

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

Bakalářská práce

Biodegradace environmentálních polutantů

Krystalogeneze halogenalkandehalogenasy DpcA
z *Psychrobacter cryohalolentis* K5

Autor: Jakub Jung

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

Studijní program a obor: B4103 Zootechnika, Rybnářství

Forma studia: Prezenční

Ročník: 3.

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

V Českých Budějovicích dne 30. dubna 2013

Děkuji svému vedoucímu práce Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za příkladné vedení bakalářské práce, odborné rady a cenné připomínky. Dále bych rád poděkoval Mgr. Tatyane Prudnikove, Mgr. Oksaně Degtjarik a Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. za metodické vedení celým praktickým experimentem. Velký dík patří také Kamile Vojslavské za závěrečné úpravy a korekci pravopisu. V poslední řadě děkuji své rodině za podporu během celého studia.

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Jakub JUNG**
Osobní číslo: **V10B025P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Biodegradace environmentálních polutantů - krystalogeneze vybraného enzymu**
Zadávací katedra: **Ústav 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.

Nové druhy halogenalkan dehalogenas a jejich mutantní formy byly izolovány z vybraných organismů. Enzymy jsou připraveny ke krystalizačním experimentům.

Cílem práce bude provést krystalizační experimenty s nově připraveným enzymem DpcA z *Psychobacter cryohalolentis* K5 a pokusit se vypěstovat difraktující monokrystaly tohoto proteinu. V další fázi projektu budou naměřená difrakční data použita k určení a upřesnění proteinové struktury.

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:

Nolene Byrne, C. Austen Angell: The solubility of Hen Lysozyme in Ethylammonium Nitrate/H₂O Mixtures and a Novel Approach to Protein Crystallization. *Molecules* 15, 793-803 (2010).

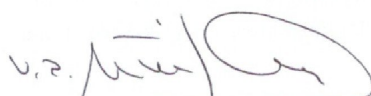
Jiří Emmer: Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, in English. University of South Bohemia, Faculty of Science, Č. Budějovice, (2007).

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.**
Ústav komplexních systémů

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

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


prof. Ing. Otomar Ljnhart, DrSc.
děkan

L.S.


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

OBSAH

1. Úvod	10
2. Literární přehled	12
2.1. Historie krystalizace	12
2.2. Krystalizační proces	13
2.2.1. Vznik krystalů	13
2.2.2. Supersaturace	15
2.2.3. Nukleace	15
2.2.4. Růst krystalů	16
2.2.5. Ukončení (terminace) růstu	16
2.3. Faktory ovlivňující krystalizaci	17
2.4. Proteinová krystalografie	17
2.4.1. Krystaly	18
2.4.2. Makromolekulární krystaly	18
2.4.3. Makromolekulární databáze	18
2.5. X-ray krystalografie	19
2.6. Test před krystalizací	19
2.7. Krystalizační metody	20
2.8. Základní krystalizační metody	20
2.8.1. Dávková krystalizace („Batch Crystallization“)	20
2.8.2. Metody založené na difúzi par rozpouštědla	22
2.8.2.1. Metoda sedící kapky	23
(„Sitting Drop Vapor Diffusion“)	23
2.8.2.2. Metoda visící kapky	24
(„Hanging Drop Vapor Diffusion“)	24
2.8.2.3. Metoda sendvičové kapky	26
(„Sandwich Drop Vapor Diffusion“)	26

2.8.3. Dialýza („Dialysis“)	26
2.8.3.1. Varianty dialýzy	28
2.8.4. Mikrokrystalizace pod olejem	29
(„Microbatch Under Oil“)	29
2.9. Lysozym	30
2.10. Halogenalkandehalogenasy	31
2.10.1. Struktura	31
2.10.1.1. Aktivní místo	32
2.10.2. Funkce a využití	32
2.10.3. DpcA	33
3. Metodika	34
3.1. Gelová SDS – PAGE elektroforéza	34
3.1.1. Příprava spodního („lower“) gelu	35
3.1.2. Příprava horního („higher“) gelu	35
3.1.3. Vlastní elektroforéza	36
3.2. Příprava krystalizačních roztoků	37
3.2.1. Krystalizační roztok pro lysozym	38
3.2.2. Krystalizační roztok pro DpcA	38
3.3. Vlastní krystalizace	38
3.3.1. Metoda visící kapky	39
(„Hanging Drop Vapor Diffusion“)	39
3.3.1.1. Provedení metody v Petriho misce	39
3.3.1.2. Provedení v krystalizační destičce	39
3.3.2. Metoda sedící kapky	41
(„Sitting Drop Vapor Diffusion“)	41
3.3.2.1. Provedení v Petriho misce	41
3.3.2.2. Provedení v krystalizační destičce	41

3.3.3. Mikrokrystalizace pod olejem	43
(„Microbatch Under Oil“).....	43
3.3.4. Krystalizace v kapilárách („Counter Diffusion“)	44
3.4. Testování krystalů	44
3.4.1. Test zbarvením krystalu („Dye binding test“)	44
3.4.2. Test rozdrcení krystalu („Crush test“).....	45
3.4.3 Test vysoušením krystalu („Dry test“).....	45
3.5. Grafické znázornění DpcA	45
3.5.1. WinCoot	46
3.5.2 VMD.....	46
3.5.3. ChemSketch.....	46
4. Výsledky.....	47
4.1. Vyhodnocení výsledků gelové SDS – PAGE	47
elektroforézy.....	47
4.2. Výsledky krystalizačních metod	47
4.2.1. Výsledky metody visící kapky	48
4.2.1.1. Lysozym	48
4.2.1.2. DpcA	49
4.2.2. Výsledky metody sedící kapky.....	50
4.2.2.1. Lysozym	51
4.2.2.2. DpcA	52
4.3. Výsledky mikrokrystalizace pod olejem	53
4.3.1. Lysozym.....	53
4.4. Výsledky testování krystalů.....	54
4.5. Výsledky modelování	55
4.5.1. DpcA	55
4.5.2. Lysozym.....	56

4.5.3. ChemSketch.....	57
5. Diskuze.....	58
5.1. Lysozym.....	58
5.2. DpcA.....	60
5.3. Struktura enzymů.....	60
5.3.1. Struktura lysozymu.....	61
5.3.2. Struktura DpcA.....	61
5.4. Enzym a jeho aktivní místo.....	61
5.4.1. Aktivní místo halogenalkandehalogenasy DpcA.....	62
5.5. Dehalogenační reakce.....	63
5.5.1. Příklad reakce v aktivním místě enzymu DpcA.....	64
6. Závěr.....	66
7. SEZNAM LITERURY.....	67
8. PROGRAMY.....	72
9. SEZNAM ZKRATEK.....	73
10. SEZNAM TABULEK.....	74
11. SEZNAM OBRÁZKŮ.....	75
12. ABSTRAKT.....	77
13. ABSTRACT.....	78

1. Úvod

Krystalizace biologických makromolekul představuje jeden z nejefektivnějších nástrojů ve strukturní biologii či fyzikální biochemii. Je založena na hledání vhodných podmínek pro růst krystalů a jejich následné optimalizace. Toho je využito k vypěstování monokrystalů o vhodné velikosti a kvalitě pro rentgenovou difrakční analýzu. Krystalizace se stala zásadním krokem k objasnění struktur makromolekulárních látek. Protože jediné pochopení struktury nám může ukázat, jak daná molekula funguje.

V teoretické části práce je shrnut stručný úvod, dále je popsán krystalizační proces a jednotlivé základní krystalizační metody.

Experimentální část práce spočívá v praktické aplikaci základních, ale i pokročilých krystalizačních metod. Dále pak zhodnocení výsledků včetně jejich následného vyhodnocení.

Halogenované uhlovodíky představují látky, které závažně znečišťují životní prostředí. Nejenom v České republice, ale po celém světě se vyskytují halogeny kontaminované oblasti. Halogenované sloučeniny představují v životním prostředí řadu rizik a bezpochyby lze říci, že mají negativní dopad na mnohé ekosystémy. Do skupiny halogenovaných organických látek patří látky nebezpečné, ale mnohdy i karcinogenní. Pokud se tyto látky dostanou do volných vod, tak jsou vysoce toxické pro ryby a ostatní vodní organismy. Jejich toxicita silně vzrůstá, obsahují-li v řetězci chlor, brom nebo jód. Tyto látky mají navíc schopnost bioakumulace, tudíž se kumulují v životním prostředí a velice špatně se odbourávají. Následně se šíří potravním řetězcem směrem vzhůru, tzn. od nižších živočichů směrem k predátorům. Jejich vliv na kvalitu životního prostředí lze tedy označit za velmi významný. Proto je snaha tyto látky odbourávat jak z vody, tak i půdy. Likvidace těchto látek je ale velice nákladná, a proto se hledají nové, efektivnější, a především levnější způsoby odbourávání. Proces odbourávání halogenů se nazývá dehalogenace a klíčovou roli při něm hrají halogenalkandehalogenasy. Proto jejich krystalizace a následné pochopení struktury může vést ke zkvalitnění životního prostředí.

Cíle bakalářské práce

Předložená bakalářská práce popisuje:

- Stručný historický úvod do krystalografie jako jednoho z nejdůležitějších oborů strukturní chemie
- Podstatu krystalizačního procesu
- Teoretické zpracování základních krystalizačních metod s jejich výhodami a nevýhodami

Praktická část práce je zaměřena na krystalizační studie modelového proteinu lysozymu a nově připravené halogenalkandehalogenasy DpcA z *Psychrobacter cryohalolentis* K5.

2. Literární přehled

2.1. Historie krystalizace

Historie krystalizace sahá do období asi před 160 lety, kdy byl zaznamenán první růst proteinových krystalů. Jako první pozoroval krystalizaci proteinů Hünefeld v roce 1840, když se pokusil vykrystalizovat hemoglobin z žížaly (Leunissen, 2001). Krystalické formy dosáhl lisováním kapky krve mezi dvěma krycími sklíčky. Jeho pozorování jasně dokazuje, že proteinové krystaly mohou být připraveny řízeným odpařováním koncentrovaného proteinového roztoku. To znamená, že mohou být získány formou pomalé dehydratace (pomalého vysoušení). Tento proces je základem většiny krystalizačních technik, které dnes využíváme.

V následujících letech se vědci pokoušející o krystalizaci proteinů zaměřili na hemoglobin z různých druhů zvířat. Bohužel, až do roku 1850 všechny známé krystaly hemoglobinu vyrostly více či méně náhodně. Nebyl navrhnut žádný obecný postup pro růst krystalů.

První člověk, který vymyslel úspěšné a reprodukovatelné metody pro růst hemoglobinových krystalů, byl Fünke. Ten následně publikoval i sérii článků o růstu krystalů (Leunissen, 2001).

V období od roku 1850 do roku 1900 byly prozkoumány další třídy proteinů, konkrétně se jednalo o rostlinné proteiny, tzv. globuliny. V tomto období byly vyvinuty metody ke krystalizaci proteinů založené na extrakci proteinů z roztoku solí s následným pomalým ochlazením, dialýze z extraktu solného roztoku proteinu proti destilované vodě a úpravě proteinových roztoků alkoholem, acetonem nebo éterem. V těchto metodách se již najdou jakési základy dnešních krystalizačních metod. Hlavně pak použití srážecích činidel.

Téměř ve stejnou dobu, kdy se vědci snažili o krystalizaci proteinů ze semen rostlin, se Hofmeister (Leunissen, 2001) pokusil krystalizovat slepičí vaječný protein albumin a také albumin z koňského séra. Zvolil metodu založenou na vylučování proteinů z roztoku o vysoké koncentraci soli při pomalé regulaci pH.

V roce 1925 Summer (Leunissen, 2001) vykrystalizoval ureázu, která je považována za první vykrystalizovaný enzym. A v přibližně stejné době se dočkal krystalické podoby i první hormon, inzulin.

Pro krystalizaci inzulínu bylo rozhodující přidání dvojmocných zinečnatých iontů.

Po roce 1930 se začala používat pro charakterizaci krystalů proteinů rentgenová (X – ray) difrakční analýza. O tento nový přístup se zasloužili především Bernal, Crowfoot a Perutz (McPherson, 2004). X – ray difrakce se v dnešní době ukazuje jako nezbytná technika používaná v proteinové krystalografii k určení struktury proteinů z připravených krystalů.

Zásadním okamžikem v krystalizaci proteinů se stal rok 1980, kdy došlo k rozvoji technologie rekombinantní DNA, která vědcům zajistila dostatečné množství jinak vzácných proteinů, čehož se využívá i v současné době.

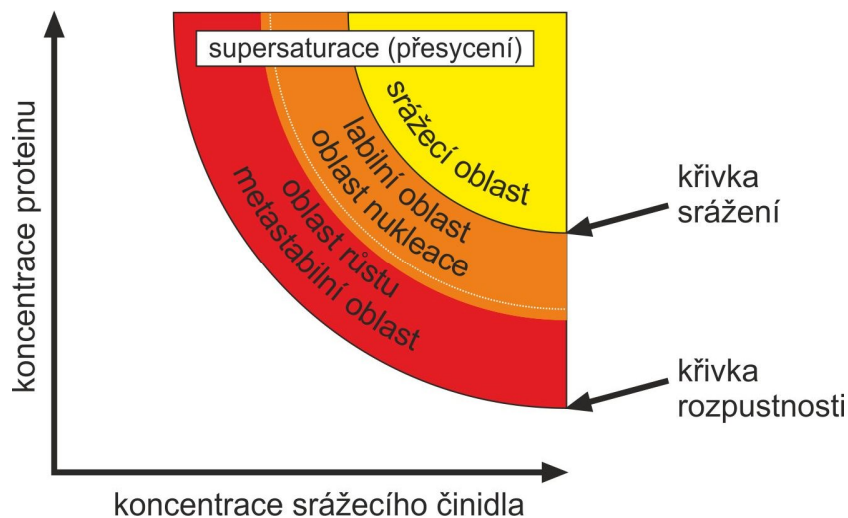
2.2. Krystalizační proces

Krystalizace biologických makromolekul je jedním z neefektivnějších nástrojů ve strukturní biologii a fyzikální biochemii. Poznání struktury makromolekulárních látek je důležitým předpokladem pro objasnění strukturně-funkčních vztahů a poskytuje podklady pro modifikace makromolekul pro potřeby farmaceutického, medicínského, zemědělského a mnoho dalších průmyslových odvětví (Kutá Smatanová, 2008). Proces krystalizace se řadí mezi nejstarší postupy používané v chemickém inženýrství (Mullin, 2001). Krystalizace makromolekul, která zahrnuje krystalizaci proteinů, nukleových kyselin, ale také velkých makromolekulárních komplexů, jako jsou viry a ribozomy, vychází především ze zkušeností krystalografů. Neexistuje žádná komplexní teorie říkající jak přesně při krystalizaci proteinů postupovat, ačkoliv právě na tom velice záleží. V důsledku toho je molekulární růst krystalů do značné míry empirický. Je založen na trpělivosti, vytrvalosti a intuici (McPherson, 2004).

2.2.1. Vznik krystalů

Vznikem krystalů se rozumí fázová změna kapaliny resp. plynu na pevnou látku (Kutá Smatanová, 2008). V některých případech dochází ke krystalizaci velmi rychle a výsledkem je velké množství krystalů. Cílem ale je spíše získání malého množství větších jednotlivých krystalů, které jsou lépe použitelné pro pozdější analýzy (Chayen, 1997). Výsledkem krystalizace ale nemusejí být vždy vhodné krystaly. Může docházet i k různým defektům, které se nacházejí zpravidla na povrchu

krystalu (Byrappa and Ohachi, 1965). Mezi nejčastější defekty krystalů patří mechanická pevnost, elektrická vodivost, fotovodivost, absorpce světla a luminiscence (Dhanaraj et al., 2010). Někdy je třeba pro získání proteinových krystalů nejvyšší kvality pokusy několikrát opakovat (Rhodes, 2006). Tvorba krystalizačních jader spojená s následným růstem krystalů je závislá na seskupování molekul do pevné krystalizační mřížky. Tím dochází ke snížení pohyblivosti molekul a růstu krystalů. V krystalickém stavu dominují nekovalentní chemické a fyzikální vazby. Tyto vazby drží krystaly pohromadě. Jsou to energeticky příznivé mezimolekulární interakce, které řídí růst krystalu. Pokud chceme zvýšit pravděpodobnost vzniku a následného růstu krystalů, je nezbytné zajistit co největší počet většiny stabilních interakcí mezi molekulami rozpuštěné látky v pevném stavu. (McPherson, 1990). Rychlost růstu a růstový mechanismus závisí na struktuře povrchu, který může být buď hladký, nebo drsný. V závislosti na drsnosti povrchu rozlišujeme tři růstové mechanismy. Adhezní typ drsných povrchů, 2D nukleační růst, spirálovitý růst pro hladké povrchy. Růst krystalů je ve fyzikální chemii vyjádřen fázovým diagramem. Tento typ grafu poukazuje na podmínky, za kterých můžou různé termodynamické fáze dosáhnout rovnováhy (Byrappa and Ohachi, 1965). Fázový diagram růstu krystalů ukazuje Obr. č. 1.



Obr. č. 1 Fázový diagram růstu krystalů

2.2.2. Supersaturace

Krystalizace makromolekul vyžaduje vytvoření stádia supersaturace (přesyceného stavu). To je nerovnovážný stav dosažený úpravou některých fyzikálních a chemických podmínek, v němž je určité množství molekul v nadbytečném limitu rozpustnosti. Rovnováha je obnovována tvorbou pevné fáze (krystalů), čímž je následně dosaženo limitu nasycení. K tvorbě přesycených roztoků musí být vlastnosti těchto roztoků upraveny tak, aby byla snížena schopnost média k rozpouštění makromolekul (McPherson, 2004).

2.2.3. Nukleace

Nukleace je první krok skutečného růstu krystalů, během něhož se vytvářejí jádra (Emmer, 2007). V průběhu nukleace dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul a po překročení limitu nasycení se začínají tvořit stabilní agregáty neboli krystalické zárodky (Kutá Smatanová, 2008). Nukleace je nejkomplicovanější krok, který představuje první stav fázového přechodu, kdy molekuly přecházejí ze zcela neuspořádaného stavu do stavu cílového. Pravděpodobně k tomu dochází prostřednictvím tvorby částečně uspořádaných meziproductů (parakrystalů). V tomto případě vznikají malé proteinové agregáty, nazývané také kritická jádra (McPherson, 2004). Během nukleace se proteinové molekuly sdružují do stabilních komplexů, jako jsou amorfní sraženiny (precipitáty) nebo mikrokristaly (Bollag et al., 1996). Při nukleaci dochází ke slučování molekul s vhodnou orientací a energií pomocí nekovalentních vazeb. Vylučováním částic z roztoku dochází ke snižování energie o 3-6 kcal mol⁻¹. Pokud dojde ke sloučení molekul, tak není ještě jasné, že vzniklý krystal bude mít dostatečnou kvalitu pro rentgenovou analýzu. Míra nukleace závisí na rozpustnosti dané látky. Z toho vyplývá, že pokud má protein v roztoku vysokou rozpustnost, máme i vyšší šanci, že budou přítomny mikrokristalická jádra (Berry, 1995). Nukleace a tvorba krystalizačních jader je jednou z nejdůležitějších fází růstu krystalů. K nukleaci může dojít samovolně díky podmínkám v počáteční fázi, nebo může být vyvolaná uměle. Proto je studium nukleačních forem nedílnou součástí procesu růstu krystalů (Dharanaj et al., 2010).

