

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Výzkumný ústav rybářský a hydrologický

Bakalářská práce

**Biodegradace environmentálních polutantů –
charakterizace mutantní
halogenalkandehalogenasy DhaA31 z
Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13064**

Autor práce: Pavel Malcher

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

Konzultant: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.

Studijní program a obor: Zootechnika, rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník studia: 2012/2013

Prohlášení autora bakalářské práce

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

V Českých Budějovicích 22. 4. 2013

.....

Pavel Malcher

Poděkování

Rád bych poděkoval své vedoucí Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za vedení celé práce, za poskytnutí materiálů, užitečných rad, ale také za ochotu a vstřícnost. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Tatyňě Prudnikové, Mgr. Oksaně Degtjarik a Mgr. Michalu Kutému, Ph.D., za trpělivost při praktické části experimentu. Také bych chtěl poděkovat své rodině za podporu celého studia.

Pavel Malcher

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

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Pavel MALCHER**
Osobní číslo: **V10B034P**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Rybářství**
Název tématu: **Biodegradace environmentálních polutantů - charakterizace vybrané halogenalkan dehalogenázy**
Zadávající katedra: **Škola komplexních systémů**

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

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

Několik vybraných halogenalkan dehalogenas mutantních forem DhaA bylo připraveno a úspěšně vykrystalizováno. Struktury byly upřesněny a uloženy v PDB. Pro poznání strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkan dehalogenas byla realizována krystalografická analýza komplexů DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 s vybranými substráty.

Po domluvě s Loschmidtovými laboratořemi MU v Brně budou připraveny další typy halogenalkan dehalogenasy. Cílem práce bude provést krystalizační experimenty s nově připraveným enzymem, připravit difraktující monokrystaly a naměřená difrakční data použít k určení a upřesnění struktury studovaného enzymu.

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:

Alena Stsiapanava, Radka Chaloupkova, Andrea Fortova, Jiri Brynda, Manfred Weiss, Jiri Damborsky and Ivana Kuta Smatanova: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild type haloalkane dehalogenase DhaA and the variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Cryst F* 67, 253-257 (2011).

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


Alena Stsiapanava, Tana Koudelakova, Mikalai Lapkouski, Martina Pavlova, Jiri Damborsky and Ivana Kuta Smatanova: Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultra high resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Cryst. F* 64, 137-140 (2008).

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


Brezovský, J.: Computer modeling of enzymes. Ph.D. Thesis, in English. Masaryk university, Faculty of Science, Brno (2011).

Vedoucí bakalářské práce: doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Škola komplexních systémů
Konzultant bakalářské práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.
Škola komplexních systémů
Ostatní konzultanti: MSc. Oxana Degtjarik
Škola komplexních systémů

Datum zadání bakalářské práce: 2. prosince 2011
Termín odevzdání bakalářské práce: 30. dubna 2013


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
FAKULTA RYBÁŘSTVÍ A OCHRANY VOD
Zátiší 728/II
389 25 Budějovice (2)


Ing. Petr Čisář, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 3. února 2012

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární rešerše	8
2.1. Úvod do krystalizace	8
2.1.1. Vlastnosti krystalů	9
2.1.2. Proces krystalizace	9
2.1.3. Proteinová krystalografie.....	10
2.1.4. Postup proteinové krystalizace	11
2.2. Fázový diagram	12
2.2.1. Snížení rozpustnosti proteinu	14
2.2.2. Precipitace proteinu	14
2.2.3. Srážecí roztoky	15
2.3. Krystalizační metody	17
2.3.1. „Sitting drop vapor diffusion“ - metoda sedící kapky.....	17
2.3.2. „Hanging drop vapor diffusion“ - metoda visící kapky	17
2.3.3. „Counter-diffusion“ - metoda krystalizace v kapilárách	18
2.3.4. „Microbatch“ - metoda krystalizace pod olejem	18
2.4. Halogenalkandehalogenasy	18
2.4.1. Struktura halogenalkandehalogenas	19
2.4.2. Funkce halogenalkandehalogenas	19
2.4.3.1. Funkce enzymu DhaA	20
2.4.3.2. Varianty mutace DhaA	20
2.5. Thermolysin.....	21
3. Materiál a metodika	22
3.1. Gelová elektroforéza (SDS-PAGE).....	22
3.1.1. Příprava spodního (lower) gelu	22
3.1.2. Příprava svrchního (higher) gelu	23
3.1.3. Vlastní SDS-PAGE elektroforéza	23
3.2.1. Krystalizační roztok pro DhaA31	24
3.2.2. Krystalizační roztok pro Thermolysin.....	24
3.3. Krystalizace a použité krystalizační metody	27
3.3.1. Metoda sedící kapky („Sitting drop vapor diffusion“)	27

3.3.2. Metoda visící kapky („Hanging drop vapor diffusion“)	29
3.3.3. Metoda krystalizace pod silikonovým olejem („Microbatch“)	30
3.3.4. Metoda krystalizace v kapilárách („Counter diffusion“)	31
3.4. Testy na krystalech	32
3.4.1. Metoda DYE testu (barvení krystalů)	32
3.4.2. Metoda Crush testu (destrukce krystalu)	33
3.5. Zobrazení struktury proteinu DhaA31 za pomoci počítačových programů	33
3.5.1. Práce s programem VMD	33
3.5.2. Práce s programem ChemSketch	34
3.5.3. Práce s programem WinCoot	35
4. Výsledky	36
4.1. Vyhodnocení gelové SDS-PAGE elektroforézy	36
4.2. Výsledky krystalizace	36
4.2.1. Výsledky metody sedící kapky	36
4.2.1.1. Výsledky metody sedící kapky pro protein DhaA31	37
4.2.1.2. Výsledky metody sedící kapky pro protein Thermolysin	38
4.2.2. Výsledky metody visící kapky	39
4.2.2.1. Výsledky metody visící kapky pro protein DhaA31	39
4.2.2.2. Výsledky metody visící kapky pro protein Thermolysin	40
4.3. Výsledky modelování proteinu DhaA a Thermolysinu	41
4.3.1. Znázornění proteinu DhaA v programu VMD	41
4.3.2. Znázornění pentády enzymu DhaA31 v aktivním místě	42
4.3.3. Znázornění proteinu Thermolysin v programu VMD	43
5. Diskuze	44
5.1. Protein DhaA31	44
5.2. Schéma katalytické hydrolýzy enzymu DhaA31 při detoxikaci 1,2,3-trichloropropanu na 2,3-dichloropropan-1-ol	45
5.3. Protein Thermolysin	48
6. Závěr	50
7. Seznam použité literatury	51
8. Přílohy	55
9. Abstrakt (česky)	58
10. Abstrakt (anglicky)	59

1. Úvod

Ochrana přírody a životního prostředí je dnes hlavní otázkou, kterou se zabývá celá řada vědeckých výzkumů. Otázka jak „napravit“ životní prostředí je součástí také výzkumu zaměřeného na využití bakteriálních zdrojů k dekontaminaci zamořených lokalit polutanty. Jednou takovou možností je například využití halogenalkandehalogenas, které jsou schopny přeměnit halogenovaný nebezpečný substrát na netoxický produkt. Proces dekontaminace halogenalkandehalogenas a jejich mutantů se stále zkoumá a přesné objasnění jejich účinku na zlepšení stavu životního prostředí je ve fázi výzkumu. Struktura a funkce halogenalkandehalogenas jsou řešeny například metodami proteinové krystalografie, kterým se věnuje i tato bakalářská práce.

Cílem této práce je se naučit na modelovém proteinu Thermolysinu metody proteinové krystalografie a poté se pokusit připravit krystaly zkoumané mutantní varianty halogenalkandehalogenasy DhaA31 vhodné pro difrakční analýzu. Podle mapy elektronové hustoty pak vytvořit strukturu DhaA31 s aktivním místem a pokusit se vysvětlit detoxikační účinek enzymu.

2. Literární rešerše

2.1. Úvod do krystalizace

Hlavním úkolem v "postgenomické" éře je pochopit roli jednotlivých genů v rámci čtení lidského genomu. Je všeobecně známo, že mnohé geny spojené s nemocemi pravděpodobně hrají významnou roli při ochraně zdraví a zvýšení citlivosti k nemocím. Jinými slovy, funkce genů je velmi úzce spjata s proteiny, které geny kódují, a proto je velká část vědeckého výzkumu zaměřena na studium proteinů (Berman *et al.* 2000).

Aktuální krystalizační strategie jsou založeny především na prověřování dříve úspěšně použitých chemických koktejlů s využitím klasických krystalizačních technik založených převážně na difúzi par při odpařování rozpouštědla. Tento postup je značně úspěšný při krystalizaci a řešení struktur rozpustných globulárních proteinů. Pro membránové proteiny, které představují dvě třetiny všech bílkovin, je úspěšnost krystalizovatelnosti výrazně nižší. Je to důsledek toho, že se většinou jedná o nestabilní komplexy, které jsou velmi citlivé na teplotu, světlo a další vnější vlivy. Ramanova *et al.* (2006) uvádí, že je 178 struktur membránových proteinů uložených v "Membrane Protein databank"(MPDB), což je ve srovnání s počtem struktur uložených v PDB pouze 0,5 %. Úspěch vyřešení struktury proteinů závisí především na kvalitě získaných krystalů (Otwinowski *et Minor* 1997).

Vlastnosti krystalů biologických makromolekul a krystalizační údaje byly sestaveny v biologické makromolekulární krystalizační databázi (BMCD) (Gilliland *et al.* 1994, Gilliland 1998). BMCD obsahuje krystalizační údaje a krystalizační podmínky, které byly shromážděny z literatury. Gilliland *et al.* (1994) uvádí, že BMCD obsahuje 5247 makromolekul, pro které byly získány krystaly difrakční kvality. Patří mezi ně proteiny, proteinové komplexy, nukleové kyseliny, komplexy nukleových kyselin, komplexy proteinů a nukleových kyselin a viry. Všechny krystalografické informace o konkrétních makromolekulách včetně rentgenových difrakčních dat a statistické informace jsou k dispozici on-line v databázi Protein databank (RCSB PDB) (Berman *et al.* 2000).

2.1.1. Vlastnosti krystalů

Krystaly jsou útvary s přesně definovaným chemickým složením, často jsou geometricky přesné s pravidelnými plochami a ostrými hranami. Z fyzikálního hlediska jsou krystaly pravidelné trojrozměrné útvary. Ideální krystaly mohou být zobrazeny jako nekonečné a dokonalé pole, ve kterém jsou stavební kameny (jsou asymetrické jednotky) uspořádaný podle přesně definovaných symetrií do elementárních buněk, které se opakují ve 3D uspořádání. Experimentální (skutečné) krystaly mají omezené rozměry, jejich pravidelnost není nikdy dokonalá, protože obsahují různé druhy místních poruch nebo zlomů. Makromolekulární krystaly jsou poměrně malé jemné útvary, se špatnými mechanickými vlastnostmi a vysokým obsahem rozpouštědla, které tvoří 20-80% jejich objemu. Tyto krystaly jsou vždy velmi křehké a citlivé na vnější podmínky (Kutá Smatanová 2008).

2.1.2. Proces krystalizace

Krystalizace je multiparametrický proces, který zahrnuje tři klasické kroky - nukleaci, růst krystalů a ukončení růstu krystalů. První důležitá podmínka při krystalizaci je posun proteinu do stavu přesycení a následného rovnovážného procesu, kdy je cíl kladen na minimální nukleaci a optimální růst krystalů. Metody krystalizovatelnosti proteinů se obvykle aplikují na celé řadě chemických změn, jako je pH, iontová síla kovových iontů nebo použití detergentů. Fyzikální faktory jakými jsou teplota, gravitace, povrch, viskozita, včetně dielektrických vlastností nebo vibrací musí být rovněž při krystalizaci brány v úvahu. Biochemické faktory jako čistota nebo agregace mohou ovlivnit úspěšnost růstu krystalů. Vzhledem k víceparametrické povaze krystalizačních procesů a rozmanitosti jednotlivých proteinů, je doporučeno získat ještě před vlastní krystalizací co nejvíce informací o studovaných proteinech (Kutá Smatanová 2008).

U krystalizačních experimentů obecně platí, že tyto experimenty probíhají ve dvou krocích. První krok je zkouška (screening) rozpustnosti proteinu se zřetelem k použitému srážecímu činidlu (precipitantu). Obvykle se v tomto kroku protein vysráží jako amorfni sraženina, což znamená, že koncentrace srážecího roztoku byla příliš vysoká k tomu, aby narostly krystaly. Ve druhém kroku dochází k optimalizaci podmínek prvního kroku tak, aby došlo k tvorbě krystalů. Pro pozorování

krystalizačních pokusů se nejčastěji používá stereomikroskop. Krystaly jde obvykle snadno odlišit od amorfni sraženiny. Existuje několik metod k testování charakteru krystalů. Patří mezi ně deformační zkouška, dehydratační test, test vázání aplikovaného barviva, gelová elektroforéza a rentgenová difrakce (Kutá Smatanová 2008).

Makromolekulární krystalizace proteinů, nukleových kyselin, a větších makromolekulárních komplexů (viry, ribozomy) je založena na poměrně různorodém souboru zásad, zkušeností a nápadů. Neexistuje žádná komplexní teorie, která by se dala aplikovat na všechny proteiny. Makromolekulární růst krystalů je velmi empirický proces a vyžaduje trpělivost, vytrvalost a intuici (McPherson 2004; Kutá Smatanová 2008).

2.1.3. Proteinová krystalografie

V současné době je proteinová krystalografie označována jako málo prozkoumaná oblast (McPherson *et* Weickmann 1990). Proteinová krystalizace představuje proces, ve kterém se protein pomalu vysráží z jeho roztoku. Přítomnost nečistot a jiných neznámých faktorů hraje v tomto procesu důležitou roli. Podle obecného pravidla platí: čistší protein znamená lepší šanci pro vznik a růst krystalů. Čistota ovlivňuje katalytickou aktivitu enzymu. Na druhé straně by neměly být přítomny žádné jiné sloučeniny, a také všechny molekuly proteinu musí mít stejné vlastnosti povrchu, zejména rozložení náboje na povrchu. Hmotnostní spektrometrie je cenným nástrojem při proteinových krystalizacích, používá se například při kontrole exprese proteinu, čistoty přípravy těžkých atomových derivátů, a také ke zjištění povahy proteinových konstruktů (Chen *et al.* 1994).

Krystalizace makromolekul je ovlivňována mnoha fyzikálně-chemickými parametry. Mezi nejčastější parametry patří koncentrace proteinu, koncentrace srážecího roztoku, pH a teplota. Specifická aditiva, která také mohou mít vliv na krystalizaci, jsou přidávány v nízké koncentraci. V první fázi krystalizačního procesu se identifikují chemické, biochemické a fyzikální podmínky, které poskytují jakýkoliv krystalický materiál a následně dochází k systematické změně těchto počátečních podmínek k dosažení optimálních krystalů použitelných pro difrakční analýzu (Kutá Smatanová 2008).

2.1.4. Postup proteinové krystalizace

Krystalizace proteinů zahrnuje čtyři důležité kroky. Prvním krokem je charakteristika a čistota proteinu. Pokud vzorek proteinu není čistý, je nutné provést další purifikační krok pro dosažení úspěšné krystalizace. Některé proteiny se vysráží při nízké koncentraci soli, ostatní pouze z vysoce koncentrovaných roztoků solí, a v některých případech se protein vysráží pouze tehdy, když se odstraní sůl z roztoku. Vzhledem k "salting-out" efektu je tato metoda široce používána pro selektivní vysrážení a čištění proteinů tvořících směs. V posledních letech se také stále častěji používají polymerní látky (polyethylenglykol (PEG) v různých délkách polymerů), stejně jako organická rozpouštědla (ethanol, aceton, methylpentandiol (MPD)). Nejběžnější pufrů mají být účinné v rozsahu pH v rozmezí od 6,0 do 8,0, protože nejvíce fyziologicky stabilních proteinů je v oblasti neutrálního pH. Podmínky podobné jako při izolaci purifikaci proteinů jsou následně použity v krystalizačních experimentech (Kutá Smatanová 2008).

Druhým krokem je rozpustnost proteinu ve vhodném rozpouštědle, z kterého se protein následně převede do krystalické formy. Rozpouštědlo je obvykle voda-pufr, někdy s přidáním organického rozpouštědla, jako je 2-methyl-2 4-pentandiol (MPD). Srážecí roztok je také přidán, ale pouze v takové koncentraci, aby nevznikala sraženina. Membránové proteiny, které jsou nerozpustné v soustavě voda-pufr nebo voda-organické rozpouštědlo, vyžadují přidání detergentu. Rozpustnost proteinů ve vodě závisí na parametrech jako je teplota, pH a přítomnost dalších komponentů v roztoku, jakož i složení aminokyselin (Kutá Smatanová 2008).

Třetím krokem je přesycení a nukleace. Je-li koncentrace roztoku proteinu větší než limit rozpustnosti, roztok je přesycen. V tomto stavu se protein začne slučovat. Slučování se projevuje ve dvou fázích jako nukleace a růst. Nukleace je nejsložitější krok, který představuje první fázový přechod, kdy začínají převažovat interakce protein-protein, ale molekuly jsou pořád ještě v neuspořádaném stavu (Kutá Smatanová 2008). Tento fenomén nukleace je popsán v teorii statistického kolísání vlastností roztoku (Haas *et al.* 1999). Podle této teorie "fáze tekutého proteinu" se tvoří kritická komplexní krystalizační jádra (McPherson 2004).

