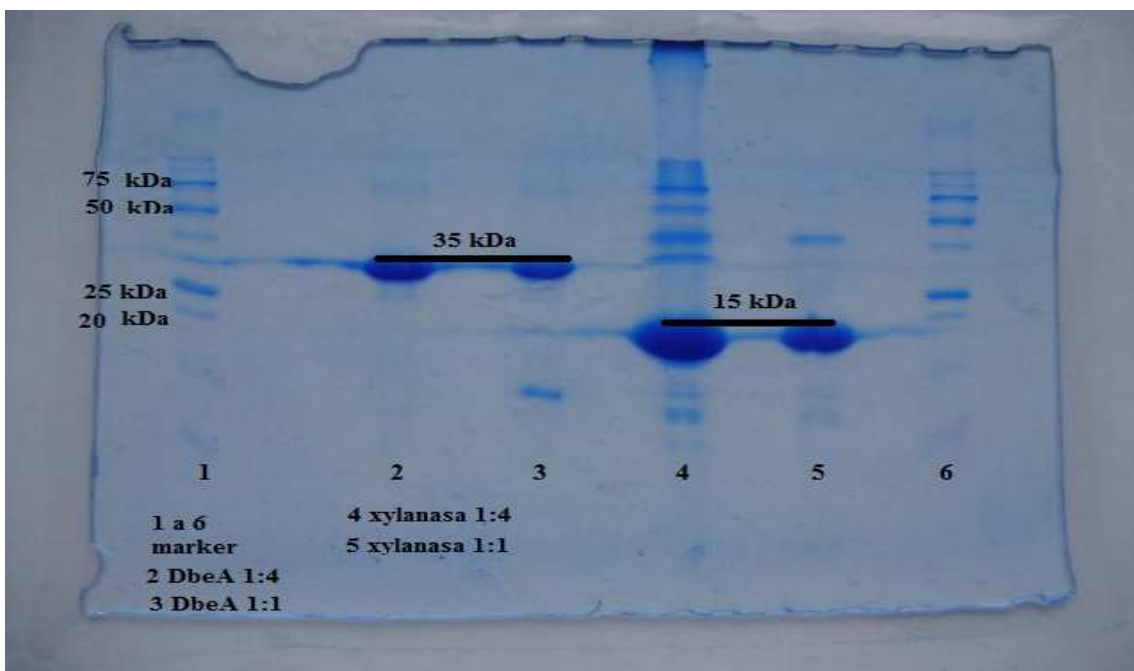
Z internetových stránek Univerzity v Leicesteru <http://www2.le.ac.uk>, byla stažena a nainstalována volně stažitelná verze modelačního programu WinCoot, ve kterém byly provedeny změny elektronové mapy, tak aby odpovídaly skutečnosti v reálném uspořádání jednotlivých aminokyselin.

Modelování konečných 3D obrazů proteinu bylo provedeno v programu VMD, který je volně stažitelný na serveru <http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>. Z těchto obrazů byla následně studována struktura proteinu.

4. Výsledky

4.1. Gelová elektroforéza

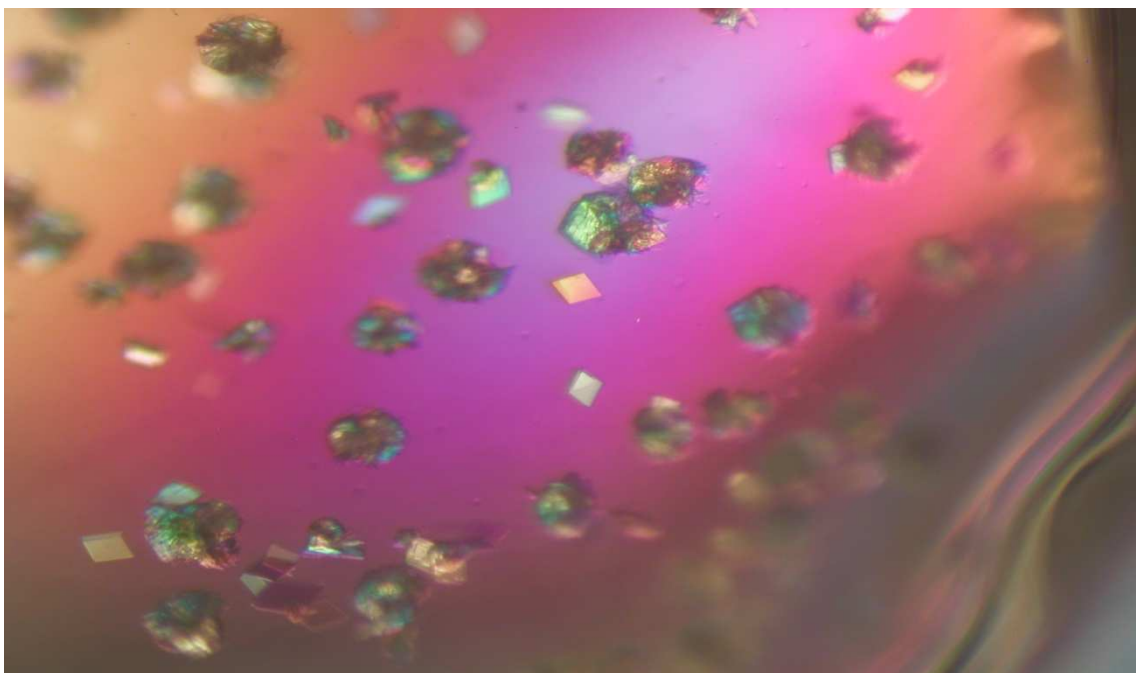
Porovnáním barevných proužků v gelu s markrem, u kterého bylo známo, který barevný proužek odpovídá danému proteinu se známou molekulární hmotností, bylo zjištěno, že oba studované proteiny mají čistotu vhodnou k dalším experimentům. Jak ukazuje Obrázek 4, modelový protein Xylanasa má velikost přibližně 15 kDa a protein halogenalkandehalogenasa DbeA 35 kDa.