2.2.4. Růst krystalů

Růst krystalů je dynamický proces, při kterém dochází k interakci vhodně orientovaných molekul nebo iontů s povrchem zárodku a jejich uspořádání na tomto povrchu. Rychlost růstu může ovlivnit difúzní a depoziční stupeň. Pokud je depoziční stupeň nízký, je růst pomalý, nebo žádný. Naopak vysoký depoziční stupeň způsobuje rychlý růst, ale následné krystaly obsahují defekty. Ideální krystaly vznikají z malého množství stabilních krystalických jader, která rostou volnou rychlostí bez defektů. (Kutá Smatanová, 2008). Pomalý růst zajistí větší a lépe uspořádané krystaly. Toho dosáhneme snížením teploty a koncentrace proteinu (Emmer, 2007). Krystaly rostou postupným zaplňováním ploch tvořících krystal. Tyto plochy jsou většinou (ne vždy) rovinné. Všeobecně platí, že každá plocha v různém rozměru a směru určuje výsledný tvar krystalu (Garside et al., 2002). Růst makromolekulárních krystalů je lépe charakterizovaný proces než nukleace a jeho mechanismy jsou poměrně dobře známy. Proteinové krystaly rostou dvěma základními mechanismy, jako je dislokace a růst podle dvojrozměrné nukleace. Společným rysem růstu a nukleace je to, že oba procesy jsou závislé na přesycení matečného roztoku. Přesycení je proměnná, jež oba procesy řídí, určuje jejich vznik, rozsah a kinetiku (McPherson, 2004).

2.2.5. Ukončení (terminace) růstu

Vhodné vzorky krystalů pro rentgenovou analýzu se nejčastěji vypěstují pomalým růstem s následným zvětšováním svých rozměrů. V druhém případě vzniká velké množství drobných mikrokystalů nebo naopak velké multikrystalické agregáty, jako například dendrity (útvary podobné sněhovým vločkám) či sferulity (tenké jehličkovité útvary). V případě, že vzorek není schopen krystalizace, je výsledný produkt v podobě nekystalických gelů či amorfních pudrů. Pokud nedojde k žádné změně, tak roztok zůstane čirý (Kutá Smatanová, 2008). K ukončení růstu zpravidla dochází z důvodu, že dvojfázový roztok se přiblíží hranici rozpustnosti proteinu, které je dosaženo množstvím molekul vyloučených do krystalické struktury. Díky nové rovnováze se zastavuje kumulace částic (Berry, 1995).

2.3. Faktory ovlivňující krystalizaci

Krystalizaci makromolekul, tudíž i proteinů, ovlivňuje mnoho faktorů. Tyto faktory zapříčiňují, že ke krystalizaci nemusí vůbec dojít, nebo je ovlivněna její rychlost či kvalita výsledného produktu. Krystalizační podmínky jsou optimalizovány pomocí různých technik, které umožňují použít mnoho kombinačních parametrů získaných na základě předchozích zkušeností (Cox et al., 2007).

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících správné provedení krystalizačního experimentu. Vznik krystalů ovlivňují mnohé termodynamické i kinetické faktory. Rozpustnost látky patří mezi faktory termodynamické, nukleace a následný růst krystalů jsou faktory kinetické (Kutá Smatanová, 2008). Rhodes (2006) řadí mezi důležité faktory velikost a čistotu makromolekuly. Nečistý vzorek nebude krystalizovat nebo bude mít za následek vznik nekvalitních krystalů. Li (2008) uvádí, že další klíčový parametr pro úspěšnou krystalizaci je rozpustnost proteinů. Kutá Smatanová (2008) klade důraz na heterogenitu vzorku, která může zabránit úspěšné krystalizaci. McPherson (2009) zase přikládá velkou váhu správnému zvolení srážecího činidla. Ta by se dala rozdělit do několika hlavních tříd. Jsou jimi soli, organická rozpouštědla, polymery s dlouhým řetězcem, nízkomolekulární polymery a netěkavé organické sloučeniny.

2.4. Proteinová krystalografie

Základním pojmem v proteinové krystalografii je pojem makromolekuly. Tímto názvem označujeme všechny polymerní látky obsahující aminokyseliny, ribonukleotidy, deoxyribonukleotidy, cukry různých druhů, mastné kyseliny a další. Tyto molekuly jsou propojeny do sekvencí komplikovanými cykly chemických reakcí v buňce, za vzniku makromolekul, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny (RNA a DNA), polysacharidy a lipidy. Základním cílem biologické krystalogeneze je studium a příprava krystalů vhodných pro rentgenovou difrakční analýzu. K tomuto účelu se používá množství chemických a molekulárně-biologických nástrojů (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.1. Krystaly

Krystaly jsou fyzicky pevné homogenní látky. Mnohé z nich mají transparentně třpytivý vzhled a dobře definovanou geometrickou strukturu s pravidelnými stranami a hranami. Vykazují vysoký stupeň vnitřního trojrozměrného uspořádání (Chirgadze, 2001). Krystaly jsou chemicky dobře definované. Ideální krystal může být zobrazen jako nekonečné a dokonalé pole, v kterém jsou stavební bloky (asymetrické jednotky) uspořádány podle definované symetrie do elementárních buněk, které se opakují v trojrozměrných překladech. Skutečné „experimentální“ krystaly mají konečné dimenze, jejich periodicita není nikdy dokonalá vzhledem k odlišným druhům poruch a dislokací (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.2. Makromolekulární krystaly

Makromolekulární krystaly se od krystalů malých molekul liší tím, že jsou spíše menší s horšími mechanickými vlastnostmi a vysokým obsahem rozpouštědla, které tvoří 20-80% jejich objemu. Tyto krystaly jsou velice křehké a citlivé k vnějším podmínkám. Pro tento důvod musí být makromolekulární krystaly uchovány v prostředí, ve kterém vznikly. Dehydratace vede k praskání a destrukci krystalů (Kutá Smatanová, 2008).

2.4.3. Makromolekulární databáze

Krystaly biologických makromolekul a podmínky jejich vzniku jsou uvedeny v biologické makromolekulární krystalizační databázi (BMCD) (Gilliland, 1998). Tato databáze obsahuje krystalizační data a podmínky, které byly shromážděny z literatury. Všechny krystalografické informace o konkrétních makromolekulách včetně X-ray difrakčních dat a statistických informací jsou dostupné v on-line databázi Protein DataBank (RCSB PDB) (Bermann et al., 2000). RCSB PDB poskytuje různé nástroje a zdroje pro studování struktur biologických makromolekul.

2.5. X-ray krystalografie

Rentgenová (X-ray) krystalografie je unikátní technika používána pro studium struktury proteinů a makromolekulárních komplexů na základě jejich atomárního složení (Kutá Smatanová, 2008).

Rentgenová krystalografie využívá skutečnosti, že paprsky rentgenového záření jsou při průchodu proteinovým krystalem rozptýlené nebo difraktované předvídatelným způsobem. K difrakci dochází, když rentgenové paprsky narazí na elektrony. Proto velikost a povaha rozptylu závisí na počtu elektronů, které jsou přítomny v atomu, a dále na organizaci atomů v prostoru. Generované difrakční vzory se používají k vytvoření trojrozměrného obrazu mapy elektronové hustoty dané molekuly, na kterém je postaven konstrukční model proteinu (Twyman, 2004). X-ray krystalografie poskytuje strukturální detaily potřebné pro objasnění funkce proteinů jako i enzymových mechanismů nebo vazeb ligandů. Hlavní nevýhodou krystalografie je podmínka existence krystalů použitelných pro X-ray analýzu (Bollag et al., 1996).

Jedná se o důležitý nástroj pro mnoho vědců a zároveň neodmyslitelnou součást mnoha vědeckých a průmyslových odvětví. Konkrétně se jedná o matematiku, fyziku, chemii, biologii nebo medicínu (Woolfson, 1997).

2.6. Test před krystalizací

„Prekrystalizační“ test (PCT) se používá na determinování (určení) vhodné koncentrace proteinového roztoku pro krystalizační experimenty. Koncentrace proteinu je významná krystalizační proměnná. Příliš koncentrované roztoky mohou mít za následek vznik amorfni sraženiny, zatímco u příliš zředěných roztoků nedochází k žádným změnám a zůstávají pouze čiré kapky. Sraženina (precipitát) a čistá kapka jsou typické obrazové výsledky pro činidlo (precipitant), které není schopno podporovat krystalizaci. PCT test poskytne pohled buď na odpovídající koncentraci vzorku, nebo ukazuje, že by měla být provedena další diagnostická testování (Kutá Smatanová, 2008).

Možnosti diagnostického testování:

- Může být provedena denaturační gelová SDS-PAGE elektroforéza pro změření čistoty vzorku
- Může být provedena nativní gelová elektroforéza pro změření stejnorodosti vzorku
- K zjištění homogenity vzorku se dále může použít metoda založená na dynamickém rozptylu světla nebo analytická gelová chromatografie

2.7. Krystalizační metody

Krystalografie je hlavní způsob určování struktury biologických makromolekul. Krystalogeneze zahrnuje krystalizační metody, které se používají k pěstování proteinových krystalů (Ducruis and Giegé, 1999). Je mnoho metod používaných ke krystalizaci biomakromolekul, všechny z nich mají za cíl přinášet řešení makromolekul do stádia supersaturace (Bergfors, 1999).

V dnešní době jsou tyto techniky rozděleny do třech hlavních tříd:

- Konvenční (standardní, základní)
- Pokročilé
- Alternativní

2.8. Základní krystalizační metody

V současné době se nejvíce používají metody založené na odpařování („batch“), difúzi vodních par („vapor diffusion“), dialýze („dialysis“) a metoda krystalizace pod kapkou oleje („microbatch under oil“) (McPherson, 2009).

2.8.1. Dávková krystalizace („Batch Crystallization“)

„Batch“ krystalizace je nejstarší a nejjednodušší metoda pro krystalizaci proteinů. Princip metody je takový, že srážecí činidlo je smícháno s proteinovým roztokem a okamžitě poté dochází ke stavu vysokého přesycení (supersaturace). Pokud budeme mít štěstí, tak krystaly porostou postupně z přesyceného roztoku bez dalšího přičinění (Drenth and Mesters, 2010).

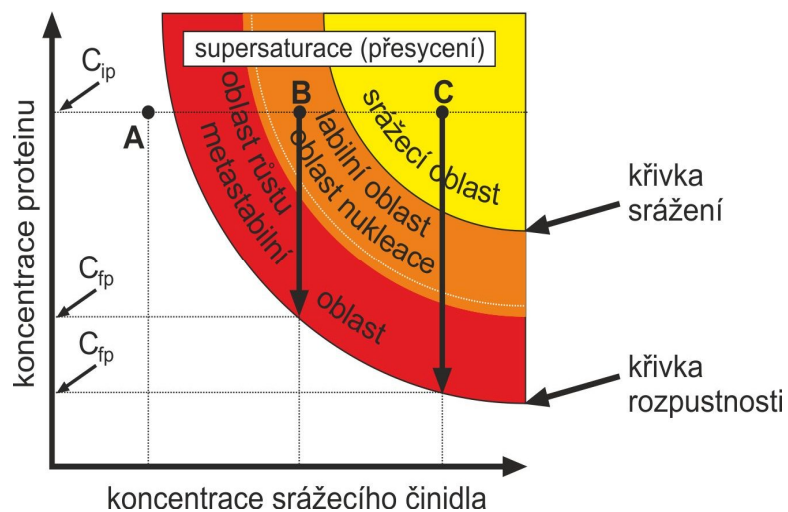
Pro růst krystalů je důležité, aby byl počáteční roztok v labilní zóně a byla zajištěna správná teplota pro nukleaci (Myerson, 2002). V případě, že jsou pro nukleaci a růst krystalů odlišné podmínky, je užitečné provést jednotlivou optimalizaci těchto procesů. To může být provedeno pomocí očkování („seeding“). Při této technice jsou krystaly převedeny z nukleační zóny do oblasti, která podporuje pouze růst. Existují dvě varianty očkování: 1. Makroočkování („Macroseeding“), kde dochází k převedení jednoho krystalu do kapky, 2. Mikroočkování („Microseeding“), kdy roztok obsahuje větší množství malých krystalů (Messerschmidt, 2007).

Mezi vědci je „batch“ krystalizace jednou z nejoblíbenějších metod. Tento experiment se může snadno provést v kapiláře, malé nádobce (Petriho miska) nebo v krystalizační destičce. Pro úspěch této metody je důležité, aby byl kontrolován průběh krystalizace a krystalizační podmínky, které podporují následný růst krystalů (Kutá Smatanová, 2008). Fázový diagram růstu krystalů metodou „batch“ ukazuje Obr. č. 2.

Myerson (2002) mezi výhody „batch“ krystalizace řadí:

- Rychlost
- Jednoduchost
- Ovládání teploty během experimentu

Kutá Smatanová (2008) jako hlavní nevýhodu uvádí, že v experimentu testujeme pouze úzký prostor srážedla.



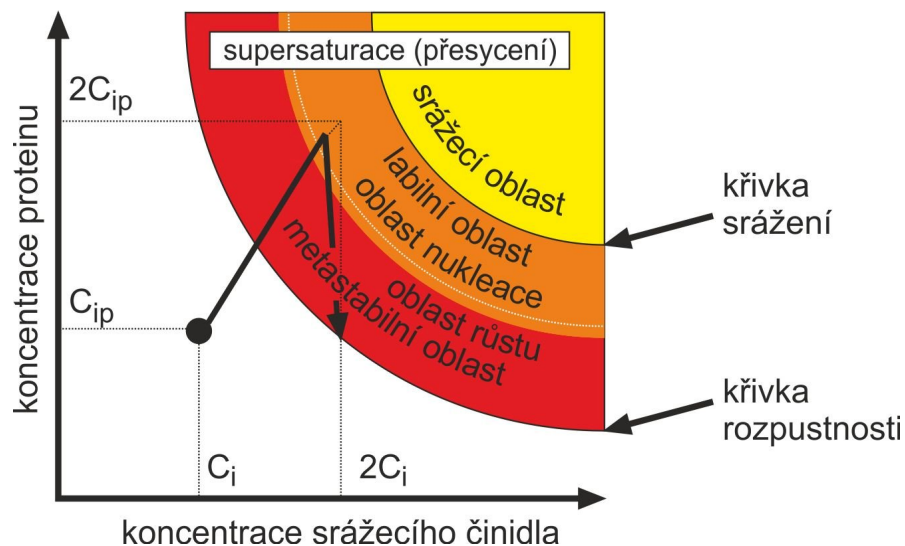
Obr. č. 2 Fázový diagram růstu krystalů při použití metody „batch“

2.8.2. Metody založené na difúzi par rozpouštědla

Metody založené na difúzi par rozpouštědla jsou často používané díky své jednoduchosti provedení. Na začátku krystalizačního experimentu je kapička s roztokem proteinu a srážecího činidla umístěna do vzduchotěsné komůrky rezervoáru. Rozdíl mezi tlakem vodních par v kapce a rezervoáru je během celého experimentu hnací silou vyrovnávacího procesu. Složky roztoku musí být zvoleny tak, aby měly nižší tlak vody, než je tlak v kapce. Obvyklý způsob, jak toho docílit, je jednoduché umístění neředěného krystalizačního činidla do rezervoáru. Voda se poté odpaří z kapky a sráží se na povrchu rezervoáru až do doby než se tlak vodních par vyrovná. V závislosti na chemických podmínkách roztoku může toto vyrovnání trvat hodiny (soli) nebo týdny (PEG). Netěkavé chemikálie jako například PEG, proteiny nebo soli zůstávají v kapičce (Bergfors, 1999).

McPherson (2009) uvádí, že difúzí bylo vykrystalizováno více makromolekul než všemi ostatními metodami dohromady. Fázový diagram růstu krystalů difúzí par rozpouštědla je ukazuje Obr. č. 3.

Metody založené na difúzi pár se provádějí v sedící, visící nebo sendvičové kapce (Messerschmidt, 2007).

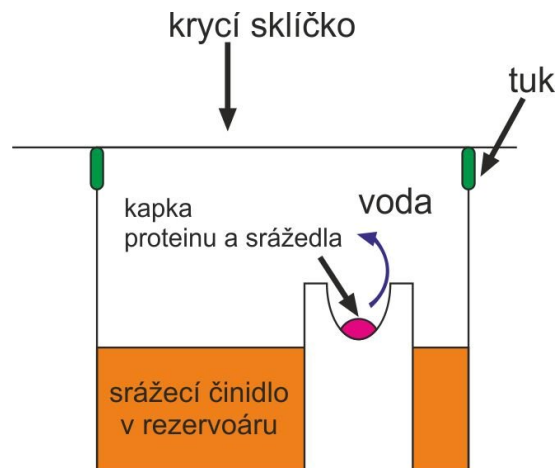


Obr. č. 3 Fázový diagram krystalizace založené na difúzi par

2.8.2.1. Metoda sedící kapky („Sitting Drop Vapor Diffusion“)

Metoda sedící kapky je oblíbená metoda pro krystalizaci makromolekul. Princip difúze vodních par je jednoduchý. Kapička obsahující směs vzorku a srážecího činidla je umístěna ve stojánku v rezervoáru naplněném srážecím činidlem. Obvykle má kapička proteinu a srážecího činidla nižší koncentraci, než je koncentrace činidla v rezervoáru. Po dosažení rovnováhy opouští vodní pára kapičku, vzorek prochází stádiem zvyšování relativní supersaturace (přesycení). Jak ve vzorku, tak v činidle se zvyšuje koncentrace a voda opouští kapičku do rezervoáru. Rovnováhy je dosaženo, když koncentrace činidla v kapičce je přibližně stejná jako v rezervoáru.

Pro tuto metodu je možno použít různé druhy krystalizačních destiček. Mezi nepoužívanější se řadí Cryschem Plate, Linbro Plates s Micro-Bridges, Glass sitting Drop Rods. Destičky mívají zpravidla řádky označeny pomocí písmen a sloupce pomocí číslic. To usnadňuje orientaci v destičce (Hampton Research, 2001). Schéma krystalizační jamky v destičce je zobrazeno na Obr. č. 4.



