

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Krystalizační studie lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a
LysSt11**

Diplomová práce

Bc. Vendula Flanderová

Školitel: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

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

České Budějovice 2020

Flanderová, V., 2020: Krystalizační studie lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11. [Crystallization studies of lytic enzymes of bacteriophages LysAm24, LysSi3 and LysSt11. Mgr. Thesis, in Czech.] – 59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This master thesis is focused on the crystallization experiments of the lytic enzymes of bacteriophages LysAm24, LysSi3 and LysSt11. Main aim of this work is finding of crystallization conditions to prepare suitable protein crystals, which will be used for X-ray structural analysis. Diffraction data will be used for description of protein structures and for further research.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 9. 12. 2020

.....
Bc. Vendula Flanderová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Tatyňě Prudnikové, Ph.D. za ochotné a trpělivé vedení jak praktické, tak teoretické části diplomové práce. Dále bych také ráda poděkovala za připomínky a cenné a odborné rady při psaní práce. V závěru bych také chtěla poděkovat Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D za užitečné rady při práci.

Obsah

1. Úvod	1
2. Literární přehled	3
2.1 Struktura krystalu.....	3
2.2 Rentgenová difrakční analýza.....	6
2.3 Princip difrakce	6
2.4 Rentgenový difrakční experiment.....	9
2.5 Fázový problém a jeho řešení	10
2.6 Lytické enzymy.....	12
2.7 Lytický enzym bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11	13
3. Materiály a metody.....	15
3.1 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24.....	15
3.1.1 Příprava krystalizačního roztoku	15
3.1.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysAm24.....	15
3.1.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24.....	16
3.2 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3	17
3.2.1 Příprava krystalizačního roztoku	17
3.2.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysSi3	17
3.2.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3	17
3.3 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11	18
3.3.1 Příprava krystalizačního roztoku	18
3.3.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysSt11	18
3.3.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11	18
3.4 Testování vzniklých krystalů	19
3.4.1 Test drcením	19
3.4.2 Barvicí test.....	19
3.5 Difrakční data	19

3.6	Modelování struktury lytického enzymu LysSi3	19
4.	Výsledky.....	21
4.1	Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24	21
4.2	Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3	22
4.3	Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11	24
4.4	Výsledky testování krystalů.....	26
4.5	Výsledky difrakční analýzy	30
4.6	Porovnání krystalizačních podmínek při krystalizaci lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11.....	32
4.7	Výsledky modelování 3D struktury lytického enzymu bakteriofágu LysSi3	33
5.	Diskuze	36
6.	Závěr.....	40
7.	Seznam literatury	41
8.	Přílohy	45
8.1	Složení krystalizačních činidel použitých pro krystalizaci lytických enzymů	45
8.2	Schéma krystalizace lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11	47

1. Úvod

Enzymy jsou důležitou součástí lidského života. Podílí se na důležitých biochemických procesech, které jsou nedílnou součástí všech organismů. Nadále jsou využívány i v mnoha jiných oblastech každodenního života, například v environmentálních technologiích nebo v průmyslu (Koonin a Tatusov, 1994; Soda a kol., 1996; Schmidberger a kol., 2007). Speciálním druhem enzymů jsou lytické enzymy, které patří mezi peptidoglykanické hydrolázy a jsou velice důležité díky svému potenciálu degradovat hostitelské bakteriální buňky. Díky své funkci rozkládat hostitelské bakteriální buňky se předpokládá, že budou využívána jako antimikrobiotika, která buď zcela nahradí současná antibiotika, nebo dojde alespoň k částečnému nahrazení používaných antibiotik (Porter a kol., 2007).

K tomu, aby bylo možné zjistit využití daného enzymu, je potřeba nejprve určit třídimenzionální strukturu tohoto enzymu. K určení atomární struktury se používá rentgenová krystalografie. Dne 3. 10. 2020 obsahovala PDB databáze 169 436 proteinových struktur. 90 % z těchto struktur bylo vyřešeno právě metodou rentgenové krystalografie ((RCSB PDB, 2020). K tomu, aby byla rentgenová krystalografie úspěšná je potřeba nejprve vypěstovat kvalitní krystaly, které poskytují difrakční data pro určení struktury studovaného enzymu.

Teoretická část práce se zabývá základními daty o struktuře proteinového krystalu. Nejprve se zabývá elementární buňkou a asymetrickými jednotkami, přes krystalovou mřížku až k prostorovým grupám. Další část obsahuje informace o rentgenové difrakční analýze, jsou zde vysvětleny základní pojmy. Dále je v práci vysvětlen princip difrakce a průběh celého rentgenového difrakčního experimentu. Zbytek teoretické části se zabývá lytickými enzymy a studovanými lytickými enzymy bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11.

Praktická část práce popisuje krystalizaci lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 a testování vzniklých krystalů. Závěrečný díl praktické části se věnuje modelování 3D struktury enzymu LysSi3.

V závěrečné fázi jsou zaznamenány výsledky krystalizace a následného testování připravených krystalů lytických enzymů. Dále je zde zpracováno srovnání podmínek pro krystalizaci lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11. Tato část obsahuje také difrakční data lytických enzymů a 3D strukturu lytického enzymu LysSi3.

Cílem práce bylo

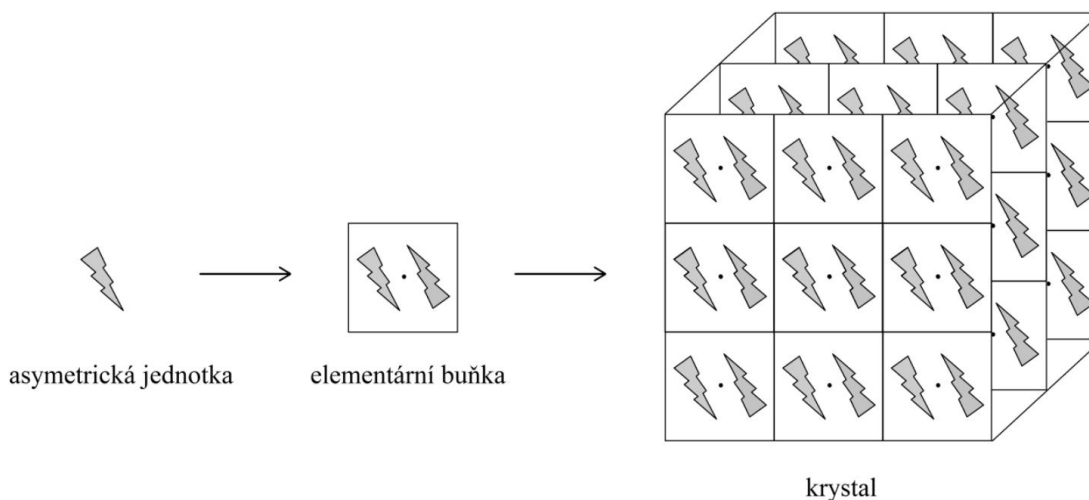
- nalézt a optimalizovat krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů nových lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11
- připravit krystaly studovaných proteinů v difrakční kvalitě
- otestovat připravené krystaly a získat difrakční data
- porovnat krystalizační podmínky vzniklých krystalů LysAm24, LysSi3 a LysSt11
- molekulové modelování 3D struktur nových lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11
- příprava obrázků 3D struktur proteinu LysAm24, LysSi3 a LysSt11

2. Literární přehled

2.1 Struktura krystalu

Podle definice je krystal pravidelné trojrozměrné uspořádání molekul, jednotlivé molekuly jsou k sobě vázány slabými vazebnými interakcemi. U krystalů proteinů je molekula relativně flexibilní (Rhodes, 2006). K nejsnazšímu popisu struktury a symetrie krystalu se velmi často používá pojem ideální krystal. Ideální krystal je definovaný jako nekonečný, má pravidelnou strukturu a neobsahuje poruchy. Trojrozměrná translační periodicitu je základním rysem pravidelnosti ideálního krystalu. Opakování základního motivu, který je tvořen jedním nebo více atomy ve třech směrech napříč celým krystalem, je pro ideální krystal charakteristické. V případě organických krystalů může motiv obsahovat i tisíce atomů. Struktura ideálních krystalů se však jen přibližuje struktuře reálného krystalu (Valvoda a kol., 1992).

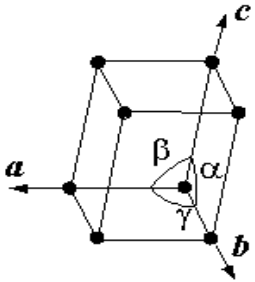
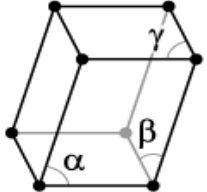
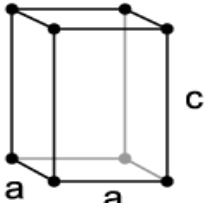
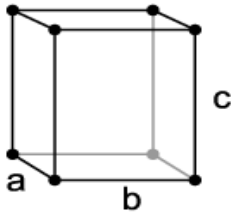
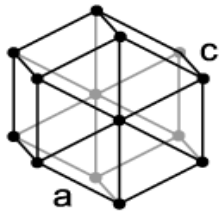
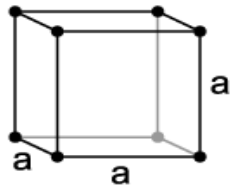
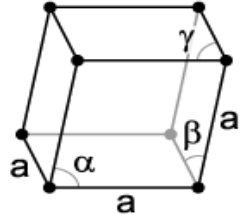
Základní stavební jednotku krystalu tvoří elementární buňka. Elementární buňka je nejjednodušší a nejmenší objemový prvek, který se pravidelně opakuje ve všech směrech a reprezentuje celý krystal. Elementární buňku udávají rozměry hran (a , b , c) a úhly mezi nimi (α , β , γ). Dalším pojmem užívaným kromě elementární buňky je asymetrická jednotka. Asymetrická jednotka je nejmenší jednotka struktury, která může utvářet celý krystal, nejprve však musí dojít k aplikaci operace symetrie (Rhodes, 2006). Asymetrická jednotka, elementární jednotka a krystal jsou znázorněny na Obr. 1. Při operaci symetrie, dochází ke geometrické transformaci, kdy jsou zachovány vzdálenosti v tělese a po jejím provedení není poznat, jestli s tělesem byla nebo nebyla prováděna nějaká transformace. K základním operacím symetrie patří translace, zrcadlení, rotace a inverze (Vávra a Losos, 2006).



Obr. 1: Uspořádání asymetrické jednotky do elementární buňky s využitím inverze (střed symetrie = černý bod), krystal složený z elementárních buněk (upraveno podle Rupp, 2010).

Jednotlivé atomy jsou v krystalu uspořádány do krystalové mřížky, která se skládá z identických elementárních buněk. Krystalovou mřížku lze definovat jako množinu bodů s totožným a stejně orientovaným okolím. Jde o mřížku, jejíž mřížové body se mohou shodovat se středy atomů, avšak mohou se i lišit. Mřížka slouží k popisu uspořádání atomů krystalu a k charakterizaci struktury, například pomocí umístění atomů v buňce mřížky (Valvoda a kol., 1992). Používáme sedm různých krystalových mřížek, často nazývaných jako krystalové soustavy. Jednotlivé krystalové soustavy jsou: jednoklonná (monoklinická), trojklonná (triklinická), čtverečná (tetragonální), kosočtverečná (ortorombická), šesterečná (hexagonální), krychlová (kubická) a klencová (trigonální). Jednotlivé soustavy jsou zobrazeny v Tab. I. Krystaly se řadí do krystalových soustav dle společných prvků symetrie. Jako centrosymetrickou označujeme mřížku, která obsahuje střed symetrie, krystal obsahující tuto mřížku nazýváme centrosymetrickým (Vávra a Losos, 2006).

Tab. I: Krystalové struktury (upraveno podle Vávra a Losos, 2006).