Obrázek 3: Výsledek elektroforézy (foto autor)

4.2. Výsledky krystalizace Xylanasy

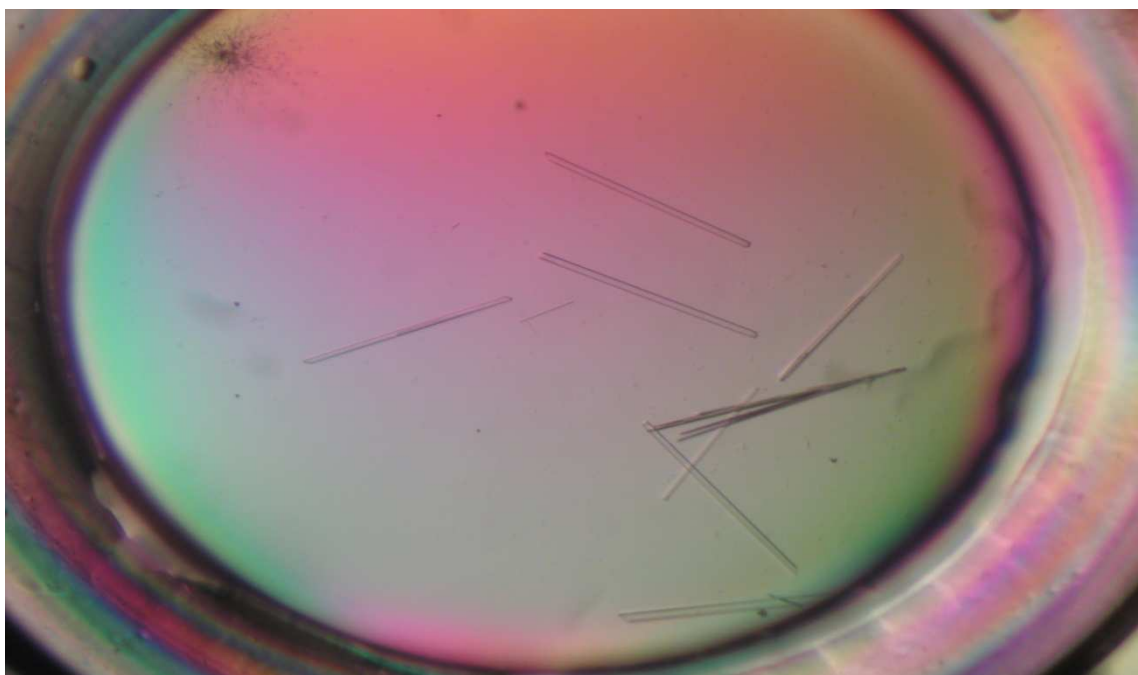
Provedenými krystalizačními metodami byly získány krystaly Xylanasy (Obrázek 5). Následným testováním byl potvrzen proteinový charakter. Monokrystaly Xylanasy byly vypěstovány z krystalizačního roztoku obsahujícího 0,1 M Tris HCl a 1,9 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ při pH 8,4 a 17% roztoku proteinu metodami sedící a visící kapky v Petriho miskách, v krystalizačních destičkách, pod olejem a v kapilárách.



Obrázek 4: Krystaly Xylanasy (foto autor)

4.3. Výsledky krystalizace DbeA

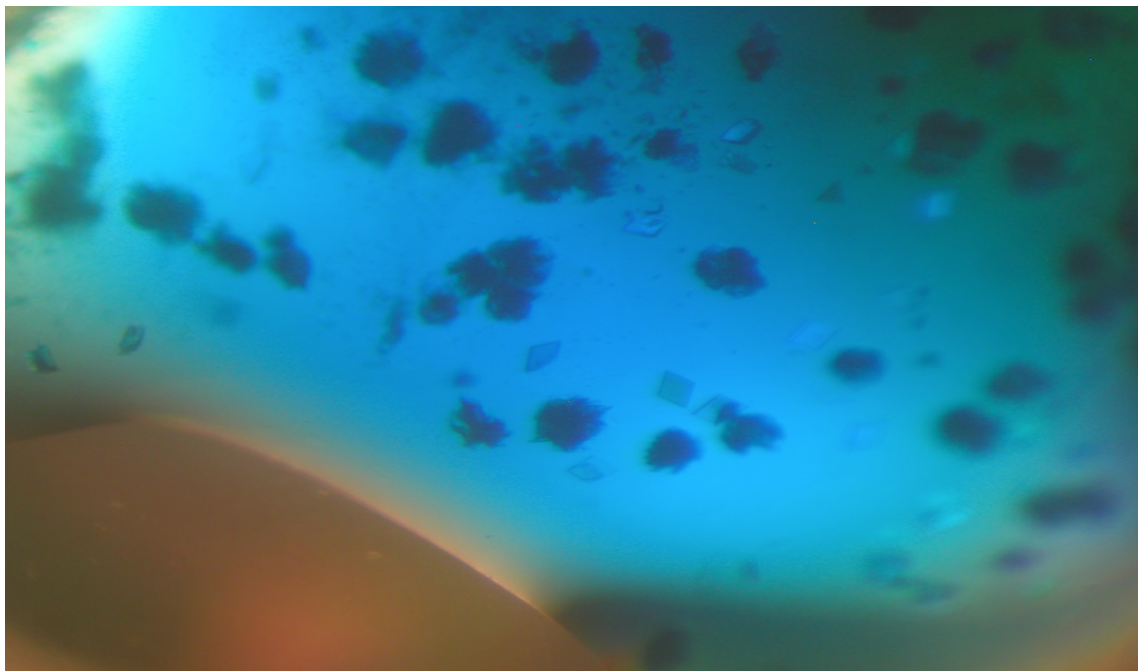
Stejnými krystalizačními technikami jako u Xylanasy byly vypěstovány krystaly DbeA (Obrázek 6). Tyto krystaly byly vypěstovány z precipitačního roztoku složeného z 20 % PEG 3350, 150 mM octanu vápenatého a 0,2 M Tris HCl při pH 7,5 a 10,45% roztoku proteinu metodami visící kapky v Petriho miskách, v krystalizačních destičkách a pod olejem



Obrázek 5: Krystaly DbeA (foto autor)

4.4. Testování krystalů – DYE Test

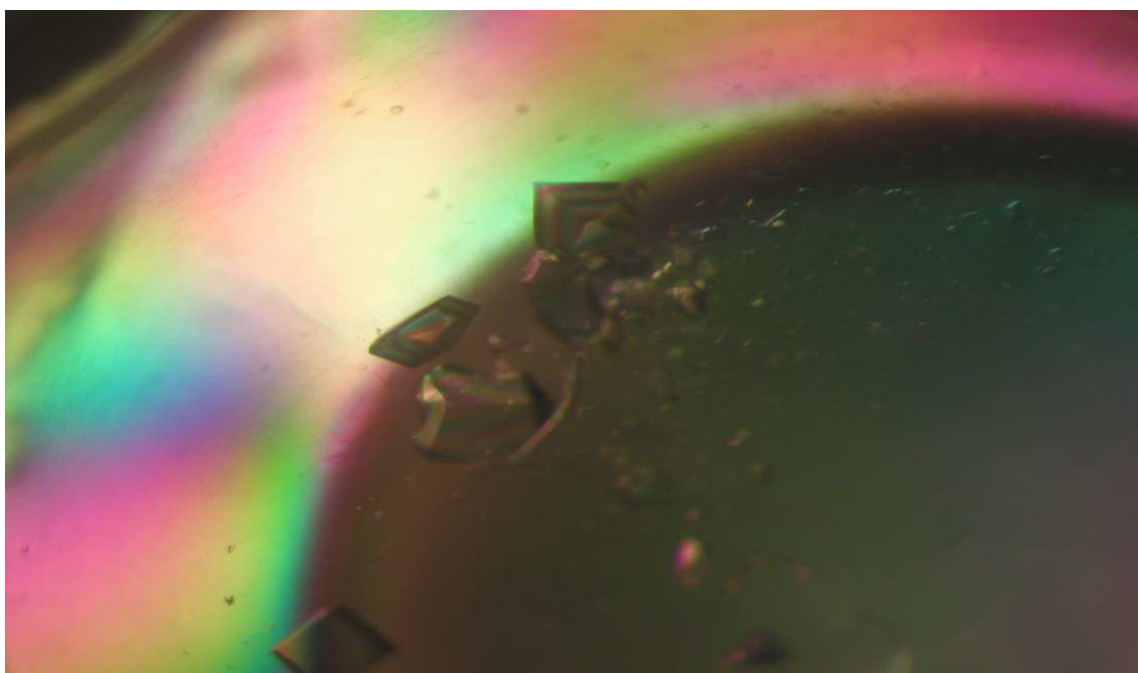
Do krystalizační destičky k vytvořeným krystalům byla pipetována modrá barva IzIt. Po 30 minutách došlo k obarvení krystalů (Obrázek 7). Tím bylo ověřeno, že se jedná o krystaly proteinu.