Obr. č. 4 Schéma krystalizační jamky v destičce pro sedící kapky

Hampton Research (2001) uvádí tyto výhody metody sedící kapky:

- Je nákladově výhodná
- Není časově náročná
- Často je jednodušší při použití detergentů a hydrofobních činidel
- Kapičky jsou umístěny ve stabilní sedící poloze
- Je kompatibilní s gely

Bergfors (2009) zase mezi další výhody řadí schopnost využití široké škály objemů roztoku. Od 100 μl do 1000 μl . Dále jsou sedící kapky mechanicky stabilnější než kapky visící a jsou více odolné ke změnám teploty.

Drenth and Mesters (2010) uvádí, že pokud má proteinový roztok nízké povrchové napětí, tak má tendenci se rozprostírat po krycím sklíčku. S tím souvisí obtížné odstranění krystalu z krycího sklíčka.

2.8.2.2. Metoda visící kapky

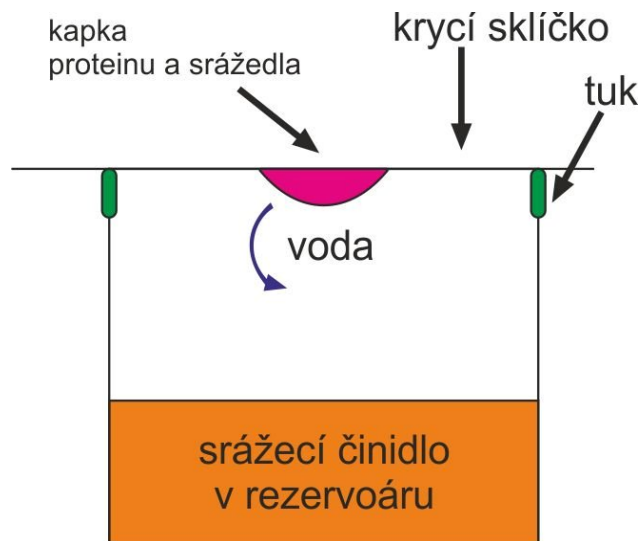
(„Hanging Drop Vapor Diffusion“)

Metoda visící kapky je jednou z nejpoužívanějších metod pro krystalizaci proteinů. Princip metody spočívá v pipetování malé kapky proteinového roztoku a srážecího činidla na skleněné krycí sklíčko. To je následně překlopeno nad krystalizační jamku s roztokem srážecího činidla a pomocí silikonu utěsněno. Roztok v rezervoáru obsahuje srážecí činidlo, které má nižší koncentraci, než je jeho koncentrace v kapce (Carter, 1989).

Ačkoliv je metoda visící kapky náročnější na přípravu, tak zpravidla poskytuje krystaly o vhodné kvalitě pro rentgenovou difrakční analýzu. Zahrnuje optimalizaci mnoha chemických a fyzikálních parametrů. Tato metoda kombinuje difúzi par s použitím srážecího činidla k přivedení proteinového roztoku do stádia nasycení v kontrolovaných podmínkách (Bollag et al., 1996).

Princip difúze vodních par je jednoduchý. Kapka obsahující vzorek proteinu a srážecí činidlo je umístěna proti rezervoáru s činidlem. Jak voda opouští kapku, vzorek prochází stádiem vzrůstající relativní supersaturace, a tím se ve vzorku i činidlo zvyšuje koncentrace. Vyrovnání je dosaženo, když koncentrace činidla v kapce je přibližně stejná jako v rezervoáru (Hampton Research, 2001). Krystalizační destičky by měly být umístěny v polystyrenové krabici (Styrofoam box). To minimalizuje lokální kolísání teploty, která může vést ke kondenzaci na povrchu krycích sklíček. Metoda visící kapky je k tomu více náchylná než metoda sedící kapky a „microbatch“ (Doublie, 2007).

Hampton Research (2001) doporučuje pro krystalizaci visící kapkou speciální VDX krystalizační destičku. Schéma krystalizační jamky v destičce je zobrazeno na Obr. č. 5.



Obr. č. 5 Schéma krystalizační jamky v destičce pro visící kapky

Podle Kuté Smatanové (2008) jsou výhody metody visící kapky následující:

- Efektivita
- Snadný přístup ke krystalům
- Lze provést několik kapek (experimentů) s jedním rezervoárem

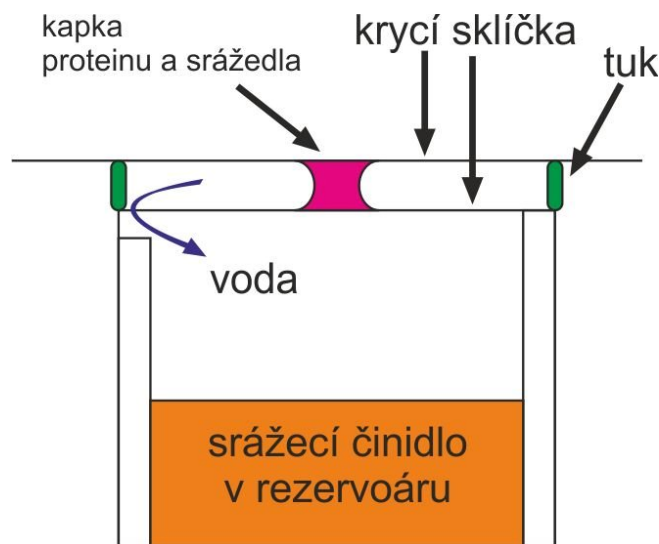
Luft and DeTitta (1992) uvádí, že mezi další výhody se může zařadit použití velmi malého množství vzorku, které je potřeba na experiment. K správnému provedení jednoho experimentu by stačilo i méně než 2 μl .

Mezi nevýhody řadí Luft and DeTitta (1992) tyto skutečnosti:

- časová náročnost
- příprava silikonovaných destiček
- důkladné čištění krycích sklíček
- nutná optimalizace fyzikálních a chemických parametrů

2.8.2.3. Metoda sendvičové kapky („Sandwich Drop Vapor Diffusion“)

Metoda sendvičové kapky využívá smíchání roztoku proteinu a srážecího činidla a jejich následné umístění do středu menšího 18 mm krycího sklíčka. Kapka je pak překryta větším 22 mm krycím sklíčkem, které tvoří kryt rezervoáru. Dochází tedy k utěsnění kapky mezi krycími sklíčky. K provedení této techniky jsou vytvořené speciální Q krystalizační destičky (Kutá Smatanová, 2008). Schéma krystalizační jamky v destičce je zobrazeno na Obr. č. 6.



Obr. č. 6 Schéma krystalizační jamky v destičce pro sendvičové kapky

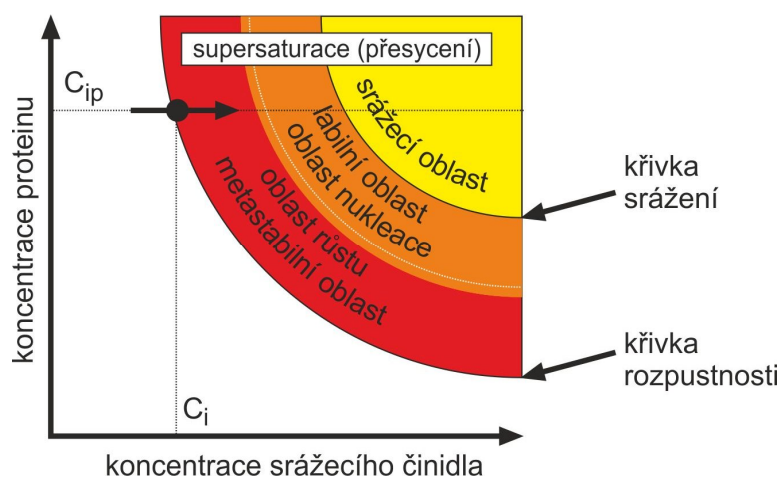
Kutá Smatanová (2008) uvádí, že mezi hlavní výhody této metody patří výborné optické vlastnosti pro mikroskopovou prohlídku. Naopak nevýhody spočívají ve zdlouhavé přípravě a nutnosti pracovat s většími objemy kapek.

2.8.3. Dialýza („Dialysis“)

Krystalizace dialýzou je jednoduchá variace klasické metody založené na difúzi vodních par. V dialyzační metodě je oddělen vzorek od srážecího činidla pomocí polopropustné membrány, která umožňuje průchod malým molekulám, jako jsou ionty, pufrý, soli, ale zabraňuje průchodu velkých makromolekul. Polopropustná membrána odděluje vnitřní roztok s proteinem od vnějšího, který obsahuje srážecí

činidlo. Kinetika vyrovnání závisí na molekulové hmotnosti, srážecím činidle, poměru objemů, koncentraci jednotlivých komponentů uvnitř i vně mikro dialyzační komůrky a typu použité membrány (Kutá Smatanová, 2008).

Při krystalizaci dialýzou zůstává koncentrace makromolekuly konstantní, jako je tomu u metody „batch“. Složení roztoku je změněno difúzí nízkomolekulárních látek skrze polopropustnou membránu. Proudění molekul skrze membránu vytváří koncentrační gradient. Dialýza je používána pro krystalizaci látek s nízkou iontovou silou a za přítomnosti těkavých činidel, jako jsou např. alkoholy (Messerschmidt, 2007). Fázový diagram růstu krystalů dialýzou ukazuje Obr. č. 7.



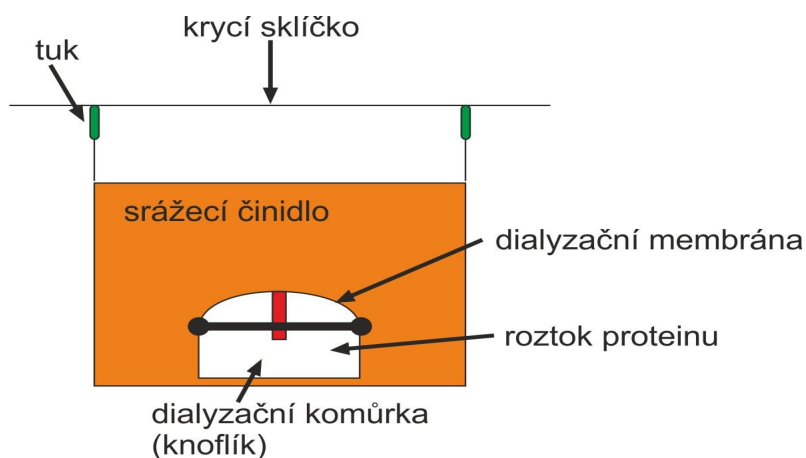
Obr. č. 7 Fázový diagram růstu krystalů dialýzou

Stejně jako u jiných metod existuje pro provedení dialýzy velké množství variací. Pro střední obsah proteinového roztoku (více než 0,1 ml) může být použit dialyzační knoflík. Dialyzační membrána je připevněna ke knoflíku pomocí pryžového kroužku. Před použitím by měla být membrána opláchnuta vodou a vyvařena 10 minut ve vodě (Drenth and Mesters, 2010). Schéma dialyzační metody je zobrazeno na Obr. č.8.

Kinetika rovnováhy závisí na:

- propustnosti dialyzační membrány
- použitým srážecím činidlem
- poměru objemů
- koncentraci složek uvnitř a vně mikro dialyzační buňky
- geometrii buňky.

Albert Messerschmidt (2007) uvádí jako hlavní výhodu dialýzy jednoduchou výměnu srážecího činidla.



Obr. č. 8 Schéma dialyzační metody

2.8.3.1. Varianty dialýzy

Makrodialýza – Vzorek je vložen do dialyzační tuby o dané molekulové hmotnosti, kde dochází k dialýze v rezervoáru s příslušným roztokem. Tato metoda vyžaduje obvykle alespoň 100 µl vzorku a může být provedena až s litry vzorku ve velkých dialyzačních tubách (Kutá Smatanová, 2008).

Zeppenauer method – Pro menší množství proteinových roztoků se mohou použít silnostěnné kapiláry nebo knoflíky z plexiskla překryté dialyzační membránou. (Zeppenauer et al., 1971). Nevýhodou je, že proteinový krystal v knoflíku nemůže být pozorován světelným mikroskopem (Drenth and Mesters, 2010).

Dialýza „Microcap“ – Vzorek je umístěn do skleněné kapiláry, která je na jednom konci utěsněna voskem, na druhém dialyzační membránou. Trubička je umístěna do malé odstředivkové zkumavky (nebo eppendorfky) naplněné vhodným rezervoárem (Ducruix and Giege, 1992).

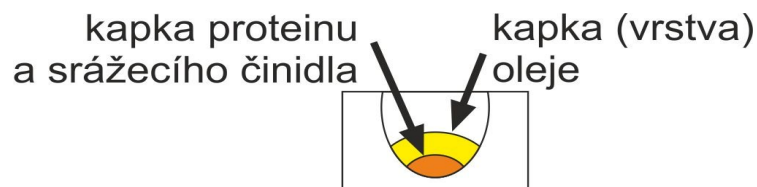
Dvojitá dialýza – Tato metoda snižuje rychlost ustálení a může poskytnout zlepšení kontroly nad krystalizací vzorku. Dialyzační knoflík je připraven a umístěn uvnitř rezervoáru a zapečetěn dialyzační membránou, která je pak umístěna uvnitř jiného rezervoáru (Thomas et al., 1989).

2.8.4. Mikrokrystalizace pod olejem

(„Microbatch Under Oil“)

Krystalizační metoda „microbatch under oil“ je metoda, kdy je malá kapka vzorku smíchaná se srážecím činidlem. Tato směs je napipetována pod tenkou vrstvou parafinového oleje. Obecně se používá minerální olej s rozvětvenými parafiny a více než 20 uhlíky. Tento rozsah umožňuje malou, nebo žádnou difúzi vody přes olejovou vrstvu (Hampton Research, 2001).

Kapka, která obsahuje proteinový roztok a srážecí činidlo, se dává buď ručně, nebo automaticky do krystalizační jamky pod vrstvu oleje. Kapka se odpojí od špičky pipety a klesá ke dnu jamky, protože je těžší než olej. Špička pipety je poté zničena a nahrazena novou, čímž se zabraňuje jakémukoliv přenosu látek z jednoho pokusu do druhého. Olej zde působí jako bariéra mezi rezervoárem a krystalizující kapkou. Vodní pára difunduje pomalu přes vrstvu oleje. Typ oleje a tloušťka olejové vrstvy určuje rychlost difúze vodní páry, a tudíž i rychlost celé krystalizace. Tato metoda snižuje počet krystalů, ale zvětšuje jejich velikost (Chayen, 1997). Schéma krystalizační jamky v destičce je zobrazeno na Obr. č. 9.



Obr. č. 9 Schéma krystalizační jamky v destičce

Silikonové oleje jsou polymerní kapaliny, které se skládají z opakujících se dimethylsiloxanových jednotek. Také je možné použít směs silikonového a parafinového oleje 1:1, známou též jako Al's oil, (D'Arcy, 1996). Silikonový olej umožňuje difúzi rozpouštědla (vody) z kapičky přes olej. V průběhu „microbatch“ experimentu dochází k zakoncentrování vzorku a činidla v kapičce. Tato metoda může být jednoduše aplikovaná buď s použitím ruční vícekanálové pipety, nebo s jednoduchým robotem. Metoda „microbatch“ také umožňuje velmi jednoduchou manipulaci s teplotou, mezi 4 a 37 °C, které jsou problematické v difúzi (Kutá Smatanová, 2008).

Hampton Research (2001) řadí mezi výhody:

- použití velmi malého vzorku a objemu činidla
- minimalizace povrchu interakce se vzorkem
- schopnost přesně kontrolovat koncentrace vzorku a činidla během experimentu
- minimalizace kondenzace během teplotního kolísání

Chayen (1997) uvádí, že mezi další výhody této metody patří jednoduchost a rychlost oproti jiným metodám. Zvláště pak, pokud je tato metoda řízena automaticky, což umožňuje více než 100 pokusů za dobu 25 minut.

2.9. Lysozym

Lysozym je enzym z rodiny hydrolas patřící do podrodiny glykosidas. Je velmi rozšířený v živočišné říši. Specificky štěpí některé glykosidové vazby v proteoglykanech buněčných stěn bakterií a chrání tak organismus před bakteriální infekcí. Používá se k rozrušení stěn bakterií při přípravě různých součástí cytoplazmy. Někdy se může použít při léčbě zubního kazu (Kodíček, 2004).

Podle Kodíčka (2004) se lysozym vyskytuje v:

- krevní plazmě
- mateřském mléce
- vaječném bílku
- slinách, slzách a nosním hlenu

Je to enzym, který hydrolyzuje polysacharidy v bakteriálních buněčných stěnách. Lysozym se skládá z jednoho řetězce obsahujícího 129 aminokyselin. Molekulovou hmotnost má 14,296 Da (dalton = 1.66×10^{-27} kg). Lysozym má třídimenzionální strukturu obsahující plochý model aminokyselin, tvořících jeho oporu. Je oblíbený modelový protein v proteinové krystalografii pro svoje dobře definované krystalizační podmínky a termofyzikální vlastnosti (Leunissen, 2001).

Lysozym napadá buněčné stěny bakterií. Ty následně také ničí, díky unikátní schopnosti rozrušení karbohydrátových řetězců s následným rozpadem buněčné stěny.

Alexander Fleming objevil lysozym při hledání antibiotik. Bohužel, lysozym byl příliš velká molekula, která neumožňovala volný průchod mezi buňkami. Stal se ale základem dnes již široce využívaného antibiotika s názvem penicilin (Leysen et al., 2011).

2.10. Halogenalkandehalogenasy

Halogenalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolyzu halogenovaných uhlovodíků. Při této reakci se jako reakční produkty uvolňují odpovídající alkohol, halogenidový aniont a proton (Janssen, 2004). Jsou popsány dvě základní třídy halogenalkandehalogenas, jež jsou izolovány z bakterií *Xanthobacter* a *Rhodococcus*. Tyto enzymy mají shodnou 30% aminokyselinovou sekvenci, ale výrazně odlišné požadavky na substrát (Newman et al., 1999). Dehalogenasy je možné rozdělit do třech podrodin: HLD-I, HLD-II, HLD-III (Chovancová et al., 2007). Tyto podrodiny se liší hlavně v sekvenci genů, struktuře a často mívají i odlišný mechanismus reakce (Janssen et al., 1994). Existuje několik příbuzných tříd halogenalkandehalogenas, které pokrývají širokou škálu substrátů. Často obsahují chlorované, bromované a jodované primární a sekundární haloalkany. Pomocí rentgenové difrakční analýzy byly vyřešeny struktury několika bakteriálních enzymů, které byly následně pomocí genové mutace různě klonovány (Janssen, 2004).