Krystalová mřížka	Mřížkové parametry	Schéma
Jednoklonná (monoklinická)	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \gamma, \beta > 90^\circ$	
Trojklonná (triklinická)	$a \neq b \neq c$ $\alpha \neq \beta \neq \gamma \neq 90^\circ$	
Čtverečná (tetragonální)	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Kosočtverečná (ortorombická)	$a \neq b \neq c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Šesterečná (hexagonální)	$a = b \neq c$ $\alpha = \beta = 90^\circ$ $\gamma = 120^\circ$	
Krychlová (kubická)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	
Klencová (trigonální)	$a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$	

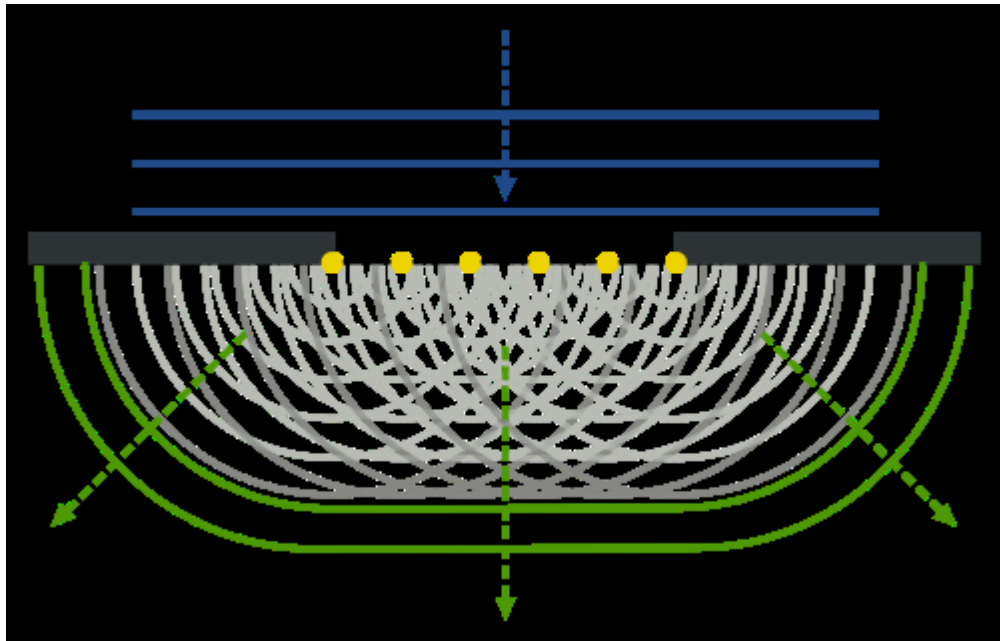
Pro popsání struktury krystalů neslouží pouze krystalové mřížky, ale využívají se i prostorové grupy. Výhodou prostorové grupy je, že jsou v ní obsaženy všechny údaje o symetrii krystalu. Obsahuje symetrii makroskopickou i symetrii atomové struktury (Valvoda a kol., 1992). Můžeme odvodit 230 prostorových grup. Ty zahrnují všechny možné kombinace translačních a beztranslačních prvků symetrie, které jsou přípustné pro krystalografické transformace. Prvky symetrie jednotlivých prostorových grup nabývají v prostoru charakteristické polohy a orientace (Vávra a Losos, 2006). Prostorová grupa je označována čtyřmi znaky. První písmeno označuje typ mřížky. Zbylé tři znaky slouží k označení prvků symetrie, které byly kombinovány s translacemi mřížky při utvoření prostorové grupy (Valvoda a kol., 1992). K definování polohy všech atomů v krystalu je potřeba znát elementární buňku, obsah asymetrické jednotky a prostorovou grupu (Rhodes, 2006).

2.2 Rentgenová difrakční analýza

Metoda rentgenové difrakční analýzy se využívá k určení struktury krystalických látek. Tato metoda využívá interakce rentgenového (elektromagnetického) záření s elektrony atomů krystalů v periodicky uspořádané hmotě. K ohybu záření, tedy k difrakci, dochází v krystalové mřížce díky podobným rozměrům krystalové mřížky a vlnové délce rentgenového záření. Jedná se přibližně o 0,1 nm (Žídek, 2015).

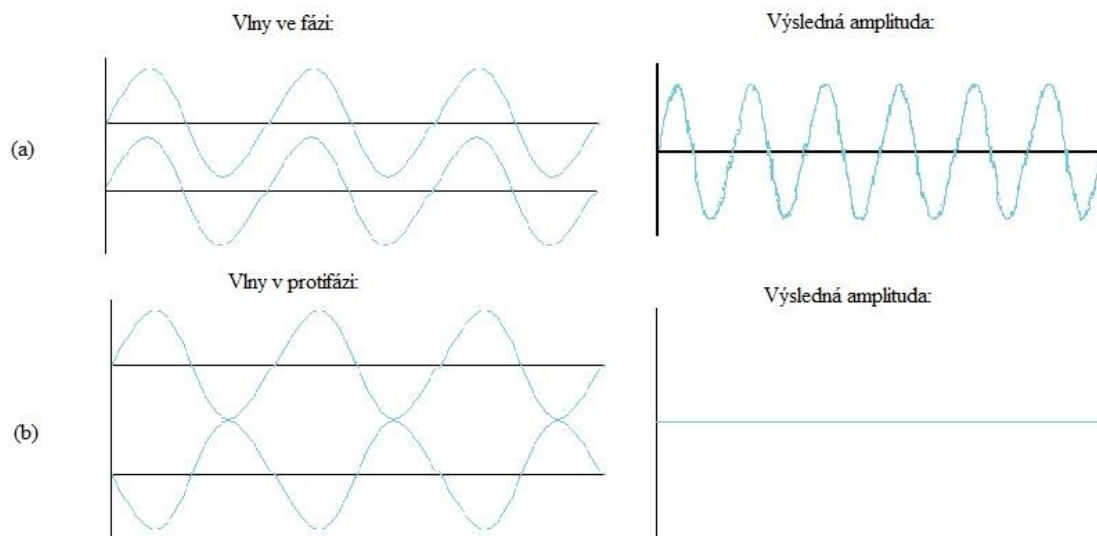
2.3 Princip difrakce

Při ději nazývaném difrakce dochází v případě, že vlnění narazí na štěrbinu nebo překážku. Může se jednat o jakékoli vlnění, například o vlnění zvukové, elektromagnetické, na vodní hladině, rádiové nebo rentgenové. V případě, že světlo narazí na překážku, dojde k ohybu vlnění do oblasti nazývané geometrický stín překážky. Tento jev popisuje Huygensův princip, který říká, že v každém okamžiku může být každý bod šířící se vlny chápán jako další nový zdroj vlnění sekundárních vln (viz Obr. 2). V případě, že se rozměr překážky, štěrbinu přibližně rovná vlnové délce, je účinek difrakce největší (Rappaport, 2002).



Obr. 2: Huyfensův princip difrakce (převzato z Nordmann, 2007).

V případě, že vlnění narazí na více překážek, popř. štěrbin, dochází buď ke konstruktivnímu, nebo destruktivnímu složení sekundárních vln. Vlastností sekundárních vln je, že mají stejnou vlnovou délku, ale jsou vůči sobě různě fázově posunuté, což závisí na poloze překážek. K destruktivnímu složení sekundárních vln dochází v případě, že se vlny navzájem vyruší, naopak v případě, že dojde k zesílení intenzity záření, jedná se o skládání konstruktivní. Zda-li se bude jednat o složení destruktivní nebo konstruktivní určuje fázování vln, vlny mohou být ve fázi, v protifázi nebo mezi těmito fázemi (viz Obr. 3).

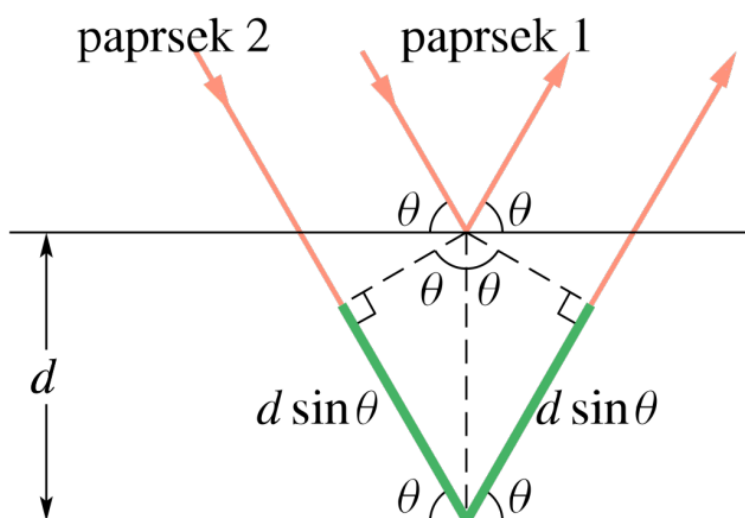


Obr. 3: Skládání vln. Konstruktivní (a), destruktivní (b) (upraveno podle Haade a Quibik, 2010).

V případě, že se odražené paprsky nachází ve fázi, dojde k sečtení jejich amplitud a k tvorbě difrakčního obrazce. Na detektoru dojde k zachycení uspořádaných skvrn, tzv. reflexí. Jev je popsán Braggovým zákonem (Bragg a Bragg, 1913):

$$2d \sin \theta = n\lambda$$

d značí vzdálenost mezi atomovými vrstvami krystalu, θ je úhel dopadu rentgenového paprsku, n symbolizuje kladné celé číslo a λ je vlnová délka dopadajícího rentgenového paprsku (Rupp, 2010). Braggův zákon je zobrazen na Obr. 4.



Obr. 4: Braggův zákon (převzato z Halliday a kol., 2000).

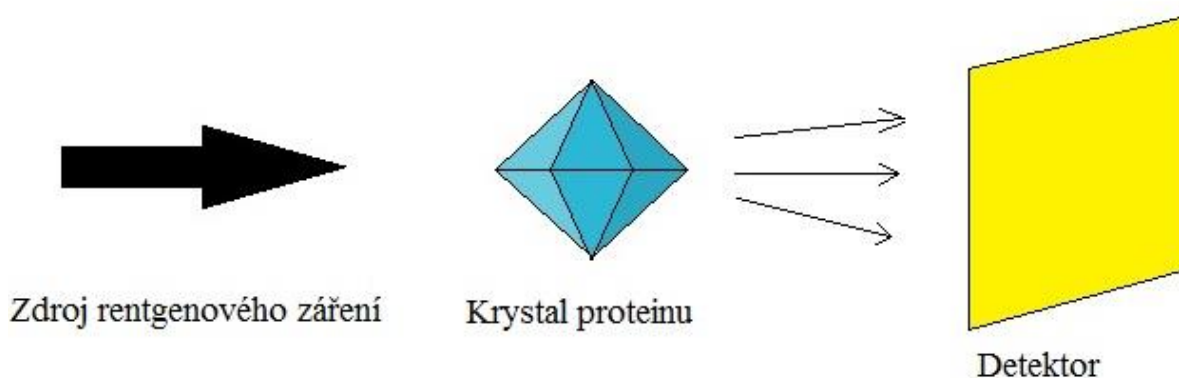
Reflexe charakterizuje strukturální faktor $F(hkl)$ (Židek, 2015):

$$F(hkl) = V \int_{x=0}^1 \int_{y=0}^1 \int_{z=0}^1 \rho(xyz) e^{2\pi i(hx+ky+lz)} dx dy dz$$

h, k, l jsou Millerovy indexy, které definují rovinu atomů v krystalu podle průsečíků se základními krystalografickými osami, V značí objem elementární buňky zkoumaného krystalu a ρ značí elektronovou hustotu v bodě x, y, z v elementární buňce (Židek, 2015). Strukturální faktor udává celkový rozptyl ze všech atomů elementární buňky, dále zahrnuje relativní fázový úhel mezi odraženými vlnami a amplitudu strukturálního faktoru. Strukturální faktor je vyjádřen komplexním číslem (Rupp, 2010). Při hledání struktury molekuly je potřeba určit rozložení elektronů s využitím elektronové hustoty, proto není nutnost počítat strukturální faktor. O tvaru molekuly rozhoduje rozložení elektronů (Židek, 2015).

2.4 Rentgenový difrakční experiment

Rentgenový difrakční experiment je prováděn na monokrystalu studovaného proteinu. Rentgenový difrakční experiment je schematicky znázorněn na Obr. 5. Pro tento experiment je velmi podstatné získat kvalitní monokrystal, což může být mnohdy dlouhý a složitý proces. Pro získání kvalitního monokrystalu je potřeba nalézt krystalizační podmínky, při kterých se podaří vykrytalizovat krystal o všech třech rozměrech 0,01 mm, navíc musí být krystal bez defektů a prasklin (Kratochvíl a kol., 2008).



Obr. 5: Schéma rentgenového difrakčního experimentu (vlastní obrázek).

K provedení experimentu se používají různé typy zařízení nazývaná difraktometr. Generátory pro sběr difrakčních dat, čtyřkruhový difraktometr a vícekruhové difraktometry. Difraktometry mohou být připojeny na zdroj synchrotronového záření v rentgenové oblasti. Výhodou takového spojení je, že dojde k vybuzení většího množství měřitelných difrakcí a data jsou kompletnější (Kratochvíl a kol., 2008). Zdrojů synchrotronového záření se nachází v Evropě celkem čtrnáct. V Německu nalezneme DEZY v Hamburku, BESSY v Berlíně, další se nacházejí v Itálii, Francii, Švýcarsku, Španělsku, Rusku a Švédsku (BioSync, 2018).