Během nukleace se proteinové molekuly spojují do komplexu jako amorfní sraženiny nebo mikrokristaly. Amorfní sraženiny mají tendenci být převládající, když je

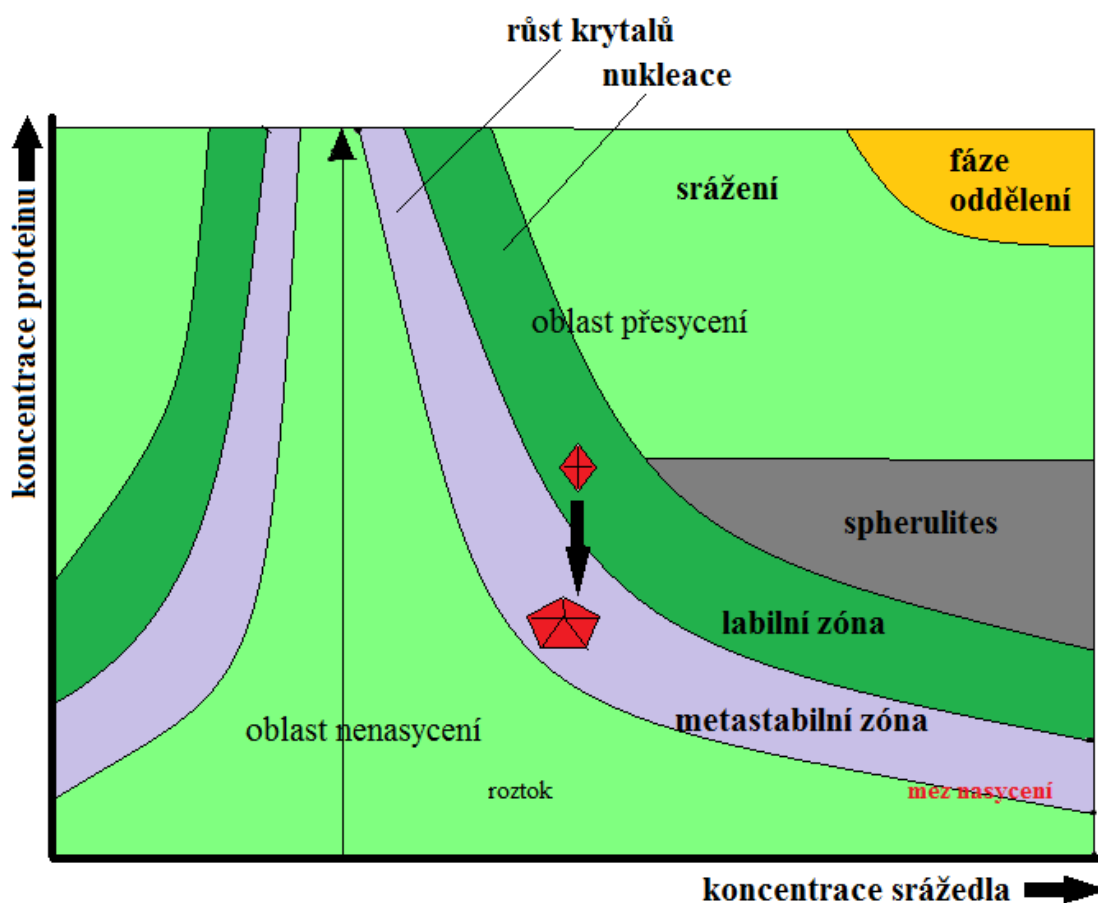
koncentrace proteinu výrazně nad limitem nasycení (saturací). Kromě toho, krystaly rostou mnohem pomaleji než amorfni sraženiny, takže, je-li koncentrace proteinů nad bodem nasycení příliš vysoko, sraženiny opět převládají. Je-li v metastabilní oblasti přítomno málo jader, budou tyto nadále růst, ale bez spontánního vzniku nových jader. Růst bude pomalý a řádný a bude produkovat větší a větší monokrystaly. Krystalizace malých molekul je popsána jako spontánní tvorba jader vyžadující dodání energie povrchového napětí. Jakmile dojde k překonání energetické bariéry, začne růst krystalů. Energetickou bariéru je snazší překonat na úrovni vyššího přesycení. Z tohoto důvodu je spontánní tvorba jader nejlépe dosáhnuta při vysokém přesycení. Mnoho vědců předpokládá, že toto platí i pro krystalizaci proteinů. Vznik jader, funkce přesycení a dalších parametrů mohou být studovány řadou technik, včetně rozptylu světla, fluorescenční depolarizací, nebo elektronovou mikroskopií (Kutá Smatanová 2008).

Posledním čtvrtým krokem je růst makromolekulárních krystalů, tento proces je charakterizovaný lépe než samotná nukleace. Proteinové krystaly rostou hlavně po klasických vrstvách dislokací růstu, dochází k růstu z 2D nukleace, stejně jako normálnímu růstu z 3D nukleace. Podobně jako nízká molekulová hmotnost sloučenin, upevnění nových molekul na povrchu rostoucích krystalů se děje v postupných krocích na povrchu. Tyto kroky vedou buď k vytvoření dislokací v krystalickém růstu, nebo dojde k tvorbě jader náhodně na povrchu. Růst proteinových krystalů musí být prováděn v prostředí, které umožňuje změnit rozpustnost proteinu nebo vlastnosti srážecího roztoku za použití jedné z krystalizačních strategií.

2.2. Fázový diagram

Fázový diagram je mapa, která popisuje závislost stavu materiálu (např. koncentrace proteinu) jako funkci okolních podmínek (např. teplota, koncentrace srážecího roztoku, aj.). Kompletní fázový diagram zobrazuje stav materiálu v závislosti na všech relevantních proměnných systému. Pro proteinový roztok jsou tyto proměnné: koncentrace proteinu, teplota a vlastnosti rozpouštědla (Kutá Smatanová 2008). Nejčastější formou zobrazení pro proteiny je 2D fázový diagram (Asherie 2004). Fázový diagram umožňuje předpovědět podmínky, za kterých můžou proteiny krystalizovat. Zobrazování krystalizačních procesů proteinů pomocí fázových diagramů začalo relativně nedávno, a zatím je nejasné, jaký typ fázových diagramů může existovat pro vodné roztoky proteinů. Existují pouze dva druhy proteinů, pro které byly

vytvořeny kompletní fázové diagramy, a to lysosym a γ -crystalin (Asherie 2004). Fázový diagram popisuje proteinovou krystalizaci pomocí křivky rozpustnosti, přičemž platí, že krystaly mohou růst pouze v oblasti přesycení (Kutá Smatanová 2008).



Obrázek 1: Fázové diagramy pro popis krystalizace proteinů zobrazují závislost koncentrace proteinu (rozpustnost proteinu) na koncentraci srážecího roztoku. Homogenní fáze obsahuje částice rozpuštěné látky (proteinu) a částice rozpouštědla. Rovnovážná koncentrace nebo rozpustnost (C_e) je koncentrace rozpuštěné látky (proteinu) v rozpouštědle, která je v rovnováze s nerozpuštěnou látkou (protein v krystalu), při dané teplotě a tlaku. Pro nasycený roztok platí: $C = C_e$, pro přesycený roztok je: $C > C_e$ a pro nenasycený roztok: $C < C_e$ (McPherson 1999). Pro dosažení nejlepších výsledků krystalizace by protein měl být krystalizován z roztoku na nižší úrovni přesycení (Kutá Smatanová 2008).

Vytvoření přesyceného stavu je základním požadavkem pro krystalizaci makromolekul. Tento nerovnovážný stav, kdy se některé makromolekuly nachází nad hranicí rozpustnosti, za určitých chemických a fyzikálních podmínek není v roztoku přítomen. Nerovnováha se obnoví tvorbou pevných seskupení (krystaly) a tím je dosažen limit nasycení. K získání efektu přesyceného roztoku musí být vlastnosti

nenасыceného roztoku upraveny tak, aby se snížila schopnost látky rozpouštět se na molekuly, nebo musí být změněna rozpustnost látky a zároveň zvýšena vzájemná přitažlivost molekul v roztoku (McPherson 2004). Nejsou-li při změně podmínek získány zárodky krystalů, rozpuštěná látka nebude oddělena z roztoku a roztok zůstane v přesyceném stavu. Když je mez nasycení překročena energií chemické reakce, tato energie je použita k vytvoření stabilního jádra krystalu nebo sraženiny. Jestliže vznikne stabilní jádro v přesyceném roztoku, bude pokračovat růst krystalu, až do doby kdy systém získá rovnováhu (Kutá Smatanová 2008).

2.2.1. Snížení rozpustnosti proteinu

Pro snížení rozpustnosti proteinu v roztoku lze použít několik postupů podle Kuté Smatanové (2008):

- Změna proteinu samotného, např. když se změnou pH změní ionizační stav povrchových aminokyselinových zbytků.
- Změna chemické aktivity vody přidáním soli.
- Změna stupně přitažlivosti jedné proteinové molekuly pro jinou změnou pH nebo přidáním soli.
- Změna charakteru interakcí mezi molekulami proteinu a rozpouštědla přidáním polymerů nebo iontů.

K dosažení růstu krystalů se musí stav přesycení snížit na úroveň poblíž limitu nasycení; zachování vysokého přesycení by mělo za následek vznik velkého množství krystalizačních jader a tím pádem i příliš mnoho malých krystalů. Kromě toho by měly krystaly růst pomalý k dosažení maximálního stupně uspořádání (Kutá Smatanová 2008).

2.2.2. Precipitace proteinu

Srážení neboli precipitace proteinu lze dosáhnout několika způsoby. Často se k proteinovému roztoku přidává sůl nebo polyethylenglykol (PEG). Princip je založen na imobilizaci molekul vody, která má za následek zvýšení efektivní koncentrace proteinu. Některé proteiny jsou špatně rozpustné ve vodě a přidáním malého množství soli se jejich rozpustnost zvyšuje. Proces rozpustnosti proteinu v koncentrovaném solném roztoku je složitý. Proces může být popisován jako konkurence mezi solnými

ionty (hlavně anionty) a molekulami proteinu pro vázání molekul vody, které jsou nezbytné pro rozpustnost. Některé solné ionty, zejména kationty, jsou nutné k zajištění rozpustnosti proteinů. Při nízkých koncentracích solí je rozpustnost proteinu nedostačující a krystaly se mohou začít tvořit (Kutá Smatanová 2008).

Odstraněním soli se protein může srážet. Tento "salting-in" efekt je vysvětlen, pokud bereme proteiny jako iontové sloučeniny. Podle teorie Debye-Hückela (1923) pro iontové roztoky, zvýšená iontová síla snižuje aktivitu iontů v roztoku a zvyšuje rozpustnost iontových sloučenin. Alternativně může být tento "salting-in" efekt považován jako důsledek konkurence mezi nabitými skupinami na povrchu molekuly proteinu a iontů v roztoku. Naopak "salting-out" efekt je hlavním dehydratačním testem. Jiná metoda srážení proteinu (precipitace) je snížení odpudivé síly mezi molekulami proteinu nebo zvýšení přitažlivé síly mezi molekulami. Tyto síly mohou být různého typu (např.: hydrofobní, elektrostatické aj.). Elektrostatické síly jsou ovlivněny organickým rozpouštědlem, jako je např. alkohol nebo také změna pH. Pevnost hydrofobních interakcí se zvyšuje s teplotou (Kutá Smatanová 2008).

2.2.3. Srážecí roztoky

Srážecí roztoky (srážedla, precipitanty, precipitační činidla) proteinů spadají do čtyř hlavních kategorií: 1. Soli, 2. Organická rozpouštědla, 3. Dlouhé řetězce polymerů a 4. Nízkomolekulární polymery netěkavých organických sloučenin (Kutá Smatanová 2008).

Soli představují konkurenci pro molekuly vody a mají vliv hlavně na dehydrataci proteinu. Organická rozpouštědla snižují dielektrické vlastnosti rozpouštědla, které zprostředkovává makromolekulární interakce v roztoku. Vzhledem k tomu, že koncentrace organického rozpouštědla se zvyšuje a přitažlivost mezi makromolekulami se také zvyšuje, rozpouštědlo se stává méně účinné (McPherson 2004). Některé polymery (PEG) vyvolávají účinky objemového vyloučení, které také indukuje oddělení makromolekul z roztoku. Polymerní precipitanty zabírají mnohem více místa v prostoru makromolekuly ve srovnání s rozpouštědlem a tím pádem se makromolekuly oddělí a vytvoří v pevném stavu krystaly (McPherson 2004).

V praxi je množství proteinu pro krystalizační experimenty velmi malé. Je to z důvodu charakteru proteinů a možností jejich exprese a purifikace. Pro stanovení

nejlepších krystalizačních podmínek je obvykle nutné provést velké množství experimentů, proto by mělo být použito minimální množství proteinu pro daný experiment. Proteinový krystal měří přibližně 0,027 mm³ a váží přibližně 15 mikrogramů. 1 mg čistého proteinu by měl být dostačující k provádění asi 65 krystalizačních experimentů (Kutá Smatanová 2008).

Tabulka 1: Rozdělení srážecích roztoků podle Kuté Smatanové (2008).

Soli	Těkavé organické sloučeniny	Polymery	Netěkavá organická rozpouštědla
fosforečnan a síran amonný	Ethanol	PEG 1000, 3350, 6000, 8000, 20000	2-methyl-2,4-pentandiol
lithium fosfát	propanol a isopropanol	jeffamin	ethylen glycol 400
NaCl, KCl, NH ₄ Cl, fosfát, acetát, vlnan	1,3-propandiol	polyamin	
MgSO ₄ , CaSO ₄ , CaCl ₂ , MgCl ₂	Dioxan		
formiát sodný nebo horečnatý	Aceton		
	Methanol		

2.3. Krystalizační metody

2.3.1. „Sitting drop vapor diffusion“ - metoda sedící kapky

Metoda sedící kapky je oblíbenou metodou při krystalizaci makromolekul proteinů. Princip je jednoduchý a je založen na difúzi vodních par mezi kapkou a rezervoárem obsahujícím srážecí roztok. Kapička sedící kapky obsahuje vždy směs vzorku (proteinu) a srážecího roztoku. Kapička činidla má obvykle nižší koncentraci než srážecí roztok v rezervoáru. Pro dosažení rovnováhy mezi kapkou a rezervoárem opouští vodní pára kapku, vzorek prochází stádiem zvyšování relativní supersaturace (přesycení). Jak ve vzorku, tak v činidle se zvyšuje koncentrace a voda přechází do rezervoáru. Rovnováhy je dosaženo, když koncentrace činidla v kapce je stejná jako v rezervoáru (Kutá Smatanová 2008).

Výhody této metody jsou:

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

2.3.2. „Hanging drop vapor diffusion“ - metoda visící kapky

Metoda visící kapky je nejpobulárnější metoda pro krystalizaci makromolekul proteinů především pro svoji jednoduchost. Princip je založen na difúzi vodních par. Kapka, která vznikla smícháním vzorku proteinu a srážecího roztoku má nižší koncentraci než činidlo v rezervoáru. Voda při této metodě opouští kapku a vzorek prochází stádiem supersaturace. Koncentrace se zvyšuje jak v kapce, tak v rezervoáru (vlivem vyloučení vody). Koncentrace v kapce a rezervoáru se postupně vyrovnají.

Výhody této metody jsou:

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

2.3.3. „Counter-diffusion“ - metoda krystalizace v kapilárách

Tato metoda krystalizace proteinů patří mezi pokročilé krystalizační techniky a je možné ji označit jako metodu jednoduchou, nenákladnou, efektivní a vhodnou pro získání krystalů vhodných pro jejich pozdější analýzu (Garcia-Ruiz *et al.* 1993). Vzorek proteinu a srážecího roztoku jsou umístěny na sobě a při krystalizaci oba roztoky do sebe pronikají (protisměrně) (Kutá Smatanová 2008). Tím dochází k přesycení a začínají se tvořit mikrokrystaly, po ústupu přesycení vznikají větší a kvalitnější krystaly vhodné pro další analýzu (Garcia-Ruiz *et al.* 1993). Celý pokus spočívá na základě správně zvolené koncentrace proteinu a srážecího roztoku stejně jako u ostatních metod (Garcia-Ruiz *et al.* 2001).

2.3.4. „Microbatch“ - metoda krystalizace pod olejem

Tato metoda je založena na principu smíchání roztoku vzorku a srážecího roztoku (precipitantu), který se poté vnáší mikropipetou pod vrstvu parafínového oleje. Parafínový olej zabraňuje rychlé difúzi vody (Kutá Smatanová 2008).

2.4. Halogenalkandehalogenasy

Halogenalkandehalogenasy jsou bakteriální enzymy, které štěpí vazbu mezi halogenem (Br, Cl, F, I) a uhlíkem v halogenderivátech uhlovodíků (Damborský *et al.* 2010) na odpovídající alkoholy (Stsiapanava *et al.* 2008). První halogenalkandehalogenasa byla izolována v roce 1985 z bakterie *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 (Keuning *et al.* 1985) a sloužila jako vzorový enzym pro izolaci jiných halogenalkandehalogenas (Damborský *et al.* 2010). Fylogenetická analýza ukázala, že lze dehalogenasy (HLD) rozdělit do tří podrodin: HLD-I, HLD-II, HLD-III (Chovancová *et al.* 2007). Počet praktických aplikací využívaných při experimentech na halogenalkandehalogenasach vzrostl z důvodů znalosti jejich vlastností a strukturních a funkčních vztahů. Halogenalkandehalogenasy nacházejí své uplatnění např. v bioremediaci látek znečišťující životní prostředí (Stucki *et Thuer* 1995), v biosnímání toxických chemických látek (Campbell *et al.* 2006), průmyslové katalýze (Janssen 2007), dekontaminaci látek (Prokop *et al.* 2005) a stejně jako u buněk na nich lze provést analýzu a zobrazení struktury (Los *et Wood* 2007).

2.4.1. Struktura halogenalkandehalogenas

Halogenalkandehalogenasy patří do skupiny enzymů hydrolas a superrodiny α/β hydrolas (Ollis *et al.* 1992). Proteiny obsažené v této rodině nemají zjevnou sekvenční podobnost, ačkoli mají společného předka. Trojrozměrná struktura halogenalkandehalogenas se skládá ze dvou oblastí: cap domény a hlavní domény (Damborský *et al.* 2010). Cap doména se skládá z několika α -šroubovic spojených smyčkami (Kmunicek *et al.* 2001) a je vložena do hlavní domény, která určuje substrátovou specifitu (Pries *et al.* 1994). Halogenalkandehalogenasy obsahují katalytické zbytky, které představují základní katalytické kyseliny (společná katalytická trojice - triáda) a pár aminokyselin stabilizující halogenid v aktivním místě dehalogenasy. Tyto aminokyseliny se označují jako pentáda (Damborský *et al.* 2010). Pentáda se liší v každé podrodině dehalogenas (Chovancová *et al.* 2007).

2.4.2. Funkce halogenalkandehalogenas

Halogenalkandehalogenasy jsou substrátově specifické enzymy, katalyzující reakce chlorovaných, bromovaných a jodovaných sloučenin; haloalkanů, haloalkenů, haloalkoholů, haloetherů, haloesterů, haloacetamidů, haloacetonitrilů a cyklohaloalkanů (Damborský *et al.* 2001). Substrátová specifita halogenalkandehalogenas je primárně určena strukturou cap domény. Vazba substrátu a štěpení halogenderivátu probíhá velice rychle, což má za následek akumulaci meziprojektu alkyl-enzymu, který se poté přetváří hydrolyzou pro dehalogenaci (Damborský *et al.* 2010).

2.4.3. Halogenalkandehalogenasa DhaA

Halogenalkandehalogenasa DhaA je enzym, který je izolovaný z grampozitivní bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (Kulakova *et al.* 1997). Některé struktury mutantů DhaA byly již publikované (Newman *et al.* 1999). Hlavní α/β -hydrolasová doména v DhaA tvoří místo pro substrát a katalytické zbytky. Druhou část enzymu tvoří cap doména, která je složena z α -šroubovic aminokyselin. Tato doména je strukturálně více variabilní a ovlivňuje substrátovou specifitu těchto enzymů (Chovancová *et al.* 2007). V aktivním místě se nachází katalytická pentáda, kterou tvoří nukleofilní Kyselina asparagová 106, báze Histidin 272, katalytická kyselina Glutamin acid 130 a dvě aminokyseliny stabilizující halogenid Asparagin 41, Tryptofan 107 (Pavlová *et al.* 2009, Stsiapanava *et al.* 2011).