2.10.1. Struktura

Halogenalkandehalogenasy strukturálně patří do superrodiny α/β -hydroláz (Nardini and Dijkstra, 1999). Proteiny obsažené v této rodině nemají zjevnou sekvenci podobnost, ačkoliv mají společného předka (Damborský et al., 2010). Jejich trojrozměrná struktura se skládá ze dvou oblastí. Základ tvoří hlavní doména, kde jsou jednotlivé komponenty přesně umístěny. Tato struktura je většinou složena z centrálního β -skládaného listu tvořeného 8 β -řetězci, které lemují α -šroubovici. Na hlavní doménu nasedá víčková doména („cap doména“). Ta už je variabilní, pokud jde o počet a uspořádání sekundárních prvků. Víčková doména je více náchylná k mutacím. Skládá ze 4-5 α -šroubovic spojených smyčkami. Je vložena za 6. β -řetězec hlavní domény (Chovancová et al., 2007).

Víčková doména je „posazena“ na hlavní doméně a určuje její substrátovou specifitu (Kmunicek, 2001). Mezi těmito dvěma doménami je umístěno aktivní místo (Verschueren et al., 1993).

2.10.1.1. Aktivní místo

Aktivní místo je s okolním prostředím propojeno přístupovými tunely. Tyto tunely umožňují vstup a výstup ligandů (Otyepka and Damborský, 2002). Katalytické zbytky tvoří základ katalytických kyselin, které utvářejí katalytickou triádu. Ta je následně doplněna ještě o jeden pár aminokyselin a tvoří pentádu (Damborský et al., 2010). Ta je vždy rozdílná u halogenalkandehalogenas odlišného původu (Chovancová et al., 2007). Pentáda je klíčové místo pro hydrolyzu. Je složena z nukleofilu, basické kyseliny, katalytické aminokyseliny a 2 halogenstabilizujících aminokyselin (Damborský a Koča, 1999).

2.10.2. Funkce a využití

O halogenalkandehalogenasy je v poslední době velký zájem, jelikož katalyzují mnoho reakcí na úrovni životního významu. Katalytické vlastnosti těchto enzymů byly podrobeny mnohým zkouškám a pokusům. S úspěchem se halogenalkandehalogenasy využívají jako biokatalyzátory (Drienovska et al., 2012). Jednou z nejdůležitějších vlastností je, že odbourávají halogeny, které mají negativní vliv na životní prostředí. Odbourání halogenu se nazývá dehalogenace. Proces dehalogenace hraje ústřední roli např. v odbourávání mnoha chlorovaných sloučenin. Halogenalkandehalogenasy ale představují velké zdravotní riziko, pokud jsou přítomny v pitné vodě. Pokud jsou přítomny v půdě, tak jsou uvedeny regulačními agenturami jako znečišťující látky (Holloway et al., 1998).

2.10.3. DpcA

DpcA je nově izolovaná psychrofilní halogenalkandehalogenasa z gram-negativní bakterie *Psychrobacter cryohalolentis* K5. Vykazuje zajímavé katalytické vlastnosti, kterých bylo využito v krystalizačních experimentech. Tento psychrofilní enzym vykazuje jedinečné teplotní profily a to má za následek vysokou aktivitu při malých i vysokých teplotách. Enzym je enantioselektivní k bromovaným esterům (Tratsiak et al., 2013). Substrátové vlastnosti DpcA byly testovány u 30 různých halogenovaných substrátů. Bylo zjištěno, že DpcA má lepší aktivitu za přítomnosti delších substrátů obsahujících alespoň 3 uhlíky v řetězci. Jako nejlepší substrát pro DpcA se ukázal 1 - brombutan, jenž se následně použil pro stanovení ideálních teplot a pH. Teplotní aktivita u DpcA byla naměřena v rozsahu 5 °C až 35 °C. Přičemž nejvyšší aktivita byla při 25 °C. Dalším důležitým faktem je, že enzym si zachoval až 27 % své původní aktivity i při teplotě pod 5 °C. Vliv pH na aktivitu byl naměřen v rozsahu 5,2 – 10,1. Přičemž maximální aktivita enzymu byla při pH 8,7. DpcA ztrácí veškerou aktivitu pod pH 6,4 a nad 9,6 (Drienovska et al., 2012).

3. Metodika

Ve své bakalářské práci jsem se zaměřil na hledání krystalizačních podmínek a vlastní krystalizaci modelového proteinu a nově připravené halogenalkandehalogenasy. Jako modelový protein byl vybrán lysozym, u kterého jsou krystalizační podmínky již dobře známy. Proteinem, u kterého ještě nejsou krystalizační podmínky příliš specifikovány, byla nově vyizolovaná halogenalkandehalogenasa DpcA z *Psychrobacter cryohalolentis* K5.

Celá práce zahrnuje několik důležitých kroků, které na sebe navazují v přímém sledu. Nejprve se jednalo o gelovou SDS - PAGE elektroforézu. Následovala příprava krystalizačních roztoků a posléze vlastní krystalizační proces. V této fázi jsem použil základní krystalizační metody založené na difúzi par („sitting drop“ a „hanging drop“), krystalizaci pod vrstvou oleje („microbatch under oil“) a pokročilou metodu krystalizace v kapilárách („counter diffusion“). Poté byl důraz kladen na celkové zhodnocení výsledků včetně zhotovení fotodokumentace. Následovalo testování krystalů na jejich proteinový původ. V poslední řadě byly pomocí softwarových programů připraveny modely lysozymu a enzymu DpcA a také navržen reakční mechanismus.

3.1. Gelová SDS – PAGE elektroforéza

V první řadě bylo nutno provést gelovou SDS – PAGE elektroforézu v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti dodecylsíranu sodného. To je pravděpodobně nejčastější analytická metoda používaná ke zjištění, zda je vzorek proteinu čistý. Princip metody je založen na různé pohyblivosti proteinů v elektrickém poli. Díky elektrickému proudu se záporně nabitě proteiny stahují k anodě. Schopnost proteinů pronikat gelem se liší v závislosti na jejich velikosti. Menší proteiny snadněji pronikají póry v gelu. Pohyblivost v gelu závisí například na délce polypeptidového řetězce či molekulární hmotnosti. Po několika hodinách jsou proteiny na základě molekulové hmotnosti rozděleny. Tato technika se využívá také k separaci proteinů. SDS se váže na proteinový řetězec v poměru 1,4 g SDS na 1 g proteinu. Na základě srovnání pohyblivosti neznámého proteinu a standardů je pak možné určit jeho relativní molekulovou hmotnost. Vzdálenost mezi SDS a proteinem je úměrná molekulové hmotnosti. Této metody je často využíváno v biochemii,

genetice, imunologii a molekulární biochemii. Je nezbytné, aby byla sestava pro SDS – PAGE sestavená správně a nedocházelo k úniku gelu. Sestava se skládá se dvou skel, mezi kterými je gumička, a vše je uchyceno pomocí klipů.

3.1.1. Příprava spodního („lower“) gelu

Následovala příprava spodního gelu, který byl 12 % o celkovém objemu 10 ml. Tento gel obsahoval:

- 3,3 ml H₂O
- 4 ml akrylamidu (směs akrylamidu a bisakrylamidu, poměr těchto komponentů určuje velikost pórů)
- 2,5 ml 1,5 M Tris o pH 8,8 (pufr, který stabilizuje pH)
- 0,1 ml 10% SDS (přidává negativní náboj)
- 0,1 ml 10% APS (samovolně se rozkládá za vzniku volných radikálů a zajišťuje začátek polymerace)
- 0,008 ml TEMEDu (radikálový stabilizátor, který urychluje polymeraci)

Spodní gel se následně pomocí stříčky nalil do dvou třetin sestavy na elektroforézu. Poté se přidal ethanol, který vyrovnal hladinu gelu a zahájil polymeraci. To znamená, že se z malých molekul (monomerů) stávají vysokomolekulární látky (polymery). Reakce byla exotermická, tudíž se uvolňovala energie ve formě tepla. Takto připravený gel se nechal mezi sklíčky 30 minut odstát, aby došlo k jeho ztuhnutí. Poté se ethanol vylil a přidal horní gel („higher gel“).

3.1.2. Příprava horního („higher“) gelu

Bylo zapotřebí připravit 4 ml horního gelu. Jeho příprava spočívala ve smíchání následujících komponentů:

- 2,7 ml H₂O
- 0,67 ml 30 % akrylamidu
- 0,5 ml 1 M TRIS o pH 6,7
- 0,04 ml 10 % APS
- 0,004 ml TEMEDu.

Do takto připraveného gelu byl vložen plastový hřebínek, který vytvořil v horním gelu komůrky, kam se následně pipetovaly roztoky proteinu a markeru.

3.1.3. Vlastní elektroforéza

Takto připravený gel (již ztuhlý mezi sklíčky) byl umístěn do elektroforetické komory, která se později naplnila připraveným pufrem. Konkrétně se jednalo o „runnig pufr“, který se skládal z 25 mM Tris, 192 mM glycine a 0,1% SDS.

Poté se přidaly vzorky proteinů a ke každému specifický vzorový pufr („sample buffer“). Ten se přidává ke vzorku proteinu z důvodu jeho přípravy pro elektroforézu. Složení bylo následující: 40 % glycerol, 240 mM Tris/HCl o pH 6,8, 8 % SDS, 0,04 % bromfenolová modř („bromophenol blue“) a 5% beta-mercaptoethanol. SDS pokrývá molekuly proteinů, a tím jim dává negativní náboj. Bromfenolová modř umožňuje sledovat postup elektroforézy. Mercaptoethanol ruší disulfidické můstky a glycerol zahušťuje vzorek, a tím pomáhá proteinu procházet přes póry v gelu. Poté byl z gelu opatrně vyjmut plastový hřebínek. Jednotlivé vzorky byly pipetovány do komůrek. Kvůli pozdější lepší orientaci se vzorky dávkovaly do každé druhé komůrky.

Do první a poslední komůrky byl pipetován marker. Konkrétně se jednalo o high range molecular weight marker od firmy Bio-Rad Laboratories. Marker má úlohu standardu a podle něho může být vyhodnocen následný výsledek elektroforézy. Do třetí a čtvrté komůrky byly pipetovány roztoky modelového proteinu lysozymu (2 μ l lysozymu + 8 μ l vzorového pufru a 5 μ l lysozymu + 5 μ l vzorového pufru). Do šesté a sedmé komůrky se pipetovaly roztoky proteinu DpcA (2 μ l DpcA + 8 μ l vzorového pufru a 5 μ l DpcA + 5 μ l vzorového pufru). Do deváté a desáté komůrky se pipetoval protein DmxA, který měl sloužit pouze jako srovnání s DpcA. V dalších fázích již nebyl zahrnut do experimentu. Poměry proteinu a srážecího činidla byly totožné (2 μ l DmxA + 8 μ l vzorového pufru a 5 μ l DmxA + 5 μ l vzorového pufru). Pipetování jednotlivých komponentů je znázorněno v Tab. č. 1.

Tab. č. 1 Pipetování proteinů a vzorového pufru při gelové SDS – PAGE elektroforéze

1.	3.	4.	6.	7.	9.	10.	12.
marker	2 μ l lysozym + 8 μ l vzorový pufr	5 μ l lysozym + 5 μ l vzorový pufr	2 μ l DpcA + 8 μ l vzorový pufr	5 μ l DpcA + 5 μ l vzorový pufr	2 μ l DmxA + 8 μ l vzorový pufr	5 μ l DmxA + 5 μ l vzorový pufr	marker

Po přidání posledního vzorku se přidala methylová modř, pro následné zbarvení výsledků elektroforézy (zbarvení gelu). Methylová modř je roztok 0.1% Coomassie R-250, 40% ethanol a 10% acetic acid, který dodal roztoku zbarvení. Tohoto roztoku se přidalo takové množství, aby zakrylo celý gel a ten zůstal po dobu míchání ponořen. Poté se komora SDS-PAGE dolila až po horní okraj připraveným pufrům, zakryla krytem a připojila ke stejnosměrnému elektrickému proudu. Vlastní elektroforéza trvala 1,5 hodiny při proudu 21 mA. Elektrický proud byl o napětí 300 V a výkonu 300 W.

Po uplynutí této doby byl sejmут kryt boxu a vyndány skleněné destičky s gelem. Poté se odstranila gumička a rozebrala sklíčka. Samotný gel byl se vši opatrností pomocí skalpelu vyjmut ze skel. Gel se následně umístil do boxu s připraveným roztokem metanolu, kyseliny octové a vody. Celý box i s gelem se poté přemístil na mixér firmy Eppendorf. Po pár hodinách již bylo možno pozorovat výsledek elektroforézy. V první řadě nás zajímalo, zda je náš protein čistý a bude schopen pozdější krystalizace.

3.2. Příprava krystalizačních roztoků

Pro krystalizaci proteinů bylo nutné připravit příslušná srážecí činidla. Pro modelový protein lysozym byl použit roztok octanu sodného (sodium acetate) a 12% NaCl (chlorid sodný). Pro enzym DpcA se již muselo srážecí činidlo připravit z několika komponentů.

3.2.1. Krystalizační roztok pro lysozym

Krystalizační roztok obsahoval směs chloridu sodného a octanu sodného (sodium acetate) o pH 4,8. Jelikož byl chlorid sodný 12%, přepočtem bylo zjištěno, že pro přípravu 100 ml roztoku bude potřeba navážít 12 g. Octan sodný byl 0,1 M roztok. Na základě přepočtu bylo potřeba navážít 0,82 g octanu sodného.

3.2.2. Krystalizační roztok pro DpcA

Srážecí činidlo pro DpcA obsahovalo 0,2M octan amonný (amonium acetate), dále pufr 0,1M citrát sodný (sodium citrate) o pH 5,8 a 30% PEG 4000. Pomocí výpočtů na základě krystalizačních podmínek se určilo přesné množství jednotlivých komponentů pro přípravu 100 ml tohoto roztoku. Bylo zapotřebí navážít 1,541 g octanu amonného, 2,94 g citrátu sodného a 30 g PEGu. Jelikož roztok citrátu sodného měl pH 8,87, bylo nutné ho snížit za pomoci HCl (kyseliny chlorovodíkové) na požadované pH 5,8.

3.3. Vlastní krystalizace

Tato fáze celého experimentu byla nejobsáhlejší a časově nejnáročnější. Námi připravené, výše uvedené krystalizační roztoky, byly nedílnou součástí krystalizace. Během celého experimentu bylo využito několika krystalizačních metod. Jednalo se jak o metody základní, tak i ty pokročilé. Pokud máme tu možnost, tak je ideální protein krystalizovat ihned po jeho purifikaci. V tomto stádiu je protein nejčistější. Dalším skladováním proteinu dochází k jeho degradaci oxidací.

Použité metody:

- Visící kapka („hanging drop“)
- Sedící kapka („sitting drop“)
- Mikrokrystalizace pod olejem („microbatch under oil“)
- Krystalizace v kapilárách („counter diffusion“)

3.3.1. Metoda visící kapky

(„Hanging Drop Vapor Diffusion“)

Krystalizace ve visící kapce patří mezi nejvíce používané metody. V případě krystalizační destičky kapka proteinu „visí“ na mikroskopickém krycím sklíčku nad krystalizačním roztokem v rezervoáru. Sklíčko je utěsněno pomocí silikonového tuku. Princip metody je stejný i v Petriho misce, liší se pouze provedení.

3.3.1.1. Provedení metody v Petriho misce

První způsob krystalizace pomocí metody visící kapky byl proveden v Petriho misce. To není zcela typický způsob provedení této metody a slouží především pro pochopení principu krystalizace. Postup byl následující: Na dno misky bylo nanášeno srážecí činidlo, které dosahovalo výšky 3 mm. Na víčko Petriho misky byly nanášeny 3 kapky srážecího činidla. Do těchto kapek se poté pomocí mikropipety dávkovaly kapky proteinů. Došlo tedy k jejich smíšení.

V každé kapce byl ale rozdílný poměr proteinu a srážecího činidla. V první kapce byl poměr proteinu a srážecího činidla 3:3 (3 μ l proteinu a 3 μ l srážecího činidla). Druhá kapka byla připravena v poměru 2:3 (obsahovala 2 μ l proteinu a 3 μ l srážecího činidla). Poměr v poslední kapce byl 3:2 (obsahovala 3 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla). Těsnění v tomto případě zajišťuje lepicí páska, která je oblepena po obvodu Petriho misky. Tento krok bylo důležité provést pečlivě, protože následné pronikání vzduchu dovnitř misky by kontaminovalo vzorky. Tyto kroky byly provedeny pro oba proteiny.

3.3.1.2. Provedení v krystalizační destičce

Metoda visící kapky byla také provedena v krystalizační destičce, která představuje další způsob provedení. Konkrétně se jednalo o destičku Linbro (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA). To je destička o 24 jamkách, zhotovená z průhledného a neohebného plastu, která je primárně určena pro metodu visící kapky („hanging drop“). Pro vlastní krystalizaci nám v tomto případě stačilo 12 jamek. Kolem každé jamky se nacházel silikonový tuk, který slouží k přilepení

krycího sklíčka. Je možno použít jak kruhové, tak i čtvercové krycí sklíčko. Ale jeho rozměr by měl být 22 mm.

Poté se do každé jamky přidalo srážecí činidlo. Jeho objemy se ale v jednotlivých jamkách lišily. Přidané objemy byly následující: 50 μl , 100 μl , 300 μl , 500 μl , 800 μl , 1000 μl . Poté se jednotlivé jamky překrývaly krycími sklíčky obsahující kapky proteinu a srážecího činidla. Krycí sklíčko se musí obracet velice pomalu, aby kapka zůstala centrovaná. Poté se mírným zatlačením na krycí sklíčko docílilo správného utěsnění. Takto připravená krystalizační destička, zakrytá krytem, se uložila na nerušené místo. Ideálně mimo dosah přímého slunce a větších teplotních změn.

Pro oba testované proteiny byly zvoleny tyto poměry proteinu a srážecího činidla - 2:4, 4:4, 4:2 (2 μl proteinu a 4 μl srážecího činidla, 4 μl proteinu a 4 μl srážecího činidla, 4 μl proteinu a 2 μl srážecího činidla). Byly použity dvě rozdílné koncentrace lysozymu (100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) a odlišné koncentrace byly rovněž u DpcA (10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Pipetování vzorků a činidel je znázorněno v Tab. č. 2.