Obrázek 6: Výsledek DYE testu (foto autor)

4.5. Testování krystalů – Crush Test

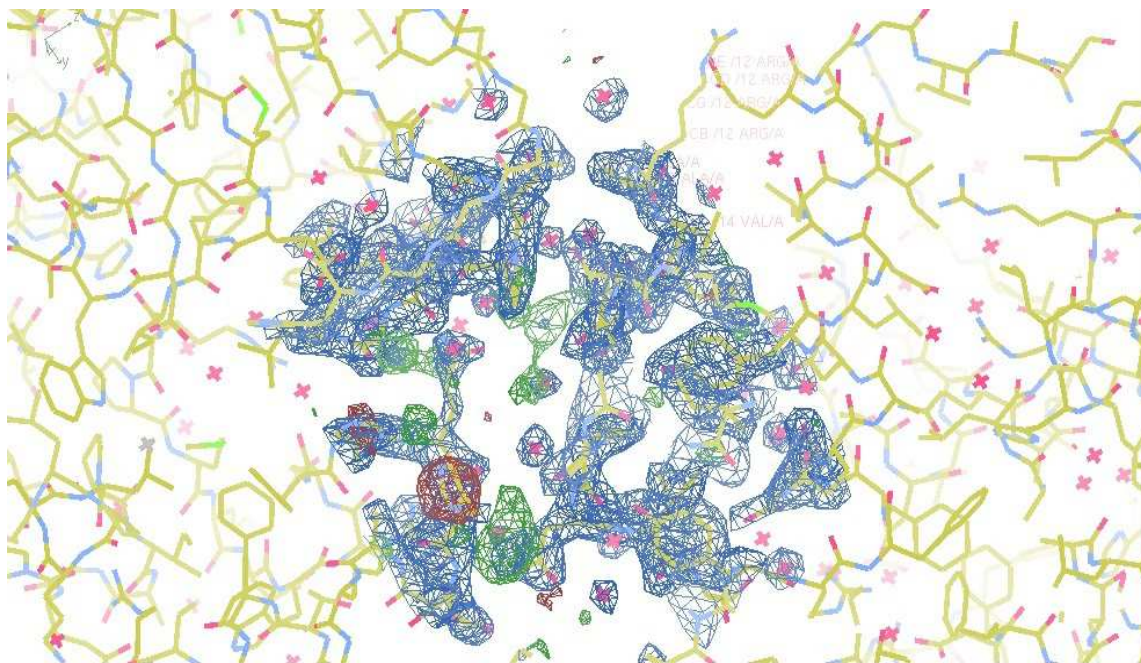
Vytvořené krystaly byly pod mikroskopem rozbity jehlou (Obrázek 8). Rozbité krystaly potvrdily, že byly vytvořeny krystaly proteinu.



Obrázek 7: Výsledek crush testu (foto autor)

4.6. Modelování v programu WinCoot

V programu WinCoot byla načtena a prohlédnuta mapa elektronové hustoty proteinu DbeA (obrázek 9) a bylo ověřeno, jestli při jejím vytváření nedošlo k nějakým odchylkám v prostorovém uspořádání aminokyselin. Případně byly tyto odchylky opraveny a/nebo byly doplněny molekuly vody.