2.4.3.1. Funkce enzymu DhaA

Enzym DhaA je zvláště zajímavý, protože umožňuje velmi pomalou konverzi toxické sloučeniny, dokáže detoxikovat lidský karcinogen 1,2,3-trichlorpropan (TCP) (Bosma *et al.* 1999, Stsiapanava *et al.* 2008) na 2,3-dichloropropan-1-ol v laboratorních podmínkách (Schindler *et al.* 1999). Katalytická aktivita enzymu je ale příliš malá při použití v průmyslovém měřítku. Praktické využití DhaA vůči detoxikaci TCP se výrazně zlepšilo vlivem evoluce a výzkumu zaměřeného na mutagenезi DhaA (Lahoda *et al.* 2010).

2.4.3.2. Varianty mutace DhaA

Dnes je již známo několik DhaA mutantů a jejich 3D struktury jsou řešeny (Klvana *et al.* 2009). Pro zvýšení účinnosti detoxikace TCP byl vytvořen mutant DhaA31, který má 32x vyšší katalytickou aktivitu a 26x vyšší katalytickou účinnost než původní typ tohoto enzymu (Pavlová *et al.* 2009). Rychlost katalytické reakce mutantu DhaA31 je k_{cat} 1,26 s⁻¹ a hodnota K_m je 1,2 mM. Pozice pro mutagenезi tohoto enzymu byly vybrány pomocí počítačových programů na základě modelování struktury. DhaA31 má velké aromatické zbytky na dvou ze tří náhodných pozic a ve dvou polohách modifikovaných v cíleném místě mutagenезe. Tyto změny zvyšují aktivitu vůči TCP snížením přístupnosti aktivního místa na molekuly vody, tím podporují tvorbu aktivovaného komplexu (Lahoda *et al.* 2010). Kinetické analýzy potvrdily, že mutace DhaA zlepšily štěpení a posunuly rychlost určující krok k tvorbě produktů (Pavlová *et al.* 2009). Nativní DhaA a mutantní DhaA31 jak ve volné formě, tak i v komplexu s TCP, poskytnout hodnotné strukturální informace o molekulárním základě zvýšené katalýzy (Lahoda *et al.* 2010). Dalšími novými variantami mutace DhaA jsou mutanti DhaA57 a DhaA80, které mají posílenou strukturální a kinetickou stabilitu v přítomnosti dimethylsulfoxidu (Plevaka *et al.* 2013).

Dalšími mutanty DhaA, u kterých byla stanovena struktura, jsou DhaA04, DhaA14 a DhaA15 (Stsiapanava *et al.* 2010). Struktura DhaA04 obsahovala v aktivním místě s největší pravděpodobností jako ligand kyselinu benzoovou, zatímco struktury DhaA14 a DhaA15 obsahovaly v aktivním místě 2-propanol a jeden chloridový iont. Nejvýznamnější odchylky ve struktuře DhaA04 ve srovnání se strukturami DhaA14 a DhaA15 jsou ve flexibilní části proteinu. Pentáda a chloridový iont je u DhaA04,

DhaA14 a DhaA15 na téměř totožné pozici (Stsiapanava *et al.* 2010). Jiným mutantem DhaA je DhaA12, který je nejaktivnější kumulativní mutant vůči 1,3-dibromopropanu (DBP) ve srovnání s DhaA základního typu (Emmer 2007).

2.5. Thermolysin

Thermolysin je bakteriální termostabilní neutrální enzym ze skupiny proteas a rodiny hydrolas produkovaný bakterií *Bacillus sphaerothermophilus* (Endo 1962). Thermolysin hydrolyzuje peptidové vazby hydrofobních zbytků na amínové části, především v Leucinu, Isoleucinu, Valinu a Phenylalaninu (Matsubara 1966). Aktivitu enzymu způsobuje zinečnatý iont, stabilitu udržují 4 ionty vápníku (Feder *et al.* 1971, Latt *et al.* 1969). Tiani (1972) uvádí, že 3D struktura a sekvence aminokyselin thermolysinu byla již vyřešena a to na základě krystalografické struktury (Matthews 1988).

3. Materiál a metodika

Bakalářská práce je zaměřena na studium vybraných proteinů pomocí krystalizačních metod a na hledání podmínek vhodných pro vypěstování proteinových krystalů. K dispozici byly dva proteiny, protein modelový (Thermolysin) a protein, na kterém byly testovány krystalizační podmínky – mutantní varianta DhaA31 halogenalkandehalogenasy DhaA z bakterie *Rhodococcus rhodochrous*.

Celý experiment byl rozdělen do několika fází. V první fázi šlo o zjištění čistoty obou proteinů pomocí gelové elektroforézy. Ve druhé fázi byly připraveny srážecí roztoky. Třetí fáze experimentu byla krystalizace obou proteinů pomocí základních krystalizačních metod a byla použita také jedna metoda pokročilá. Ve čtvrté fázi se zhodnotily výsledky krystalizace a prováděly se testy na krystalech. Poslední pátá fáze experimentu byla založena na modelování struktury proteinu DhaA31 pomocí počítačových programů.

3.1. Gelová elektroforéza (SDS-PAGE)

Prvním krokem pro úspěšnou krystalizaci je zjištění čistoty proteinu. Čistota studovaných proteinů byla zjišťována gelovou elektroforézou (SDS - PAGE) v polyakrylamidovém gelu. Tato metoda je častá v biochemii, genetice, imunologii a také v molekulární biologii a používá se pro separaci proteinu na základě jejich elektroforetické pohyblivosti.

3.1.1. Příprava spodního (lower) gelu

Nejdříve se sestavila sestava pro SDS-PAGE ze dvou skel a těsnění, poté byl připraven spodní (lower) gel. Spodní gel byl připraven smícháním 3,3 ml H₂O, 4 ml akrylamidu, 2,5 ml 1,5 M Tris, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% persulfátu amonného a 0,008 ml TEMEDu (TEMEDu se přidalo 2x více z důvodů urychlení polymerace). Roztok spodního gelu byl aplikován pomocí mikropipety mezi sklíčka SDS-PAGE zhruba do dvou třetin. Na spodní gel se stříčkou přidal etanol pro zarovnání hladiny gelu. Takto připravený spodní gel s SDS-PAGE se nechal 30 minut odstát (aby gel ztuhnul). Po uplynutí této doby se etanol odstranil.

3.1.2. Příprava svrchního (higher) gelu

Svrchní (higher) gel byl připraven obdobně jako gel spodní. Roztok svrchního gelu se připravil z 2,7 ml H₂O, 0,67 ml 30 % akrylamidu, 0,5 ml 1 M TRIS (pH 6,7), 0,04 ml 10 % SDS, 0,04 ml 10 % persulfátu amonného a 0,004 ml TEMEDu (TEMEDu opět dvojnásobek než by měl být). Roztok tohoto gelu byl přidán mikropipetou mezi skla do poslední třetiny objemu. Do tohoto gelu se poté vložil plastový hřebínek pro vytvoření drážek v gelu pro nanášení proteinu. Po ztuhnutí gelu se hřebínek opatrně vyndal. Hřebínek vytvořil 12 komůrek pro nanášení vzorků.

3.1.3. Vlastní SDS-PAGE elektroforéza

Sklička s gelem byly umístěny do drážek komory SDS-PAGE a celá komora se naplnila již připraveným Running pufrém. Tento pufr je složen z 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS. Do drážek vytvořených hřebínkem se pipetovaly vzorky a marker vždy ob jednu přepážku z důvodu lepšího přehledu. Do první a předposlední přepážky se pipetoval marker (range molecular weight marker) od firmy Bio-Rad Laboratories, který obsahoval proteiny se známou molekulární hmotností a sloužil k určení molekulárních hmotností studovaných proteinů. Do ostatních komůrek se pipetoval vždy sample buffer a protein. Sample buffer je vzorkový pufr, který je složen ze 40% glycerolu, 240 mM Tris/HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.04% bromfenolové modré a 5% beta-mercaptoethanolu. Sample buffer připravuje vzorek proteinu pro elektroforézu a to tak, že SDS pokrývá molekuly proteinu a dává jim negativní náboj a glycerol zahušťuje vzorek proteinu a tím usnadňuje přechod proteinu přes póry gelu. Do druhé a třetí komůrky se pipetoval roztok proteinu DhaA31 se sample bufferem (druhá komůrka 5 μ l roztoku proteinu DhaA31 + 5 μ l SB, třetí komůrka 1 μ l roztoku proteinu DhaA31 + 5 μ l SB). Do páté a šesté komůrky se pipetoval mikropipetou roztok proteinu Thermolysinu se sample bufferem (pátá komůrka 5 μ l roztoku proteinu Thermolysinu + 5 μ l SB, šestá komůrka 1 μ l roztoku proteinu Thermolysinu + 5 μ l SB) (Tabulka 2).

Tabulka 2: Rozvržení koncentrací proteinů se sample bufferem na SDS-PAGE gelu.

I.	II.	III.	V.	VI.	VII.
Marker	DhaA31 5 μ l + 5 μ l SB	DhaA31 1 μ l + 5 μ l SB	Therm 5 μ l + 5 μ l SB	Therm 1 μ l + 5 μ l SB	Marker

Poté byla ke každému vzorku přidána methylová modř (pro zabarvení proteinu na výsledném gelu po elektroforéze). Následně byla komora SDS-PAGE dolita po okraj a uzavřena. Na svorky se připevnila anoda a katoda dle komplementarity. Elektroforéza byla nastavena na 1,5 hodinu při stejnosměrném elektrickém proudu o napětí 21 mA. Po uplynutí této doby se kryt komory odkryl a sklíčka SDS-PAGE opatrně odebraly ze štěrbin. Po rozložení sklíček a odstranění těsnění, se opatrně vybral gel za pomoci skalpelu. Gel byl umístěn do krabičky s roztokem metanolu, kyseliny octové a vody (Destaining solution for Coomassie brilliant blue R250) a nechal se vyvíjet. Poté byl gel vyjmut a byla posouzena čistota studovaných proteinů.

3.2. Příprava krystalizačních roztoků

Druhý krok pokusu byl založen na přípravě krystalizačního roztoku vhodného pro krystalizaci zkoumaných proteinů (Thermolysin, DhaA31). Roztoků bylo připraveno celkem 100 ml, jednotlivé komponenty roztoků se počítaly jednoduchou matematickou operací na základě známých krystalizačních podmínek.

3.2.1. Krystalizační roztok pro DhaA31

Krystalizační nebo precipitační (srážecí) roztok byl připraven smícháním: 100mM MES (morpholinoethan sulfonic acid), 29% PEG 4000 (Polyethylenglykol 4000) a destilované vody.

$$100 \text{ mM} = 0,1 \text{ M}$$

$$1\text{M MES} = 195,2\text{g} / 1 \text{ mol}$$

$$0,1 \text{ M MES} \dots 19,52 \text{ g v 1 litru} = \underline{1,952 \text{ g ve 100 ml}}$$

$$\text{PEG: } 100 \% = 100 \text{ g, } 29\% = \underline{29 \text{ g ve 100 ml}}$$

$$\text{Voda: } 100 - (29 + 1,952) = \underline{69,048 \text{ g}}$$

3.2.2. Krystalizační roztok pro Thermolysin

Pro protein Thermolysin nebyl připravován krystalizační srážecí roztok, ale použily se již připravené srážecí roztoky z krystalizační sady CrystalScreen od firmy Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA). Srážecí roztoky byly vybrány podle krystalizačních podmínek pro krystalizaci Thermolysinu a byly vyhledány v seznamu roztoků CrystalScreen. Poté se podle seznamu dohledaly v sadách srážecích roztoků vhodné krystalizační roztoky, které byly následně použity jako srážecí roztoky při krystalizaci tohoto proteinu. Tyto roztoky a jejich složení jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tabulka 3: Použité komerční srážecí roztoky pro protein Thermolysin a jejich složení.

Číslo srážedla	Sůl	Pufr	Srážedlo (Precipitant)	pH
4		0,1 M Sodium acetate trihydrate	2,0 M Ammonium sulfate	8,5
7		0,1 M Sodium cacodylate trihydrate	1,4 M Sodium acetate trihydrate	6,5
15	0,2 M Ammonium sulfate	0,1 M Sodium cacodylate trihydrate	30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	6,5
16		0,1 M HEPES sodium	1,5 M Lithium sulfate monohydrate	7,5
17	0,2 M Lithium sulfate monohydrate	0,1 M TRIS hydrochloride	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	8,5
18	0,2 M Magnesium acetate tetrahydrate	0,1 M Sodium cacodylate trihydrate	20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	6,5
22	0,2 M Sodium acetate trihydrate	0,1 M TRIS hydrochloride	30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	8,5
25		0,1 M Imidazole	1,0 M Sodium acetate trihydrate	6,5
29		0,1 M HEPES sodium	0,8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	7,5
30	0,2 M Ammonium sulfate		30 % w/v Polyethylene glycol 8,000	7
31	0,2 M Ammonium sulfate		30 % w/v Polyethylene glycol 4,000	7
35		0,1 M HEPES sodium	0,8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate	7,5
36		0,1 M TRIS hydrochloride	8 % w/v Polyethylene glycol 8,000	8,5
37		0,1 M Sodium acetate trihydrate	8 % w/v Polyethylene glycol 4,000	4,6
39		0,1 M HEPES sodium	2 % v/v Polyethylene glycol 400	7,5
41		0,1 M HEPES sodium	10 % v/v 2-Propanol	7,5
42	0,05 M Potassium phosphate monobasic		20 % w/v Polyethylene glycol 8,000	7
43			30 % w/v Polyethylene glycol 1,500	7
44			0,2 M Magnesium formate dihydrate	7
45	0,2 M Zinc acetate dihydrate	0,1 M Sodium cacodylate trihydrate	18 % w/v Polyethylene glycol 8,000	6,5
46	0,2 M Calcium acetate hydrate	0,1 M Sodium cacodylate trihydrate	18 % w/v Polyethylene glycol 8,000	6,5
48		0,1 M TRIS hydrochloride	2,0 M Ammonium phosphate monobasic	8,5

3.3. Krystalizace a použité krystalizační metody

Třetím krokem byla vlastní krystalizace, při které se nejdříve určily potencionální srážecí roztoky, s použitím kterých by dané proteiny mohly krystalizovat. Po určení srážecích roztoků se přistoupilo k vlastním pokusům. Byly použity základní krystalizační metody a to metoda sedící kapky („sitting drop vapor diffusion“) a visící kapky („hanging drop vapor diffusion“), a také krystalizace pod olejem („microbatch“) a dále pokročilá krystalizační technika - krystalizace v kapilárách („counter diffusion“).

3.3.1. Metoda sedící kapky („Sitting drop vapor diffusion“)

Nejdříve se udělal malý pokus sedící kapky na proteinu DhaA31 v Petriho misce. Mikropipetou se napipetovaly tři kapky do Petriho misky. Každá kapka obsahovala roztok proteinu DhaA31 a srážecího roztoku, které vzniklo smícháním 100mM MES (morpholinoethan sulfonic acid), 29% PEG 4000 (Polyethylenglykol 4000) a destilované vody. První kapka obsahovala 3 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu, druhá 2 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu a třetí 3 μ l srážecího roztoku a 2 μ l roztoku proteinu (Tabulka 4).

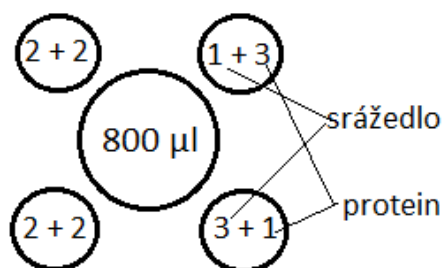
Tabulka 4: Obsah příměsí srážecího roztoku a roztoku proteinu DhaA31 při prekrytalizačním testu (srážecí roztok = směs 100mM MES, 29% PEG 4000 a destilovaná voda, protein = roztok proteinu DhaA31).

I.	II.	III.
3 μ l srážecí roztok + 3 μ l roztoku proteinu	2 μ l srážecí roztok + 3 μ l roztoku proteinu	3 μ l srážecí roztok + 2 μ l roztoku proteinu

Poté se miska uzavřela víčkem a zaizolovala parafilmem (proti přístupu vzduchu). Takto se postupovalo u obou proteinů.

Následně byl proveden pokus v krystalizační destičce pro sedící kapky [CombiClover crystallization plates (EBS plate, Emerald BioStructures, WA, USA)]. Destička má 24 otvorů, u každého otvoru je stojánek na 4 kapky. Do otvoru (rezervoáru) se pipetovalo mikropipetou vždy 800 μ l krystalizačního činidla a do malých otvorů pro kapku se pipetoval roztok proteinu s roztokem srážedla. Srážecí roztok byl přidán k proteinu z rezervoáru. První 2 stojánky (levý horní a levý spodní) pro kapku obsahovaly vždy 2 μ l roztoku proteinu a 2 μ l srážecího roztoku. Třetí (horní

vpravo) stojánek pro kapku obsahoval vždy 1 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu. Čtvrtý (spodní vpravo) stojánek obsahoval 3 μ l srážecího roztoku a 1 μ l roztoku proteinu (Obrázek 2).



Obrázek 2: Schéma krystalizační destičky CombiClover (Protein = roztok proteinu DhaA31, nebo Thermolysinu, Srážecí roztok = směs 100mM MES, 29% PEG 4000 a destilovaná voda pro DhaA31 a roztok z CrystalScreen pro Thermolysin).

Takto se postupovalo u obou proteinů. U proteinu DhaA31 byl použit jako srážecí roztok obsahující PEG 4000, MES a vodu, který byl připraven v druhé fázi celého pokusu. Po ukončení pipetování se destička uzavřela víčkem a zalepila lepicí páskou proti přístupu vzduchu. Fixem se na lepicí pásku napsaly údaje a jméno.

U proteinu Thermolysinu byly použity komerční srážecí roztoky z CrystalScreen od Hampton Research (Aliso Viejo, CA, USA), které se určily ve druhé fázi celého pokusu. Čísla roztoků vybraných z CrystalScreenu v destičce jsou uvedeny v tabulce 5. Po ukončení pipetování se postupovalo stejně jako u destičky na krystalizaci proteinu DhaA31.

Tabulka 5: Srážecí roztoky z CrystalScreen kitu použité při krystalizaci modelového proteinu Thermolysinu v destičce CombiClover pro sedící kapku (složení srážedel je uvedeno v tabulce 3).

	1	2	3	4	5	6
A	4	7	15	16	17	18
B	22	25	29	30	31	35
C	36	37	39	41	42	43
D	44	45	46	48	X	X

3.3.2. Metoda visící kapky („Hanging drop vapor diffusion“)

Nejdříve se opět udělal malý pokus na proteinu DhaA31 v Petriho misce. Do Petriho misky byl přidán srážecí roztok (směs 100mM MES, 29% PEG 4000 a destilovaná voda) přibližně do výšky 3 mm ode dna. Na víčko misky se poté napipetovaly 3 kapky. Vždy se nejdříve pipetoval srážecí roztok (směs 100mM MES, 29% PEG 4000 a destilované vody) a až poté roztok proteinu DhaA31. První kapka obsahovala 3 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu, druhá 2 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu a třetí 3 μ l srážecího roztoku a 2 μ l roztoku proteinu (Tabulka 6). Poté se miska uzavřela víčkem a utěsnila parafilmem (proti přístupu vzduchu). Takto se postupovalo u obou proteinů.