Tab. č. 2 Pipetování proteinů a srážecích činidel

	Lysozym 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$			Lysozym 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Lysozym	2 μl lysozym + 4 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8	4 μl lysozym + 4 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8	4 μl lysozym + 2 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8	2 μl lysozym + 4 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8	4 μl lysozym + 4 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8	4 μl lysozym + 2 μl 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
	DpcA 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$			DpcA 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
DpcA	2 μl DpcA + 4 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 μl DpcA + 4 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 μl DpcA + 2 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	2 μl DpcA + 4 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 μl DpcA + 4 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 μl DpcA + 2 μl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000

3.3.2. Metoda sedící kapky

(„Sitting Drop Vapor Diffusion“)

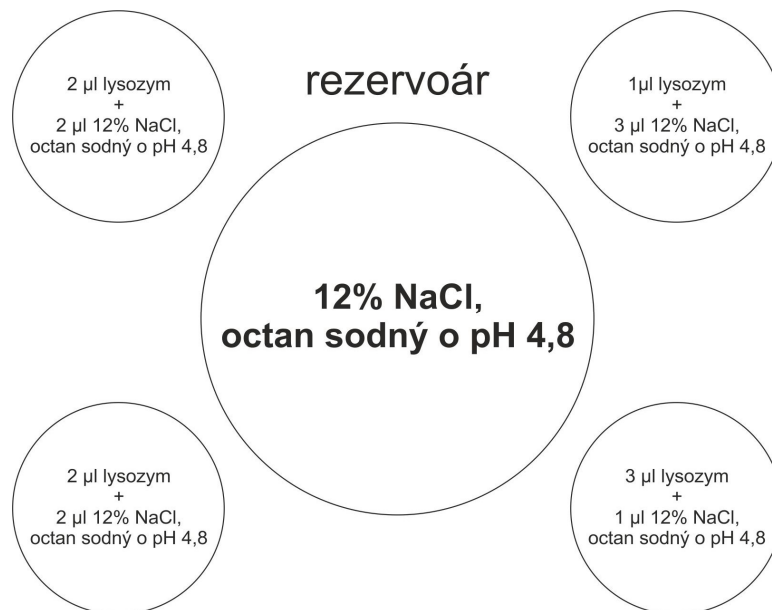
Krystalizace sedící kapkou byla provedena nejprve v Petriho misce a poté v krystalizační destičce pro sedící kapky. Princip metody spočívá v tom, že kapka „sedí“ ve stojánku krystalizační destičky. V případě Petriho misky je princip stejný, s rozdílem že kapka „nesedí“ ve stojánku, ale na dně Petriho misky.

3.3.2.1. Provedení v Petriho misce

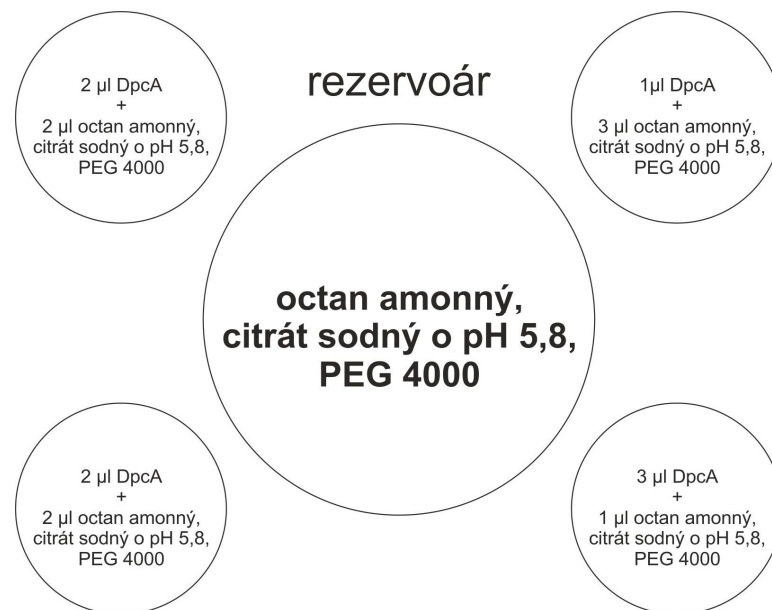
Metoda sedící kapky byla poprvé také provedena v Petriho misce. S tím rozdílem, že na její dno nebylo přidáno srážecí činidlo. Na dno Petriho misky se postupně nanášelo 6 kapek tvořených z proteinu a srážecího činidla. Všechny kapky měly stejný poměr 3:3 (3 μl proteinu a 3 μl srážecího činidla). Měnila se jen koncentrace jednotlivých proteinů. Jednalo se o koncentrace 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 100 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u lysozymu a koncentrace 5 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ u DpcA. U několika kapek proteinů byla také testována různá srážecí činidla. Petriho miska se poté opět zavřela víčkem a po obvodu přelepila lepicí páskou.

3.3.2.2. Provedení v krystalizační destičce

Metoda sedící kapky byla provedena v krystalizační destičce CombiClover crystallization plate (EBS plate, Emerald BioStructures, WA, USA). Je to již daleko obvyklejší a častěji využívaný způsob krystalizace touto metodou. Tato destička má 24 otvorů a u každého z nich je stojánek (rezervoár) na 4 kapky. Do každého otvoru bylo přidáno 800 μl krystalizačního činidla. Do jednotlivých jamek pro kapičky byl pipetován roztok proteinu a srážecího činidla. Pro tento experiment stačilo pouze 12 jamek z celé destičky. Poměry proteinu a srážecího činidla byly 2:2, 1:3, 3:1. Pipetování lysozymu a srážecích činidel je znázorněno na Obr. č. 10. Použitý enzym DpcA byl rozdílné koncentrace 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a 13 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Pipetování DpcA a srážecích činidel zobrazuje Obr. č. 11. Takto připravená krystalizační destička se zakryla víkem a přelepila lepicí páskou, aby se zabránilo přístupu vzduchu.



Obr. č. 10 Schéma krystalizačního experimentu pro lysozym



Obr. č. 11 Schéma krystalizačního experimentu pro DpcA

3.3.3. Mikrokrystalizace pod olejem

(„Microbatch Under Oil“)

Pro získání proteinových krystalů bylo využito i mikrodávkové metody pod olejem („microbatch under oil“). Pro krystalizaci tohoto typu se používá tzv. Teresakiho destička, která má 72 jamek. Před samotným pipetováním se musela destička zalít 4 ml směsí parafinového a silikonového oleje. Až poté se mohlo pomocí mikropipety aplikovat do jamek jednotlivé kapky proteinu a srážecího činidla. Nezbytné bylo dodržet správné pořadí pipetování vzorků. Nejprve kapky srážecího činidla a do nich protein. V této metodě se testovalo 5 různých poměrů proteinů a srážecích činidel. Jeden poměr se aplikoval do celé řady v destičce. V první a druhé řadě byl použit shodný poměr 2:2 (2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla). Dále se jednalo o poměry 1:2 (1 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla), 2:1 (2 μ l proteinu a 1 μ l srážecího činidla), 1:3 (1 μ l proteinu a 3 μ l srážecího činidla), 3:1 (3 μ l proteinu a 1 μ l srážecího činidla). Tento pokus byl proveden pro oba proteiny (Tab. č. 3. a Tab. č. 4).

Tab. č. 3 Pipetování lysozymu a srážecího činidla

1.	2 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
2.	2 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
3.	1 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
4.	2 μ l lysozym + 1 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
5.	1 μ l lysozym + 3 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
6.	3 μ l lysozym + 1 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8

Tab. č. 4 Pipetování DpcA a srážecího činidla

1.	2 μ l DpcA + 2 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000
2.	2 μ l DpcA + 2 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000
3.	1 μ l DpcA + 2 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000
4.	2 μ l DpcA + 1 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000
5.	1 μ l DpcA + 3 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000
6.	3 μ l DpcA + 1 μ l octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000

3.3.4. Krystalizace v kapilárách („Counter Diffusion“)

Volná krystalizace v kapilárách byla poslední námi vyzkoušená metoda. Byly použity skleněné kapiláry o průměru 0,5 mm. Každá kapilára má jeden konec užší a na druhém konci se postupně rozšiřuje. Úzký konec byl vložen do roztoku proteinu a díky kapilární síle stoupal vzhůru kapilárou. Bylo zapotřebí dostat roztok až do místa, kde se kapilára rozšiřuje. Následně se úzký konec kapiláry utěsnil pomocí speciální hmoty. V dalším kroku bylo přidáno srážecí činidlo pomocí mikropipety do rozšířené části kapiláry. Všechny kapiláry se následně přemístily do krystalizačního boxu GCB® [Triana Sci&Tech, Spain]. Až poté se začalo s jejich utěšňováním. Pomocí kapičky roztaveného vosku se utěsnil širší konec, aby do kapiláry nepronikal vzduch. Tento proces byl proveden pro oba proteiny po třech kapilárách.

3.4. Testování krystalů

Testování krystalů se provádělo pro ujištění, zda se opravdu jedná o krystaly proteinů. Jelikož krystaly solí byly v našem případě nežádoucí. Většina pufrů používaných ke krystalizaci mají tak nízkou koncentraci, že by nemělo docházet k jejich krystalizaci. Pokud ale jsou používány v koncentracích vyšších, můžou vykristalizovat místo proteinu.

3.4.1. Test zabarvením krystalu („Dye binding test“)

Vlastní provedení tohoto testu spočívalo v několika jednoduchých krocích. Do kapičky, ve které vyrostl krystal, se mikropipetou přidalo barvivo „Izit“ (Hampton Research). Barvivo působilo po dobu 30 minut a následně byly pozorovány změny pod mikroskopem. Krystaly barvící se modrou barvou měly proteinový původ. Pokud by se jejich barva po přidání barviva „Izit“ nezměnila, jednalo by se o krystaly solí.

3.4.2. Test rozdrčení krystalu („Crush test“)

Na krycí skličko se umístil krystal a pod mikroskopem došlo k jeho rozbití skleněnou kapilárkou. Pokud se krystal po dotyku hrotu kapilárky okamžitě rozpadal, tak se jednalo o krystal proteinový. Ten má tendenci se rozbíjet na velké množství malých kousků. Naopak krystaly solí se rozbíjejí velice těžko. Pokud ale k jejich rozbití přeci jen dojde, tak se štěpí na menší množství kousků.

3.4.3 Test vysoušením krystalu („Dry test“)

Tento test je založen na principu jednoduchého vysoušení krystalu. Proteinové krystaly se na vzduchu rozpadají. Naopak krystaly solí zůstávají na vzduchu neporušené.

3.5. Grafické znázornění DpcA

V poslední fázi celého praktického pokusu byl enzym DpcA graficky zobrazen za pomoci několika programů. Pro programy WinCoot (Emsley et al., 2010) a VMD (Humphrey et al., 1996) byl použit soubor *.pdb, který obsahoval strukturu proteinu DpcA. V těchto programech byla k dispozici celá řada nejrůznějších nástrojů. Šlo především o vytvoření pohledu na protein jako celek, ale také o názorné zobrazení aktivního místa včetně katalytické pentády. Důležité bylo pochopení struktury a následného dehalogenačního procesu. Soubor *.pdb byl stažen z PDB databáze <http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>, unikátního celosvětového úložiště informací a 3D struktur biologických molekul zahrnující i proteiny a nukleové kyseliny. Najdeme zde molekuly, které se nacházejí ve všech organismech od bakterií přes rostliny až po člověka. Pochopení tvaru a struktury je velice důležité, protože jedině tak zjistíme, jak určitá molekula funguje. Tyto znalosti mohou být následně využity například pro tvorbu léků. Archiv PDB je dostupný zdarma pro všechny uživatele a každý týden aktualizován. Poslední program, který již nebyl závislý na *.pdb souboru byl ChemSketch (ACD/ChemSketch Freeware 2012). Tento program není schopen zobrazovat trojrozměrné struktury. Z tohoto důvodu nám nemůže poskytnout celkový pohled na protein. Velice dobře nám ale může poskytnout pohled na katalytickou pentádu v názornějším 2D vyobrazení.

3.5.1. WinCoot

Je program pro vytváření makromolekulárních modelů, zejména proteinů za pomoci X-ray dat. Zobrazuje mapy a modely, s kterými je možno různými způsoby manipulovat. Mezi nejpoužívanější nástroje patří *idealization*, *real space refinement*, *manual rotation/translation*, *rigid-body fitting*, *ligand search*, *solvation*, *mutations*, *rotamers*, *Ramachandran plots*, *skeletonization* a další. Coot pracuje s proteiny, které jsou vkládány ve formátech *.pdb, mmCIF, MTZ files, .phs. (Emsley et al., 2010).

3.5.2 VMD

VMD je program vytvořený pro modelování, vizualizaci a analýzu biologických systémů, jako jsou proteiny, nukleové kyseliny, lipidy a mnoho dalších. VMD zobrazuje strukturu na základě vloženého *.pdb (Protein Data Bank) souboru. Poskytuje širokou škálu vykreslování a barvení molekul. Mezi nejpoužívanější by se daly zařadit jednoduché body a linky. Dále to mohou být módy „CPK, cylinders, licorice bonds, tube, ribbons, cartoon drawings“ a další. VMD může být použit k animování a následné analýze trajektorie molekulové dynamiky (Humphrey et al., 1996).

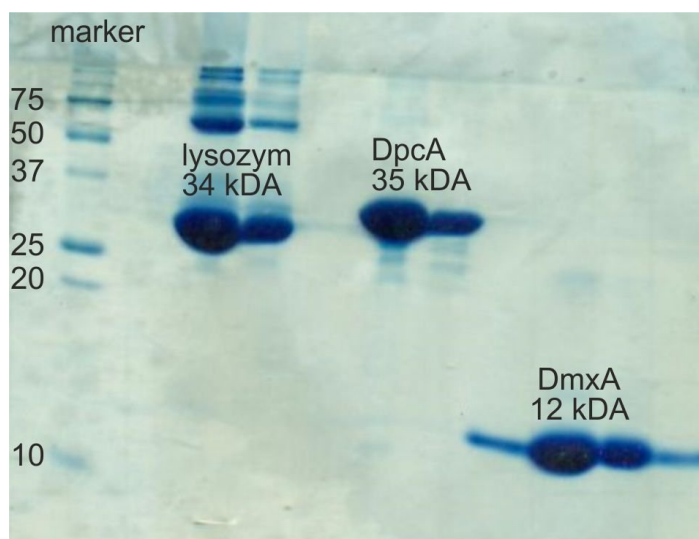
3.5.3. ChemSketch

ChemSketch umožňuje kreslení chemických struktur včetně jejich vizualizace. Výhodná je rovněž poměrně rychlá a jednoduchá tvorba chemických vzorců, zejména pak organických látek. Dále jsme schopni pomocí toho programu zjistit některé údaje o látkách jako např. molární hmotnost, geometrie molekul, procentuální obsah jednotlivých prvků, hustota, povrchové napětí a další. Po spuštění programu můžeme pracovat ve dvou základních módech. Buď „structure“ (struktura), nebo „draw“ (kreslení) (ACD/ChemSketch Freeware 2012).

4. Výsledky

4.1. Vyhodnocení výsledků gelové SDS – PAGE elektroforézy

Pomocí gelové elektroforézy byla zjištěna molekulární hmotnost a čistota jak modelového proteinu lysozymu, tak i enzymů DpcA a DmxA. Pro další experiment byla vybrána halogenalkandehalogenasa DpcA. Molekulární hmotnosti se určily dle stupnice markeru. Marker využívá hodnot proteinů s již známou molekulární hmotností. U lysozymu byla stanovena molekulární hmotnost přibližně 34 kDa. U halogenalkandehalogenasy DpcA byla molekulární hmotnost okolo 35 kDa, zatímco DmxA měla nízkou molekulární hmotnost 12 kDa (Obr. č. 12). Všechny enzymy vykazovaly vysokou čistotu, která je nezbytná pro úspěšnou krystalizaci.



Obr. č. 12 Gelová SDS – PAGE elektroforéza (foto autor)

4.2. Výsledky krystalizačních metod

V této kapitole uvádím všechny úspěšné (i neúspěšné) provedené krystalizační experimenty, kterých bylo docíleno pomocí různých metod a podmínek.

4.2.1. Výsledky metody visící kapky

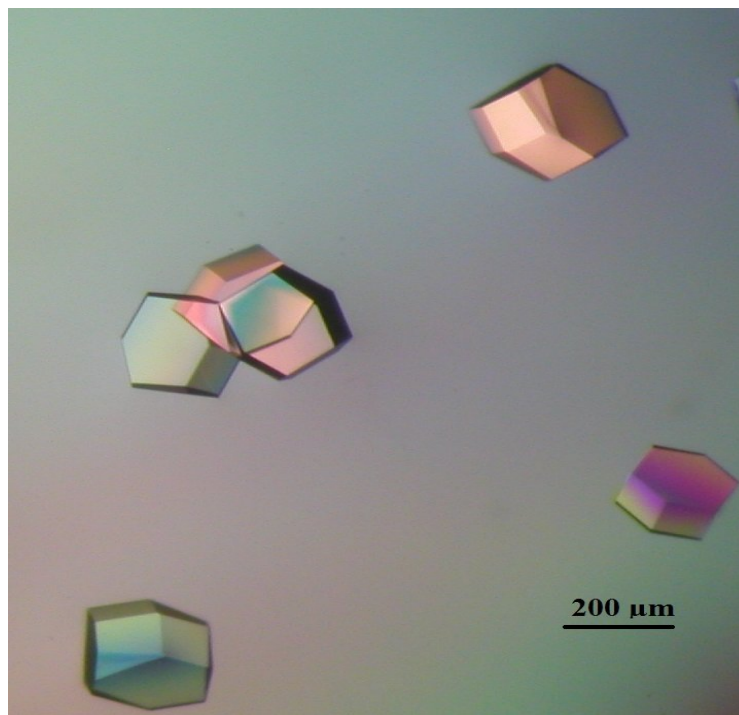
Krystalizace provedená metodou visící kapky byla u modelového proteinu téměř ve všech podmínkách úspěšná. Kvalita a velikost krystalů se lišila v závislosti na zvolených poměrech proteinu a srážecího činidla. U DpcA se podařilo dosáhnout krystalické podoby jen v jednom poměru proteinu a srážecího činidla.

4.2.1.1. Lysozym

Modelový protein lysozym krystalizoval z krystalizačního činidla složeného z 12 % NaCl a octanu sodného o pH 4,8. Krystaly vznikaly ve všech poměrech lysozymu a srážecího činidla. Avšak jejich velikost a kvalita se lišila. Výsledkové schéma krystalizační destičky s proteinem a srážecím činidlem je znázorněno v Tab. č. 5. Nejlepších výsledků bylo dosaženo u koncentrace lysozymu 50 mg.l⁻¹. A konkrétně při poměru proteinu a srážecího činidla 4:4 (Obr. č. 13). Pravděpodobně na to měl vliv i objem krystalizačního činidla v rezervoáru, jelikož v tomto rezervoáru bylo použito největší množství a to 1000 µl. Ke krystalizaci tohoto proteinu docházelo velice brzy a již za několik hodin bylo vidět pod polarizačním mikroskopem formování krystalizačních jader. Experiment trval jeden týden a poté byla pořízena náležitá fotodokumentace.