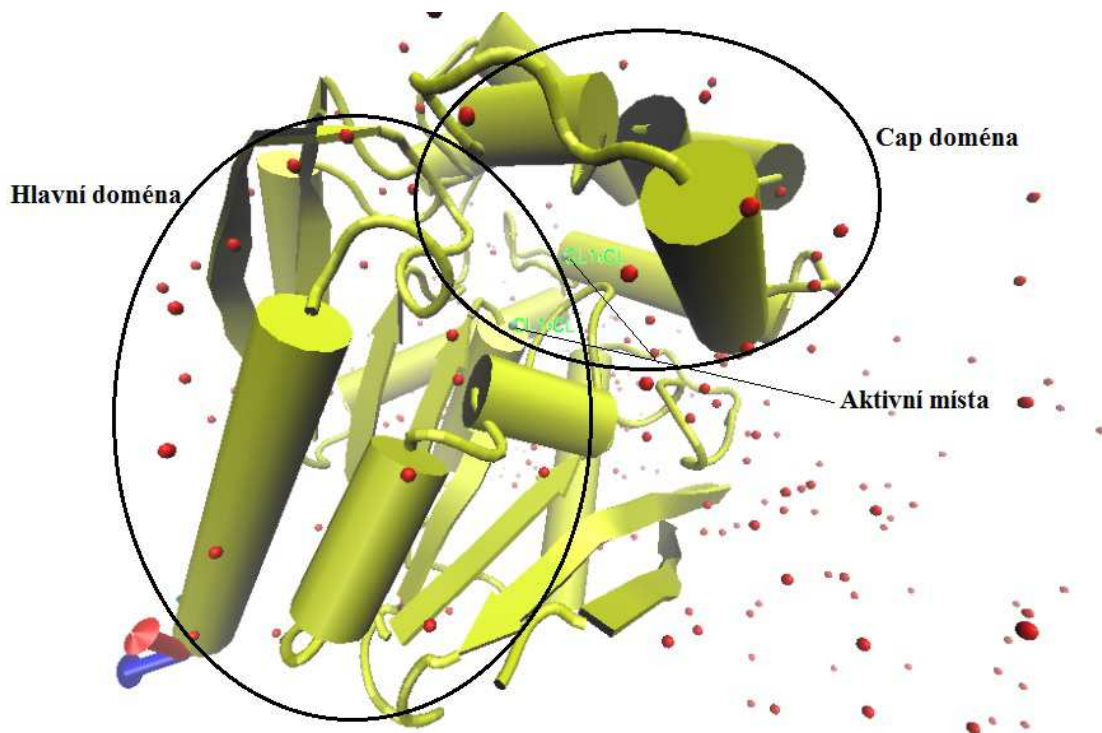


Obrázek 8: Mapa elektronové hustoty DbeA

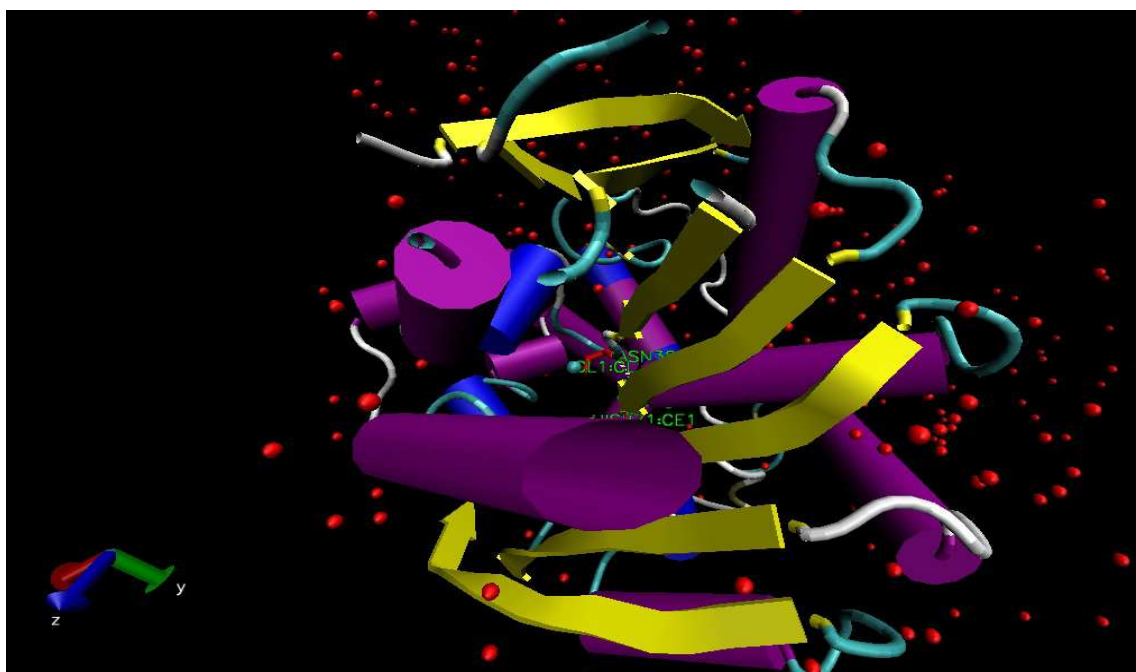
4.7. Modelování v programu VMD

V programu VMD byla vymodelována struktura proteinu DbeA, ze které je dobře patrné terciární struktura DbeA a to její rozdělení na menší cap doménu spojenou šroubovitou oblastí s hlavní doménou (Obrázek 9, Obrázek 10).

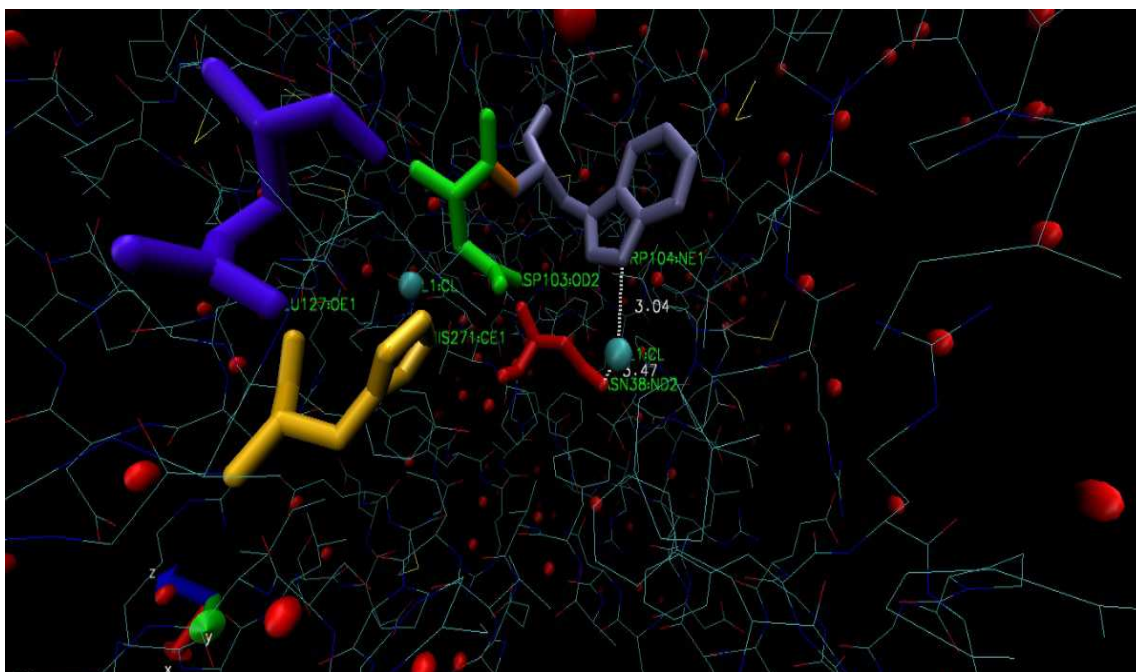
Uvnitř proteinu, v hydrofobní dutině, se nachází aktivní místo proteinu (Obrázek 9), ve kterém probíhá dehalogenační reakce. DbeA obsahuje dvě aktivní místa, což je podstatný rozdíl oproti jiným halogenalkandehalogenasám, které obsahují aktivní místo pouze jedno. V aktivním místě se nachází molekula chloru, na kterou jsou navázány aminokyseliny. Pětici aminokyselin (pentádu) pro první aktivní místo vytváří: Glu127 + His271 + Asp103 + Trp104 + Asn35 (Obrázek 11). Aminokyseliny, které se vážou na druhé aktivní místo, jsou Gln102, Gln274, Thr40 a Gly37 (Obrázek 12).