Tabulka 6: Obsah srážecího roztoku a roztoku proteinu DhaA31 při prekrytalizačním testu pro krystalizaci ve visící kapce (srážedlo = směs 100mM MES, 29% PEG 4000 a destilovaná voda, protein = roztok proteinu DhaA).

I.	II.	III.
3 μ l srážecí roztok+ 3 μ l roztok proteinu	2 μ l srážecí roztok + 3 μ l roztok proteinu	3 μ l srážecí roztok + 2 μ l roztok proteinu

Následně byl proveden pokus krystalizace ve visící kapce v krystalizační destičce Limbro plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Tato destička má celkem 24 otvorů ve čtyřech řadách po šesti. Kolem každého otvoru je silikonový gel, který slouží na přilepení a utěsnění krycího sklíčka. Do každého otvoru bylo přidáno 800 μ l srážecího roztoku. Na krycí sklíčko se pipetoval mikropipetou roztok proteinu a srážecího roztoku. První dvě řady v destičce (řada A a B) obsahovaly vždy 2 μ l srážecího roztoku a 2 μ l roztoku proteinu na krycím sklíčku. Ve třetí řadě (řada C) pak vždy 3 μ l srážecího roztoku a 1 μ l roztoku proteinu a ve čtvrté řadě (řada D) se aplikoval vždy 1 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu (Tabulka 7). Po aplikaci kapky na sklíčko se sklíčko musí vždy hned přiklopit na otvor reservoáru a jemně přitlačit. Krycí sklíčko se přilepí za pomoci silikonu.

Tabulka 7: Rozložení obsahu srážecího roztoku a roztoku proteinu v destičce Limbro plate.

	1	2	3	4	5	6
A	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2 μ l
B	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2	2+2 μ l
C	3+1	3+1	3+1	3+1	3+1	3+1 μ l
D	1+3	1+3	1+3	1+3	1+3	1+3 μ l

Takto se postupovalo u obou proteinů. U proteinu DhaA31 byl použit jako krystalizační srážecí roztok obsahující PEG 4000, MES a vodu, který se připravoval v druhé fázi celého pokusu.

U proteinu Thermolysin byly použity jako krystalizační činidla komerční srážecí roztoky ze sady CrystalScreen, které se určily v druhé fázi celého pokusu. Čísla srážecích roztoků z CrystalScreenu v destičce jsou uvedeny v tabulce 8. Některé roztoky v tomto případě testovány nebyly. Po ukončení pipetování se postupovalo stejně jako u destičky na krystalizaci proteinu DhaA31. Po ukončení celého pokusu se destička uzavřela víčkem a na víčko bylo napsáno jméno a údaje o proteinu.

Tabulka 8: Srážecí roztoky z CrystalScreenu použité při krystalizaci modelového proteinu Thermolysinu v destičce Limbro plate (X = prázdné místo v destičce, složení srážecích roztoků v tabulce č. 2).

	1	2	3	4	5	6
A	4	7	15	16	17	18
B	X	25	29	30	X	35
C	36	37	39	41	42	X
D	44	45	46	48	X	X

3.3.3. Metoda krystalizace pod silikonovým olejem („Microbatch“)

K této metodě byla použita speciální destička určená pro krystalizaci pod olejem – Terasaki plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Destička obsahuje 72 otvorů v šesti řadách A-F a dvanácti sloupcích 1-12. Nejdříve se do připravené destičky aplikovalo 4 ml oleje, který vznikl smícháním dvou olejů, a to oleje parafinového (2 ml) a oleje silikonového (2 ml). Poté se opatrně nanášely mikropipetou kapky srážecího roztoku a roztoku proteinu (vždy nejdříve roztok srážedla) do otvorů destičky. V prvních dvou řadách (řada A a B) byly aplikovány 2 μ l srážecího roztoku a 2 μ l roztoku

proteinu, ve třetí (řada C) řadě 1 μ l srážecího roztoku a 2 μ l roztoku proteinu, ve čtvrté (řada D) řadě 2 μ l srážecího roztoku a 1 μ l roztoku proteinu, v páté (řada E) řadě 1 μ l srážecího roztoku a 3 μ l roztoku proteinu a v šesté řadě (řada F) 3 μ l srážecího roztoku a 1 μ l roztoku proteinu (Tabulka 9).

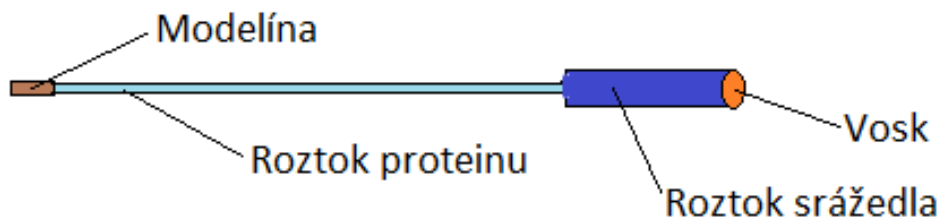
Tabulka 9: Rozložení obsahu srážecího roztoku a roztoku proteinu v destičce Terasaki plate.

A	2+2
B	2+2
C	1+2
D	2+1
E	1+3
F	3+1

Takto se postupovalo u obou proteinů, jako srážecí roztoky byly použity stejné roztoky jako v předchozích metodách. Po ukončení pokusu se destička uzavřela víčkem a fixem se na víčko dopsaly důležité informace.

3.3.4. Metoda krystalizace v kapilárách („Counter diffusion“)

Pro tuto metodu byly použity skleněné kapiláry o průměru 0,5 mm. Nejdříve se užším koncem naplnila kapilára roztokem proteinu DhaA31 nebo Thermolysinem do výšky jejího začátku rozšiřování. Plnění probíhalo tak, že se kapilára vložila úzkým koncem do eppendorfky, poté se kapilára naklonila, aby se roztok proteinu dostal do požadované výšky. Následovně byla spodní část kapiláry utěsněna modelínou, aby roztok proteinu nemohl vytéct. Dalším krokem byla aplikace srážecího roztoku do kapiláry. Aplikace se prováděla za pomoci mikropipety do širší části kapiláry až po její horní okraj. Takto připravená kapilára (Obrázek 3) byla umístěna do krystalizačního boxu GCB® (Triana Sci&Tech, Spain) určeného pro tuto metodu krystalizace. Nakonec se každá kapilára utěsnila za pomoci rozehřátého vosku (proti přístupu vzduchu). Takto se postupovalo u obou proteinů (3 kapiláry s proteinem DhaA31 a 3 kapiláry s proteinem Thermolysin). Po dokončení pokusu se box uzavřel víčkem a na box byly napsány potřebné informace.



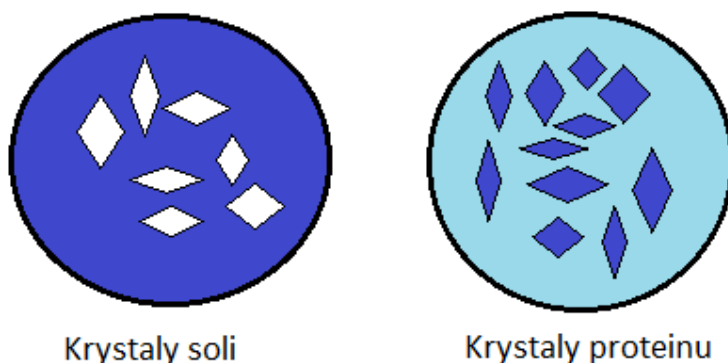
Obrázek 3: Schéma kapiláry.

3.4. Testy na krystalech

Po ukončení krystalizace byly krystaly testovány základními testy (DYE test a Crush test). Podle základních testů bylo určeno, zda se jedná o krystaly proteinů, nebo zda se jedná o krystaly soli.

3.4.1. Metoda DYE testu (barvení krystalů)

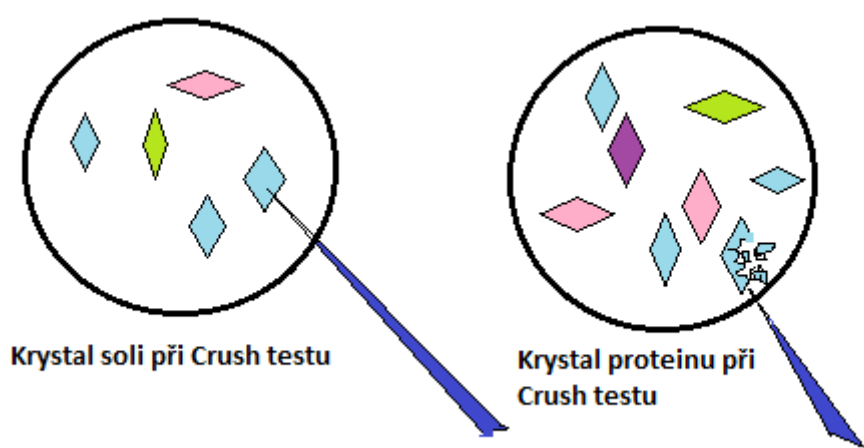
Na výsledných krystalech, které vznikly v předchozích pokusech, byla použita metoda testu barvení. K vybraným krystalům se přidala modrá barva IzIt [Hampton Research] a nechala se 30 minut působit. Po uplynutí této doby se krystaly zkontrolovaly. Došlo-li k obarvení celého krystalu, jednalo se o krystal proteinu (barva proniká póry v krystalu), nedošlo-li k obarvení, jedná se o krystal anorganické soli (krystal je bez póru, barva nemůže projít dovnitř krystalu) (Obrázek 4).



Obrázek 4: Výsledek DYE testu na krystalech soli a proteinu.

3.4.2. Metoda Crush testu (destrukce krystalu)

Tato metoda byla prováděna pod mikroskopem za pomoci jehly. Pod mikroskop byla umístěna destička s vytvořenými krystaly. Pomocí jehly se krystaly rozbíjely. Jestliže se krystal po doteku jehly rozbil, jednalo se o krystal proteinu, který je mnohem méně odolný než krystal soli. Jestliže se krystal po doteku jehly nerozbil, jednalo se o krystal anorganické soli (Obrázek 5).



Obrázek 5: Výsledek Crush testu na krystalech soli a krystalech proteinu.

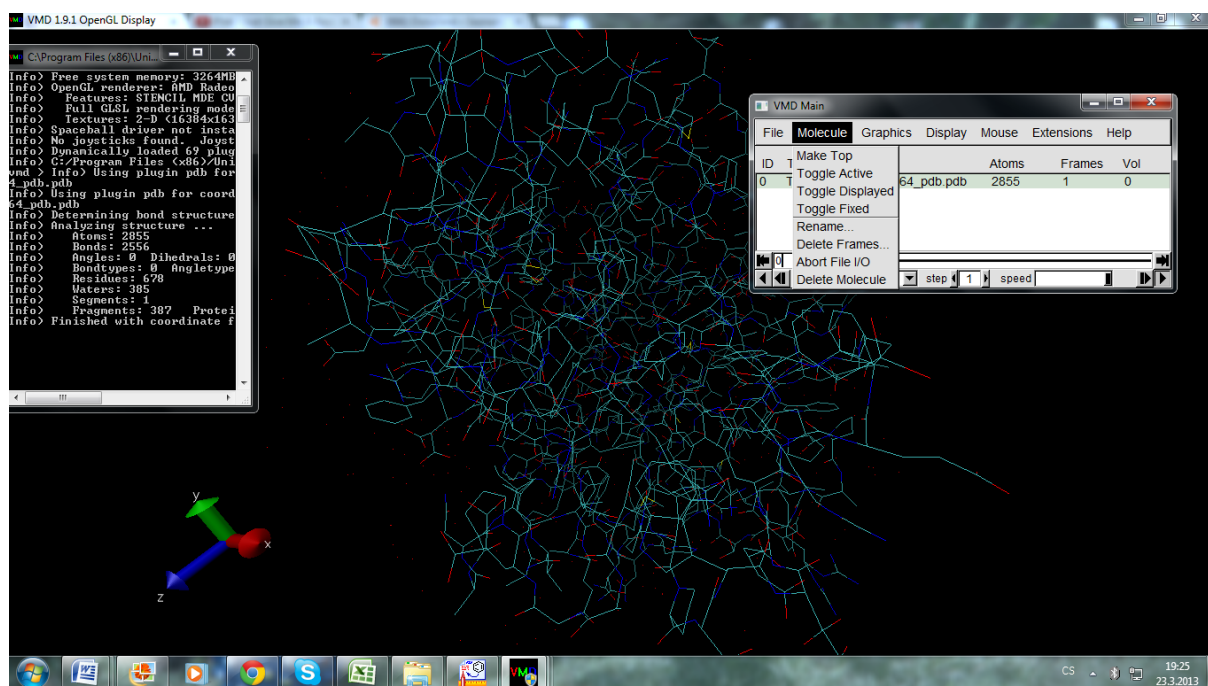
3.5. Zobrazení struktury proteinu DhaA31 za pomoci počítačových programů

V poslední fázi pokusu byl protein DhaA31 modelován pomocí počítačových programů. Použil se soubor pdb se strukturou proteinu DhaA31 a programy pro zobrazení struktury. Jednalo se o dva soubory proteinu DhaA31 (*31_shelx64.fcf.mtz* a *31_shelx64_pdb.pdb*) a programy VMD, WinCoot a ChemSketch. Programy VMD a Wincoot zobrazují celou strukturu proteinu.

3.5.1. Práce s programem VMD

Pomocí programu VMD lze na struktuře proteinu nalézt vazebné místo (v mém případě se v něm vázal chlor) a určit také proteinovou pentádu (Obrázek 6). Po nalezení chloru ve struktuře byla určena pentáda (5 aminokyselin souvisejících s vazebným

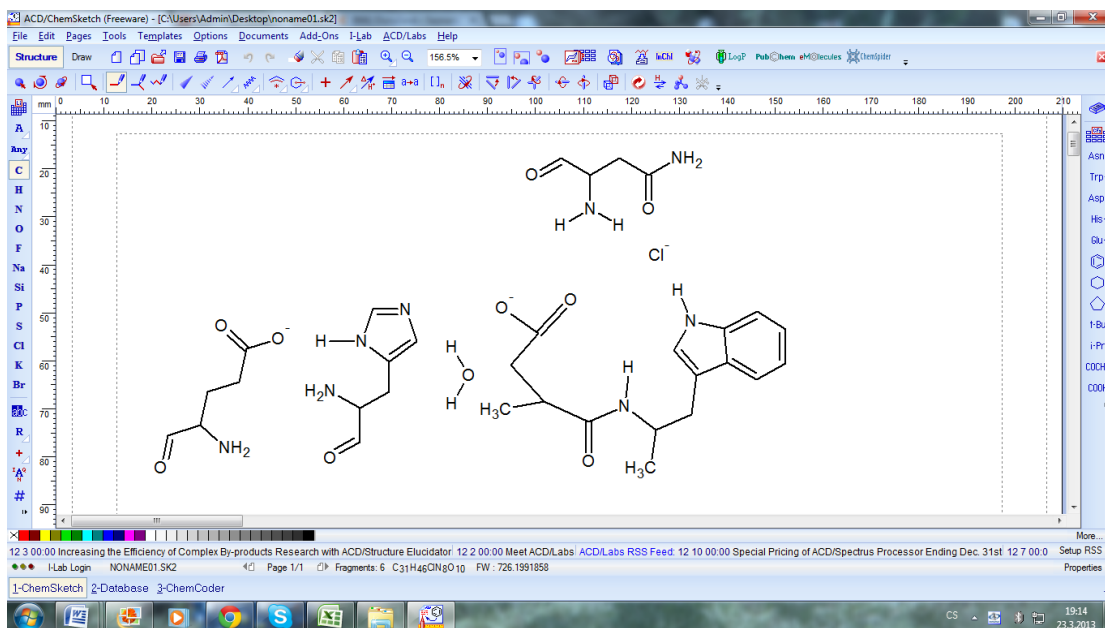
místem). Tyto aminokyseliny byly společně s chlorem zvýrazněny pomocí různých typů barevných modelů vyobrazení, oproti zbytku celého proteinu, aby celé vazebné místo bylo zřetelné. Pentádu u DhaA31 tvoří aminokyselina Tryptofan, Asparagin, Kyselina asparagová, Histidin a Glutamin. Pentáda aminokyselin a vazebné místo byly nutné zjistit pro jejich znázornění v programu ChemSketch. Dále byla zjištěna v tomto programu sekvence aminokyselin v pentádě (Humphrey *et al.* 1996).



Obrázek 6: Práce s programem VMD.

3.5.2. Práce s programem ChemSketch

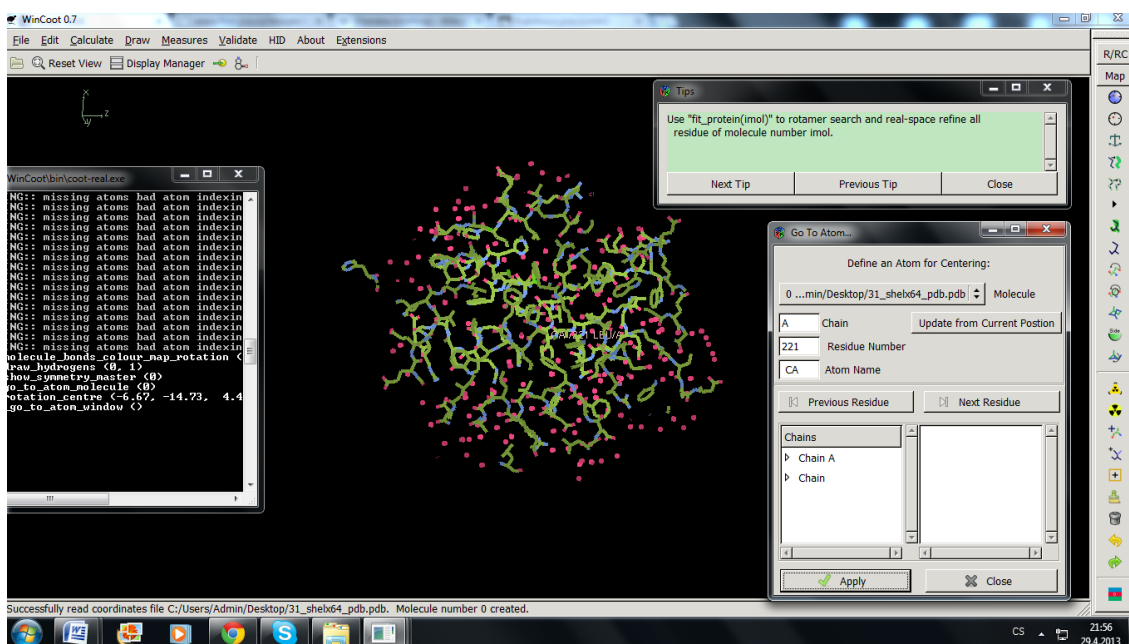
V programu ChemSketch byla vyobrazena v 2D pentáda aminokyselin proteinu DhaA31 s vazebným místem (Obrázek 7). Do programu byly vkládány strukturální vzorce aminokyselin, které se poté libovolně upravovaly podle potřeby. Program pracuje automaticky na základě vaznosti jednotlivých prvků a netvoří anionty. Anionty a kationty se musely doplnit manuálně. ChemSketch také nezobrazuje atomy vodíku, které byly v některých případech doplněny do strukturního vzorce. V programu ChemSketch se pracovalo s aminokyselinami Tryptofan 107, Asparagin 41, Kyselina asparagová 106, Histidin 272 a Glutamin 130. Čísla aminokyselin byly určeny podle sekvence aminokyselin v polypeptidovém řetězci (v programu VMD) (ACD/ChemSketch Freeware 2012).