Při experimentu dojde k vystavení krystalu paprskům rentgenového záření a k zachycení jednotlivých difrakcí na detektoru, je získán difrakční obrazec. Pro získání všech potřebných dat musí být krystal otáčen o 180°, některé krystaly s vyšší symetrií mohou využívat úhlový rozsah 45° nebo 90° (McPherson, 2002). Otáčení krystalu zajišťuje goniometr, díky kterému lze působit zářením na krystal ze všech směrů (Emmer a kol., 2007). Složitost krystalu ovlivňuje počet potřebných difrakcí pro určení struktury. V případě krystalů kovů se jedná o několik desítek difrakcí, pokud se určuje struktura krystalů virů, je potřeba i několika milionů difrakcí. S tím souvisí i doba sběru dat, při malém počtu difrakcí

se jedná o několik hodin, v případě velkého počtu difrakcí může být tato potřebná doba i několik dní (Kratochvíl a kol., 2008).

Vysokoenergetické rentgenové záření způsobuje poškození organické hmoty, tedy i proteinových krystalů (Rupp, 2010). Aby nedošlo k poškození krystalu vysokoenergetickým rentgenovým zářením, chladí se krystal proudem tekutého dusíku (100 K). Nízká teplota navíc zabraňuje nežádoucím teplotně-vibračním pohybům atomu (Kratochvíl a kol., 2008).

Získaná difrakční data v podobě difrakčních obrazců jsou výsledkem experimentu. Z difrakčních obrazců však nelze přímo určit vnitřní strukturu krystalu, mohou být ale použity na určení polohy a intenzity jednotlivých difrakcí. Pomocí těchto intenzit lze odvodit pozici atomů a teplotně vibrační parametry, navíc pomocí difrakčních úhlů lze určit rozměr elementární buňky. Prostorová grupa se určuje podle systematicky vyhasínajících difrakcí (takové difrakce mají nulovou intenzitu) (Kratochvíl a kol., 2008).

2.5 Fázový problém a jeho řešení

Strukturální krystalografie nazývá fázovým problémem úvodní neznalost hodnot fází. Informace o intenzitě difrakcí a údaje o fázových úhlech jsou důležité k určení mapy distribuce elektronové hustoty. Elektronovou hustotu lze vypočítat podle Židka (2015):

$$\rho(xyz) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l F(hkl) e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\alpha(hkl)}$$

α v rovnici značí fázi strukturního faktoru.

K řešení fázového problému lze využít několik metod, které jsou založeny na skutečnosti, že neexistuje formální vztah mezi fázemi a amplitudami, existuje vztah jen mezi hustotou elektronů nebo molekulární strukturou a fázemi (Taylor, 2003). Podle Taylora (2003) se dělí tyto metody na 3 skupiny: izomorfní záměna, molekulární nahrazení a přímé metody.

Pro metodu izomorfní záměny je potřeba příprava derivátů studované chemické sloučeniny, která obsahuje alespoň malé množství atomů ve známých polohách, které jsou nahrazeny jinými atomy. Nejčastěji se nahrazují lehké atomy těžšími atomy, například atomy kovů, aby nedošlo k narušení krystalizace. Jelikož se deriváty liší jen druhem atomů v několika polohách, ale struktura zůstává stejná, nazývají se tyto deriváty izomorfní (Valvoda a kol., 1992). U necentrosymetrických krystalů dochází k dvojznačnému výsledku fázového úhlu již při použití jediného derivátu (Bokhoven a kol., 1951). Proto se využívá

série sloučenin v různých polohách (Blow a Rossmann, 1961). Ze získaných intenzit a fází difrakcí krystalu, jež obsahuje těžký atom, jsou následně odhadnuta data původního proteinu (Taylor, 2003). U jednodušších struktur se tato metoda často nevyužívá, jelikož příprava vhodného izomorfního proteinového derivátu je velmi časově i postupově náročná. V případě určování struktury složitých proteinů se tato metoda využívá hojně a je velmi úspěšná (Valvoda a kol., 1992).

S metodou izomorfní záměny bývá kombinována metoda anomálního rozptylu (Kratochvíl a kol., 2008). Při této metodě se používá pouze jeden krystal, na kterém se provádí měření o různých vlnových délkách. Vlnové délky se volí tak, aby byly blízké i vzdálené od absorpční hrany těžkého atomu, tedy od atomu, který je v asymetrické jednotce krystalu zastoupen pouze v malém množství (Terwilliger, 1994). Tato metoda je snazší na provedení než metoda izomorfní záměny zejména díky tomu, že se používá jen jeden krystal. Nevýhodou této metody je vysoký nárok na přesnost, jelikož dochází k měření skoro nepatrných rozdílů intenzit. Velmi užitečným se při této metodě stává synchrotronové zařízení, u kterého lze libovolně volit vlnové délky záření. Tímto se velmi snadno získá anomální rozptyl ve výrazné míře na jakémkoli atomu. Při různých vlnových délkách rentgenových paprsků dochází ke změně velikosti strukturního faktoru, nedochází však ke změně fáze. Fázový rozdíl mezi anomálně a neanomálně rozptylujícími atomy v elementární buňce je nezávislý na vlnové délce rentgenového záření. Zisk průměrné amplitudy strukturního faktoru a její fáze pro každou reflexi při dané vlnové délce je konečným cílem této metody (Valvoda a kol., 1992).

Další metodou je metoda molekulárního nahrazení, která se využívá zejména v případě, že dostupný homologní model obsahuje alespoň 25 % sekvenční identity (Taylor, 2003). Tato metoda se v dnešní době využívá přibližně u 80 % všech proteinových struktur, je tedy nejvyužívanější metodou. Při této metodě dochází k přemístění, nikoli k substituci. Strukturní model rotuje a poté dojde k translaci do elementární buňky, až do té doby než není získáno řešení s nejvhodnějším vztahem mezi vypočítanými difrakčními daty známého modelu a zjištěnými daty neznámé struktury (Rossmann, 1972; Rupp, 2010). Při metodě molekulárního nahrazení dochází ke třem hlavním krokům: krok rotace, krok translace a krok hodnocení kvality řešení. Oba dva první kroky se provádí podle výpočtů Pattersonovy funkce. Principem je měnění pozice modelu, dokud není vypočítaná Pattersonova translační a rotační funkce shodná s pozorovanou Pattersonovou funkcí, která odpovídá struktuře

neznámého modelu (Navaza, 1994). Za počáteční model je poté považován homologní model, který je správně umístěn v neznámé struktuře (Rupp, 2010).

Při použití přímé metody se využívají matematické techniky, které řeší fázový problém pouze pomocí matematických vztahů, nikoliv s použitím strukturně-chemických informací (Allegra, 1980). Pro tuto metodu je nutno znát některé fáze reflexí, případně se z počátečních hodnot vybírá nejvíce pravděpodobné fázování reflexí. Dále dojde k odvození zbylých reflexí a z nich se vypočítávají mapy elektronové hustoty a pozice atomů. Tato metoda je omezena rozlišením difrakčních dat, ta musí být nižší než 1,2 Å. Navíc výpočetní čas se zvyšuje s tím, jak roste počet atomů v základní buňce, proto se tato metoda využívá jen u proteinů obsahujících maximálně 1000 atomů (Taylor, 2003).

2.6 Lytické enzymy

Lytické enzymy, často nazývané jako lysiny, jsou peptidoglykanické hydrolázy, které jsou produkovány bakteriofágem a slouží k lýzi hostitelské bakteriální buňky, ke které dochází během uvolňování potomků fágů. Jak píše Projan (2003), v posledních čtyřiceti letech se vývoj antimikrobiálních léků pro novou generaci antibiotik spolehal převážně na syntetickou modifikaci již existujících sloučenin. Bohužel tento přístup nemohl udržet krok s vývojem léků a lékovou rezistencí, stejně jako s hrozbami týkající se vzniku nových nemocí. Ve světle této urgentní potřeby pro vývoj nových antimikrobiotik, byla vyvinuta třída bakteriofágů kódovaných hydroláz buněčné stěny, jako nové terapeutikum a nový profylaktický nástroj pro léčbu a prevenci infekcí způsobenou gram-pozitivními patogeny.

Lysiny jsou aktivní ve virovém infekčním cyklu a rychle štěpí vazby nezbytné pro stabilitu peptidoglykanů, aby se usnadnil rozpad bakterií a současně došlo k uvolnění potomstva fágů (Bernhardt a kol., 2002). Tyto enzymy často vykazují struktury s více doménami, přičemž N-koncové katalytické moduly se slučují s C-koncovými vazebnými doménami buněčné stěny (Croux a kol., 1993). Lysiny spadají do jedné ze čtyř různých enzymatických tříd (endo- β -N-acetylglukoaminidázy, N-acetylmuramidasy – lysozym, N-acetylmuramoyl-L-alanin amidázy, endopeptidázy) v závislosti na specifikacích štěpení v substrátu cílové buněčné stěny (Nelson a kol., 2001).

Průběh lýze dvouvláknových DNA bakteriofágů lze objasnit třemi různými mechanismy. Nejvíce demonstrovaným mechanismem je kanonická lýze. Při tomto mechanismu působí lysiny na peptidoglykanovou vrstvu pomocí druhého fágu nazývaný holin. Holiny depolarizují cytoplazmatickou membránu tím, že umožňují endolysinům

difundovat póry v membráně a zaměří se na peptidoglykanovou vrstvu. Druhý mechanismus je prováděn speciální třídou holinů, nazývanou pinholiny. Tyto pinholiny tvoří malé heptametrické kanály v membráně, namísto velkých otvorů. Společně s lysiny zajišťují zástavu signálu. Dále pinholiny spouští aktivaci enzymů a fungují jako časovače pro aktivaci lysinů. Ve třetím mechanismu se lyzační proteiny nazývají spaniny. Spaninový komplex se skládá z malého vnějšího membránového lipoproteinu (o-spanin) a integrálního cytoplazmatického membránového proteinu (i-spanin), který působí třemi způsoby: prvním způsobem je enzymatická degradace křížových vazeb peptidoglykanické vazby. Druhým způsobem je tvorba pórů a třetím způsobem fúze vnitřní membrány s vnější membránou. Tyto enzymy byly označeny za „enzybiotika“ a mohou být využity pro svou schopnost zabíjet různé patogeny (Matamp, 2019).

Dříve bylo prokázáno, že fágové lysiny jsou slibnou platformou pro vývoj terapeutických profylaktických nástrojů nebo tzv. enzybiotik. Bylo prokázáno, že lysiny lze využít pro rychlou sterilizaci kultur streptokoků A a B, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* a *Bacillus anthracis*. Navíc byla prokázána účinnost lysinů u myši jako prevence a eliminace faryngeální nebo vaginální kolonizace, pneumokokové otravy septicémií a peritoneální kolonizace. Předpokládá se, že antibiotika budou vyvinuta buď jako alternativa k současným antibiotikům, nebo jako doplněk k nim (Loeffler a kol., 1993; Schuch a kol., 2002; Cheng a kol., 2005; Enteza a kol., 2005).

2.7 Lytický enzym bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11

Tyto fágové lysiny byly získány od členů rodiny Myoviridae. Geny kódující LysAm24 z fága *Acinetobacter* AM24, LysECD7 z fága *Escherichia* phage ECD7 a Lys Si3 z fága *Escherichia* phage ECD7 byly klonovány a exprimovány v *E. coli*. Za účelem klonování byly kódující sekvence vybraných lysinů rozmnoženy z fágových lizátů a následně byly vloženy do *E. coli*. Proteiny byly čištěny afinitní chromatografií a následně proběhla gelová SDS-PAGE analýza. Použitím gelové SDS-PAGE analýzy byla zjištěna molekulová hmotnost jednotlivých lytických enzymů. Molekulová hmotnost LysAm24 byla 25,9 kDa, 16,1 kDa pro LysECD7 a molekulová hmotnost LysSi3 byla 18,5 kDa (Walmagh a kol., 2012).

Výhodou těchto lysinů je, že se jedná o malé lysiny, které jsou nákladově efektivní pro biotechnologickou výrobu. Výroba LysAm24, LysECD7 a LysSi3 je efektivní, levná a

probíhá v *E. coli*. Navíc jsou dostatečně stabilní a mají širokou baktericidní aktivitu, tedy jsou schopné inhibovat růst gramnegativních zástupců (Antonova a kol., 2019).