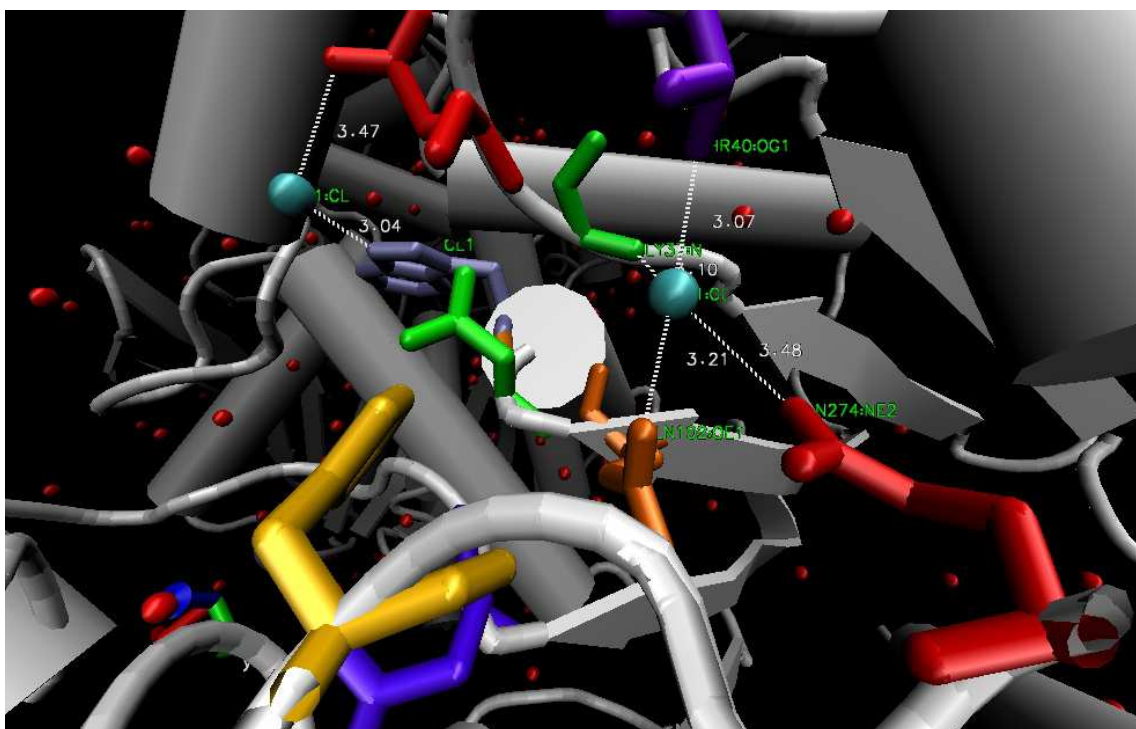
Obrázek 9: Domény a aktivní místa DbeA



Obrázek 10: Struktura DbeA



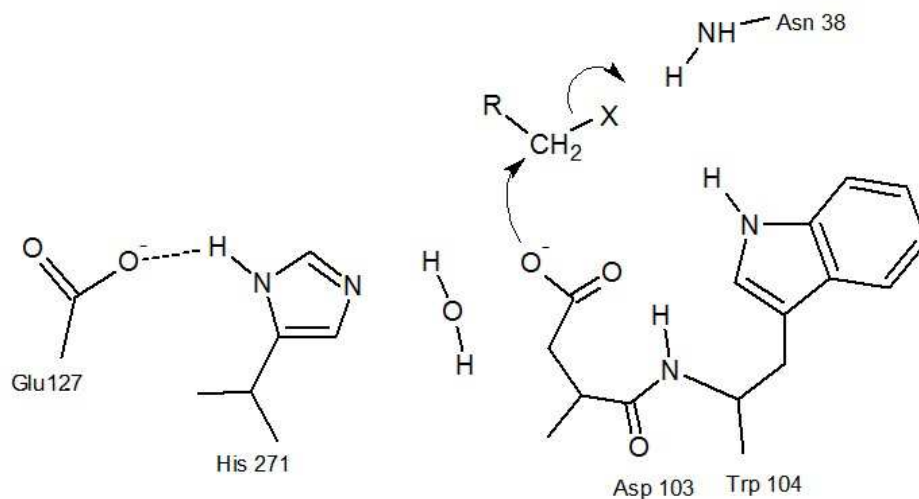
Obrázek 11: První aktivní místo DbeA – zelená barva Asp103, červená barva Asn38, modrá barva Glu127, žlutá barva His271 a fialová barva Trp104



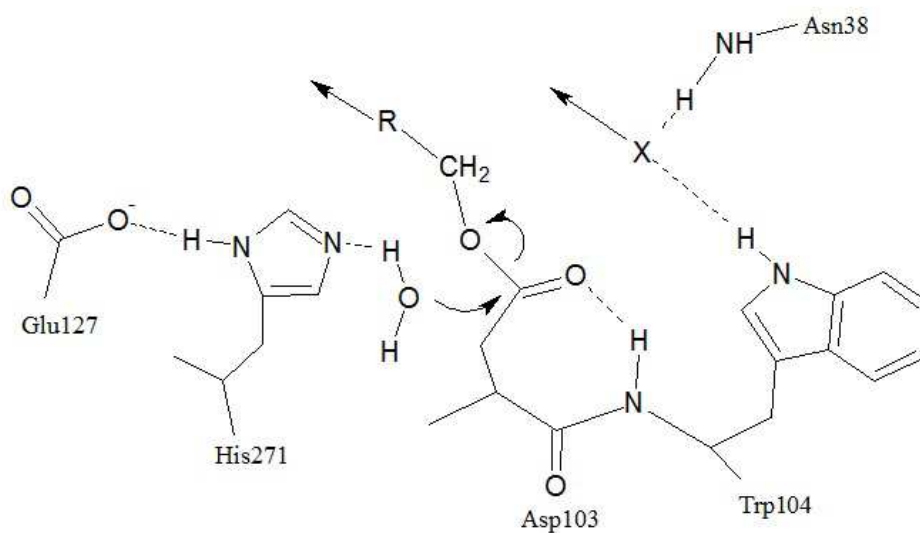
Obrázek 12: Druhé aktivní místo DbeA: Gln102 oranžová barva, Gln274 červená barva, Thr40 fialová barva a Gly37 zelená barva.