Tab. č. 5 Výsledky použití metody visící kapky pro lysozym

Lysozym	Lysozym 100 mg.l ⁻¹			Lysozym 50 mg.l ⁻¹		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	2 µl	4 µl	4 µl	2 µl	4 µl	4 µl
	lysozym +	lysozym +	lysozym +	lysozym +	lysozym +	lysozym +
	4 µl 12%	4 µl 12%	2 µl 12%	4 µl 12%	4 µl 12%	2 µl 12%
	NaCl,	NaCl,	NaCl,	NaCl,	NaCl,	NaCl,
	octan	octan	octan	octan	octan	octan
	sodný o pH	sodný o pH	sodný o pH	sodný o pH	sodný o pH	sodný o
	4,8	4,8	4,8	4,8	4,8	pH 4,8



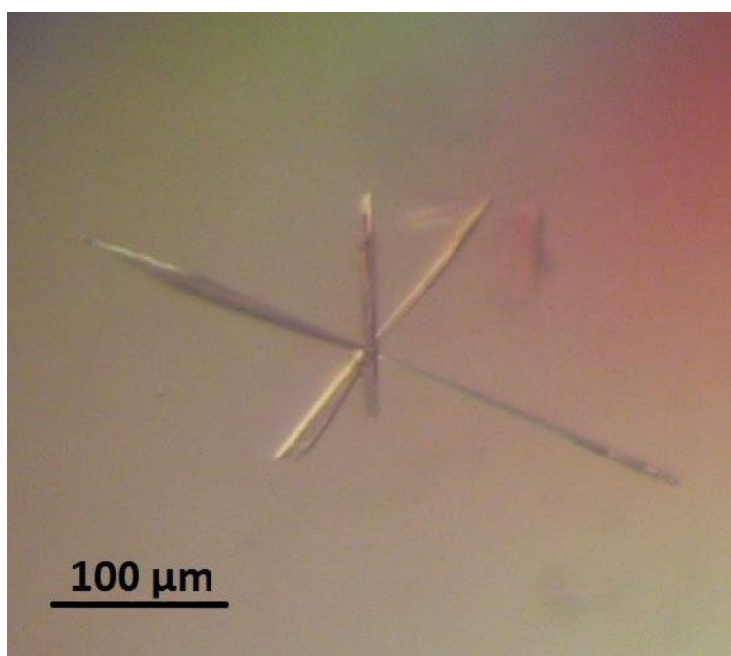
Obr. č. 13 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor)

4.2.1.2. DpcA

U halogenalkandehalogenasy DpcA byla situace odlišná. Jako krystalizační činidlo byla použita připravená směs obsahující octan amonný, citrát sodný o pH 5,8 a PEG 4000. Byly testovány dvě různé koncentrace. Enzym DpcA o původní koncentraci 5 mg.l^{-1} a koncentrovanější roztok o koncentraci 10 mg.l^{-1} . Z důvodu upřesnění krystalizačních podmínek bylo testováno více poměrů proteinu a srážecího činidla. (Tab. č. 6). Ve visící kapce bylo využito také různých objemů srážecích činidel v rezervoáru. Od $50 \mu\text{l}$ až do $1000 \mu\text{l}$. Krystalické formy DpcA se podařilo dosáhnout jen při poměru $4 \mu\text{l}$ DpcA a $2 \mu\text{l}$ srážecího činidla (Obr. č. 14). V této jamce bylo $500 \mu\text{l}$ krystalizačního činidla. Doba experimentu trvala rovněž jeden týden. Poté se pomocí polarizačního mikroskopu s fotoaparátem pořídily fotografie.

Tab. č. 6 Výsledky metody visící kapky pro DpcA

DpcA	DpcA 5 mg.l ⁻¹			DpcA 10 mg.l ⁻¹		
	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	2 µl DpcA + 4 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 µl DpcA + 4 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 µl DpcA + 2 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	2 µl DpcA + 4 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 µl DpcA + 4 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000	4 µl DpcA + 2 µl octan amonný, citrát sodný o pH 5,8, PEG 4000



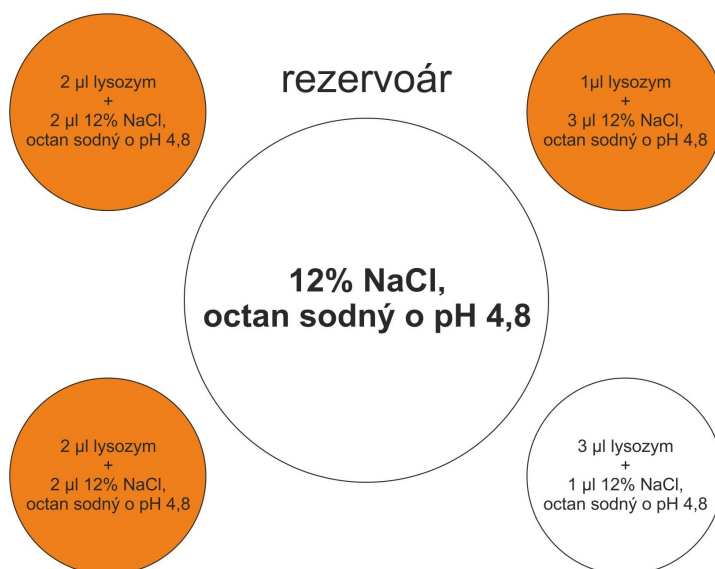
Obr. č. 14 Monokrystal DpcA (foto autor)

4.2.2. Výsledky metody sedící kapky

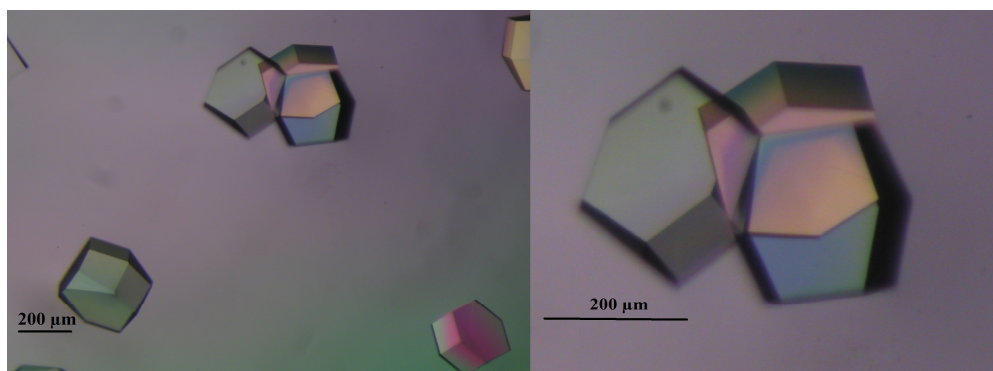
Metodou sedící kapky se rovněž podařilo vykrytalizovat studované proteiny. U lysozymu byla situace opět o poznání jednodušší, jelikož krytalizoval snáze. U DpcA se ukázal jako úspěšný pouze jeden poměr proteinu a srážecího činidla.

4.2.2.1. Lysozym

Modelový protein lysozym krystalizoval z krystalizačního činidla 12% NaCl a octanu sodného o pH 4,8. Na jednom rezervoáru byly testovány tři různé poměry proteinu a srážecího činidla. Krystaly vyrostly v poměrech 2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla, 1 μ l proteinu a 3 μ l srážecího činidla. Poměr 3 μ l proteinu a 1 μ l srážecího činidla neposkytl růst krystalů. Výsledky krystalizace jsou zobrazeny na Obr. č. 15. Nejlepší krystaly vyrostly v poměru 2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla (Obr. č. 16).



Obr. č.15 Výsledky metody sedící kapky pro lysozym

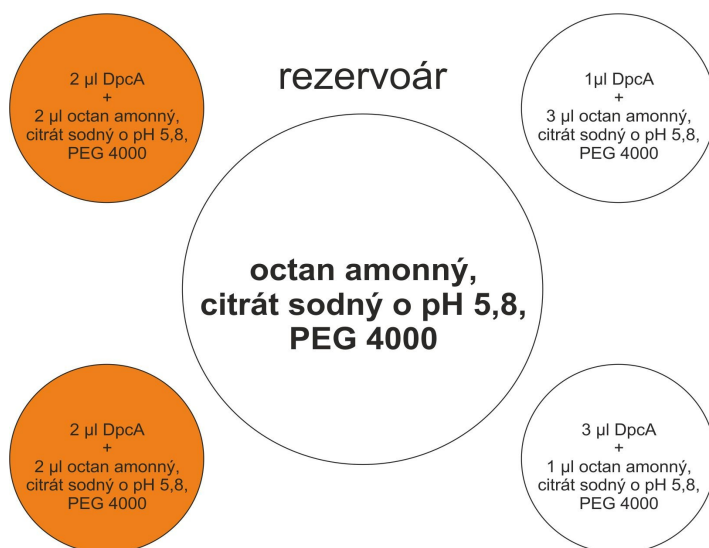


Obr. č. 16 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor)

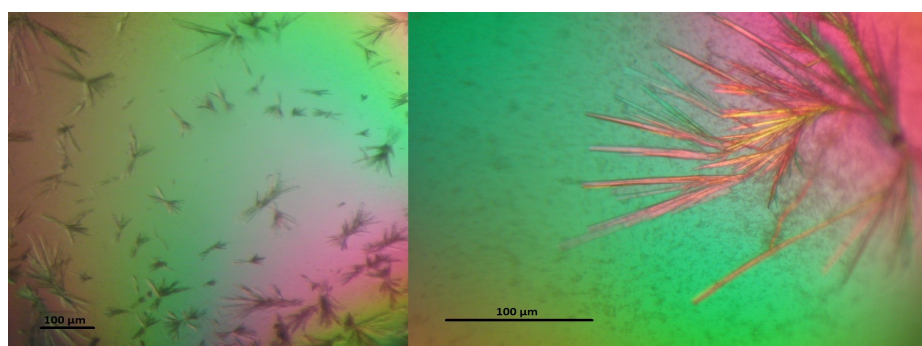
4.2.2.2. DpcA

Protein DpcA v sedící kapce sice krystalizoval, ale podmínky úspěšné krystalizace ve srovnání se vzorkem lysozymu již byly daleko specifitější. Doba krystalizačního experimentu byla jeden týden. Jako srážecí činidlo byla použita směs octanu amonného, citrátu sodného o pH 5,8 a PEGu 4000. Metoda byla provedena v krystalizační destičce CombiClover. Experiment zahrnoval tři poměry proteinu a srážecího činidla. Jako úspěšný se ale ukázal jen jeden. A tím byl poměr 2 μl DpcA a 2 μl srážecího činidla. Výsledky krystalizace jsou zobrazeny na Obr. č. 17. Krystalická podoba DpcA v tomto poměru je znázorněna na Obr. č. 18.

V ostatních poměrech se objevila buď čistá kapka, nebo amorfni sraženina. Koncentrace proteinu 10 mg.l^{-1} nebo 13 mg.l^{-1} neměly vliv na krystalizační experiment. Do pokusu byly zahrnuty obě koncentrace se shodným výsledkem.



Obr. č. 17 Výsledky metody sedící kapky pro DpcA



Obr. č. 18 Jehličkovité krystaly DpcA (foto autor)

4.3. Výsledky mikrokrytalizace pod olejem

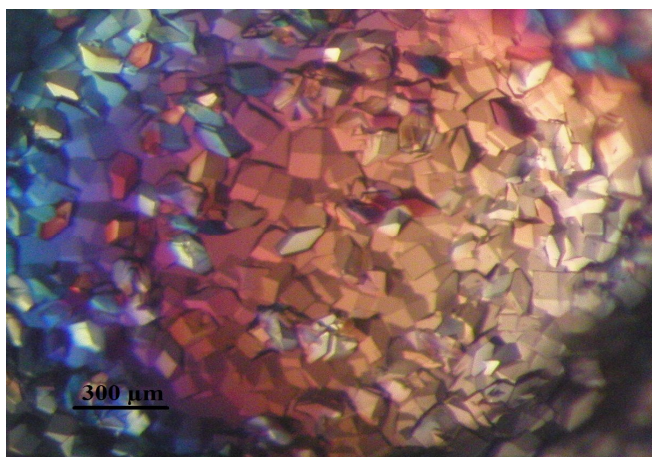
Metodou „microbatch under oil“ se podařilo vypěstovat pouze krystaly lysozymu. U enzymu DpcA pokus úspěšný nebyl.

4.3.1. Lysozym

Jako srážecí činidlo byl použit roztok 12 % NaCl a octanu sodného o pH 4,8. Modelový protein lysozyme o koncentraci 50 mg.l⁻¹ krystalizoval pod vrstvou oleje ve dvou poměrech proteinu a srážecího činidla. Jednalo se o poměry 2:2 (2 μ l lysozym a 2 μ l srážecího činidla) a 2:1 (2 μ l lysozym a 1 μ l srážecího činidla). Výsledky znázorňuje Tab. č. 7. Na Obr. č. 19 jsou vidět krystaly lysozymu v poměru 2 μ l proteinu a 2 μ l srážecího činidla.

Tab. č. 7 Výsledky metody „microbatch under oil“ pro lysozym

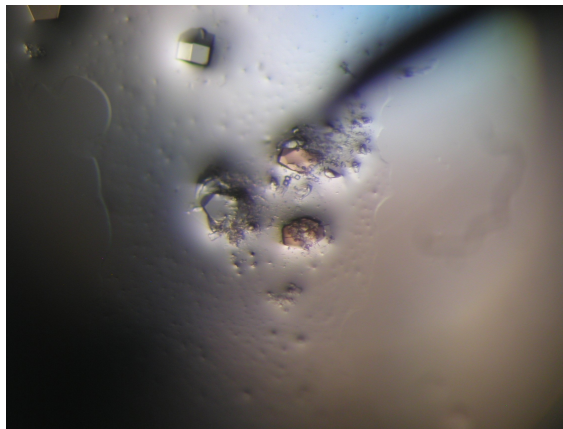
1.	2 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
2.	2 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
3.	1 μ l lysozym + 2 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
4.	2 μ l lysozym + 1 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
5.	1 μ l lysozym + 3 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8
6.	3 μ l lysozym + 1 μ l 12% NaCl, octan sodný o pH 4,8



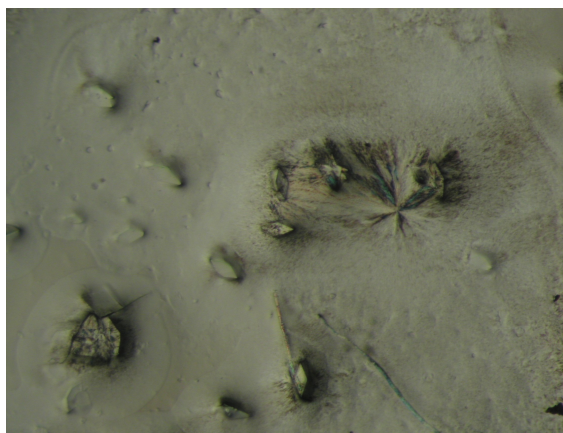
Obr. č. 19 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor)

4.4. Výsledky testování krystalů

Provedením „crush“ (Obr. č. 20), „dehydration“ (Obr. č. 21) a „dye binding“ (Obr. č. 22) testu bylo ověřeno, že se ve všech případech jednalo o krystaly proteinů.



Obr. č. 20 „Crush“ test (foto autor)



Obr. č. 21 „Dehydration“ test (foto autor)



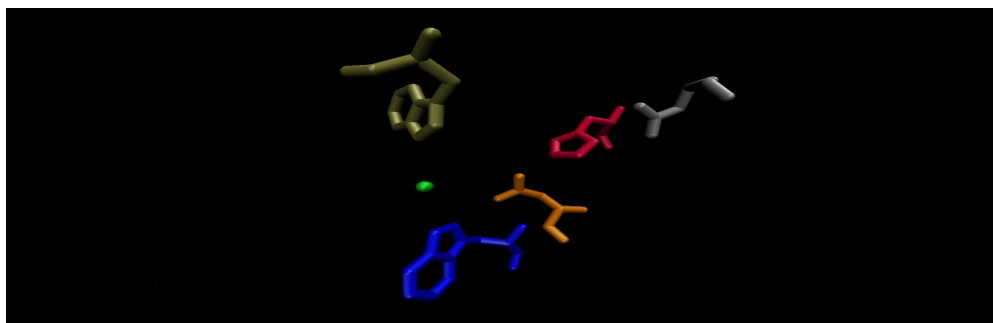
Obr. č. 22 „Dye binding“ test (foto autor)

4.5. Výsledky modelování

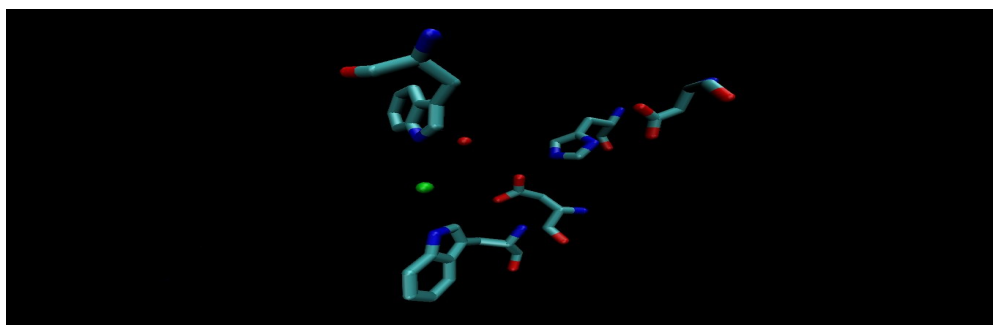
Pomocí softwarového programu VMD (Humphrey et al., 1996) byla zobrazena terciární struktura enzymu. To znamená, že bylo vidět jeho trojrozměrné uspořádání a poloha jednotlivých atomů. Hlavním cílem bylo najít reakční centrum neboli aktivní místo proteinu. V programu ChemSketch (ACD/ChemSketch Freeware 2012) bylo u enzymu DpcA také vytvořeno strukturální schéma katalytické pentády.

4.5.1. DpcA

V tomto programu bylo zobrazeno aktivní místo a podle něho složení jednotlivých aminokyselin v katalytické pentádě. Ta se skládá z trojice reziduí **Asp 250 – His 280 – Asp 123**. Tyto tři aminokyseliny jsou doplněny o **Trp 164 – Trp 124**, které v pentádě stabilizují odstupující **halogen** (Obr. č. 23). Na Obr. č. 24 je znázorněna tatáž pentáda, ale v modelu zobrazujícím jednotlivé elementy. To je výhodnější model z hlediska znázornění jednotlivých vazeb. Na modelu jsou vazby **uhlík-uhlík**, **uhlík-kyslík**, **uhlík-dusík-uhlík**. Tato pentáda je ještě doplněna o **vodu**, která vstupuje do hydrolytické reakce.