3. Materiály a metody

Cílem diplomové práce bylo nalézt a optimalizovat podmínky pro přípravu proteinových krystalů nových lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11.

K nalezení vhodných krystalizačních podmínek pro krystalizaci těchto lytických enzymů byla vybrána metoda sedící kapky. Krystalizační podmínky byly porovnány a následně vyhodnoceny. Dále byly krystaly lytických enzymů testovány pomocí krystalizačních testů a poté zaznamenána difrakční data. Pomocí difrakčních dat byla vymodelována molekulová 3D struktura. Všechny získané výsledky byly vyfotografovány a zaznamenány ke konečnému vyhodnocení.

3.1 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24

3.1.1 Příprava krystalizačního roztoku

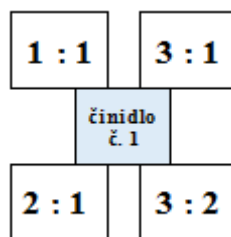
Na krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 byla použita sada komerčně dostupných krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Složení jednotlivých použitých činidel se uvádí v Přílohách.

3.1.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysAm24

Pro nalezení optimálních podmínek pro krystalizaci byla koncentrace lytického enzymu 2krát změněna z důvodu výskytu sraženiny při první použité koncentraci roztoku lytického enzymu. Roztok lytického enzymu byl ředěn roztokem 20 mM Tris-HCl pH 7.5-8.0.

Lytický enzym byl naředěn na koncentraci 5 mg/ml. Následně byl používán roztok lytického enzymu o koncentraci 3,5 mg/ml.

Nejprve byla provedena krystalizace lytického enzymu o koncentraci 5 mg/ml s využitím krystalizačních činidel PEG/Ion 1 číslo činidla 1-24. Na tuto krystalizaci byla využita krystalizační destička pro krystalizaci metodou sedící kapky. Schéma jedné jamky je znázorněno na Obr. 6. V dalších jamkách byl zachován stejný poměr, jen došlo ke změně krystalizačního činidla. Reservoár obsahoval 100 μ l krystalizačního činidla.



Obr. 6: Schéma jamky krystalizačního experimentu (vlastní obrázek).

Takto připravená krystalizační destička byla vložena do chladicího zařízení. Po týdnu vznikla v kapkách sraženina, což znamenalo, že roztok enzymu je příliš koncentrovaný a proto byl následně naředěn na koncentraci 3,5 mg/ml.

3.1.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24

Pro krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 byla použita metoda sedící kapky. Vlastní krystalizace poté probíhala při teplotě kolem 4°C v chladicím zařízení.

Metoda sedící kapky

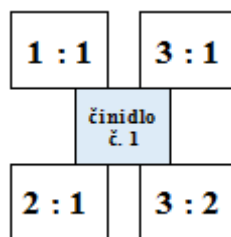
Při krystalizaci metodou sedící kapky byla koncentrace roztoku lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 nejprve 5 mg/ml, po vzniku sraženiny byla koncentrace snížena na 3,5 mg/ml. Sada krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] byla použita jako činidlo.

Pro nalezení optimálních krystalizačních podmínek pro růst krystalů byl poměr množství roztoku lytického enzymu a roztoku krystalizačního činidla měněn. V tabulkách je uváděn vždy takovýto poměr; množství roztoku lytického enzymu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci touto metodou byly použity celkem 4 krystalizační destičky určené pro krystalizaci metodou sedící kapky.

V reservoáru bylo vždy stejné množství krystalizačního činidla a to 100 µl.

Schéma jedné jamky je znázorněno na Obr. 7. V dalších jamkách byl zachován stejný poměr, jen došlo ke změně krystalizačního činidla.



Obr. 7: Schéma jamky krystalizačního experimentu (vlastní obrázek).

3.2 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3

3.2.1 Příprava krystalizačního roztoku

Na krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 byla použita stejná sada komerčně dostupných krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA], která byla použita i v případě krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24. Složení jednotlivých použitých činidel se uvádí v Přílohách.

3.2.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysSi3

Koncentrace roztoku lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 byla 5 mg/ml. Jelikož nedošlo ke vzniku sraženiny, nemusela se dále koncentrace roztoku měnit.

3.2.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3

Pro krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 byla použita metoda sedící kapky. Vlastní krystalizace poté probíhala při teplotě kolem 4°C v chladícím zařízení.

Metoda sedící kapky

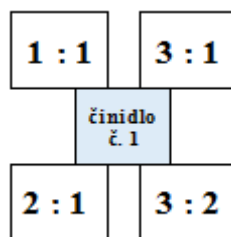
Při krystalizaci metodou sedící kapky byla koncentrace roztoku lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 3,5 mg/ml. Sada krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] byla použita jako činidlo.

Pro nalezení optimálních krystalizačních podmínek pro růst krystalů byl poměr množství roztoku lytického enzymu a roztoku krystalizačního činidla měněn. V tabulkách je uváděn vždy takovýto poměr; množství roztoku lytického enzymu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci touto metodou byly použity celkem 4 krystalizační destičky, které jsou určeny pro krystalizaci metodou sedící kapky.

V reservoáru bylo vždy stejné množství krystalizačního činidla a to 100 µl.

Schéma jedné jamky je znázorněno na Obr. 8. V dalších jamkách byl zachován stejný poměr, jen došlo ke změně krystalizačního činidla.



Obr. 8: Schéma jamky krystalizačního experimentu (vlastní obrázek).

3.3 Krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11

3.3.1 Příprava krystalizačního roztoku

Na krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 byla použita stejná sada komerčně dostupných krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA], která byla použita i v případě krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 a lytického enzymu bakteriofágu LysSi3. Složení jednotlivých použitých činidel se uvádí v Přílohách.

3.3.2 Naředění lytického enzymu bakteriofágu LysSt11

Koncentrace roztoku lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 byla 5 mg/ml. Jelikož nedošlo ke vzniku sraženiny, nemusela se dále koncentrace roztoku měnit.

3.3.3 Vlastní krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11

Pro krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 byla použita metoda sedící kapky. Vlastní krystalizace poté probíhala při teplotě kolem 4°C v chladícím zařízení.

Metoda sedící kapky

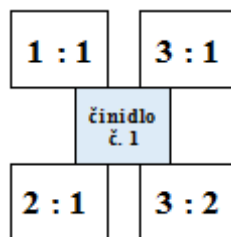
Při krystalizaci metodou sedící kapky byla koncentrace roztoku lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 3,5 mg/ml. Sada krystalizačních činidel PEG/Ion Screen HR2-126 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] byla použita jako činidlo.

Pro nalezení optimálních krystalizačních podmínek pro růst krystalů byl poměr množství roztoku lytického enzymu a roztoku krystalizačního činidla měněn. V tabulkách je uváděn vždy takovýto poměr; množství roztoku lytického enzymu : množství krystalizačního činidla.

Pro krystalizaci touto metodou byly použity celkem 4 krystalizační destičky, které jsou určeny pro krystalizaci metodou sedící kapky.

V reservoáru bylo vždy stejné množství krystalizačního činidla a to 100 μ l.

Schéma jedné jamky je znázorněno na Obr. 9. V dalších jamkách byl zachován stejný poměr, jen došlo ke změně krystalizačního činidla.



Obr. 9: Schéma jamky krystalizačního experimentu (vlastní obrázek).

3.4 Testování vzniklých krystalů

Pro ověření, že vzniklé krystaly jsou opravdu krystaly příslušného lytického enzymu a nejedná se o krystaly soli, byly využity tyto testy: test drcením a test barvicí.

3.4.1 Test drcením

Při tomto testu dochází k drcení krystalů pod mikroskopem. V případě, že se jedná o krystal lytického enzymu, dojde k jeho rozpadu již po jemném dotyku. Pokud by se však jednalo o krystal nežádoucí soli, krystal by se rozpadl až při vynaložení větší síly. Výsledek testu drcením byl zaznamenán pro další vyhodnocení.

3.4.2 Barvicí test

Na destičku s krystaly byl přidán 1 μ l barviva, které se poté nechalo jednu hodinu působit, aby mohlo dojít k obarvení krystalů. Kdyby nastala situace, kdy se krystaly ani po hodině neobarvily, vzniklý krystal by nebyl krystalem příslušného lytického enzymu. Jednalo by se o krystal soli. Výsledek testu byl vyfotografován k dalšímu vyhodnocení.

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

3.5 Difrakční data

Vzniklé krystaly lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 byly následně otestovány rentgenovou difrakční analýzou na synchrotronu BESSY-II, který provozuje Helmholtz-Zentrum Berlin (Berlin-Adlershof, Německo).

3.6 Modelování struktury lytického enzymu LysSi3

Difrakční data byla získána a zpracována na synchrotronu BESSY-II mou školitelkou Mgr. Tatyánou Prudnikovou, Ph.D., vlastní struktura byla řešena za její asistence a následné zanalyzování a vyobrazení již proběhlo bez její spolupráce.

Samotné 3D modelování struktury lytických enzymů bylo prováděno pomocí programu VMD. Výsledkem modelování byla 3D struktura studovaného lytického enzymu.

4. Výsledky

Tato část diplomové práce zahrnuje výsledky provedených experimentů, a to konkrétně: krystalizace lytických enzymů bakteriofágů, testování vzniklých krystalů, RTG difrakce lytických enzymů, srovnání podmínek krystalizace a modelování 3D struktury.

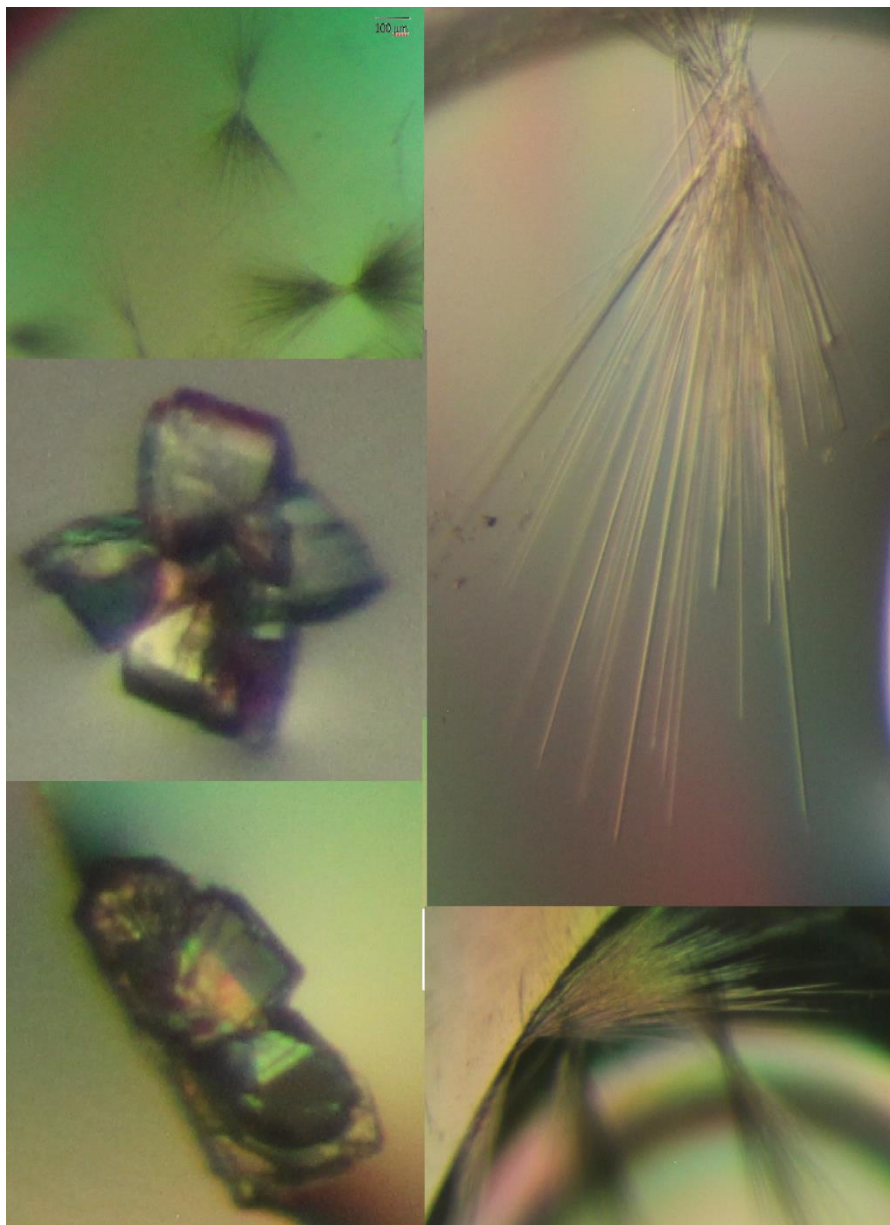
Výsledky a průběh celé diplomové práce byl zaznamenán pomocí fotoaparátu Olympus (Olympus, Praha), který byl upevněný na mikroskopu SZX9 se zvětšením 450x.