4.8. Schéma dehalogenační reakce

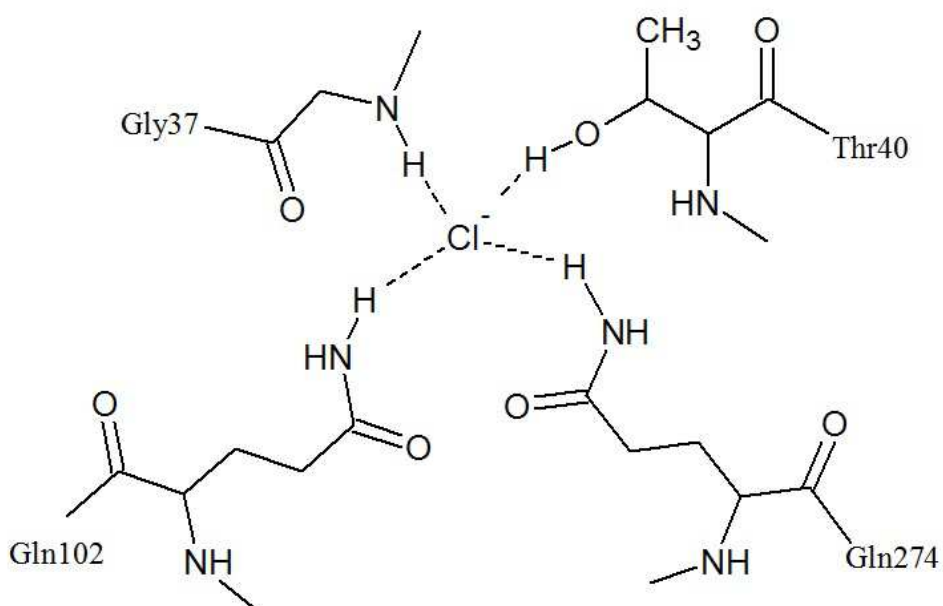
V programu ChemSketch (volně dostupný na <http://www.acdlabs.com/download/>) byly vytvořeny rovnice dehalogenační reakce prvního aktivního místa (Obrázek 13, 14) a schéma ne vazebných interakcí druhého aktivního místa (Obrázek 15).



Obrázek 13: Vytvoření kovalentního enzym-substrát meziprojektu a halogenidového iontu vázaného mezi halogenid-stabilizujícími rezidui



Obrázek 14: Hydrolýza meziprojektu



Obrázek 15: Schéma nevazebných interakcí chloridového anionu Cl^- ve druhém aktivním místě

5. Diskuze

Krystalizační experimenty probíhaly ve sterilních podmínkách při laboratorní teplotě 18 °C. Krystaly studovaného proteinu halogenalkandehalogenasy DbeA byly získány z precipitačního roztoku složeného z 20 % PEG 3350, 150 mM octanu vápenatého a 0,2 M Tris HCl při pH 7,5 a koncentraci proteinového roztoku 10,45%. Jednalo se o bezbarvé krystaly ve tvaru jehly o rozměrech přibližně 0,05 x 0,05 x 0,3 mm, které vyrostly do dvou týdnů (Obrázek 6). V případě Xylanasy byly získány krystaly z precipitačního roztoku obsahujícího 0,1 M Tris HCl a 1,9 M (NH₄)₂SO₄ při pH 8,4 a 17% roztok proteinu. V tomto případě byly vytvořeny kosočtverečné krystaly červené, modré a žluté barvy o velikosti přibližně 0,15 x 0,15 x 0,03 mm (Obrázek 5).

5.1. Krystalizace provedena v Petriho miskách

Při metodě sedící kapky nedošlo k vytvoření krystalů DbeA, zřejmě vlivem špatného uzavření misky. Krystaly Xylanasy byly vypěstovány v koncentracích proteinového roztoku 8,5% a 17%.

Při metodě visící kapky vznikly krystaly DbeA v nejvyšší koncentraci, tedy 10,45%. Xylanasa vykrytalizovala ve stejných koncentracích jako při metodě sedící kapky.

Z výsledků experimentů vyplývá, že k nárůstu krystalů dochází v nejvyšších koncentracích proteinového roztoku pro obě zmíněné metody.

5.2. Krystalizace provedena v krystalizačních destičkách

Při metodě sedící kapky v CrysChem krystalizačních destičkách byly vypěstovány krystaly DbeA na pátém a šestém ostrůvku, které odpovídaly koncentraci proteinu 10,45% při objemu srážecího činidla 1000 a 200 µl. V případě Xylanasy došlo u první koncentrace 4,25% a objemů srážecího činidla 50 a 100 µl pouze k vytvoření sraženiny. Stejně tak u koncentrace 8,5% a objemech srážecího činidla 500 a 800 µl. Krystaly vznikly u koncentrace 17% a objemů srážecího činidla 1000 a 200 µl. Z výsledků experimentů vyplývá, že krystaly vznikaly opět při nejvyšších koncentracích proteinového roztoku a objem srážecího činidla v rezervoáru růst krystalů neovlivňoval.

Při metodě visící kapky byly vypěstovány krystaly jak DbeA, tak Xylanasy z nejvyšších koncentrací a při největších objemech srážecího činidla. Ostatní kapky na sklíčkách byly vyschlé pravděpodobně vlivem netěsností.

5.3. Krystalizace pod olejem

Krystaly obou proteinů byly vytvořeny v řadách, ve kterých byly stejné objemy roztoku proteinu a srážecího činidla. Krystaly byly vytvořeny i v řadách, kde objem roztoku proteinu byl větší než objem srážecího činidla. Naopak v řadách, kde byl větší objem srážecího činidla a menší roztoku proteinu, krystaly nevznikly.

5.4. Krystalizace v kapilárách

Krystaly DbeA v kapilárách vypěstovány nebyly. Krystaly Xylanasy narostly v kapiláře o koncentraci proteinového roztoku 17% na 100 % roztoku.

Z vyzkoušených metod vyplývá, že v případě obou proteinů byla vhodně zvolena nejvyšší koncentrace proteinových roztoků, kdy došlo k nárstu krystalů v destičkách. Nejvhodnějším poměrem roztoku proteinu a srážecího činidla byl poměr 1 : 1, případně větší objem proteinového roztoku než srážecího činidla.

5.5. Struktura DbeA

Na základě použití programů WinCoot a VMD byla vymodelována halogenalkandehalogenasa DbeA. Vzhledem k vysokému rozlišení 2.2 Å bylo možné detailně popsat strukturu (Obrázek 10 a 11). Jsou na ní velmi dobře patrné obě domény a jejich spojení, aktivní místa i molekuly vody. Hlavní doménou je hydrolasa, skládající se z centrální oblasti osmi skládaných beta-listů obklopených šesti alfa-šroubovicemi (Ollis., 1992). Hlavní doména je připojena k vedlejší šroubovitou oblastí cap domény. Nedokonalé balení na rozhraní mezi těmito dvěma doménami vytváří dutinu, která je zodpovědná za dehalogenační funkci. Toto aktivní místo dutiny se skládá z aminokyselinových zbytků pocházejících z obou domén. Zatímco hlavní doména přispívá zejména zachovanými zbytky, zbytky z aktivního místa pocházející z oblasti cap domény jsou variabilní (Chovancová a kol., 2007).

Enzym DbeA je oproti ostatním halogenalkandehalogenasám jedinečný v tom, že v jeho struktuře se nacházejí dvě aktivní místa. Tato skutečnost je momentálně intenzivně studována, aby byla objasněna jejich přesná funkce a mechanismus odbourávání bromovaných a jodovaných sloučenin, pro které má specifitu a mohl tak být využit ve větší míře v technologiích odbourávajících tyto látky ze životního prostředí. V současné době je již využíván při čištění průmyslových odpadních vod.