Obrázek 7: Práce s programem ChemSketch.

3.5.3. Práce s programem WinCoot

V programu WinCoot se mohlo libovolně manipulovat s celým proteinem DhaA31 a celou jeho strukturu bylo možné libovolně upravovat. Bylo vyzkoušeno i centrování aminokyselin do optimální polohy v polypeptidovém řetězci, záměna aminokyseliny za jinou (mutace) a jiné funkce programu na proteinu DhaA31 (Obrázek 8) (Emsley *et al.* 2010).

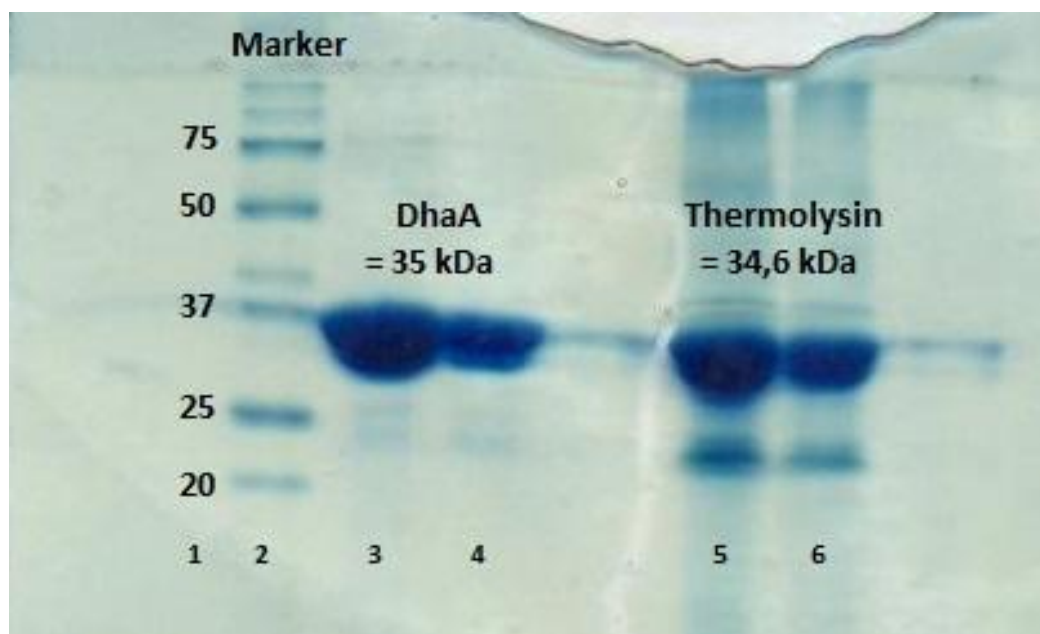


Obrázek 8: Práce s programem WinCoot.

4. Výsledky

4.1. Vyhodnocení gelové SDS-PAGE elektroforézy

Na základě provedení zkoušky na čistotu proteinu za pomoci SDS-PAGE elektroforézy byla zjištěna molekulární hmotnost a čistota proteinu halogenalkandehalogenasy DhaA31 a modelového proteinu Thermolysinu. U proteinu DhaA31 byla naměřena molekulární hmotnost přibližně 35 kDa a u proteinu Thermolysin 34,6 kDa. K určení Mr studovaných proteinů byl použit marker obsahující proteiny s přesně stanovenými molekulárními hmotnostmi. Protein DhaA31 neobsahoval příměsi, které by mohly ovlivnit nebo znemožnit jeho pozdější krystalizaci. Protein Thermolysin obsahoval příměs různorodých látek o molekulární hmotnosti 20-25 kDa, které působily negativně na pozdější krystalizaci proteinu (Obrázek 9).



Obrázek 9: Gelová elektroforéza: slouce 1 a 2 - stupnice markru s proteiny známých molekulárních hmotností, sloupce 3 a 4 - protein DhaA31, sloupce 5 a 6 - protein Thermolysin.

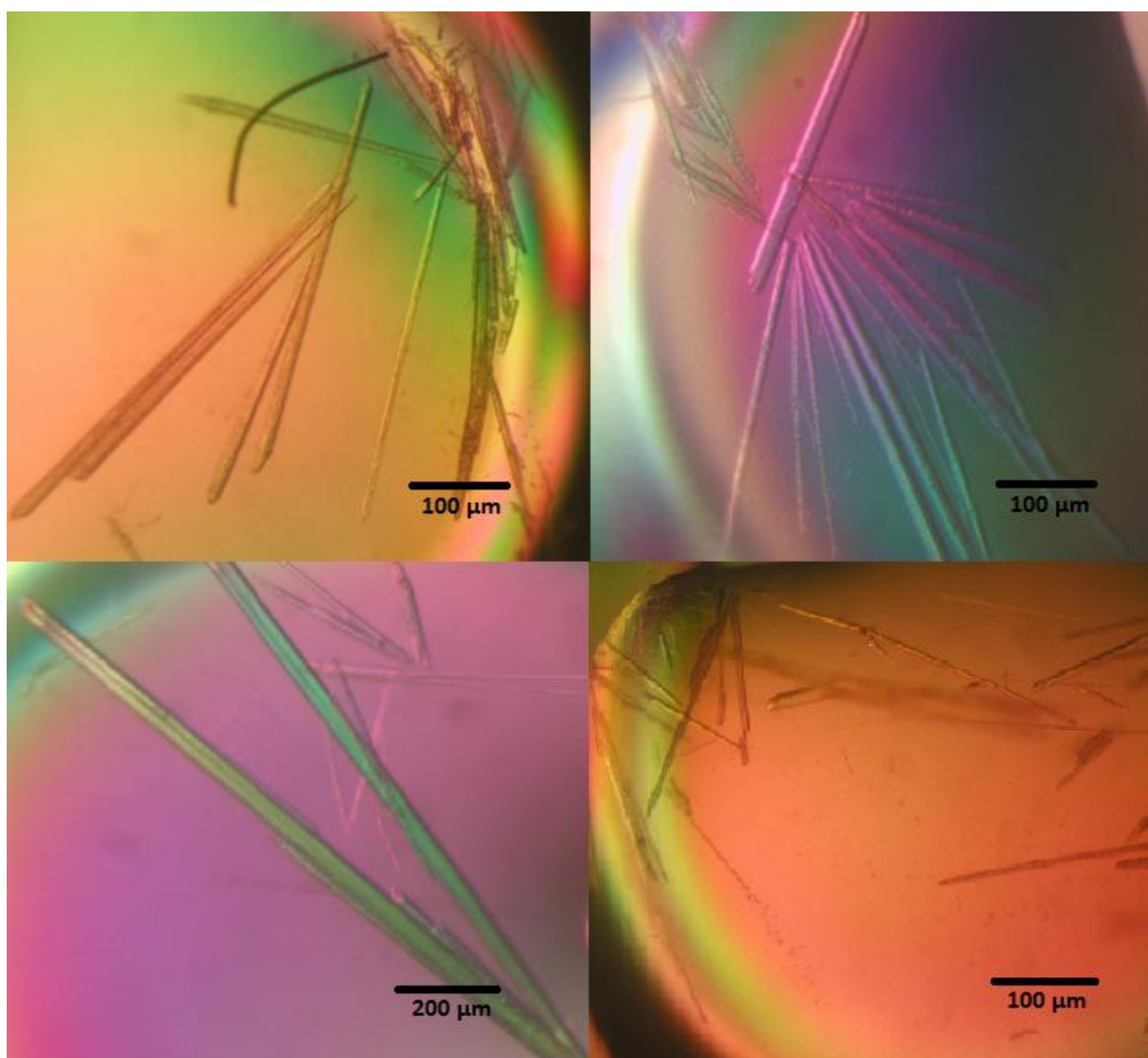
4.2. Výsledky krystalizace

4.2.1. Výsledky metody sedící kapky

Při této metodě byla krystalizace úspěšná pouze v některých koncentracích proteinu a srážedla.

4.2.1.1. Výsledky metody sedící kapky pro protein DhaA31

Protein DhaA31 krystalizoval pomocí krystalizačního srážecího roztoku složeného z PEG 4000, MES a vody. Krystaly vznikly pouze v některých koncentracích proteinu a srážedla. Krystaly DhaA31 se vytvořily během jednoho týdne. Jednalo se především o tyčinkovité krystaly, které je možné použít pro pozdější difrakční analýzu. Krystaly vznikly v koncentračních poměrech 2 μ l srážecího roztoku a 2 μ l proteinu a 1 μ l srážecího roztoku a 3 μ l proteinu (Obrázek 10).

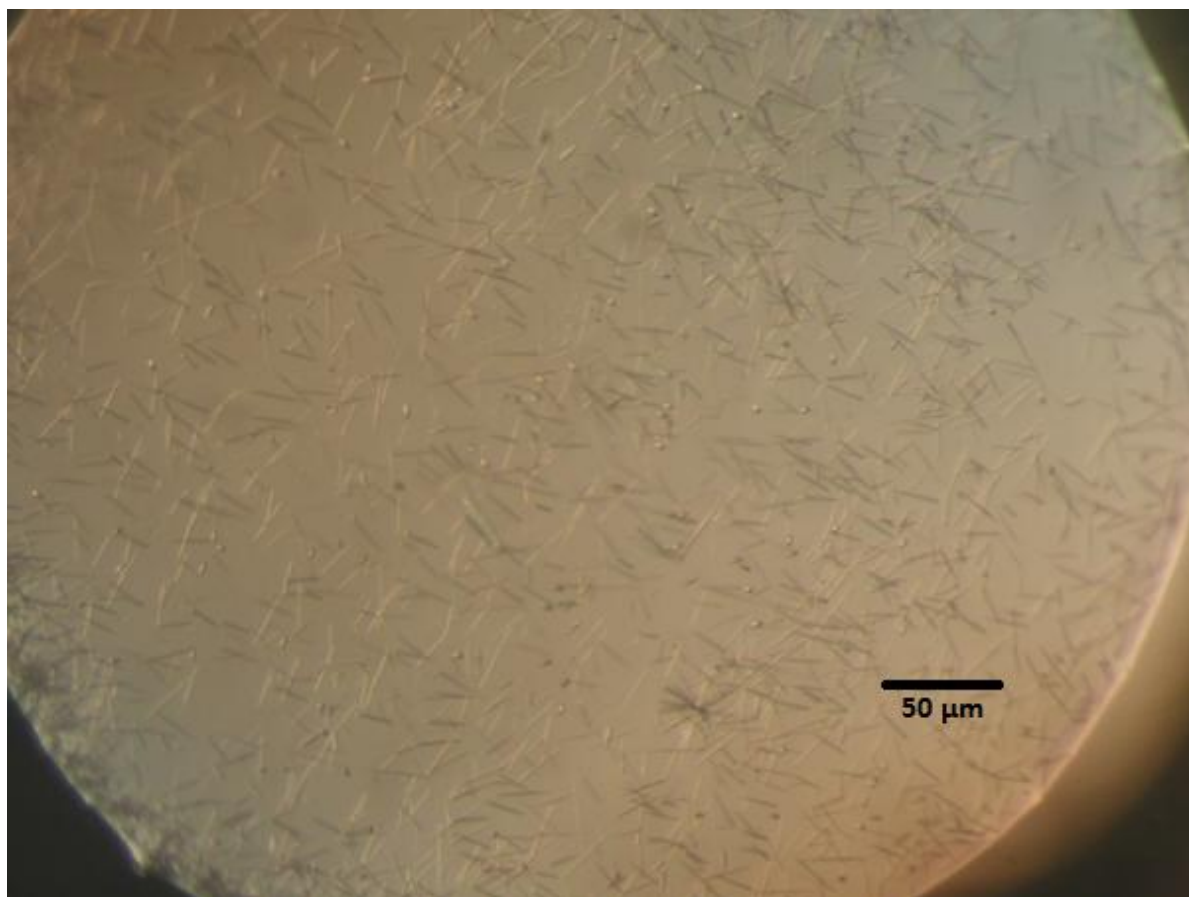


Obrázek 10: Tyčinkovité krystaly DhaA31 vyrostlé ze srážecího roztoku složeného z PEG 4000, MES a vody v poměru 1:1 a 1:3 s roztokem proteinu (sedící kapka) (foto autor).

4.2.1.2. Výsledky metody sedící kapky pro protein Thermolysin

Tento protein krystalizoval pomocí srážecích roztoků číslo 16, 25, 36 a 44 z krystalizační sady CrystalScreen od Hampton Research [Aliso Viejo, USA]. S ostatními srážecími roztoky z CrystalScreenu protein netvořil krystaly. Drobné krystaly Thermolysinu měly jehličkovitý charakter a nebyly vhodné pro další analýzu (Obrázek 11). Krystaly rostly po dobu jednoho týdne v poměrech koncentrací:

- 2 μl proteinu + 2 μl srážecího roztoku CrystalScreen č.16 (0,1 M HEPES sodium, 1,5 M Lithium sulfat monohydrate, pH 7,5)
- 3 μl proteinu + 1 μl srážecího roztoku CrystalScreen č.25 (0,1 M Imidazole, 1,0 M Sodium acetate trihydrate, pH 6,5) a srážedla CrystalScreen č.36 (0,1 M TRIS hydrochloride, 8 % w/v Polyethylene glycol 8,000, pH 8,5)
- 1 μl proteinu + 3 μl srážecího roztoku CrystalScreen č.44 (0,2 M Magnesium formate dihydrate)



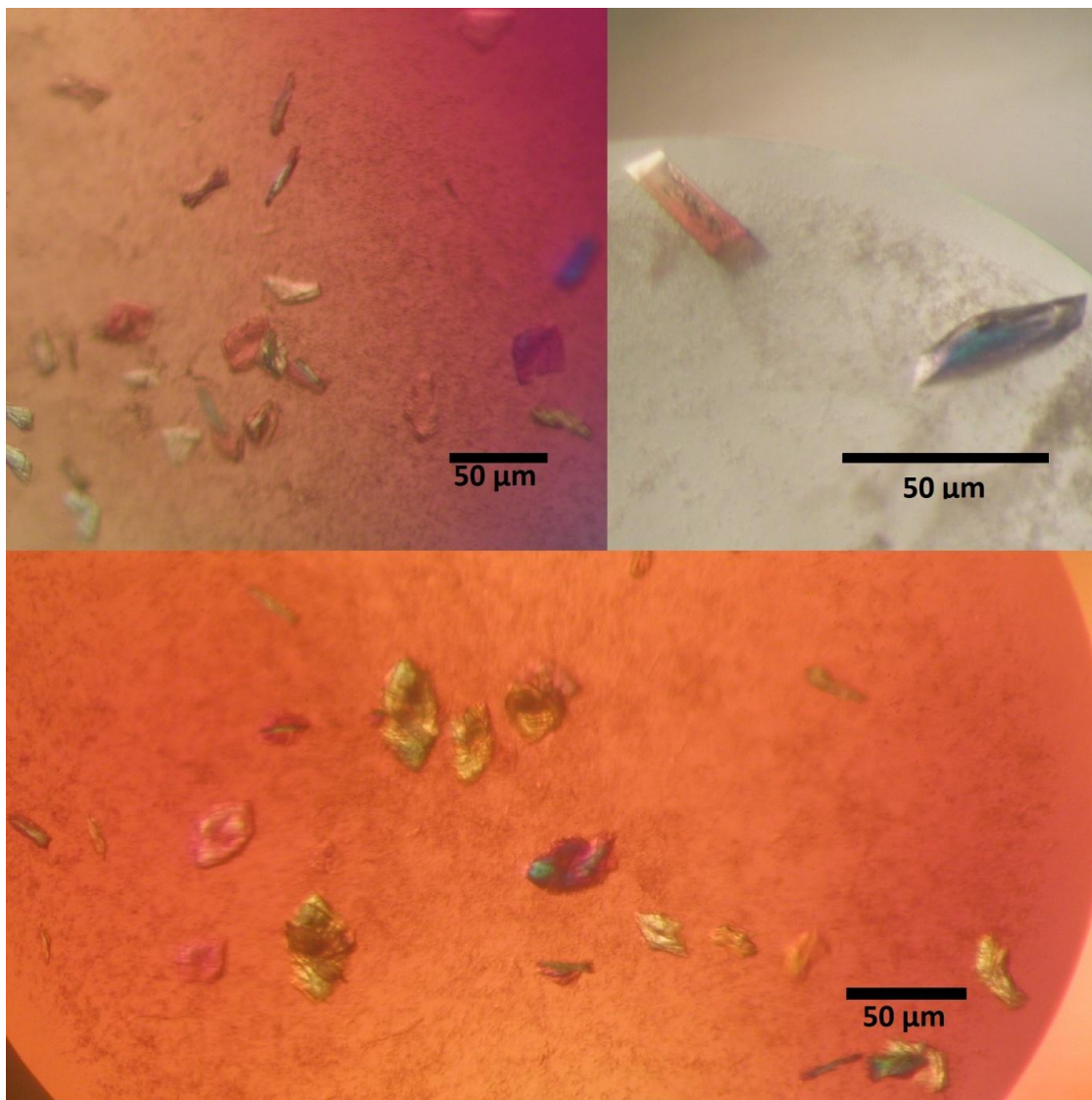
Obrázek 11. Jehličkovité krystaly Thermolysinu vyrostlé ze srážecího činidla CrystalScreen č.16 složeného z 0,1 M HEPES sodium, 1,5 M Lithium sulfat monohydrate v poměru 1:1 s roztokem proteinu (sedící kapka) (foto autor).

4.2.2. Výsledky metody visící kapky

Při této metodě byla krystalizace úspěšná jen v některých koncentracích proteinu a srážecího roztoku.

4.2.2.1. Výsledky metody visící kapky pro protein DhaA31

Protein DhaA31 krystalizoval po dobu jednoho týdne za použití srážecího roztoku složeného z PEG 4000, MES pH 6,4 a vody. Výsledkem krystalizace byly monokrystaly (Obrázek 12), které je možné použít k pozdější difrakční analýze. Pravost proteinových krystalů byla ověřena crash testem a DYE testem. Krystaly vznikly v poměru srážecího roztoku a proteinu 1:1 (2 μ l + 2 μ l).