4.1 Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysAm24

Ke krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 bylo použito pět krystalizačních destiček. Roztok lytického enzymu byl nejprve o koncentraci 5 mg/ml, po vzniku sraženiny byl roztok naředěn na 3,5 mg/ml, aby se dalším sraženinám zabránilo.

Při krystalizaci lytického enzymu LysAm24 vznikly krystaly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu za těchto podmínek: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 3 (0,2 M fluorid amonný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 7 (0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 34 (0,2 M síran draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 40 (0,2 M dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, 20% w/v PEG 3350), poměr 1:1 a 2:1. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 23 (0,1 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 29 (0,1 M dvojsytný vínán amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 39 (0,04 M kyselina citronová, 0,06 M BIS-TRIS propan, pH 6,4, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1 a 3:2.

Za zbylých podmínek vznikly krystaly, které nebylo možné použít pro rentgenovou difrakční analýzu nebo nedošlo ke vzniku žádného krystalu. Obrázky vhodných krystalů, které vznikly za podmínek uvedených výše, jsou znázorněny na Obr 10.



Obr. 10: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 (foto autor).

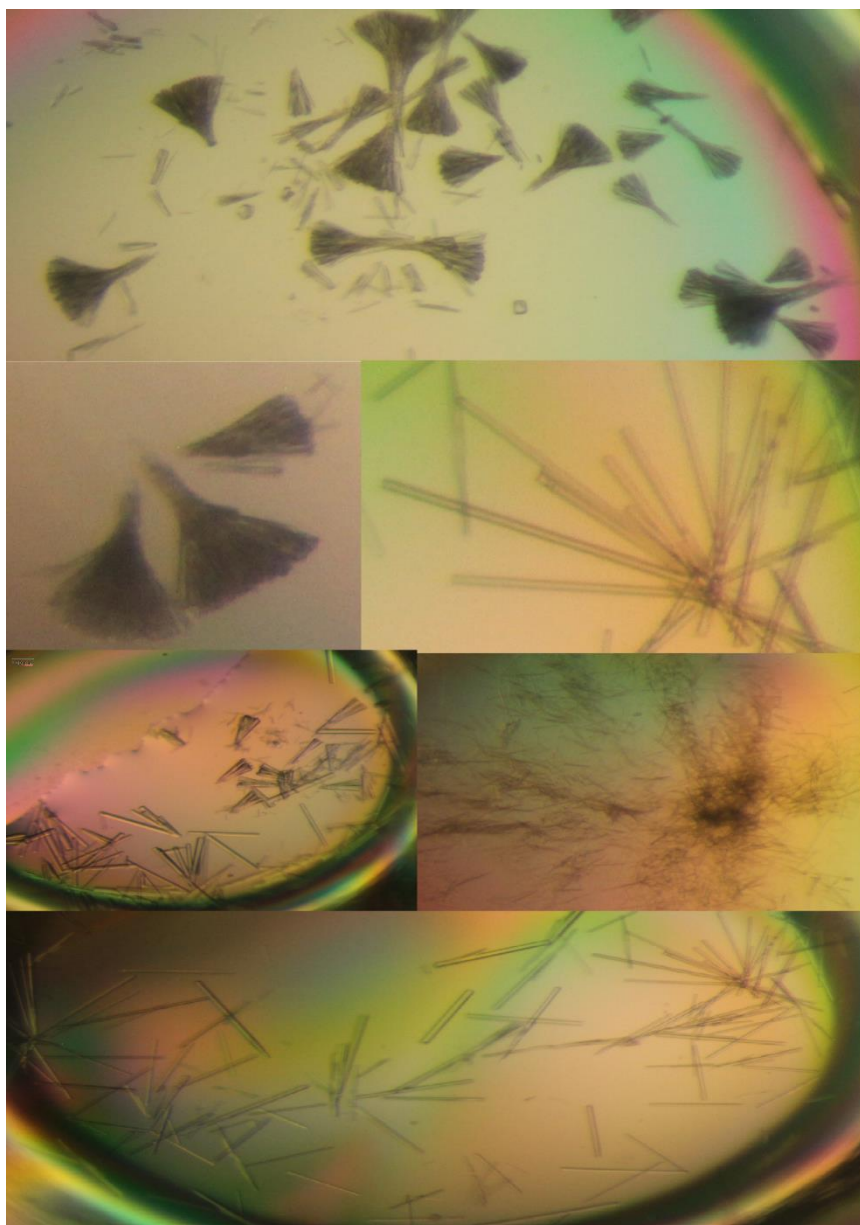
4.2 Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSi3

Ke krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 byly použity čtyři krystalizační destičky. Roztok lytického enzymu měl koncentraci 5 mg/ml.

Krystalizační podmínky, za kterých vznikly vhodné krystaly lytického enzymu LysSi3 jsou: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 8 (0,2 M chlorid draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 18 (0,2 M dusičnan draselný,

20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 24 (0,2 M dihydrát octanu lithného, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 38 (0,2 M dvojsytný vřinan amonný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 45 (0,2 M tetrahydrát trilitiumcitrátu, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 10 (8% v/v Tacsimate pH 4,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 13 (4% v/v Tacsimate pH 6,0, 12% w/v PEG 3350) poměr 1:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 14 (8% v/v Tacsimate pH 6,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 24 (0,2 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 30 (0,2 M dvojsytný vřinan amonný pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 1:1 a 3:1.

Za zbylých podmínek vznikly krystaly, které nebylo možné použít pro rentgenovou difrakční analýzu nebo nedošlo ke vzniku žádného krystalu. Obrázky vhodných krystalů, které vznikly za podmínek uvedených výše, jsou znázorněny na Obr 11.



Obr. 11: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 (foto autor).

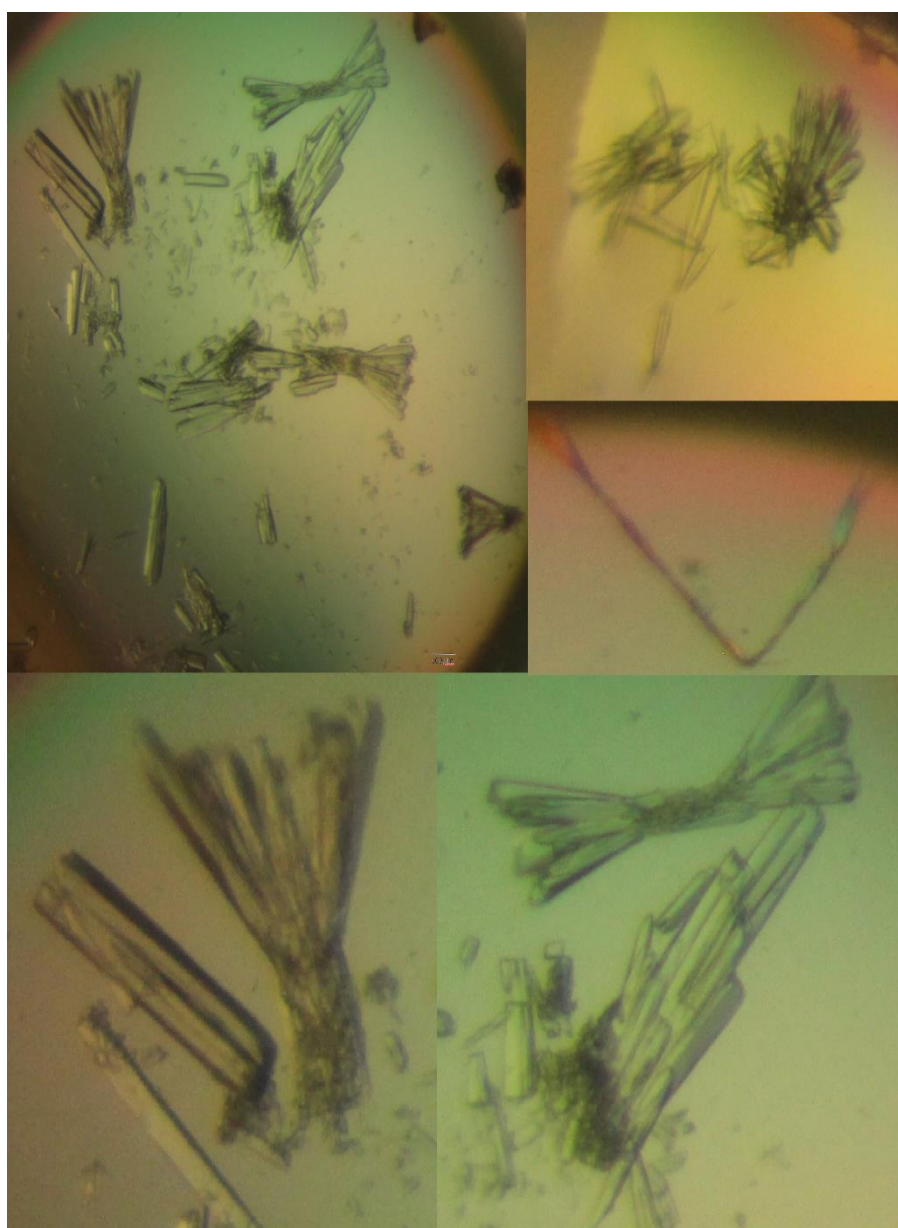
4.3 Výsledky krystalizace lytického enzymu bakteriofágu LysSt11

Ke krystalizaci lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 byly použity čtyři krystalizační destičky. Koncentrace roztoku lytického enzymu byla 5 mg/ml.

Lytický enzym LysSt11 krystalizoval za takovýchto podmínek: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 17 (0,2 M dusičnan sodný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 31 (0,2 M monohydrát síranu lithného, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 41 (0,2 M dihydrogenfosforečnan draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1 a 3:2. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 1 (0,1 M disodná sůl kyseliny malonové pH 4,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 4 (0,2 M malonát sodný pH 5,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:2;

PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 29 (0,1 M dvojsytný vlnan amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 30 (0,2 M dvojsytný vlnan amonný pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 31 (2% v/v Tacsimate pH 4,0, 0,1 M trihydrát octanu sodného pH 4,6, 16% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 32 (2% v/v Tacsimate pH 5,0, 0,1 M dihydrát citronanu sodného pH 5,6, 16% w/v PEG 3350), poměr 3:1.

Za zbylých podmínek vznikly krystaly, které nebylo možné použít pro rentgenovou difrakční analýzu nebo nedošlo ke vzniku žádného krystalu. Obrázky vhodných krystalů, které vznikly za podmínek uvedených výše, jsou znázorněny na Obr. 12.

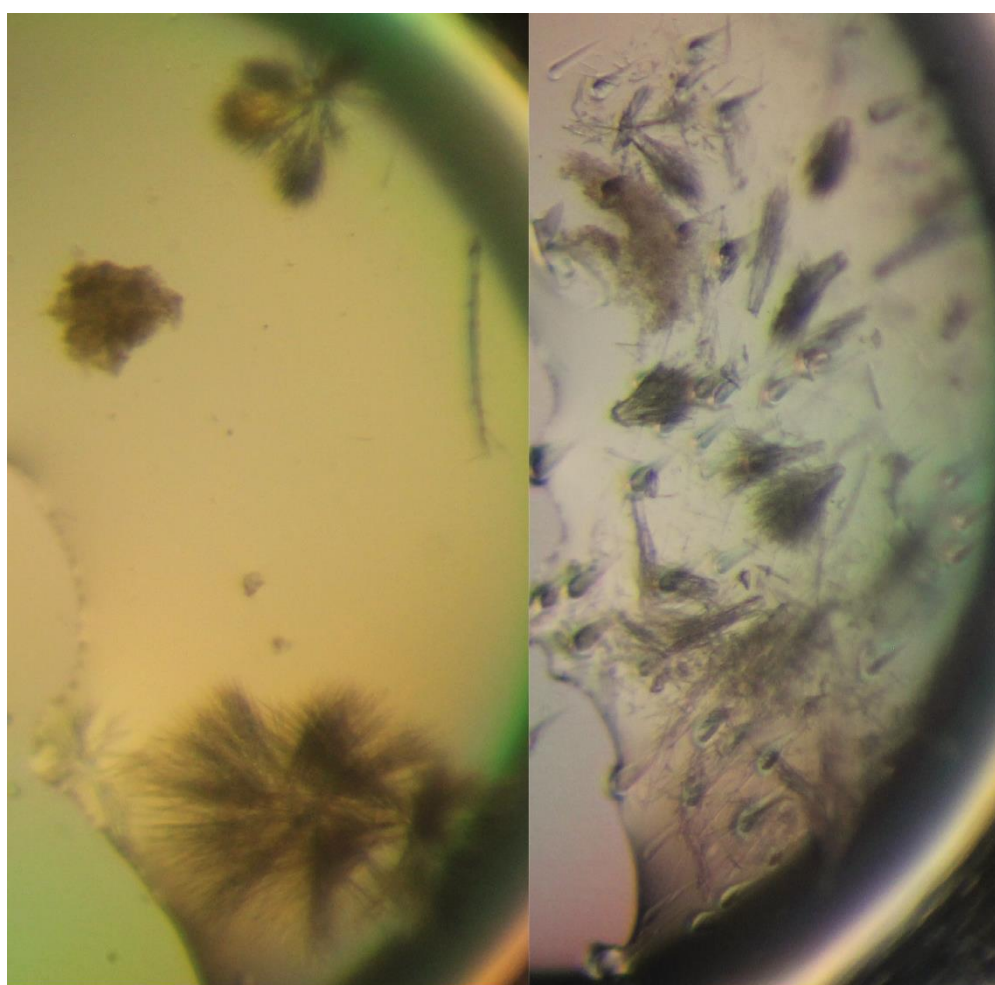


Obr. 12: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 (foto autor).