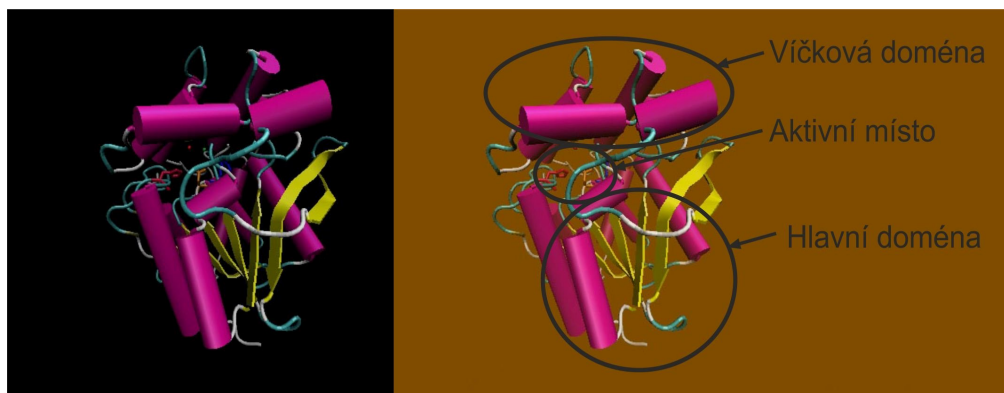


Obr. č. 23 Katalytická pentáda



Obr. č. 24 Katalytická pentáda

Pro názornou ukázkou bylo aktivní místo zobrazeno i v celé struktuře enzymu DpcA. Zde můžeme vidět kompletní strukturu včetně víčkové domény a hlavní domény. Znázorněny jsou také α -šroubovice, β -skládané listy a neuspořádané struktury (Obr. č. 25).



Obr. č. 25 Struktura enzymu DpcA

4.5.2. Lysozym

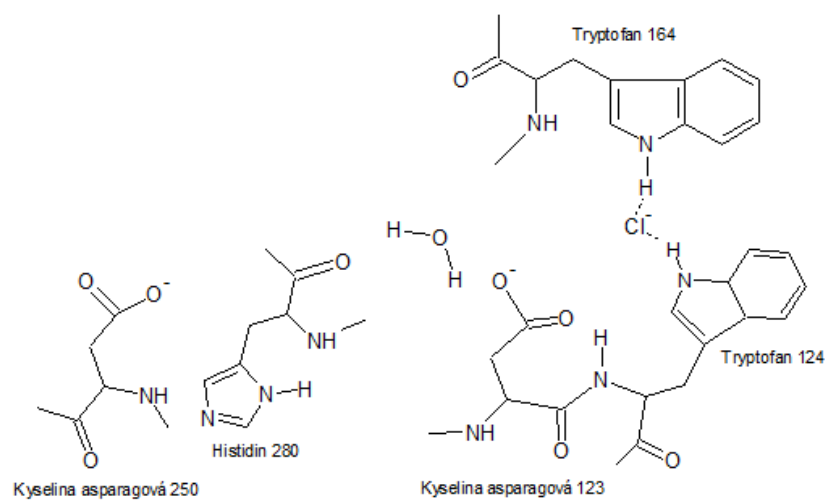
Na Obr. č. 26 je znázorněno trojrozměrné zobrazení lysozymu. Jedná se o strukturu včetně substrátu. Ten je ve složení sacharidových jednotek **MUB** a **NAG**. Na tento disacharid se váže jednoduchý peptid z aminokyselin ve složení **FGA**, **API**, **DAL**. Sacharidovou složku s peptidem spojuje aminokyselina **Ala 166**.



Obr. č. 26 Struktura lysozymu včetně substrátů

4.5.3. ChemSketch

Katalytická pentáda byla zobrazena i strukturálními vzorci v 2D vyobrazení. Na Obr. č. 27 jsou znázorněny jednotlivé aminokyseliny při substituci (hydrolýze). To je reakce, při které se odštěpují molekuly halogenů za vzniku alkoholů.



Obr. č. 27 Katalytická pentáda

5. Diskuze

Aplikace krystalizačních metod přispěla k naplnění cílu projektu, kdy se podařilo úspěšně provést počáteční krystalizační „screening“ podmínek pro růst proteinových krystalů. U nevhodně krystalizujících poměrů proteinu a srážecího činidla by se měla provést optimalizace podmínek a pokusy opakovat.

5.1. Lysozym

V případě této práce byl použit lysozym z vaječného bílku. U lysozymu ve většině testovaných případů došlo k růstu kvalitních tetragonálních krystalů. Jako srážecí činidlo byla použita směs 12% NaCl a octanu sodného o pH 4,8. V případě visící kapky krystaly narostly ve všech poměrech proteinu a srážecího činidla i koncentrací lysozymu. Krystalů o nejlepší kvalitě bylo dosaženo v poměru 4 μl proteinu a 4 μl srážecího činidla při koncentraci lysozymu 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. č. 13). Metodou sedící kapky se podařilo vypěstovat nejlepší krystaly v poměru 2 μl proteinu a 2 μl srážecího činidla (Obr. č. 16). Naopak tato metoda nebyla úspěšná pouze v poměru 3 μl proteinu a 1 μl srážecího činidla. V tomto poměru vznikala amorfni precipitát. Pravděpodobně to bylo z důvodu příliš koncentrovaného vzorku, který se hned vysrážel a dále nebyl schopen krystalizace. Metoda „microbatch under oil“ byla úspěšná v poměrech 2 μl proteinu a 2 μl srážecího činidla a 2 μl proteinu a 1 μl srážecího činidla (Obr. č. 19). Největší krystaly vznikaly ve velikosti až 250 μm .

Forsythe et al. (1997) vykrytalizovali vaječný lysozym i ze síranu amonného. Koncentrace proteinu byla 100-150 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Velká krystalizační proměnná bylo pH srážecího činidla. Se zvyšujícím se pH vznikaly tetragonální krystaly, naopak při snížení vznikaly krystaly kosočtverečné.

S tvrzením, že pH má na krystalizaci velký vliv, souhlasili i Judge et al. (1999). Jejich pokus spočíval v krystalizaci lysozymu o koncentraci 40 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ pomocí srážecího činidla v podobě 5% NaCl. O pH 3,5 se podařilo vykrytalizovat mnoho krystalů, naopak se zvyšujícím se pH počet krystalů klesal. Při pH 6,1 již nebyly přítomny žádné krystaly. Další zajímavé zjištění bylo, že počet výsledných krystalů se nemusí rovnat počtu krystalizačních jader na počátku experimentu.

Hodgson (1999) se pokusil vykrystalizovat hexagonální (šestiúhelníkové) krystaly lysozymu pomocí kyseliny mravenčí. Z této studie vyplynulo, že mezi pH 3-4 se podařilo vypěstovat sice velké množství krystalů, které ale neměly požadovaný hexagonální tvar. Po optimalizaci podmínek byla ale ke kyselině mravenčí přidána ještě kyselina octová. Tyto dvě srážecí činidla o pH 4,5 měly za následek sice menší množství krystalů, ale všechny měly požadovaný hexagonální tvar.

Brinkmann (2006) vykrystalizoval hexagonální krystaly i z roztoku dusičnanu sodného o pH 8,4. Na základě toho provedl analýzu, která vykazuje, že hexagonální krystaly vykazují vyšší obsah rozpouštědel a jsou více náchylné k poruchám než jiné krystalické formy lysozymu.

Alderton and Fevold (1945) krystalizovali lysozym srážecím činidlem v podobě 5 % chloridu sodného. Podařilo se jim dosáhnout velkého množství krystalů v rozmezí pH od 3 do 11. Krystaly tvořily dvě odlišné formy. Jedna forma byla pod pH 7 a druhá vznikla v zásaditém prostředí. Na základě tohoto pokusu bylo zjištěno, že struktury všech krystalů vzniklé v zásaditém prostředí jsou shodné. Liší se pouze chemicky a vykazují špatnou rozpustnost ve vodě. Naopak s postupně snižujícím se pH se zvyšuje rozpustnost krystalů ve vodě. Pod pH 7 se výrazně liší i struktura jednotlivých krystalů.

Z výše zmíněných studií vyplývá, že použitím různých srážecích činidel může lysozym tvořit různé krystalické podoby. Velký vliv na krystalizační experiment má i pH srážecího činidla.

5.2. DpcA

U enzymu DpcA byla situace složitější, protože se jednalo o zcela nový protein, u kterého nejsou krystalizační podmínky známy. Krystaly se podařilo připravit za použití srážecího činidla obsahujícího směs octanu amonného, citrátu sodného o pH 5,8 a 30% PEGu 4000. Metodou visící kapky byl vypěstován monokrystal v poměru 4 μl DpcA a 2 μl srážecího činidla (Obr. č. 14). Metoda sedící kapky se ukázala úspěšná v poměru 2 μl DpcA a 2 μl srážecího činidla. V tomto poměru při koncentraci 10 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ bylo vypěstováno velké množství jehličkovitých krystalů (sferulitů) (Obr. č. 18). Největší krystaly dosahovaly velikosti 220 μm . Ostatní použité poměry proteinu a srážecího činidla úspěšné nebyly. V poměru 3 μl DpcA a 1 μl srážecího činidla vznikaly amorfní sraženiny, vlivem příliš koncentrovaných vzorků. Zatímco v poměru 1 μl DpcA a 3 μl srážecího činidla se objevovaly čiré kapky. Tato skutečnost poukázala na to, že byl vzorek příliš zředěný. U metody „microbatch under oil“ nebylo dosaženo žádné krystalické podoby. Důvodem by mohla být nesprávná aplikace proteinů a srážecích činidel pod vrstvu oleje. Další možností by mohla být špatně utěsněná krystalizační destička, jelikož přístup vzduchu kontaminoval vzorky.

5.3. Struktura enzymů

Jak lysozym, tak i enzym DpcA obsahovaly α -šroubovice („ α -helixy“), které tvoří velice stabilní pravotočivé šroubovice drženy vodíkovými můstky. α -šroubovice obsahuje zhruba 3,6 aminokyselinových zbytků na jeden závit. Ve struktuře enzymů byly přítomny i β -skládané listy. Na rozdíl od α -šroubovice není β -skládaný list příliš kompaktní, ale je protažený do všech stran. Skládá se z několika aminokyselinových řetězců (peptidů). V enzymu bývá zpravidla obsažena i tzv. neuspořádaná struktura. Její vznik spočívá v rozrušení stabilizujících interakcí a následkem je její náhodné uspořádání. Tyto tři struktury tvoří základ prostorového uspořádání proteinů (tzv. sekundární struktury).

5.3.1. Struktura lysozymu

Lysozym z různých organismů se liší nejen ve struktuře, ale také v reakčních mechanismech. Na Obr. č. 26 je znázorněna celková struktura lysozymu včetně α -šroubovic a β -skládaných listů. Zobrazen je také substrát obsahující disacharid (MUB a NAG) a krátký peptid (FGA, API, DAL). Tento substrát poutá sacharidové jednotky v buněčné stěně. Sacharidovou složku s peptidem spojuje aminokyselina Ala 166. Účinek enzymu je založen na zdeformování sacharidového kruhu, který se poté velice snadno rozpadá.

5.3.2. Struktura DpcA

Struktura enzymu DpcA izolovaného z *Psychrobacter cryohalolentis* K5 obsahovala hlavní doménu, víčkovou doménu a aktivní místo. Hlavní doména je tvořena 9 α -šroubovicemi a 7 paralelními β -skládanými listy. Víčkovou doménu vytváří 5 α -šroubovic. Celkový pohled na enzym včetně uvedených komponentů je zobrazen na Obr. č. 25

5.4. Enzym a jeho aktivní místo

Enzym je jednoduchý či složený protein s katalytickou funkcí, určující rychlost, ale i povahu chemických reakcí. Z hlediska struktury mohou být enzymy jednoduché (obsahující pouze proteinovou část), nebo to mohou být enzymy složené. Ty obsahují kromě proteinové složky (apoenzymu) i malé neproteinové molekuly tzv. kofaktory (koenzymy). Tyto složené enzymy mají zpravidla katalytickou aktivitu. Právě v apoenzymu se vyskytuje aktivní místo enzymu.

Vzhledem k celkové velikosti proteinu je aktivní místo malá oblast. Je to prostorově vymezená oblast molekuly, která obsahuje přesně rozmístěné funkční skupiny aminokyselinových zbytků. Jedná se o katalyticky aktivní skupiny, skupiny specificky vážící substrát, skupiny vážící koenzym. Aktivní místo je ve tvaru prohlubně a zpravidla bývá umístěno na povrchu molekuly, aby bylo volně přístupné pro substráty. Ty se na aktivní místo váží a vytváří enzym-substrátový komplex. Substrát se k aktivnímu místu váže pomocí van der Waalsových sil, vodíkových můstků a elektrostatických sil.

Nepolární charakter těchto vazeb zesiluje polární interakce mezi substrátem a proteinem.

Existují dvě teorie aktivního místa. První je teorie komplementarity (teorie „zámku a klíče“). Tato teorie předpokládá, že navazující se substrát přesně odpovídá struktuře aktivního místa. V aktivním místě jsou vytvořena vazebná místa, která jsou tvarem komplementární k substrátu. Jiný substrát se nemůže navázat. Druhou teorií je teorie indukovaného přizpůsobení. Tato teorie předpokládá, že se aktivní místo přizpůsobuje substrátu, se kterým reaguje. To znamená, že v enzymu zpočátku nejsou vytvořena vazebná místa. Substrát si ale svou přítomností je schopen vyvolat příslušnou změnu vazebného místa.

Enzymy mají substrátovou specifitu, to znamená, že enzym katalyzuje reakci jen určitého substrátu, jiného si nevšímá. Enzymy mají také reakční specifitu, tudíž dokážou katalyzovat jeden konkrétní typ reakce nebo jednu konkrétní vazbu. Aktivita enzymů udává rychlost katalyzované reakce. Jednotka katalytické aktivity enzymů je katal (kat). To znamená množství enzymu, které způsobí přeměnu jednoho molu substrátu za sekundu. Pokud jsou splněny jednotlivé podmínky vaznosti, dojde k chemické reakci, přeměně substrátu na produkt. Po proběhnutí reakce se rozpadne enzym-substrátový komplex a z aktivního místa se uvolní produkt (produkty) reakce.

5.4.1. Aktivní místo halogenalkandehalogenasy DpcA

Aktivní místo DpcA obsahuje katalytickou pentádu a halogen. Jednotlivé aminokyseliny v pentádě jsou: Asp 250, His 280, Asp 123, Trp 124 a Trp 164 (Obr. č. 23). Trojice aminokyselin Asp 250, His 280 a Asp 123 tvoří katalytickou triádu, která je v katalytické pentádě zodpovědná za nukleofilní atak a hydrolýzu. Dále zajišťují tvorbu a štěpení kovalentní vazby meziprojektu. Zatímco úloha Trp 124 a Trp 164 je halogen-stabilizující. Tyto dvě aminokyseliny dále vytvářejí vodíkové můstky. V případě DpcA ještě není struktura plně vyřešena, tudíž nelze přesně říci, o jaký halogen se jedná. Předmětem dalšího výzkumu bude určení vlastní struktury enzymu a přesná charakterizace jednotlivých složek aktivního místa. Pravděpodobně se v aktivním místě bude nacházet chlor nebo brom. Vzdálenost od halogenu k tryptofanu je v obou případech shodná a to 3.30 angström (Å). To je velice příznivá vzdálenost pro stabilizaci halogenu.

5.5. Dehalogenační reakce

Odbourávání halogenovaných sloučenin může probíhat hydrolýzou nebo enzymaticky. V případě enzymatického odbourávání procesem oxidace, redukce, substituce, hydratace či právě dehalogenace.

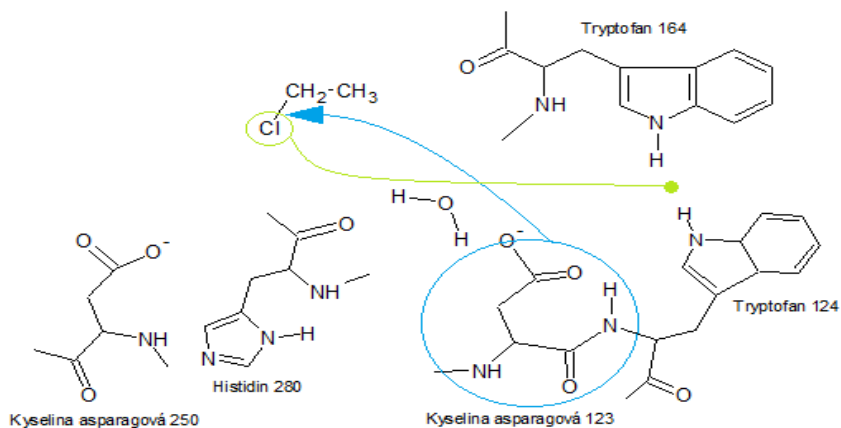
Dehalogenace je chemická reakce probíhající v aktivním místě, při které se ze sloučenin odstraňuje halogen. Za nahrazení halogenu atomem vodíku jsou odpovědné oxidačně-redukční enzymy. Eliminace halogenvodíku vede k vytvoření alkenů, který je dále rozložen oxidací. Pro enzymatickou aktivitu halogenalkandehalogenas není potřebný žádný kofaktor ani iont kovu. Reakce je iniciována navázáním substrátu do aktivního místa.

Proces dehalogenace probíhá ve dvou krocích. V prvním kroku je nezbytné, aby byl halogen navázán na atom uhlíku. Později je napaden nukleofilním reziduem (Asp 123), přičemž vzniká meziprodukt. Ten je poté hydrolyzován molekulou vody za vzniku alkoholu. Mechanismus reakce je bazicky katalyzovaná hydrolýza esteru. Reakce prvního reakčního kroku je snížena rezidui, která interagují s odstupujícím halogenem. Druhý reakční krok spočívá v nukleofilní adici vody za vzniku esterového meziproduktu. Dochází k histidické (His 280) katalýze, která polarizuje atakující vodu. Ta následně zprostředkovává přenos jejího protonu na vznikající alkohol.

5.5.1. Příklad reakce v aktivním místě enzymu DpcA

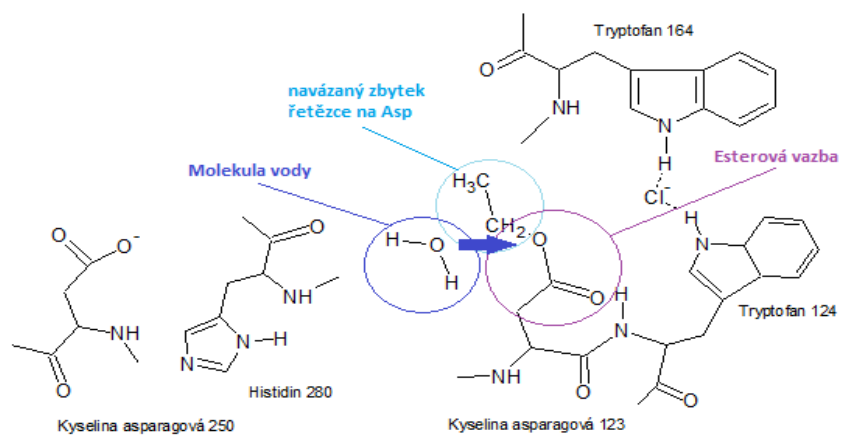
Reakce probíhá v aktivním místě enzymu. Prvním krokem je navázání substrátu do aktivního místa enzymu. Jako substrát v případě halogenalkandehalogenas jsou halogenderiváty uhlovodíku. Funkce pentády aminokyselin DpcA je vysvětlena na příkladě přeměny substrátu 1-chlorethanu. Po vniknutí 1-chlorethanu do aktivního místa začíná katalytická přeměna substrátu, na které se podílí pentáda aminokyselin (Asp 250, His 280, Asp 123, Trp 124, Trp 164,) a molekula vody potřebná pro hydrolytické štěpení.