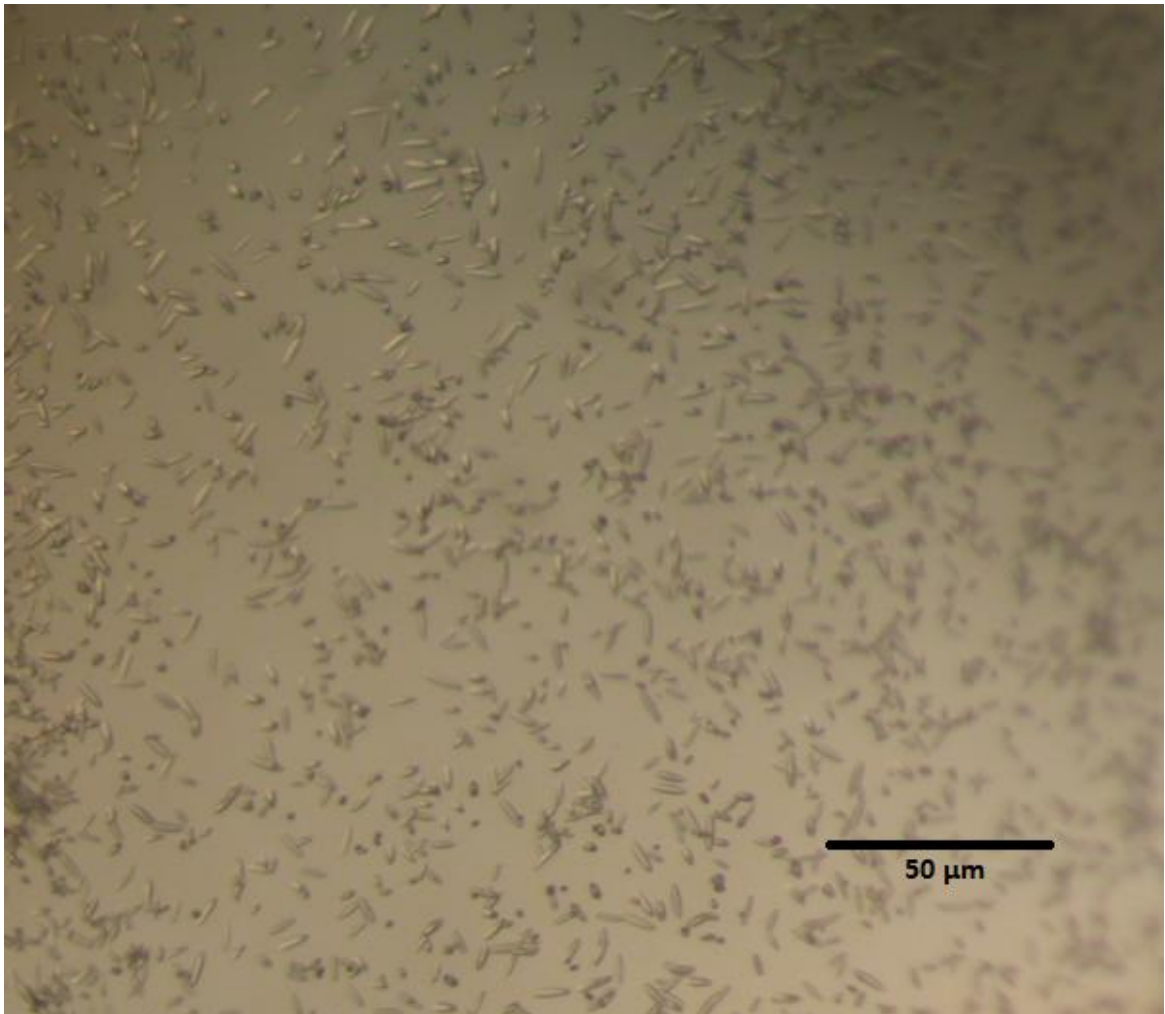


Obrázek 12: Monokrystaly DhaA31 vyrostlé ze srážecího roztoku o složení PEG 4000, MES a vody v poměru 1:1 s roztokem proteinu (visící kapka) (foto autor).

4.2.2.2. Výsledky metody visící kapky pro protein Thermolysin

Protein Thermolysin krystalizoval v destičce Limbro plates po dobu jednoho týdne. Jako srážecí roztok byly použity komerční roztoky ze sady CrystalScreen. Vznikly pouze mikrokristaly (Obrázek 13) a to v koncentraci srážecího roztoku 2 μ l a 2 μ l roztoku proteinu. Mikrokristaly vznikly za použití srážecích roztoků:

- CrystalScreen č. 25 (0,1 M Imidazole, 1,0 M Sodium acetate trihydrate, pH 6,5)
- CrystalScreen č.29 (0,1 M HEPES sodium, 0,8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, pH 7,5)
- CrystalScreen č.44 (0,2 M Magnesium formate dihydrate)
- CrystalScreen č.48 (0,1 M TRIS hydrochloride, 2,0 M Ammonium phosphate monobasic, pH 8,5)

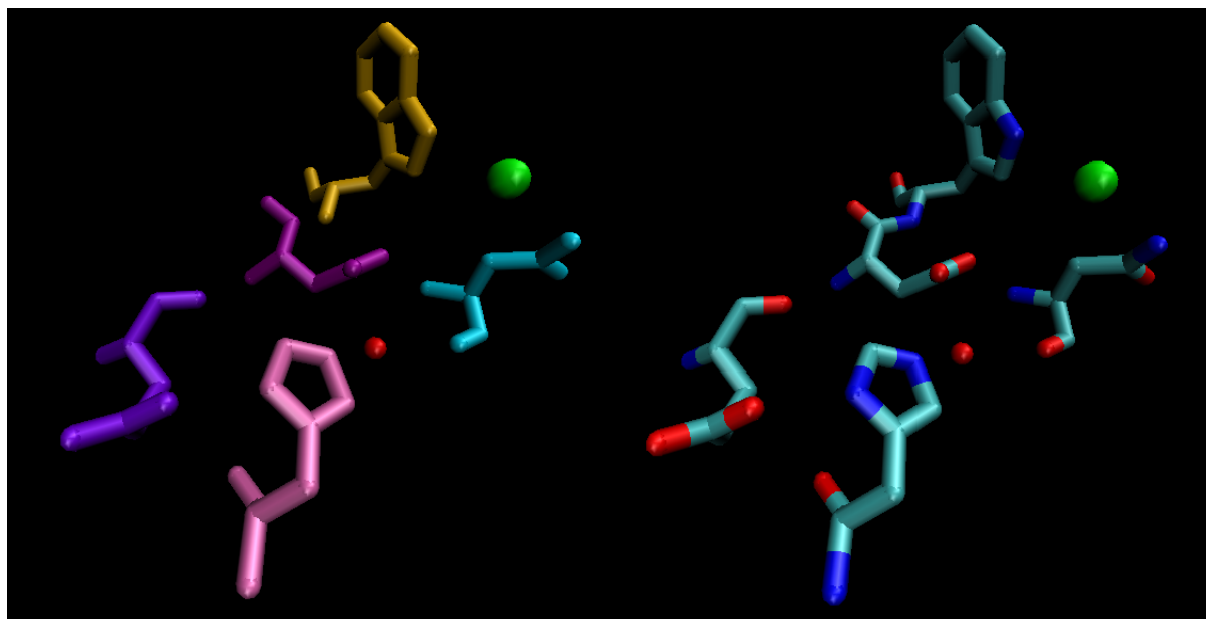












Obrázek 13: Mikrokristaly Thermolysinu vyrostlé ze srážecího roztoku CrystalScreen č.25 v poměru 1:1 s roztokem proteinu (visící kapka) (foto autor).

4.3. Výsledky modelování proteinu DhaA a Thermolysinu

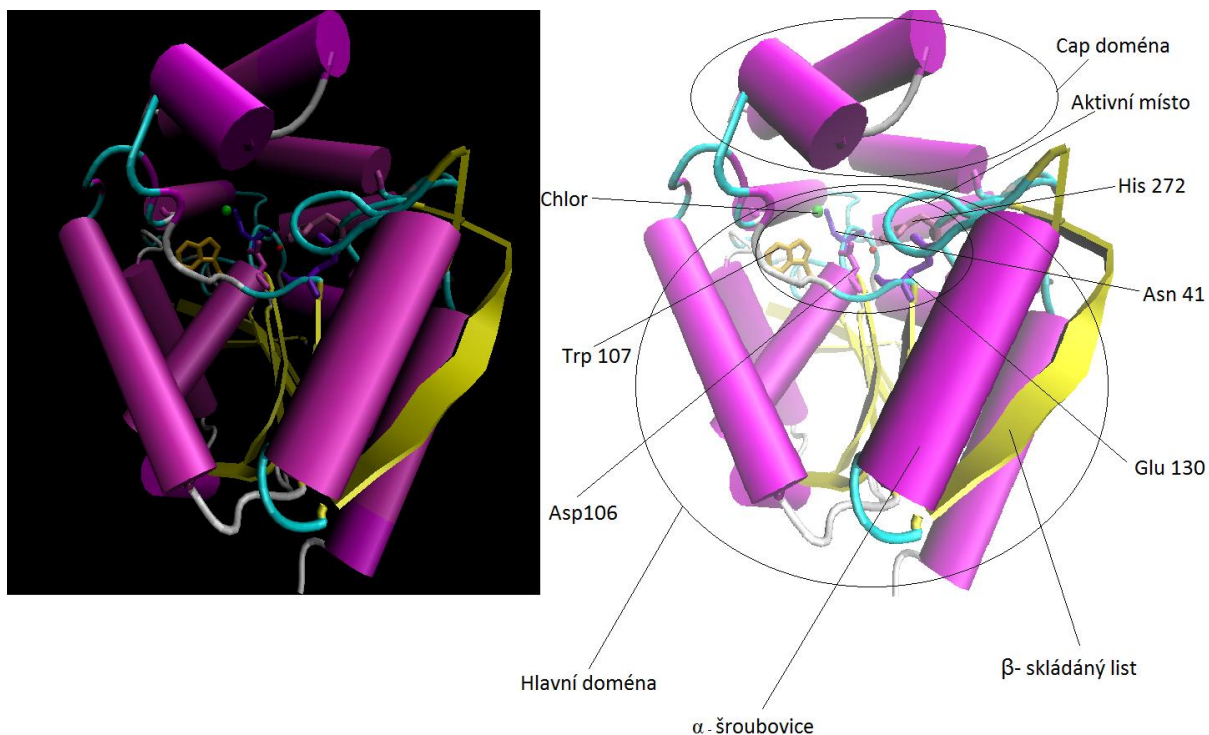
4.3.1. Znázornění proteinu DhaA v programu VMD

Pomocí programu VMD bylo určeno aktivní místo enzymu a jeho složení, znázorněna pentáda se substrátem (Obrázek 14) a znázorněna pentáda v celé struktuře enzymu halogenalkandehalogenasy DhaA31 (Obrázek 15) (Humphrey *et al.* 1996).



 Histidin 272	 C-C
 Kyselina asparagová 106	 C-O
 Glutamin 130	 C-N-C
 Tryptofan 107	
 Asparagin 41	
 Chlor	
 H ₂ O	

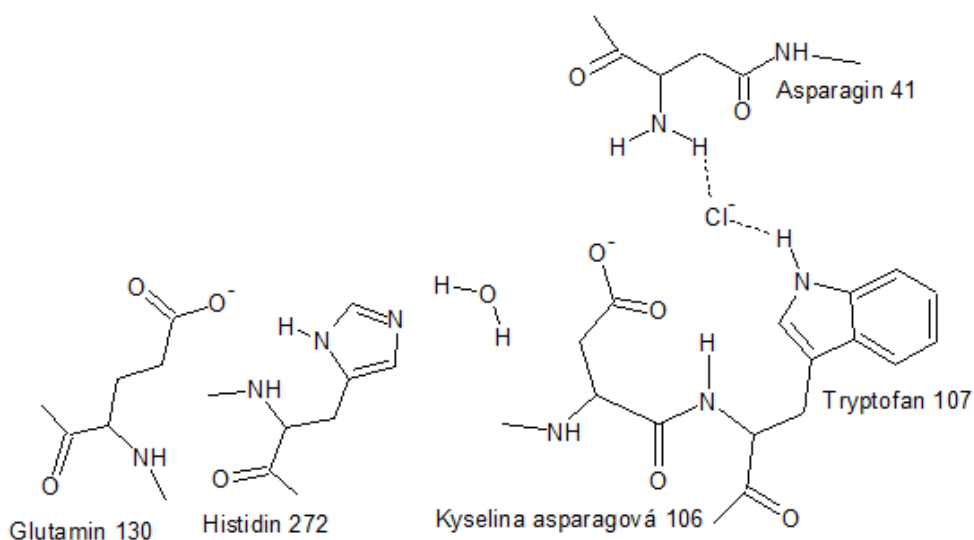
Obrázek 14: Pentáda se substrátem v aktivním místě enzymu DhaA31.



Obrázek 15: Struktura enzymu DhaA31 s aktivním místem.

4.3.2. Znázornění pentády enzymu DhaA31 v aktivním místě

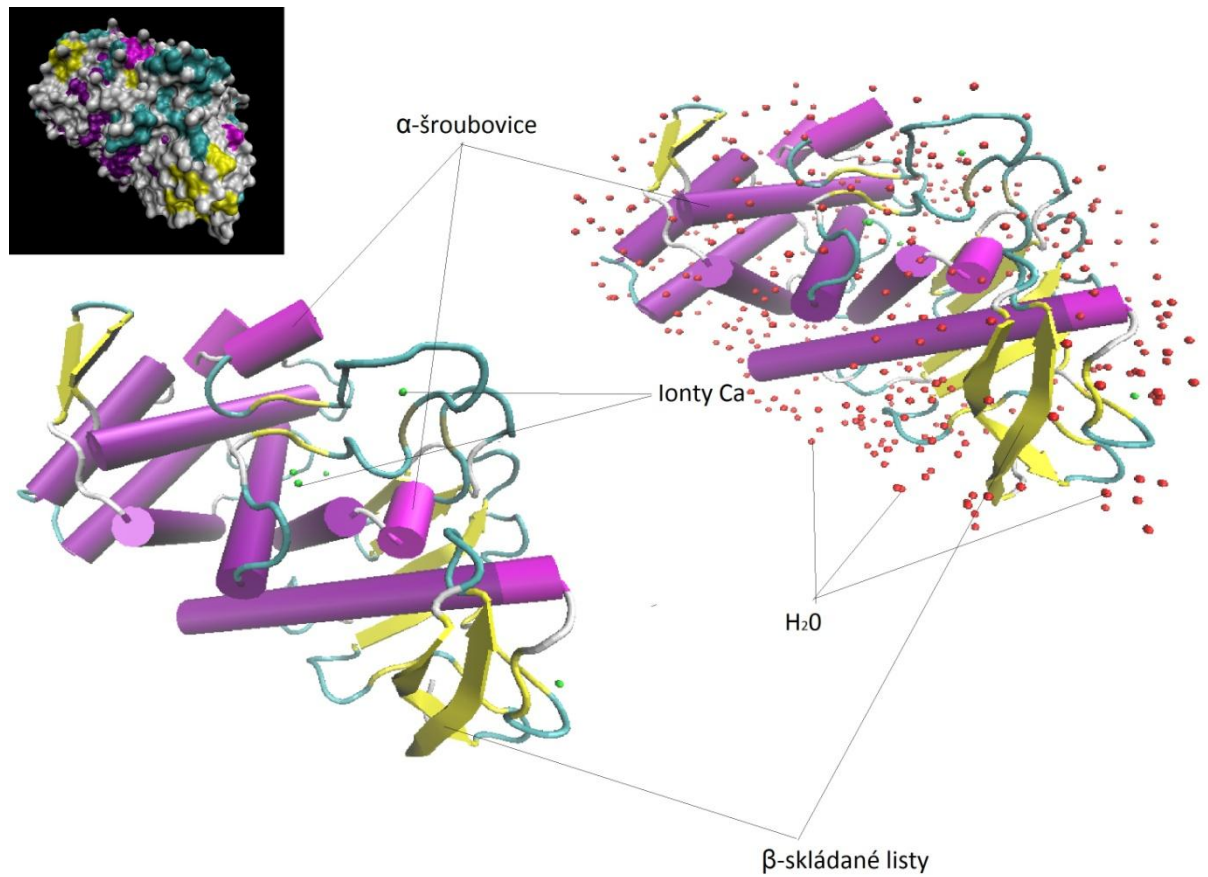
S použitím programu ChemSketch byla popsána pentáda strukturálním vzorcem a znázorněno seskupení aminokyselin při hydrolyze halogenidů za vzniku alkoholu (Obrázek 16).



Obrázek 16: Strukturální schéma pentády při hydrolyze substrátu.

4.3.3. Znázornění proteinu Thermolysin v programu VMD

Pomocí programu VMD byla zobrazena struktura enzymu, ionty vápníku a molekuly vody (Obrázek 17) (Humphrey *et al.* 1996).



Obrázek 17: Struktura proteinu Thermolysin.

5. Diskuze

5.1. Protein DhaA31

Pro gelovou elektroforézu a krystalizační experimenty byl použit mutant DhaA31 izolovaný v 100 mM Tris-HCl pufru pH 7,5 o koncentraci 6,5 mg/ml. Na základě gelové elektroforézy neobsahoval roztok proteinu žádné nečistoty, což je pro krystalizaci důležitý faktor. DhaA31 byl testován ve dvou koncentracích. Tato skutečnost byla na gelu zaznamenána formou různě intenzivních pruhů, první (silnější) je více zabarvený, druhý (slabší) je méně zabarvený. Plocha zabarvení na gelu závisí na množství použitého proteinu (Obrázek 9).

Krystalizace DhaA31 probíhala za krystalizačních podmínek, které udává Lahoda *et al.* (2011) pro růst trojrozměrných krystalů. Lahoda *et al.* (2011) udává, že krystaly rostou ze srážecího roztoku obsahujícího 29% (w / v) PEG 4000 a 100 mM MES pH 6,4, kterého bylo v reservoáru 800 μ l a v kapce 2-4 μ l.

Pro sedící kapku bylo použito množství objemu srážecího roztoku a roztoku proteinu DhaA31 v poměrech 1:1, 3:1 a 1:3. Krystaly rostly po dobu jednoho týdne bez přístupu vzduchu. V průběhu této doby vyrostly krystaly pouze v koncentračních poměrech 1:1 a 1:3, v ostatních případech vznikla amorfni sraženina. Příčinou vzniku sraženiny mohl být například přístup světla, špatná aplikace srážecího roztoku nebo roztoku proteinu, přístup vzduchu na okrajích destičky CombiClover, kde lepicí páska špatně utěsnila otvory, nebo špatný poměr srážecího roztoku a roztoku proteinu. V poměru 3:1 se krystaly netvořily. V sedící kapce destičky CombiClover vyrostly pouze tyčinkové krystaly DhaA31. V poměru 1:1 narostly krystaly menší ve velikosti 200-400 μ m, v poměru 1:3 narostly krystaly ve velikosti 300-500 μ m (Obrázek 10).