4.4 Výsledky testování krystalů

S využitím testu krystalů bylo prokázáno, že se skutečně jedná o krystaly lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11. Pro testování byl použit test drcením a test barvicí. Při testu drcením došlo k rozpadu krystalů a při testu barvicím došlo o obarvení krystalů lytických enzymů bakteriofágů.

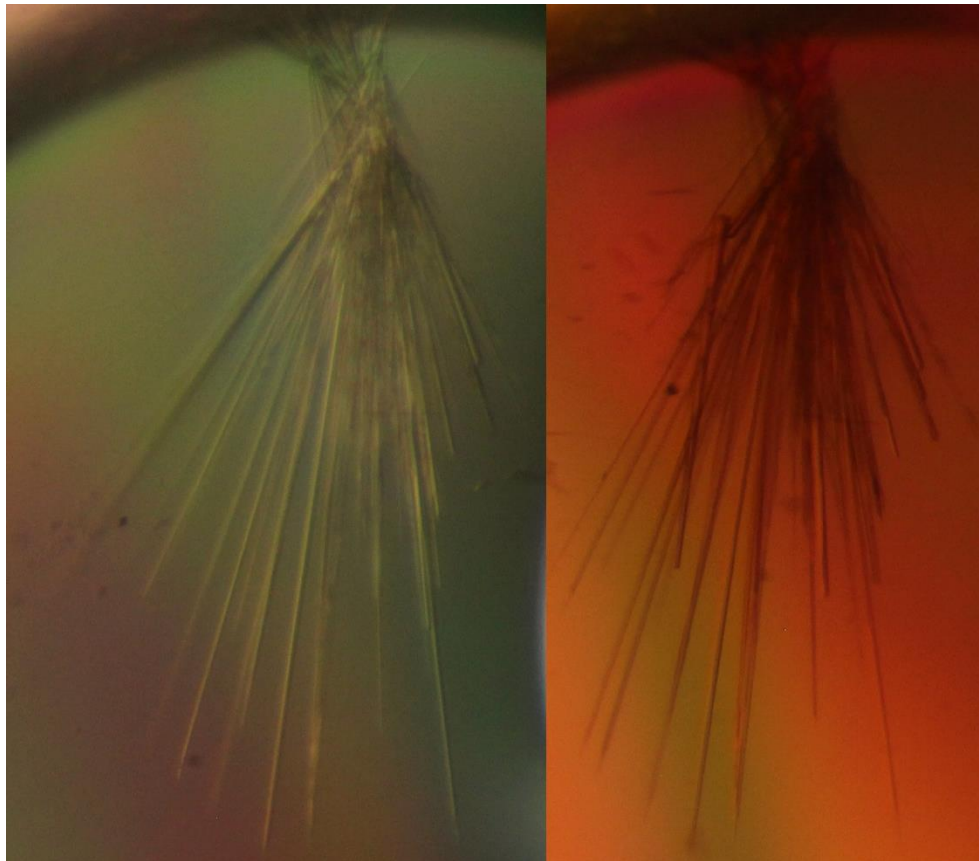
Výsledky testů jsou zaznamenány na Obr. 13, 14, 15, 16, 17, 18. Obr. 13, 14 zaznamenává výsledky testování krystalů lytického enzymu bakteriofágu LysAm24, Obr. 15, 16 zaznamenává výsledky testování krystalů lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 a Obr. 17, 18 zaznamenává výsledky testování krystalů lytického enzymu bakteriofágu LysSt11.



A

B

Obr. 13: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 při testu drcením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) (foto autor).



A

B

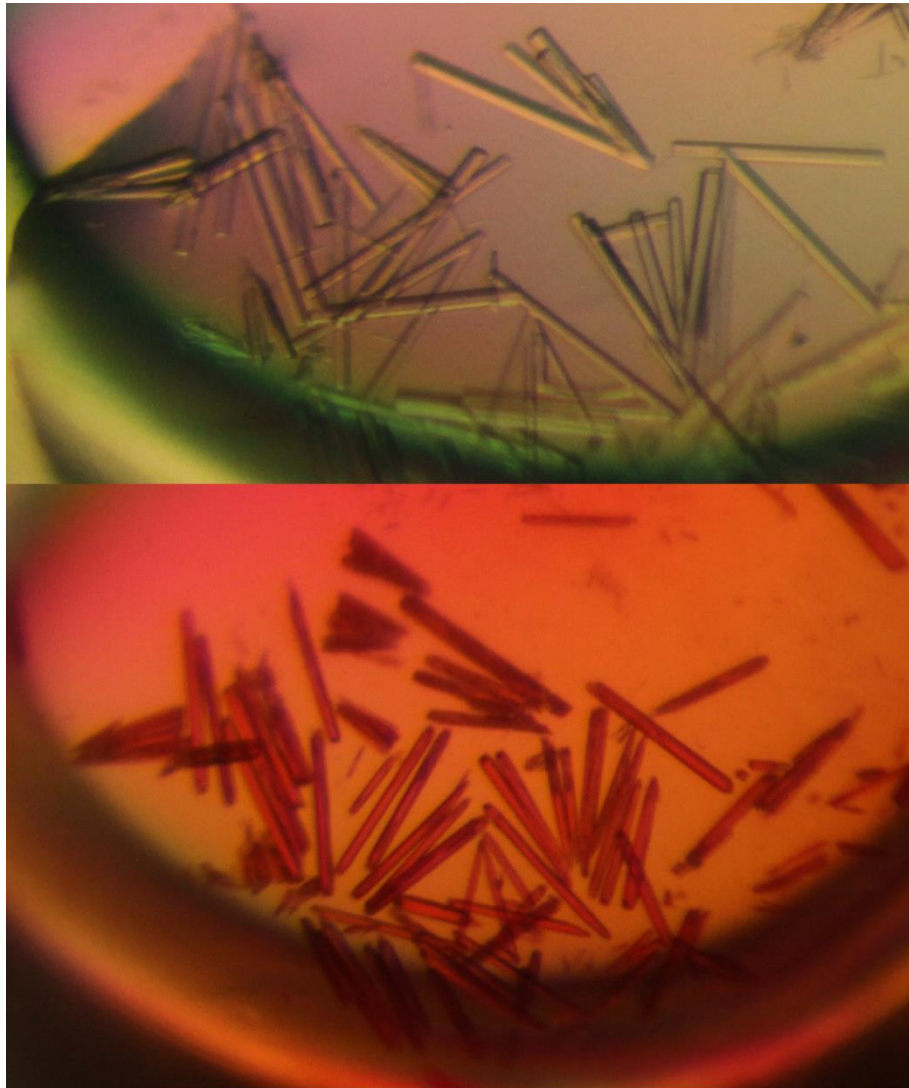
Obr. 14: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 při testu barvením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) (foto autor).



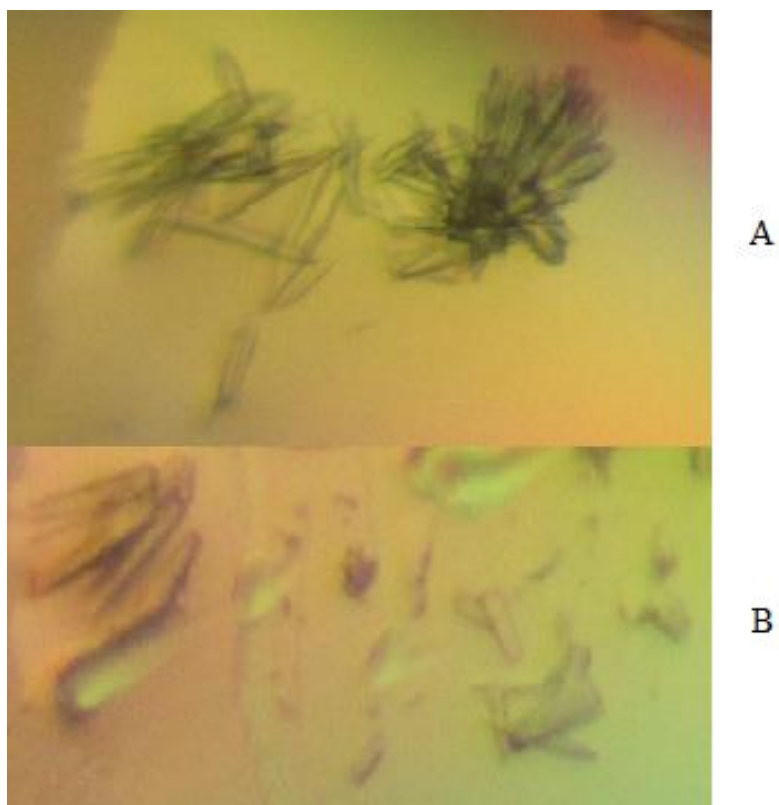
A

B

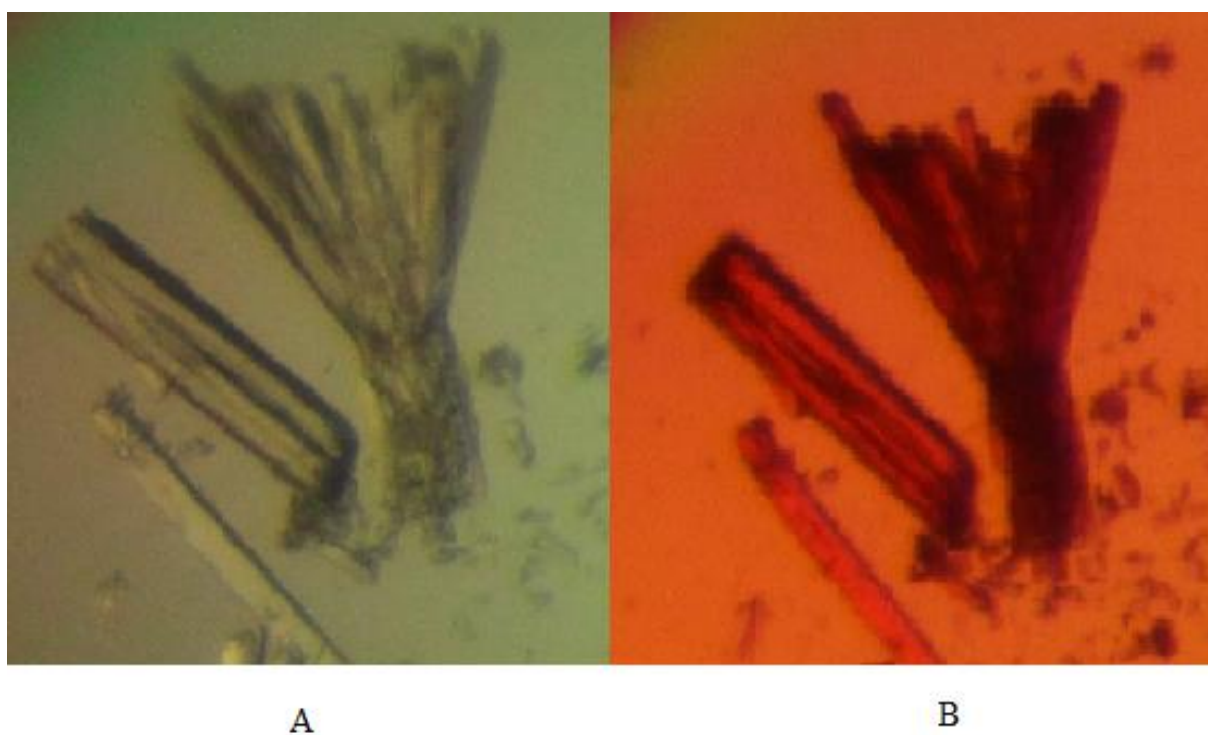
Obr. 15 Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 při testu drcením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) (foto autor).