5.6. Dehalogenační reakce

Mechanismus dehalogenační reakce HLD se skládá ze dvou fyzikálních kroků a dvou chemických kroků: navázání substrátu, S_N2 substituce, hydrolýzy a uvolňování produktů. Molekula substrátu je vázána na konformaci, ve které ji opouští atom halogenu stabilizovaný dvěma halogenid-stabilizujícími zbytky (Obrázek 14 a 15). V prvním chemickém kroku, je atom uhlíku nesoucí halogenový substituent napaden jedním z kyslíků nukleofilu (Asp), zatímco uvolňování halogenidu od substrátu je možné prostřednictvím jeho stabilizace v halogenid-stabilizujících zbytcích. Výsledkem prvního chemického kroku je vznik kovalentního enzym-substrát meziprojektu a halogenidového iontu vázaného mezi halogenid-stabilizujícími rezidui. V důsledku toho je meziprojekt hydrolyzován molekulou katalytické vody, která aktivuje katalytickou bázi (His). Náboj vytvořený na katalytické základně během hydrolýzy je stabilizován katalytickou kyselinou (Asp nebo Glu). Hydrolytický krok následuje uvolněním produktu alkoholu a iontu halogenidu z aktivního místa. Katalytický cyklus je zakončen regenerací enzymu, při které je navázán proton zbývající z použité katalytické vody a voda doplněna.

6. Závěr

Cílem práce bylo seznámit se s proteinovou krystalografií jako jednou z nejvíce používaných metod při objasňování proteinových struktur, konkrétně naučit se krystalizovat modelové a vybrané proteiny a na základě zpracovaných difrakčních dat vytvořit modely studovaného proteinu a popsat jeho základní charakteristiky. Pro krystalizaci byly použity standardní krystalizační metody sedící a visící kapky a krystalizace pod olejem a pokročilé metody krystalizace v kapilárách. Byl ověřen krystalizační protokol (Prudnikova a kol., 2011) a vypěstovány krystaly studovaného proteinu halogenalkandehalogenasy DbeA.

Struktura proteinu byla řešena pomocí modelovacích programů WinCoot a VMD. Výstupem těchto programů byly obrázky, na kterých jsou popsány obě domény proteinu. Dále pak byla popsána aktivní místa proteinu, na kterých dochází k dehalogenaci. Aktivní místa u tohoto proteinu jsou dvě, což doposud nebylo zjištěno u žádné jiné halogenalkandehalogenasy. Tím se odlišuje od ostatních halogenalkandehalogenas a toto zjištění by se mohlo stát průlomovým. Proto je potřeba další výzkum, aby byla objasněna přesná funkce druhého aktivního místa a chemických procesů, za které je zodpovědné.

Technologie odbourávání polutantů zatěžujících životní prostředí pomocí halogenalkandehalogenas je využívána k dekontaminaci půd a k čištění průmyslových odpadních vod. Proto je tomuto tématu věnována pozornost a do budoucna se plánuje jejich využití např. v čistírnách komunálních odpadních vod.

7. Použitá literatura

- Andrew G. W. Leslie: *Acta Cryst.*, 2006, D62, 48–57
- Banás P., Otyepka M., Jerábek P., Petrek M., Damborský J., 2006, *J Comput Aided Mol Des*, 20, 375-383
- Bergfors T. M.: *Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips*. La Jolla 1999. IUL Biotechnology Series.
- Cowtan, K., 2006. *Acta Cryst.* D62, 1002–1011
- Curragh H., Flynn O., Larkin M. J., Stafford T. M., Hamilton J. T., Harper D. B., 1994, *Microbiology*, 140 (Pt 6), 1433-1442
- Drenth J.: *Principles of Protein X-Ray Crystallography*, 1999, Second Edition. New York. Springer-Verlag
- Emsley P., Lohkamp B., Scott W. G. and Cowtand K. , 2009, Features and development of Coot, *Acta Crystallographica*, ISSN 0907-4449
- Franken S. M., Rozeboom H., Kalk K. H., Dijkstra B. W., 1991, *EMBO J*, 10, 1297 – 1302
- Hasan K., Fortova A., Koudelakova T., Chaloupkova R., Ishitsuka M., Nagata Y., Damborsky J., Prokop Z., 2011, *Appl Environ Microbiol*, 77, 1881-1884
- Hesseler M., Bogdanovič X., Hidalgo A., Berenguer J., Palm G. J., Hinrichs W., Bornscheuer U. T., 2011, *Appl Microbiol Biotechnol*, DOI 10.1007/s00253-011-3328-x
- Chaloupková R., Sýkorová J., Prokop Z., Jesenská A., Monicová M., Pavlová M., Tsuda M., Nagata Y., Damborský J., 2003, *J Biol Chem*, 278, 52622-52628.
- Chan W. Y., Wong M., Guthrie J., Savchenko A. V., Yakunin A. F., Pai E. F., Edwards E. A., 2010, *Microb Biotechnol*, 3, 107-120.
- Chovancová E., Kosinski J., Bujnicki J. M., Damborský J., *Proteins*, 67, 305-316.
- Janssen D. B., *Curr Opin Chem Biol* 2004, 8, 150-159.
- Janssen, D. B., Dinkla, I. J. T., Poelarends, G. J. & Terpstra, P., 2005. *Environ. Microbiol.* 7, 1868-1882
- Jesenská A., Monicová M., Koudeláková T., Hasan K., Chaloupková R., Prokop Z., Geerlof A., Damborsky J., 2009, *Appl Environ Microbiol*, 75, 5157-5160
- Jesenská A., Pavlová M., Strouhal M., Chaloupková R., Tesínská I., Monincová M., Prokop Z., Bartos M., Pavlík I., Rychlík I., Möbius P., Nagata Y., Damborský J., 2005 *Appl Environ Microbiol*, 71, 6736-6745
- Jesenská A., Bartos M., Czerneková V., Rychlík I., Pavlík I., Damborský J., 2002, *Appl Environ Microbiol*, 68, 3724-3730
- Keuning S., Janssen D. B., Witholt B., 1985, *J Bacteriol*, 163, 635-639
- Koudelakova T., Chovancova E., Brezovsky J., Monincova M., Fortova A., Jarkovsky J., Damborsky J., 2002, *Appl Environ Microbiol*, 68, 3724-3730
- Krooshof G. H., Ridder I. S., Tepper A. W., Vos G. J., Rozeboom H. J., Kalk K. H., Dijkstra B. W., Janssen D. B., 1998, *Biochemistry*, 37, 15013-15023
- Lahoda M., Chaloupkova R., Stsiapanava A., Damborsky J., Kuta Smatanova I., (2011) Crystallization and crystallographic analysis of the *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 mutant DhaA31 and its complex with 1, 2, 3-trichloropropane. *Acta Cryst F*67, 397-400
- Marek J., Vévodová J., Smatanová I. K., Nagata Y., Svensson L. A., Newman J., Takagi M., Damborský J., 2000, *Biochemistry*, 39, 14082-14086