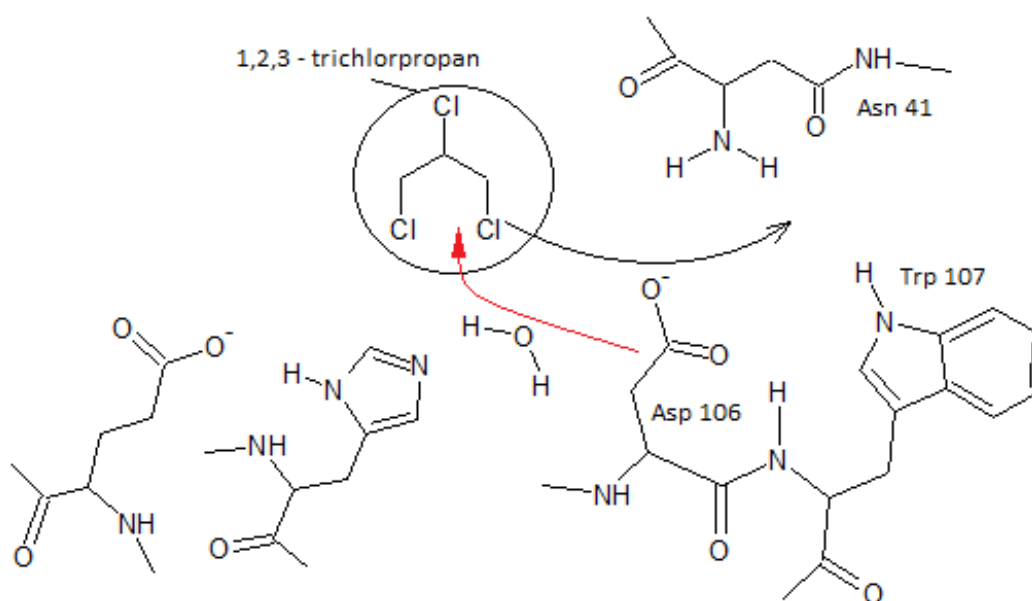
Ve visící kapce rostly krystaly DhaA31 v destičce Limbro plate za použití srážecího roztoku 29% (w / v) PEG 4000 a 100 mM MES pH 6,4 a roztoku proteinu DhaA31 ve 100 mM Tris-HCl pufru pH 7,5. Výsledky úspěšné krystalizace byly zaznamenány pouze v poměru srážecího roztoku a roztoku proteinu 1:1 (2 μ l : 2 μ l). V ostatních případech došlo k vyschnutí kapky nebo k tvorbě amorfni sraženiny. Růst krystalizace probíhal během jednoho týdne. Narostlé krystaly měly velikost 30-50 μ m (Obrázek 12).

Výsledky krystalizace pod silikovým olejem („Microbatch“) a krystalizace v kapilárách nebyly relevantní, jednalo se v naprosté většině o amorfni sraženinu. Tyto metody nebyly popsány ve výsledcích. V krystalizační destičce Terasaki plate krystaly nenarostly z důvodů nesprávné aplikace srážecího roztoku a roztoku proteinu pro vrstvu oleje. Hlavním důvodem neúspěchu krystalizace v kapilárách byl s největší pravděpodobností přístup vzduchu, kdy po aplikaci vosku nebyla kapilára zcela utěsněna.

Modelování proteinu DhaA31 proběhlo v programu VMD, kde se po načtení struktury pomocí označení iontů v „Graphical Representations“ našel iont chloru, který je součástí aktivního místa. Iont chloru byl označen zelenou barvou a modelem „CPK“. Okolo iontu chloru se poté dohledala pentáda aminokyselin, která tvoří aktivní místo. Poslední součástí aktivního místa je voda, která se vymodelovala funkcí „water all“ v „Graphical Representations“. Po nalezení příslušné molekuly vody bylo celé aktivní místo vymodelováno a následně vyfoceno funkcí „Render“ (Obrázek 14). Pro znázornění celého proteinu s aktivním místem byl použit model „Cartoon“ pro celý protein, „Licorice“ pro pentádu a „CPK“ pro molekulu vody (červeně) a iont chloru (zeleně). Takto znázorněný protein byl vyfocen funkcí „Render“ (Obrázek 15). Tyto modely jsou ve výsledcích přehledné a lze v nich rozeznat jednotlivé součásti enzymu. Pentádu i celý protein lze také zobrazit i v jiných modelech, které jsou méně přehledné a nejsou reprezentativní.

5.2. Schéma katalytické hydrolýzy enzymu DhaA31 při detoxikaci 1,2,3-trichlorpropanu na 2,3-dichlorpropan-1-ol

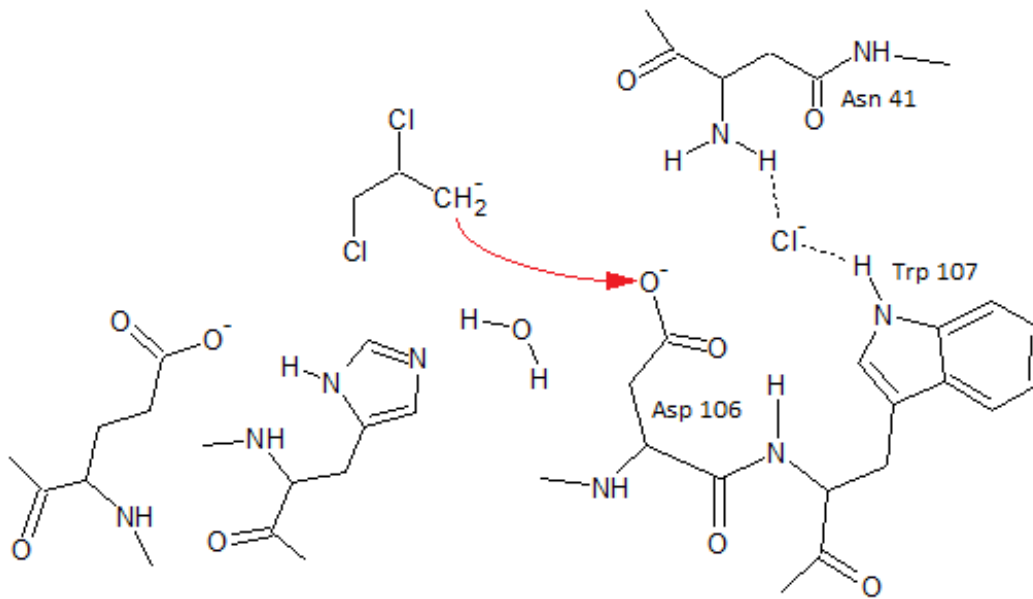
Reakce začíná navázáním substrátu (1,2,3-trichlorpropanu) do aktivního místa enzymu DhaA31, které obsahuje pentádu aminokyselin a vodu. Na molekulu halogenalkanu působí Kyselina asparagová 106, která štěpí vazbu mezi chlorem a uhlíkem (Obrázek 18).



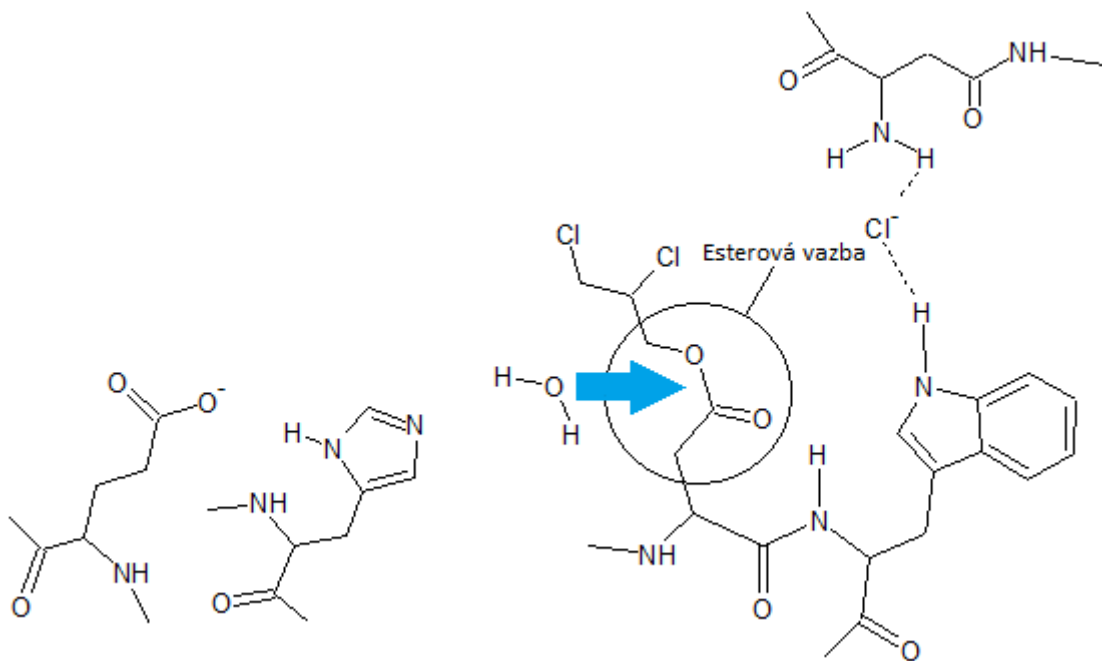
Obrázek 18: Reakce 1,2,3-trichloropropanu a Kyseliny asparagové.

Po odštěpení atomu chloru dojde k jeho navázání nekovalentní vazbou mezi vodíky Asparaginu 41 a Tryptofanu 107. Zbytek chlorovaného řetězce propanu se váže na Kyselinu asparagovou 106, se kterou tvoří dočasně ester (Obrázek 19). Tento dočasný ester podléhá hydrolýze, při které voda (H_2O) působí na esterovou skupinu 'R-COO-R' a štěpí jí na alkohol (2,3-dichlorpropan-1-ol) a aminokyselinu (Asp 106) (Obrázek 20). Při hydrolýze je spotřebován vodík z molekuly vody, a proto je doplněn z aminokyseliny Histidinu 272. Vodík z histidinu je doplněn z poslední aminokyseliny pentády, kterou je Glutamin 130 (Obrázek 21).

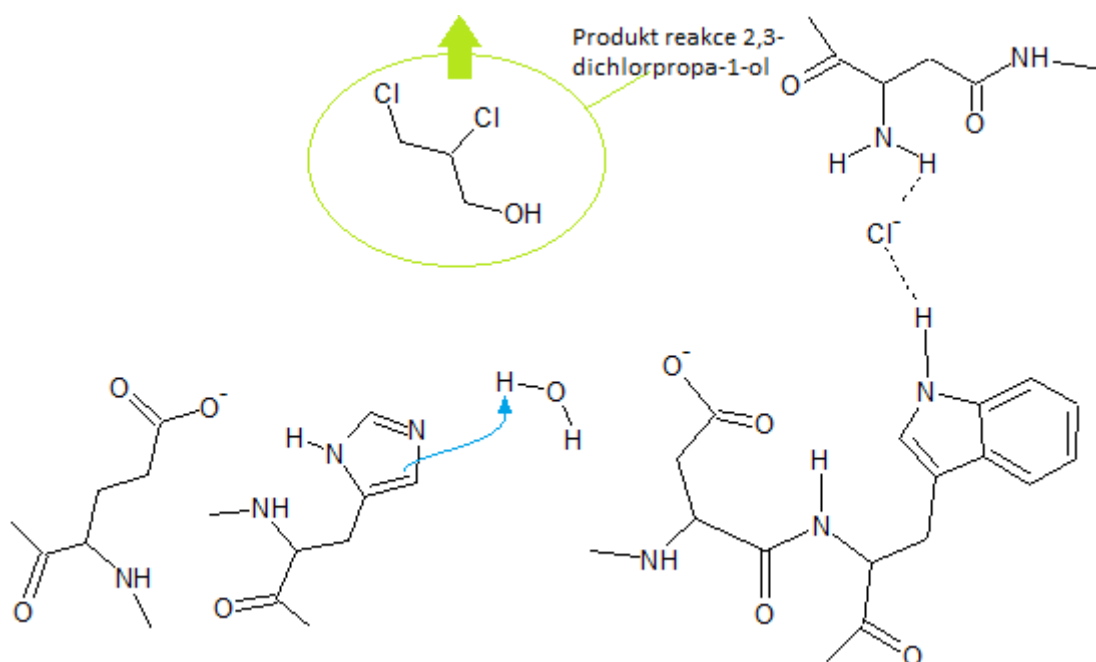
Produkt reakce 2,3-dichlorpropan-1-ol opouští aktivní místo enzymu DhaA31. Chlor udržován nekovalentní vazbou mezi aminokyselinami Trp 107 a Asn 41 zůstává do doby přijetí nového substrátu, který chlor vytlačí. Tato reakce byla rozepsána z výsledného modelu pentády v programu ChemSketch (ACD/ChemSketch Freeware 2012).



Obrázek 19: Navázání chloru nekovalentní vazbou mezi aminokyseliny Trp 107 a Asn41 a přesun zbytku řetězce z 1,2,3-trichloropropanu na Kyselinu asparagovou 106 za vzniku esteru.



Obrázek 20: Hydrolýza esteru, působení vody na esterovou vazbu 'RCOOR' (hydrolytické štěpení).



Obrázek 21: Konec reakce, produkt (2,3-dichloropropan-1-ol) opouští aktivní místo.

5.3. Protein Thermolysin

Pro gelovou elektroforézu a následnou krystalizaci byl použit roztok proteinu Thermolysinu o koncentraci 25 mg/ml v hydroxidu sodném (NaOH). SDS-PAGE elektroforézou byly testovány dvě různé koncentrace proteinu. Roztok Thermolysinu obsahoval příměs cizorodých látek, které ovlivňují negativně výsledky krystalizace. Tento roztok byl následně použit na krystalizační experimenty ve snaze vykrystalizovat pouze protein bez příměsí. V případě neúspěšné krystalizace by bylo nutné protein znovu izolovat, aby neobsahoval tyto cizorodé látky (Obrázek 9).

Krystalizace Thermolysinu probíhala po dobu jednoho týdne. Jako krystalizační činidla byly použity komerční srážecí roztoky z krystalizační sady CrystalScreen od Hampton Research [Aliso Viejo, USA]. Tyto roztoky byly již připraveny. Použilo se celkem 22 srážecích roztoků pro sedící kapku a 19 srážecích roztoků pro visící kapku. Krystaly ale narostly jen v malé škále krystalizačních srážecích roztoků. Příčinou neúspěšné krystalizace mohla být nečistota izolovaného proteinu, nebo špatná aplikace srážecího roztoku nebo roztoku proteinu.

V sedící kapce vyrostly krystaly Thermolysinu za použití roztoků CrystalScreen č. 16, 25, 36 a 44. V ostatních roztocích CrystalScreen nedošlo k růstu krystalů. Srážecí roztoky byly aplikovány s roztokem proteinu v poměrech 1:1, 3:1 a 1:3. V poměru 1:1

(2 μl + 2 μl) narostly krystaly ve srážecím roztokem CrystalScreen č. 16, které je složeno z: 0,1 M HEPES sodium, 1,5 M Lithium sulfate monohydrate pH 7,5. V poměru 3:1 (3 μl + 1 μl) narostly krystaly ve srážecím roztokem CrystalScreen č. 44, které je složeno z 0,2 M Magnesium formate dihydrate a v poměru 1:3 (1 μl + 3 μl) narostly krystaly ve srážecím roztoku CrystalScreen číslo 25 a 36. Srážecí roztok CrystalScreen č. 25 je složeno z 0,1 M Imidazole, 1,0 M Sodium acetate trihydrate, pH 6,5 a srážedlo CrystalScreen č. 36 je složeno z 0,1 M TRIS hydrochloride, 8 % w/v Polyethylene glycol 8,000, pH 8,5. Vzniklé krystaly měly převážně jehličkovitý charakter a velikost přibližně 15-30 μm (Obrázek 11). Ostatní srážecí roztoky CrystalScreenu netvořily s roztokem Thermolysinu krystaly.

Ve visící kapce krystalizoval roztok Thermolysinu v destičce Limbro plate. Bylo použito celkem 19 srážecích roztoků z CrystalScreenu. Produktem krystalizace byly malé mikrokrytaly ve velikosti 5 μm (Obrázek 13), které vznikly v poměru srážecích roztoků a proteinu 1:1 (2 μl + 2 μl). Mikrokrytaly vyrostly pouze se srážecími roztoky Crystal Screen č. 25, 29, 44 a 48.. S ostatními srážecími roztoky netvořil roztok proteinu krystaly.

Modelování proteinu Thermolysin proběhlo v programu VMD (Humphrey *et al.* 1996). Soubor „pdb“ byl získán z databáze „protein data bank“. Po otevření proteinu v programu se pomocí „Graphical Representations“ a aplikace „water all“ označily červeně molekuly vody modelem „CPK“. Poté se celý polypeptidový řetězec přemodeloval na model „Cartoon“. Takto vymodelovaný protein se vyfotil funkcí „Render“ (Obrázek 17).

6. Závěr

Cílem této práce bylo seznámení se s problematikou halogenalkandehalogenas, pochopení základů krystalografie a snaha vypěstovat krystaly zkoumaného proteinu DhaA31 vhodné pro difrakční analýzu. Dále byly vytvořeny model struktury Thermolysinu a model struktury a aktivního místa zkoumaného proteinu DhaA31, popsány jeho části a vysvětlen dehalogenační mechanismus.

Krystalizační experimenty byly prováděny v laboratořích makromolekulární struktury a dynamiky v Ústavu komplexních systémů FROV JU v Nových Hradech. Pro vlastní krystalizační experimenty a získání proteinových krystalů byly použity základní a pokročilé krystalizační metody. Struktura mutantní halogendehalogenasy DhaA31 byla modelována pomocí programu VMD a programu WinCoot. Aktivní místo enzymu a schéma reakce při dekontaminaci substrátu byly navrženy a zobrazeny za pomoci programu ChemSketch.

Protein DhaA a jeho mutantní formy jsou odpovědné za dekontaminaci toxické látky 1,2,3-trichlorpropanu, která je častým polutantem ve volných vodách. Uplatnění bakterií *Rhodococcus rhodochrous* obsahující tento enzym by mohla být jedna z možností úspěšné dekontaminace látky 1,2,3-trichlorpropanu, ale aktivita tohoto enzymu a rychlost katalytické reakce je do jisté míry značně omezena, proto se výzkum i nadále soustřeďuje na hledání mutantů DhaA, které mají vyšší aktivitu a rychlost katalytické reakce je mnohonásobnější.