Obr. 16 Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 při testu barvením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) foto autor.



Obr. 17: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 při testu drcením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) (foto autor).



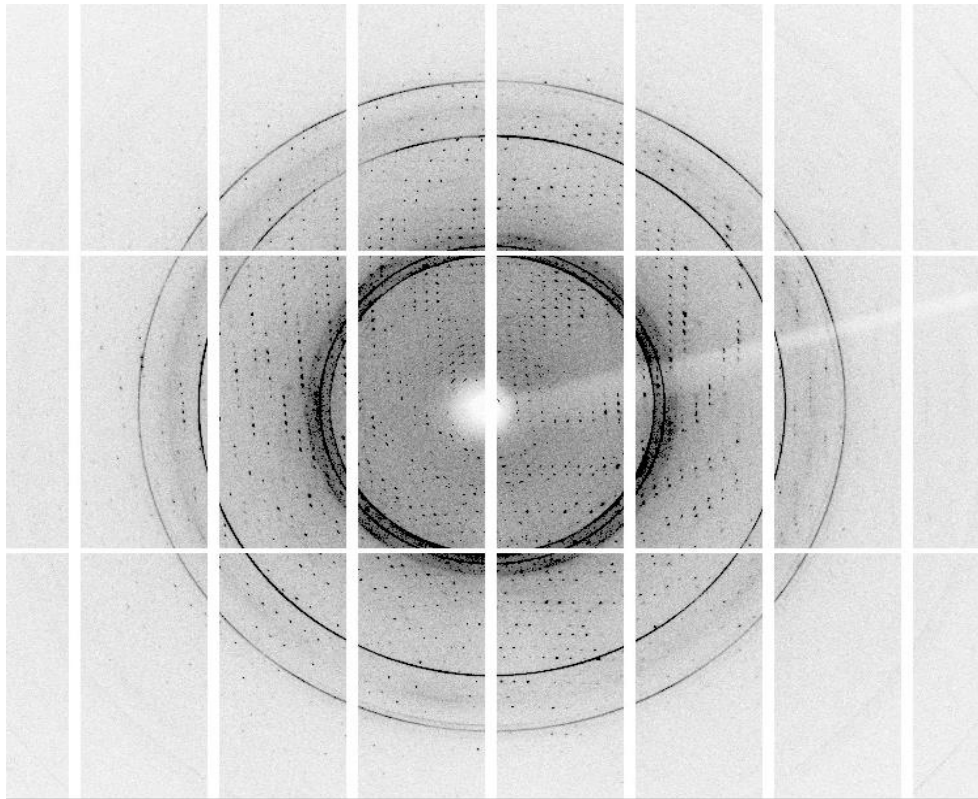
Obr. 18: Krystaly lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 při testu barvením. Krystaly před testem (A), krystaly po testu (B) (foto autor).

4.5 Výsledky difrakční analýzy

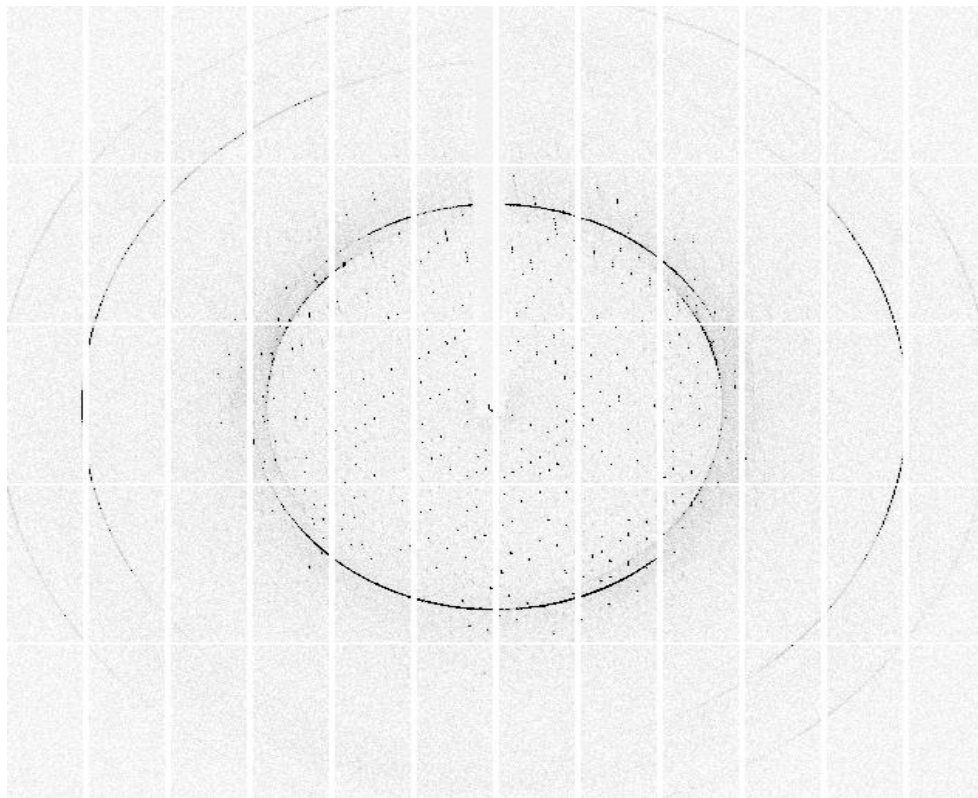
Difrakční snímek lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 byl získán rentgenovou difrakční analýzou. Snímek o rozlišení 1,7Å pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 je zaznamenán na Obr. 19, o rozlišení 1,5Å pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 jsou znázorněny na Obr. 20 a 2Å pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11 jsou zaznamenány na Obr. 21.



Obr. 19: Difrakční snímek lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 (vlastní obrázek).



Obr. 20: Difrakční snímek lytického enzymu bakteriofágu LysSi3 (vlastní obrázek).



Obr. 21: Difrakční snímek lytického enzymu bakteriofágu LysSt11 (vlastní obrázek).

4.6 Porovnání krystalizačních podmínek při krystalizaci lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11

Srovnáním výsledků krystalizace se ukázalo, že krystaly lytických enzymů bakteriofágů LysSi3 a LysSt11 vznikají za stejné koncentrace roztoku lytického enzymu. Zatímco lytický enzym LysSi3 krystalizoval za přítomnosti činidel PEG/Ion 1 číslo 8 (0,2 M chlorid draselný, 20% w/v PEG 3350), číslo 24 (0,2 M dihydrát octanu lithného, 20% w/v PEG 3350), číslo 38 (0,2 M dvojsytný vřnan amonný, 20% w/v PEG 3350) a 45 (0,2 M tetrahydrát trilitiumcitrátu, 20% w/v PEG 3350), lytický enzym LysSt11 krystalizoval v přítomnosti činidel PEG/Ion 1 číslo 17 (0,2 M dusičnan sodný, 20% w/v PEG 3350), 31 (0,2 M monohydrát síranu lithného, 20% w/v PEG 3350), 41 (0,2 M dihydrogenfosforečnan draselný, 20% w/v PEG 3350). Lze tedy konstatovat, že se velmi lišilo složení krystalizačních činidel, za kterých vznikaly vhodné krystaly.

Při použití krystalizačních činidel PEG/Ion 2 došlo ke vzniku krystalů enzymu LysSi3 u čísla 10 (8% v/v Tacsimate pH 4,0, 20% w/v PEG 3350), čísla 13 (4% v/v Tacsimate pH 6,0, 12% w/v PEG 3350), čísla 14 (8% v/v Tacsimate pH 6,0, 20% w/v PEG 3350) a čísla 24 (0,2 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), na rozdíl od podmínek vzniku krystalů pro enzym LysSt11, u kterých obsahovalo krystalizační činidlo PEG/Ion 2 číslo 1 (0,1 M disodná sůl kyseliny malonové pH 4,0, 12% w/v PEG 3350), čísla 4 (0,2 M malonát sodný pH 5,0, 20% w/v PEG 3350), čísla 29 (0,1 M dvojsytný vřnan amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), čísla 31 (2% v/v Tacsimate pH 4,0, 0,1 M trihydrát octanu sodného pH 4,6, 16% w/v PEG 3350) a čísla 32 (2% v/v Tacsimate pH 5,0, 0,1 M dihydrát citronanu sodného pH 5,6, 16% w/v PEG 3350).

U obou lytických enzymů vznikly vhodné krystaly s použitím krystalizačního činidla PEG/Ion 2 číslo 30 (0,2 M dvojsytný vřnan amonný pH 7,0, 20% w/v PEG 3350). V tomto případě se tedy shodovala koncentrace roztoku enzymu, složení krystalizačního činidla a dokonce se shodoval i jeden z poměrů krystalizačního činidla a roztoku enzymu v kapce a to poměr 3:1 (roztok enzymu : roztok krystalizačního činidla). V případě lytického enzymu LysSi3 došlo ke vzniku krystalů i při poměru 1:1, bohužel u lytického enzymu LysSt11 nevznikly při tomto poměru žádné krystaly.

U lytického enzymu bakteriofágu LysAm24 se liší zejména jeho koncentrace. Z důvodu vysrážení vzorku při koncentraci 5 mg/ml byla koncentrace snížena na 3,5 mg/ml. Krystaly lytického enzymu vznikaly za použití krystalizačního činidla PEG/Ion 1 číslo 3 (0,2

M fluorid amonný, 20% w/v PEG 3350), číslo 7 (0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3350), číslo 34 (0,2 M síran draselný, 20% w/v PEG 3350) a číslo 40 (0,2 M dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, 20% w/v PEG 3350). Lze tedy konstatovat, že při použití PEG/Ion 1 se složení krystalizačního činidla neshoduje ani s jedním lytickým enzymem.

Ani v případě použití krystalizačního činidla PEG/Ion 2 se neobjevila shoda ve složení krystalizačních činidel se zbylými dvěma lytickými enzymy. Lytický enzym LysAm24 krystalizoval s využitím činidel číslo 23 (0,1 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), číslo 29 (0,1 M dvojsytný vřinan amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350) a číslo 39 (0,04 M kyselina citronová, 0,06 M BIS-TRIS propan, pH 6,4, 20% w/v PEG 3350).

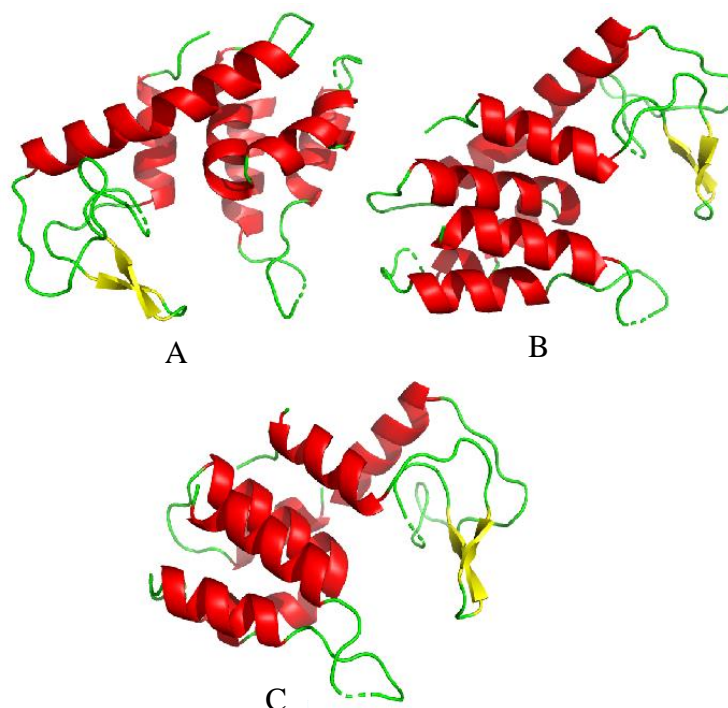
Ačkoliv se jedná o podobné lytické enzymy, krystalizační experiment ukázal, že krystalizují za jiných podmínek, liší se zejména složení krystalizačních činidel. Shodnou vlastností je pro všechny 3 enzymy poměr činidla a lytického enzymu v kapce. Ve většině případů vznikly krystaly v poměru 3:1 a 2:1. Shodnou vlastností je tedy to, že krystaly vznikly v případech, kde bylo větší množství enzymu než krystalizačního činidla. Další podmínkou, která spojuje všechny tři enzymy je teplota, za které krystalizovaly (4°C) a množství krystalizačního činidla v reservoáru (100 µl).