- Mazumdar P. A., Hulecki J. C., Cherney M. M., Garen C. R., James M. N. G., 2008, *Biochim Biophys Acta*, 1784, 351-362.
- McPherson, 1999, *Crystallization of Biological Macromolecules*, New York. CSHL Press.
- Kulakova A. N., Larkin M. J., Kulak L. A., 1997, *Microbiology*, 143, 109-115
- Nagata Y., Hynková K., Damborský J., Takagi M., 1999, *Protein Expr Purif*, 17, 299-304
- Nagata Y., Nariya T., Ohtomo R., Fukuda M., Yano K., Takagi M., 1993, *J Bacteriol*, 175, 6403-6410
- Negri A., Marco E., Damborsky J., Gago F., 2007, *J Mol Graph Model*, 26, 643-651.
- 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, *Biochemistry*, 38, 16105-16114
- Newman J., Peat T. S., Richard R., Kan, L., Swanson, P. E., Affholter, J. A., Holmes, I. H., Ollis D. L., E. Cheah, M. Cygler, B. Dijkstra, F. Frolow, S. M. Franken, M. Harel, S. J. Remington, I. Silman, J. Schrag, *Protein Eng* 1992, 5, 197-211
- Degtjarik O., Chaloupkova R., Rezacova P., Kutý M., Damborsky J., Kuta Smatanova I., 2013, Differences in crystallization of two LinB variants from *Sphingobium japonicum* UT26. *Acta Cryst F69*, Part 3, 284-287
- Panjikar, S., Parthasarathy, V., Lamzin, V. S., Weiss, M. S. & Tucker, P. A. ,2005, *Acta Cryst. D61*, 449–457.
- Pavlova M., Klvana M., Prokop Z., Chaloupková R., Banas P., Otyepka M., Wade R. C., Tsuda M., Nagata Y., Damborský J., 2009, *Nat Chem Biol*, 5, 727-733.
- Petrek M., Otyepka M., Banás P., Kosinová P., Koca J., Damborský J., 2006, *BMC Bioinformatics* 7, 316
- Pries F., Kingma J., Krooshof G. H., Jeronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P., Jansen D. B., 1995, *Biol Chem*, 270, 10405-10411
- Pries F., Kingma J., Pentengna M., van Pouderooyen G., Jeronimus-Stratingh C. M., Bruins A. P., Jansen D. B., 1994, *Biochemistry*, 33, 1242-1247
- Prokop Z., Monincová M., Chaloupková R., Klvana M., Nagata Y., Jansen D. B., Damborský J., 2003, *J Biol Chem*, 278, 45094-45100.
- 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, *Angew Chem Int Ed Engl*, 49, 6111-6115.
- Prokop, Z., Damborsky, J., Nagata, Y. & Janssen, D. B., 2004, WO 2006/079295 A2.
- Prokop, Z., Damborsky, J., Oplustil, F., Jesenska, A. & Nagata, Y., 2005, WO 2006/128390 A1.
- Sato Y., Monicová M., Chaloupková R., Prokop Z., Ohtsubo Y., Minamisawa K., Tsuda M., Damborsky J., Nagata Y., 2005, *Appl Environ Microbiol*, 71, 4372-4379.
- Silberstein M., Damborsky J., Vajda S., 2007, *Biochemistry*, 46, 9239-3249.
- Smatanová, I., 2003, *Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi*, Učební text,
- Stsiapanava A., Chaloupkova R., Fortova A., Brynda J., Weiss M., Damborsky J., Kuta Smatanova I., 2011, Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild type haloalkane dehalogenase DhaA and the variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Cryst* , F67, 253-257
- Stsiapanava, A., Dohnalek, J., Gavira, J. A., Kutý, M., Koudelakova, T., Damborsky, J. and Kuta Smatanova, I., 2010, Atomic resolution studies of haloalkane dehalogenases DhaA04, DhaA14 and DhaA15 with engineered access tunnels. *Acta Cryst D66*, 962-969,

Stsiapanava, A., Koudelakova, T., Lapkouski, M., Pavlova, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova I., 2008, Acta Cryst. F64, 137-140.

Swanson, P. E., 1999, Curr. Opin. Biotech. 10, 365-369

Terwilliger, T. C., Hao, Q., 2004. Acta Cryst. D60, 1244–1253

Prudnikova T., Chaloupkova R., Sato Y., Nagata Y., Degtjarik O., Kuty M., Rezacova P., Damborsky J., Kuta Smatanova I., 2011, Development of a Crystallization Protocol for the DbeA1 Variant of Novel Haloalkane Dehalogenase from Bradyrhizobium elkani USDA94. Crystal Growth and Design 11, 516-519

Internetové odkazy

<http://www.acdlabs.com/download/>

<http://www2.le.ac.uk>

<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>

<http://www.structmed.cimr.cam.ac.uk/Course/Crystals/Theory/phases.html>

8. Seznam příloh

Příloha 1: Certifikát z krystalizačního kurzu v Nových Hradech

Příloha 2: Abstrakt publikovaný v časopise Materials structure in Chemistry, Biology, Physics and Technology

9. Přílohy



Příloha 1: Certifikát z krystalizačního kurzu v Nových Hradech



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, Prikylova 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. Bojarova P, Slamova K, Krenek 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 Kohoutová¹, Tatyana Prudnikova¹, Katsiaryna Tratsiak¹, and Michal Kutý^{1,2}

¹ University of South Bohemia in České Budějovice, Faculty of Fisheries and Protection of Waters, CENAKVA and Institute of Complex Systems, Zámek 136, 373 33 Nove Hradky

² Academy of Sciences of the Czech Republic, Institute of Nanobiology and Structural Biology GCRC, Zámek 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, DbcA 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 ME 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 bakalářské práce je krystalizace modelového proteinu Xylanasy a nové halogenalkandehalogenasy DbeA a zobrazení její struktury pomocí programů molekulárního modelování. Za tímto účelem byla provedena krystalizace obou proteinů metodami sedící a visící kapky založené na difúzi par, krystalizace pod olejem a krystalizace v kapilárách. Struktura byla řešena pomocí programů WinCoot a VMD. Výsledky budou sloužit pro další výzkum zaměřený na studium strukturně-funkčních vztahů halogenalkandehalogenas.

11. Abstract

The aim of this work is the crystallization of model protein Xylanase and a new haloalkane dehalogenase DbeA and description of DbeA structure using modeling programs. For this purpose, the crystallization methods based on sitting and hanging drop vapor diffusion, crystallization under oil and crystallization in capillaries were applied. The structure was solved using programs WinCoot and VMD. The results will be used for further research of structure-functional relationships of haloalkane dehalogenases.