7. Seznam použité literatury

Literární zdroje:

- Asherie N. (2004): Protein crystallization and phase diagrams. *Methods* 34, 266-272.
- Berman H. M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T. N., Weissig H., Shindyalov I. N. et Bourne P. E. (2000): Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research* 28, 232-242.
- Bosma T., Kruizinga, E., de Bruin, E. J., Poelarends, G. J. et Janssen, D. B. (1999): *Applied and Environmental Microbiology*. 65.
- Campbell D. W., Muller C. et Reardon K. F. (2006): Development of a fiber optic enzymatic biosensor for 1,2- dichloroethane. *Biotechnol Lett* 28: 883–887.
- Chen Z. W., Koh M., Van Driessche G., Van Beeumen J. J., Bartsch R. G., Meyer T. E., Cusanowich M.A. et Mathews F. S. (1994): The structure of flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from a purple phototrophic bacterium. *Science* 266. 430-432.
- Chovancova E., Kosinski J., Bujnicki J. M. et Damborsky J. (2007) Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins: Struct Funct Bioinf* 67: 305–316.
- Damborsky J., Rorije E., Jesenska A., Nagata Y., Klopman G. et Peijnenburg WJGM (2001): Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases. *Environ Toxicol Chem* 20: 2681–2689.
- Damborsky J., Chaloupkova R., Pavlova M., Chovancova E. et Brezovsky J. (2010): Structure–Function Relationships and Engineering of Haloalkane Dehalogenases.
- Debye P. et Hückel E. (1923): The theory of electrolytes. I. Lowering of freezing point and related phenomena. *Physikalische Zeitschrift* 24. 185-206.
- Emmer J. (2007): Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, University of South Bohemia .
- Endo S. (1962): *J. Ferment. Technol.* 40, 346.
- Feder J., Garrett L. R. et Wildi B. S. (1971): *Biochemistry*, 10, 4552.
- Garcia-Ruiz J. M., Moreno A., Viedma C. et Coll M. (1993): Crystal quality of lysozyme single crystals grown by the gel acupuncture method. *Mat. Res. Bull.* 28., 541-546.

- Garcia-Ruiz J. M., Fermin O., Novella M. L., Gavira J. A., Sauter C. et Vidala O. (2001): A supersaturation wave of protein crystallization. *J. Cryst. Growth* 232. 149-155.
- Gilliland G. L., Tung M., Blakeslee D. M. et Ladner J. (1994): The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0, Data, and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data. *Acta Cryst. D50*. 408-413.
- Gilliland G. L. (1998): A biological macromolecule crystallization database: A basic for a crystallization strategy. *J. Cryst. Growth* 90, 50-51.
- Haas C. et Drenth J. (1999): *J. Cryst. Growth* 196. 388-394.
- Janssen D. B. (2007): Biocatalysis by dehalogenating enzymes. *Adv Appl Microbiol* 61: 233–252.
- Keuning S., Janssen D. B. et Witholt B. (1985): Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *J Bacteriol* 163: 635–639.
- Klvana M., Pavlova M., Koudelakova T., Chaloupkova R., Dvorak P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kuta Smatanova I., Dohnalek J., Kulhanek P. Wade R.C. et Damborsky J. (2009): *Journal of Molecular Biology*. 392.
- Kmunicek J., Luengo S., Gago F., Ortiz A. R., Wade R. C. et Damborsky J. (2001): Comparative binding energy analysis of the substrate specificity of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Biochemistry* 40: 8905–8917.
- Kutá Smatanová I. (2008): Crystallization techniques in protein crystallography, Habilitation thesis, Palacky university Olomouc.
- Latt S. A., Holmquist B. et Valee B. L. (1969): *Biochem. Biophys. Res.* 37, 333.
- Los G. V. et Wood K. (2007): The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol* 356: 195–208.
- Matsubara H. (1966): *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 427.
- Matthews B. W. (1988): *Acc. Chem. Res.* 21, 333-340.
- McPherson A. (2004): Introduction to protein crystallization. *Methods* 34. 254-265.

- McPherson A. et Weickmann J. (1990): X-ray analysis of new crystal forms of the sweet protein thaumatin. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 7, 1053-1060.
- McPherson A. (1999): Crystallization of biological macromolecules. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I., Schrag J., Sussman J. L., Verschueren K. H. G. et Goldman A. (1992): The a/b hydrolase fold. *Protein Eng* 5: 197–211.
- Otwinowski Z. et Minor W. (1997): Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol.* 276, 307-326.
- Plevaka, M., Kulik, D., Chaloupková, R., Koudeláková, T., Rezacová, P., Brynda, J., Kutý, M., Damborský J. et Kutá Smatanová I. (2013): Crystallization and preliminary crystallographic analysis of DhaA57 and DhaA80 mutants from *Rhodococcus rhodochrous*.
- Pries F., VandenWijngaard A. J. , Bos R., Pentenga M. et Janssen D. B. (1994): The role of spontaneous cap domain mutations in haloalkane dehalogenase specificity and evolution. *J Biol Chem* 269: 17490–17494.
- Prokop Z., Damborsky J., Oplustil F., Jesenska A. et Nagata Y. (2005): Method of detoxification of yperite by using haloalkane dehalogenases. Patent WO 2006/ 128390 A1.
- Ramanova P., Cherezov V. et Caffrey M. (2006): The Membrane Protein Data Bank. *Cell Mol. Life Sci.* 63, 36-51.
- Stsiapanava A., Dohnalek J., Gavira J. A., Kuty M., Koudelakova J., Damborsky T. et Kuta Smatanova I. (2010): Atomic resolution studies of haloalkane dehalogenases DhaA04, DhaA14 and DhaA15 with engineered access tunnels. *Acta Cryst.* (2010). D66, 962–969.
- Stsiapanava A., Chaloupkova R., Fortova A., Brynda J., Manfred Weiss, Damborsky J. et Kuta Smatanova I. (2011): Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild type haloalkane dehalogenase DhaA and the variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Cryst F67*, 253-257.
- Stsiapanava A., Koudelakova T., Lapkouski M., Pavlova M., Damborsky J. et Kuta Smatanova I. (2008): Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultra high resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Cryst. F64*, 137-140.

Stucki G. et Thuer M. (1995): Experiences of a large-scale application of 1,2-dichloroethane degrading microorganisms for groundwater treatment. *Environ Sci Technol* 29: 2339– 2345.

Tiani K., Hermodson M. A., Ericsson L. H., Walsh K. A. et Neurath H. (1972): *Nature* (London) *New Biol.*, 238, 35.

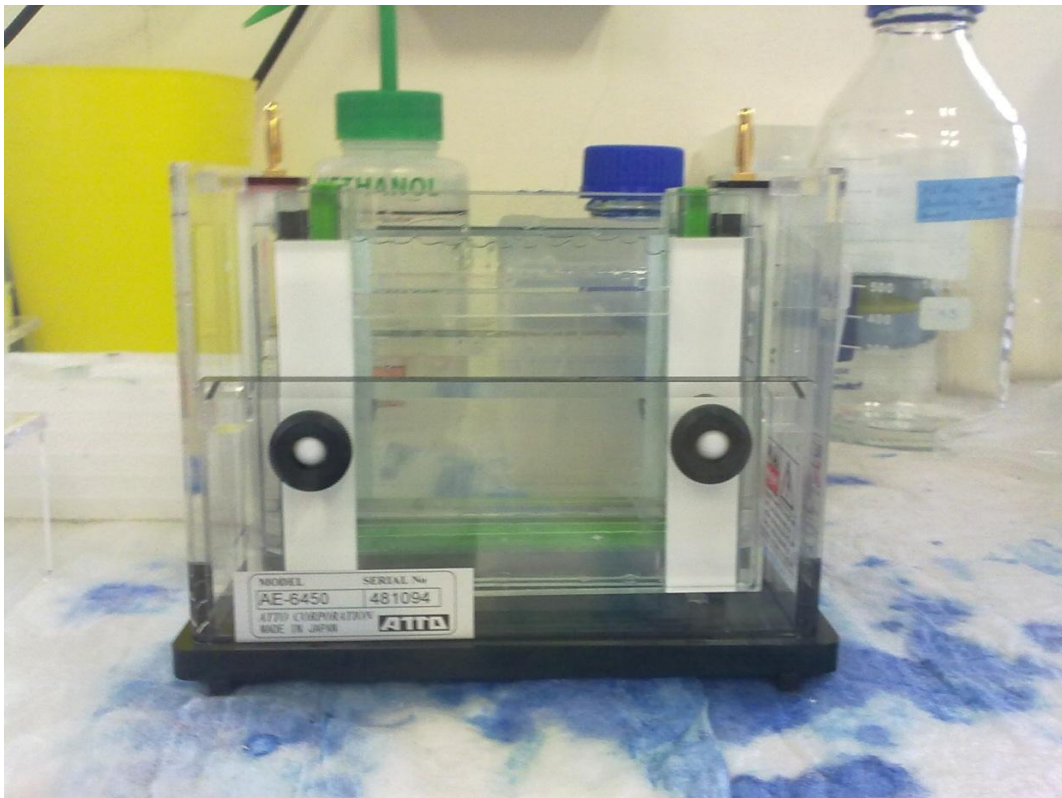
Použitý software:

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

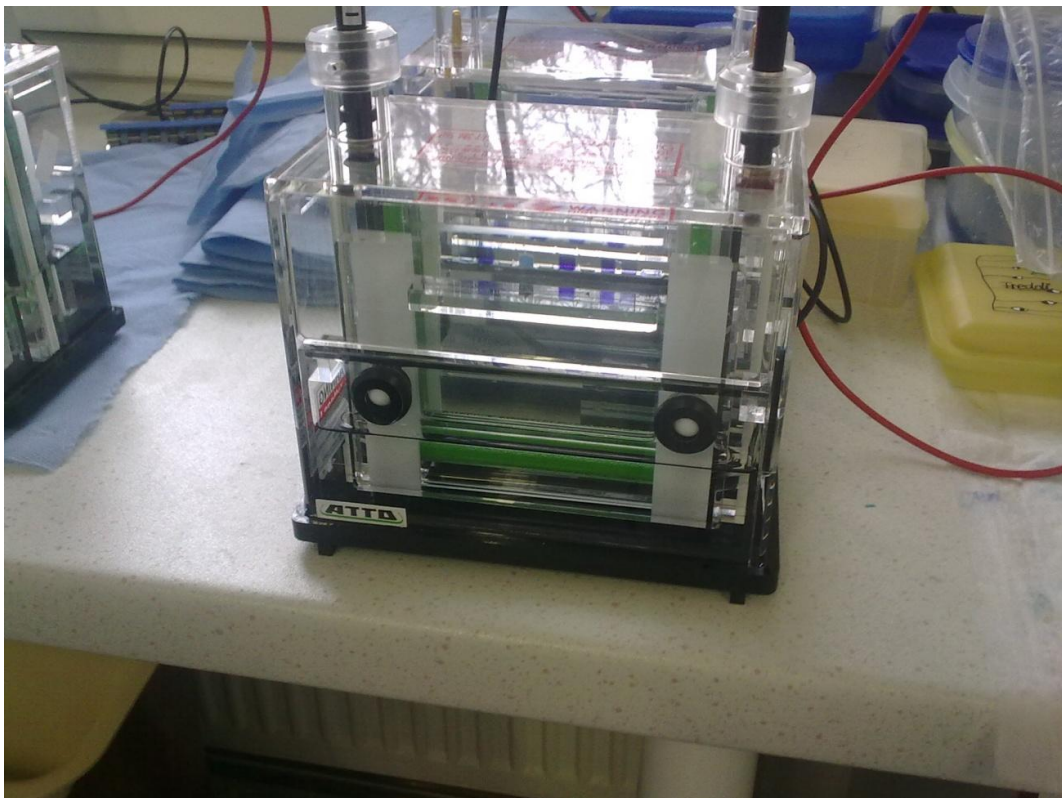
Humphrey W., Dalke A. et Schulten K. (1996): VMD - Visual Molecular Dynamics, *J. Molec. Graphics*, vol. 14, pp. 33-38.

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

8. Přílohy



Obrázek 22: Sestava SDS-PAGE pro gelovou elektroforézu (foto autor)



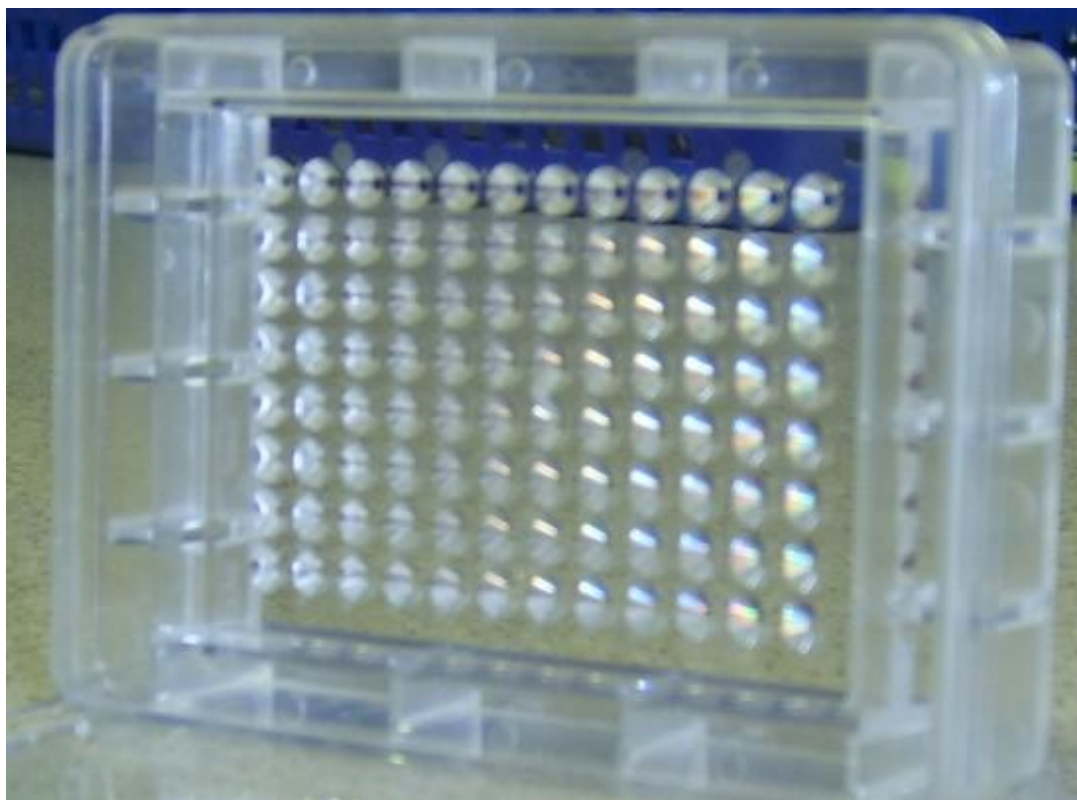
Obrázek 23: Gelová elektroforéza SDS-PAGE (foto autor).



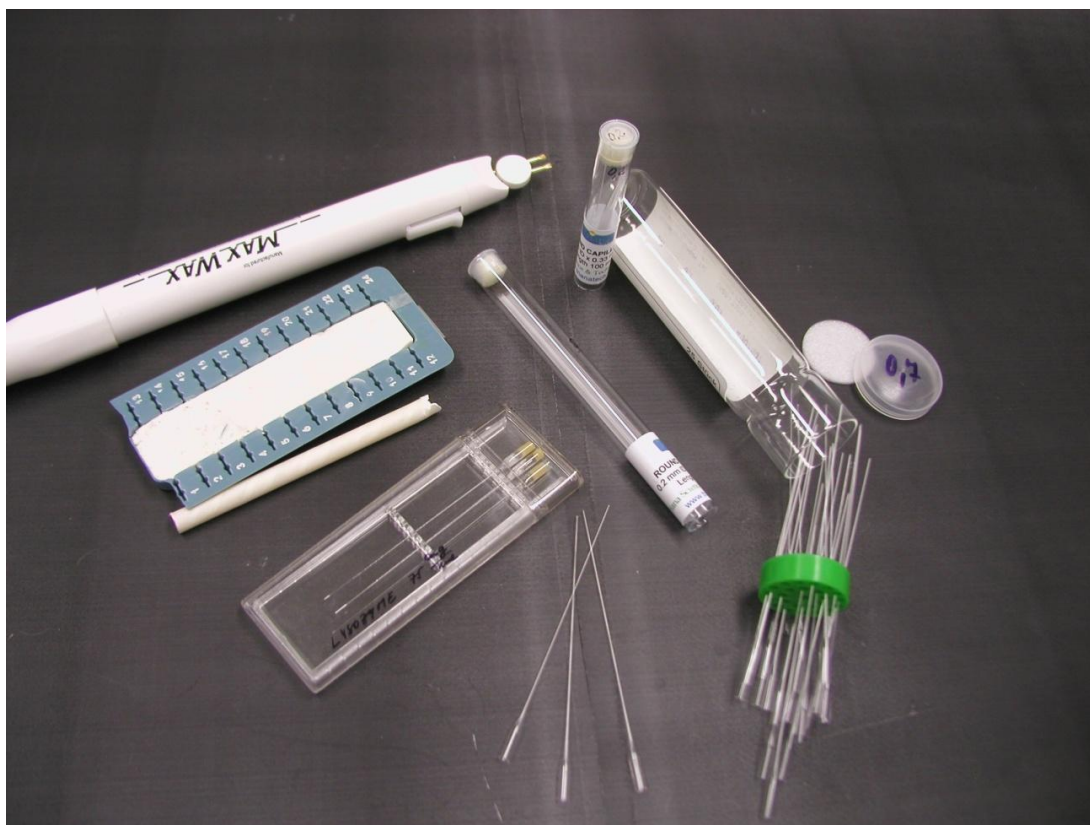
Obrázek 24: Destička Limbro plate pro visící kapku.



Obrázek 25: Destička CombiClover crystallization plates pro sedící kapku



Obrázek 26: Destička Terasaki plate pro krystalizaci pod olejem (Microbatch)



Obrázek 27: Skleněné kapiláry pro krystalizaci proteinů

9. Abstrakt (česky)

Cílem práce bylo naučit se používat metody proteinové krystalografie v praxi a pokusit se připravit krystaly mutantní formy halogendehalogenasy DhaA31 a modelového proteinu Thermolysinu pomocí základních a pokročilých krystalizačních metod a následně vyřešit a graficky zobrazit jejich struktury pomocí počítačových nástrojů používaných pro molekulární modelování. Výsledkem projektu bylo vypěstování krystalů obou proteinů a popis struktury a aktivního místa proteinu DhaA31, který byl připraven z důvodu zvýšení rychlosti katalytické reakce při odbourávání chlorovaných derivátů uhlovodíků, především 1,2,3-trichlorpropanu (TCP) z volných vod.

10. Abstrakt (anglicky)

The project was focused on using of protein crystallography practically and mainly on preparation of crystals of model protein Thermolysin and haloalkan dehalogenase mutant variant DhaA31 with the use of standard and advanced crystallization methods. Later the DhaA31 structure was solved and graphically visualized using the molecular modeling programs as well as the structure of Thermolysin. Obtaining the crystals of both studied proteins and description of the DhaA31 structure, active site and dehalogenation reaction were results of the project. DhaA31 mutant variant was prepared to increase the catalytic reaction during degradation of halogenated compounds such as 1,2,3-trichloropropane (TCP) from water sources.