Na navázaný substrát (1-chlorethan) do aktivního místa působí Asp 123, která štěpí vazbu na prvním uhlíku mezi chlorem a uhlíkem. Odštěpený iont chloru se postupně přesouvá mezi Trp 124 a Trp 164. Dochází k interakci nekovalentní vazbou (Obr. č. 28).

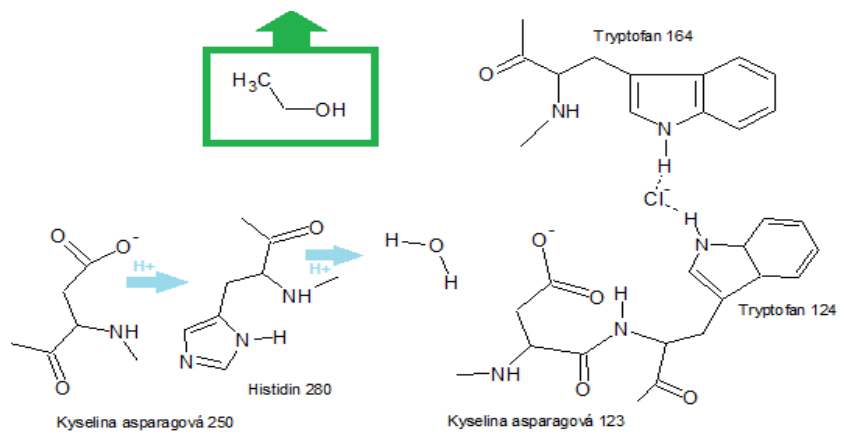


Obr. č. 28 Asp 123 štěpí vazbu mezi chlorem a uhlíkem

Zbýlý záporně nabitý řetězec se váže na Asp 123 esterovou vazbou a tvoří s ní ester, na který poté působí molekula vody (hydrolyza) (Obr. č. 29). Hydrolyzou se rozštěpí esterová vazba a vzniklý alkohol (ethanol) opouští aktivní místo. Spotřebované vodíky jsou doplněny His 280 a Asp 250 (Obr. č. 30). Navázaný iont halogenu (v případě 1-chlorethanu je to chlor) zůstává navázán nekovalentní vazbou do doby příjmu nového substrátu, kdy je nahrazen jiným halogenem.



Obr. č. 29 Hydrolýza esteru za vzniku alkoholu



Obr. č. 30 Ethanol opouští aktivní místo

6. Závěr

V úvodu první části bakalářské práce je popsána stručná historie krystalizace. Práce se dále teoreticky zabývá vlastním krystalizačním procesem, včetně vzniku krystalů a faktorů ovlivňující jejich růst. Názorně jsou popsány základní krystalizační metody včetně jejich výhod a nevýhod. Dále jsou shrnuty nejnovější informace o struktuře a funkci enzymů halogenalkandehalogenas. Je známo 15 enzymů této proteinové rodiny. Tyto enzymy mají unikátní schopnost odbourávat halogen z halogenovaných organických uhlovodíků, které se velice často používaly v zemědělství. Ačkoliv se tyto látky již řadu let nesmí používat, díky své perzistenci jsou stále přítomny v životním prostředí. Vlastnost biodegradace tedy může být využita k čištění vod a životního prostředí. Proto je ale nezbytné správné vyřešení jejich struktury. Ta se skládá z hlavní a víčkové domény. Mezi těmito doménami je uloženo aktivní místo, které se skládá z pěti katalytických aminokyselin. Právě aktivní místo na sebe váže halogenovaný substrát. Každý enzym má svoji substrátovou specifitu, je tedy schopen vázat jen určitý substrát.

Experimentální část práce spočívala v praktickém provedení krystalizačního experimentu. Krystalizoval jak modelový protein lysozym, tak i enzym DpcA. Krystalizační podmínky u lysozymu jsou dobře známy, tudíž byla větší pozornost kladena na enzym DpcA. Ten je izolován z bakterie *Psychrobacter cryohalolentis* K5 a představuje prvního psychrofilního zástupce rodiny halogenalkandehalogenas. Byly získány krystaly o vhodné velikosti a kvalitě pro rentgenovou analýzu, čímž bylo dosaženo v úvodu vytyčených cílů bakalářské práce.

Krystalická podoba je nezbytná pro správné vyřešení struktury enzymu. Toho by mohlo (mělo) být využito k dalším výzkumům. Hlavní bod by se měl týkat vyřešení substrátové specifity, která je u DpcA zatím nejasná, ačkoliv právě na ní velice záleží.

7. SEZNAM LITERURY

- Alderton, G., Fevold, H.L., 1945. Direct Crystallization of Lysozyme from Egg White and some Crystalline Salts of Lysozyme. *Journal of Biological Chemistry* 157, 43.
- Bermann, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G.L., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E., 2000. The protein Data Bank. *Nucleic Acid Research* 28, 235-242.
- Bergfors, M.T., 2009. Protein Crystallization. International University Line. La Jolla, p. 427.
- Bergfors, T.M., 1999. Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips. International University Line. Sand Diego, p. 306.
- Berry, M.B. Protein Crystallization: Theory and Practice. [online]. 1995. [cit. 2013-3-6].
Dostupné z:
<http://www.xtal.tsinghua.edu.cn/group5/web/material/Protein%20Crystallization>
- Bollag, M.D., Rozycki, D.M., Stuart, J.E., 1996. Protein Methods. Wiley-Liss, Inc. New York, p. 415.
- Brinkmann, C., Weiss, M.S., Weckert, E., 2006. The structure of the hexagonal crystal form of hen egg-white lysozyme. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 62, 349.
- Byrappa, K., Ochachi, T., 1965. Crystal Growth Technology. Wiliam Andrew Inc. New York, p. 590.
- Carter, C.D., Smith, E.R. Hanging drop crystal growth apparatus and method. United States of America. 4886646. 1989.
- Cox, M.M., Phillips, G.M., 2008. The Handbook of Proteins: structure, function and methods. John Wiley & Sons. New York, p. 1319.
- Damborský, J., Koča, J., 1999. Analysis of the reaction mechanism and substrate specificity of haloalkane dehalogenases by sequential and structural comparisons. *Protein Engineering* 12, 989-998.

- Damborsky, J., Rorije, E., Jesenska, A., Nagata, Y., Klopman G., Peijnenburg, J.G.M., 2010: Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 2681-2689.
- D'arcy, A., Elmore, C., Stihle, M., Johnston, J.E., 1996. A novel approach to crystallizing proteins under oil. *Journal of Crystal Growth* 168, 175-180.
- Dharanaj, G., Byrappa, K., Prasad, V., Dudley, M., 2010. *Springer Handbook of Crystal Growth*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York, p. 1332.
- Doublié, S., 2007. *Macromolecular Crystallography Protocols*. Humana Press Inc. New Jersey, p. 363.
- Drenth, J., Mesters, J., 2010. *Principles of Protein X-ray Crystallography*. Springer Science+Business Media. New York, p. 326.
- Drienovska, I., Chovancova, E., Koudelakova, T., Damborsky, J., Chaloupkova, R., 2012 Biochemical Characterization of a Novel Haloalkane Dehalogenase from a cold-adapted bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 14.
- Ducruix, A., Giege, R., 1999. *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: a practical approach*. Oxford University Press. Oxford, p. 435.
- Emmer, J., 2007. Structural studies of the haloalkane dehalogenase mutant (DhaA12) from *rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, University of South Bohemia.
- Forsythe, E.L., Snell, E.H., Pusey, M.L., 1997. Crystallization of chicken egg-white lysozyme from ammonium sulfate. *Biological Crystallography* 53, 795-797.
- Garside, J., Mersmann, A., Nývlt, J., 2002. Measurement of Crystal Growth and Nucleations Rates. *ICChemE*. Rugby, p. 195.
- Gilliland, G.L., 1998. A biological macromolecule crystallization database: A basis for a crystallization strategy. *Journal of Crystal Growth* 90, 50-51.

- Hodgson, J.C., Maduck, N.S., Dean, S., 1999. A Study in Hen Egg White Lysozyme Crystal Growth. *Science of Materials* 1, 30-31.
- Holloway, P., Trevors, J.T., Lee, H., 1998. A colorimetric assay for detecting haloalkane dehalogenase activity. *Journal of Microbiological Methods* 1, 31-36.
- Chayen, N.E., 1997. A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger crystals. *Journal of Applied Crystallography* 30, 198-202.
- Chirgadze, D. Protein Crystallisation in Action. [online]. 2001. [cit. 2013-2-3]. Dostupné z <http://www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~dima/whitepapers/xtal-in-action/node3.html>
- Chovancova, E., Kosinski, J., Bujnicki, J. M., Damborsky, J., 2007. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics* 67, 305-316.
- Janssen, D.B., 2004. Evolving haloalkane dehalogenase. *Current Opinion in Chemical Biology* 8, 150-159.
- Janssen, D.B., Pries, F., Van der Ploeg, J.R., 1994. Genetics and biochemistry of dehalogenating enzymes. *Annual Review of Microbiology* 48, 163-191.
- Judge, A.R., Jacobs, S.R., Frazier, T., Snell, H.E., Pusey, M.L., 1999. The effect of temperature and solution pH on the nucleation of tetragonal lysozyme crystals. *Biophysical Journal* 77, 1585-1593.
- Katalog Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA, 2001.
- Kmunicek, J., Luengo, S., Gago, F., Ortiz, A.R., Wade, R.C., Damborsky, J., 2001. Comparative binding energy analysis of the substrate specificity of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus*. GJ10. *Biochemistry* 40, 8905-8917.
- Kodíček, M., 2004. Biochemické pojmy, výkladový slovník. VŠCHT Praha. Praha. s. 171.
- Kutá Smatanová, I., 2008. Crystallization techniques in protein crystallography, Habilitation thesis, Palacky university Olomouc.

- Leunissen, M. An essay on several aspects of protein crystallization research. *Protein Crystallography* [online]. 2001. [cit. 2013-1-1]. Dostupné z: <http://people.ds.cam.ac.uk/ml527/publications/assets/leunissen-literatureresearch.pdf>.
- Leysen, S., Herrewerghe, V.J.M., Callewaert, L., Heirbaut, M., Buntinx, P., Michiels, W. C., Strelkov, V.S., 2011. Molecular basis of bacterial defense against host lysozymes: X-ray structures of periplasmic lysozyme inhibitors. *Journal of Macromolecular Biology* 405, 1233-1245.
- Luft, J.R., DeTitta, G.T. A macromolecular hanging-drop vapor-diffusion technique. *Journal of Applied Crystallography* [online]. 1992. [cit. 2013-1-15]. Dostupné z: <http://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S0021889891011354>.
- McPherson, A., 1990. Review Current approaches to macromolecular crystallization. *Journal of Biochemistry*. pp. 49-71.
- McPherson, A., 2004. Introduction to protein crystallization. *Macromolecular Crystallization* 34, 254-265.
- McPherson, A., 2009. Introduction to Macromolecular Crystallography. John Wiley & Sons. New Jersey, p. 267.
- Messerschmidt, A., 2007. X-Ray Crystallography of Biomacromolecules: A Practical Guide. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, p. 275.
- Mullin, J.W., 2001. Crystallization, fourth edition. Reed Educational and Professional Publishing Ltd. Woburn, p. 587.
- Myerson, A., 2002. Handbook of Industrial Crystallization. Butterworth-Heinemann. Woburn, p. 305.
- Nardini, M., Dijkstra, B.W., 1999 α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. *Current Opinion in Structural Biology* 9, 732-737.

- Otyepka, M., Damborský, J., 2002. Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains. *Protein science* 1, 1206-1217.
- Rhodes, G., 2006. *Crystallography Made Crystal Clear: A Guide for Users of Macromolecular Models*. Elsevier Inc. London, p. 295.
- Thomas, D.H., 1989. A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering* 2, 489.
- Tratsiak, K., Degtjarik, O., Drienovská, I., Chrást, L., Damborský, J., Řetáčová, P., Kutý, M., Chaloupková, R., Kutá Smatanová, I., 2013. Crystallographic analysis of two psychrophilic haloalkane dehalogenases: DpcA from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 and DmxA from *Marinobacter* sp. ELB17 - accepted for publication.
- Twyman, R., 2004. *Principles of Proteomics*. Taylor & Francis. New York, p. 266.
- Verschuere, K.H.G., Seljee, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W., 1993. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* 363, 693-698.
- Woolfson, M.M., 1997. *An Introduction to X-ray Crystallography*. Cambridge University Press. Cambridge, p. 399
- Zeppenauer, M., 1971. Formation of large crystals. *Methods enzymology* 22, 253.

8. PROGRAMY

ChemSketch

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

VMD

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

WinCoot

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

9. SEZNAM ZKRATEK

Ala - Alanin

Amonium acetate – octan amonný

API - 2,6-Diaminopimelic Acid

APS – persíran amonný

Asp – kyselina asparagová

DAL - D-Alanine

FGA - Gamma-D-Glutamic Acid

His – Histidin

MUB - N-Acetylmuramic Acid

NAG - N-Acetyl-D-Glucosamine

SDS- PAGE – sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

Sodium acetate – octan sodný

Sodium citrate – citrát sodný

TEMED – tetramethylethylenediamine

TRIS - tris (hydroxymethyl) aminomethan

Trp – Tryptofan

10. SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1 Pipetování proteinů a vzorového pufru při gelové SDS – PAGE elektroforéze	37
Tab. č. 2 Pipetování proteinů a srážecích činidel.....	40
Tab. č. 3 Pipetování lysozymu a srážecího činidla	43
Tab. č. 4 Pipetování DpcA a srážecího činidla	43
Tab. č. 5 Výsledky použití metody visící kapky pro lysozym	48
Tab. č. 6 Výsledky metody visící kapky pro DpcA	50
Tab. č. 7 Výsledky metody „mikrobatches under oil“ pro lysozym	53

11. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1 Fázový diagram růstu krystalů.....	14
Obr. č. 2 Fázový diagram růstu krystalů při použití metody „batch“	21
Obr. č. 3 Fázový diagram krystalizace založené na difúzi par.....	22
Obr. č. 4 Schéma krystalizační jamky v destičce pro sedící kapky	23
Obr. č. 5 Schéma krystalizační jamky v destičce pro visící kapky	25
Obr. č. 6 Schéma krystalizační jamky v destičce pro sendvičové kapky.....	26
Obr. č. 7 Fázový diagram růstu krystalů dialýzou	27
Obr. č. 8 Schéma dialyzační metody.....	28
Obr. č. 9 Schéma krystalizační jamky v destičce.....	29
Obr. č. 10 Schéma krystalizačního experimentu pro lysozym.....	42
Obr. č. 11 Schéma krystalizačního experimentu pro DpcA.....	42
Obr. č. 12 Gelová SDS – PAGE elektroforéza (foto autor).....	47
Obr. č. 13 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor).....	49
Obr. č. 14 Monokrystal DpcA (foto autor)	50
Obr. č. 15 Výsledky metody sedící kapky pro lysozym	51
Obr. č. 16 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor).....	51
Obr. č. 17 Výsledky metody sedící kapky pro DpcA	52
Obr. č. 18 Jehličkovité krystaly DpcA (foto autor).....	52
Obr. č. 19 Tetragonální krystaly lysozymu (foto autor).....	53
Obr. č. 20 „Crush“ test.....	54
Obr. č. 21 „Dehydration“ test	54
Obr. č. 22 „Dye binding“ test	54
Obr. č. 23 Katalytická pentáda.....	55
Obr. č. 24 Katalytická pentáda.....	55
Obr. č. 25 Struktura enzymu DpcA.....	56
Obr. č. 26 Struktura lysozymu včetně substrátů	56

Obr. č. 27 Katalytická pentáda.....	57
Obr. č. 28 Asp 123 štěpí vazbu mezi chlorem a uhlíkem	64
Obr. č. 29 Hydrolýza esteru za vzniku alkoholu.....	65
Obr. č. 30 Ethanol opouští aktivní místo	65

12. ABSTRAKT

Poznání struktury makromolekulárních látek je nezbytné pro objasnění jejich strukturně-funkčních vztahů. Halogenalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolýzu vazby uhlík-halogen v halogenovaných uhlovodících. Na základě této vlastnosti jsou tyto enzymy schopny odbourávat halogenované sloučeniny. Jelikož je životní prostředí hodně zatěžováno různými polutanty, je biodegradace nezbytný krok ke zkvalitnění životního prostředí. Halogenalkandehalogenasy se mohou využít i jako biosenzory, protože mohou detekovat kontaminaci halogenovanými uhlovodíky.

Tato bakalářská práce se zabývá vlastním krystalizačním procesem modelového proteinu lysozymu a halogenalkandehalogenasy DpcA izolované z organismu *Psychrobacter cryohalolentis* K5. Cílem práce bylo připravit vhodné krystaly pro rentgenovou difrakční analýzu. Po ověření čistoty proteinů byly použity základní i pokročilé krystalizační metody. Byly získány monokrystaly o vhodné kvalitě a velikosti pro rentgenovou difrakční analýzu, díky které byla vyřešena atomární 3D struktura enzymu. Jelikož mají halogenalkandehalogenasy nízkou aktivitu s halogenovanými substráty, cílem proteinového inženýrství je její zvýšení, tudíž je další výzkum zaměřen na modifikaci substrátové specifity.

13. ABSTRACT

Knowledge of protein structures is necessary to clarify their structure-function relationships. Haloalkane dehalogenases are microbial enzymes that catalyze the hydrolysis of carbon-halogen in the halogenated hydrocarbons. Based on their properties these enzymes are able to degrade halogenated compounds. As the environment is burdened by a lot of different pollutants, biodegradation is a necessary step to improve the quality of environment. Haloalkane dehalogenases can be used as biosensors since they can detect contamination by halogenated compounds.

This thesis is focused on crystallization of the model protein lysozyme and haloalkane dehalogenase DpcA isolated from the organism *Psychrobacter cryohalolentis* K5. The aim of this work was to prepare crystals suitable for X-ray diffraction analysis. After verification of protein's purity, both proteins were crystallized by the use of basic and advanced crystallization methods. Single crystals of suitable size and quality for X-ray diffraction analysis were obtained and diffraction data were used to solve the 3D atomic structure of the DpcA. Since haloalkane dehalogenases have a low activity for halogenated substrates, the main aim of protein engineering is to increase their activity so thus further research is focused on modification of substrate specificity.