4.7 Výsledky modelování 3D struktury lytického enzymu bakteriofágu

LysSi3

3D struktura lytického enzymu LysSi3 byla vyřešena pomocí molekulárního nahrazení pomocí homologní struktury 6et6 (Ref.). Pomocí programu MOLREP bylo identifikováno jednoznačné řešení první molekuly. Struktura enzymu byla upřesněna pomocí programu REFMAC (Murshudov a kol., 1997) a COOT (Emsley, a kol., 2004). Ověření struktury bylo provedeno pomocí programů COOT (Emsley, a kol., 2004) a PROCHECK (Laskowski a kol., 1993). Výsledný model byl vytvořen v programu PyMol (DeLano, 2002) a data budou uložena do proteinové databáze RCSB v nejbližší době.

3D struktura lytického enzymu byla zobrazena v programu PyMol (DeLano, 2002) a je znázorněna na Obr. 22. Výsledky struktury budou použity na přípravu mutantních forem, aby se zvýšila a rozšířila katalytická funkce enzymu.



Obr. 22: Cartoon reprezentace struktury lytického enzymu bakteriofágu LysSi3. Pohled z různých stran. Smyčky jsou zobrazeny zeleně, α -helix červeně a β -listy žlutě (vlastní obrázek).

K vyřešení struktury je potřeba znát aminokyselinovou sekvenci enzymů.

Aminokyselinová sekvence lytického enzymu LysAm24 je MDILKFNSRGDLVVHLQKKLASLGYKLNPDGIFGKATQEAVIHFQRQNGLTSDGIV GKL TWSMLDSKTSSIGKTRTISQNGINFIKSFEGRLRLRAYDDGVGVITIGYGTTRYPN GHKVQLGDTCTEKQAEQYLSNDLVKFEKAVNELVKVPVNQNQYDALVSFTYNVG VGALSTSKALKLLNAGDYTGCAKAMLSWKNKGRVGGKLVEIGGLTRRRNAEKDLFL KLEHHHHHHHH.

Tato aminokyselinová sekvence lytického enzymu LysSi3 byla použita k vyřešení struktury tohoto enzymu.

Aminokyselinová sekvence lytického enzymu LysSi3 je MQLSRKGLEAIKFFEGLEKLEAYEDSAGIPTIGYGTIRIDGKPKVKGMMKITAQAEQY LLADVEKFVAAVNKSIKVPTSQNEFDALVSETYNIGITAMQDSTFIKRHNAGNKVGC AEAMQWWNKVTVKGGKVTSNGLKNRRRMEADIYLDVYPKLEHHHHHHHH.

Aminokyselinová sekvence lytického enzymu LysSt11 je
MQLSRKGLEAIKFFEGLKLEAYEDSAGIPTIGYGTIRIGGKPVKMGMKITAEQAEQY
LLADVEKFVAAVNKAIKVPTSQNEFDALVSETYNIGITAMQDSTFIKRHNAGNKVG
CAEAMQWWNKVTVKGKKVTSNGLKNRRRMEADIYLDVYPKLEHHHHHHHHH.

5. Diskuze

V průběhu krystalizační studie se podařilo vykrystalizovat krystaly všech tří lytických enzymů. Krystaly vznikaly při těchto podmínkách: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 3 (0,2 M fluorid amonný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 7 (0,2 M dihydrát chloridu vápenatého, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 34 (0,2 M síran draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 40 (0,2 M dihydrát hydrogenfosforečnanu sodného, 20% w/v PEG 3350), poměr 1:1 a 2:1. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 23 (0,1 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 29 (0,1 M dvojsytný vínan amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 39 (0,04 M kyselina citronová, 0,06 M BIS-TRIS propan, pH 6,4, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1 a 3:2., v případě lytického enzymu LysAm24.

Krystaly lytického enzymu LysSi3 vznikaly za těchto podmínek: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 8 (0,2 M chlorid draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 18 (0,2 M dusičnan draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 24 (0,2 M dihydrát octanu lithného, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 38 (0,2 M dvojsytný vínan amonný, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 45 (0,2 M tetrahydrát trilithiumcitrátu, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 10 (8% v/v Tacsimate pH 4,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 13 (4% v/v Tacsimate pH 6,0, 12% w/v PEG 3350) poměr 1:1; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 14 (8% v/v Tacsimate pH 6,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 24 (0,2 M DL kyselina jablečná pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 30 (0,2 M dvojsytný vínan amonný pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 1:1 a 3:1.

Při dodržení těchto podmínek: PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 17 (0,2 M dusičnan sodný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 31 (0,2 M monohydát síranu lithného, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 1, krystalizační činidlo číslo 41 (0,2 M dihydrogenfosforečnan draselný, 20% w/v PEG 3350), poměr 2:1 a 3:2. PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 1 (0,1 M disodná sůl kyseliny malonové pH 4,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační činidlo číslo 4 (0,2 M malonát sodný pH 5,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:2; PEG/Ion 2, krystalizační

čínidlo číslo 29 (0,1 M dvojsytný vínan amonný pH 7,0, 12% w/v PEG 3350), poměr 2:1; PEG/Ion 2, krystalizační čínidlo číslo 30 (0,2 M dvojsytný vínan amonný pH 7,0, 20% w/v PEG 3350), poměr 3:1; PEG/Ion 2, krystalizační čínidlo číslo 31 (2% v/v Tacsimate pH 4,0, 0,1 M trihydrát octanu sodného pH 4,6, 16% w/v PEG 3350), poměr 3:1 a 2:1; PEG/Ion 2, krystalizační čínidlo číslo 32 (2% v/v Tacsimate pH 5,0, 0,1 M dihydrát citronanu sodného pH 5,6, 16% w/v PEG 3350), poměr 3:1 vznikaly krystaly lytického enzymu LysSt11.

Na závěr byla vyřešena struktury lytického enzymu bakteriofágu LysSi3. U zbylých enzymů musí dojít nejprve k optimalizaci, jelikož krystaly těchto enzymů difraktovali při 2Å (LysAm24) a při 1,7Å, což není vhodně pro řešení struktury.

Porter a kol (2006) krystalizovali lytický enzym bakteriofágu PlyB, který má silný lytický účinek na kmen typu *B. anthracis*, ATCC 4342. Počáteční pokusy o růst kvalitních krystalů byly neúspěšné. Postupně byly nalezeny vhodné krystalizační podmínky pro vznik plnohodnotných krystalů. Plnohodnotné krystaly vznikaly metodou visící kapky, která obsahovala 0,5 µl vzorku bílkovinného roztoku, 0,5 µl zásobního roztoku pufru a 0,1 µl 0,1 M CuCl₂. Zásobní roztok pufru vznikl smícháním 0,1 M CH₃COONa, pH 3,6 s 0,2 M CH₃COONH₄ dále s 32% (w/v) PEG 4000 a 0,1 µl 0,1 M CuCl₂. Reservoár obsahoval 0,5 ml zásobního pufru a krystalizace probíhala při teplotě 4°C. Krystaly se začaly objevovat po třech dnech s rozměry 0,3 x 0,1 x 0,1 mm³. Následně byly krystaly zmrazeny proudem dusíku (100K) a byla provedena difrakční analýza.

Difrakční data byla získána o rozlišení 1,6 Å (Matthews, 1968). Struktura byla řešena metodou molekulárního nahrazení s využitím programu MOLREP (Vagin a kol., 1997). Model byl založený na struktuře cellosylu, který byl pomocí serveru FFAS identifikován jako nejbližší strukturní homolog katalytické domény PlyB (Jaroszewski a kol., 2005). Smíšený model byl sestaven pomocí serveru SCRWL (Canutescu a kol., 2003). Pomocí programu MOLREP bylo identifikováno jednoznačné řešení první molekuly. Struktura druhé molekuly byla upřesněna pomocí programu REFMAC (Murshudov a kol., 1997) a COOT (Emsley, a kol., 2004). Ověření struktury bylo provedeno pomocí programů COOT (Emsley, a kol., 2004) a PROCHECK (Laskowski a kol., 1993). Výsledný model byl vytvořen v programu PyMol (DeLano, 2002) a data byla uložena v proteinové databázi RCSB s PDB identifikátorem 2NW0.

Struktura lytický enzym LysSi3 byla řešena podobně jako struktura lytického enzymu PlyB. Difrakční data byla získána o rozlišení 1,5Å. 3D struktura lytického enzymu Si3 byla

vyřešena pomocí molekulárního nahrazení pomocí homologní struktury 6et6 (Ref.). Pomocí programu MOLREP (Vagin a kol., 1997) bylo identifikováno jednoznačné řešení první molekuly. Struktura enzymu byla upřesněna pomocí programu REFMAC (Murshudov a kol., 1997) a COOT (Emsley, a kol., 2004). Ověření struktury bylo provedeno pomocí programů COOT (Emsley, a kol., 2004) a PROCHECK (Laskowski a kol., 1993). Výsledný model byl vytvořen v programu PyMol (DeLano, 2002). Data budou uložena v nejbližší době v proteinové databázi RCSB.

Antonova a kol. (2019) také zkoumaly lytické enzymy LysAm24, LysSi3 a LysECD7. Zabývali se vlivem EDTA a různými hodnotami pH na baktericidní aktivitu těchto enzymů. Ke zhodnocení baktericidní aktivity LysSi3 a LysAm24 byl využit kmen *A. baumannii* Ts 50-16. Oproti exponenciálně rostoucím bakteriálním buňkám byla prokázána závislost koncentrace na baktericidní aktivitě LysAm24 a LysSi3. Při koncentraci vyšší než 5 µg/ml pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 a vyšší než 10 µg/ml došlo k úplné eliminaci bakteriálního růstu, což naznačuje, že LysAm24 a LysSi3 by mohly mít baktericidní účinky bez permeabilizace membrán. Dále byly vyhodnoceny vlivy solí KCl a NaCl na aktivitu těchto endolysinů. Byl prokázán inhibiční účinek na aktivity obou lysinů. Aktivita LysAm24 byla snížena téměř dvojnásobně a to v přítomnosti 25mM NaCl, zatímco KCl měl stejný účinek při 50 mM. Aktivita LysSi3 byla inhibována v přítomnosti 50 mM NaCl i KCl. Oba lytické proteiny snášely přítomnost KCl lépe než NaCl.

Byly také zkoumány různé pufovací systémy, konkrétně pufrы na bázi fosforečnanu sodného a draselného při různých koncentracích a při pH 7,5. Výsledky testů hodnotících účinky fosfátových pufrů v koncentracích 5, 10 a 50 mM na aktivitu enzymů ukázaly, že nejvhodnější koncentrace byla 5 mM, přičemž pufr, obsahující fosforečnan draselný (pH 7,5) je optimální pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 a pufr obsahující fosforečnan sodný (pH 7,5) je optimální pro LysSi3.

Nejvyšší baktericidní aktivitu LysAm24 a LysSi3 v Tris HCl pufru bylo zpozorováno za středně kyselých podmínek (pH 5,0 – 6,0). Jakmile došlo ke zvýšení pH na 6,5 – 7, aktivita enzymů se snížila. U enzymu LysAm24 se snížila na 45 %, u enzymu LysSi3 na 30 % své počáteční aktivity.

Navíc byl hodnocen účinek EDTA, která se používá jako membránový permeabilizér ke zvýšení bakteriolytické aktivity lysinů. Synergie mezi EDTA a těmito enzymy byla pozorovatelná za neutrálních a alkalických podmínek (pH 6,5 – 8,5). U lysinů LysAm 24 a

LysSi3 byl pozorován velmi výrazný účinek, došlo k téměř úplnému obnovení aktivity a to při hodnotách pH 6,5 – 7,0.

McGowan a kol. (2012) se zabývaly rentgenovou difrakční analýzou lytického enzymu bakteriofágu PlyC, který patří k nejúčinnějším lytickým enzymům. Navíc byl získán z gram pozitivních bakterií a je prozatím jediný, který byl z těchto bakterií získán. Lysiny LysAm24, LysSi3 a LysSt11 patří na rozdíl od PlyC ke gram negativním bakteriím. Krystaly vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu vznikaly metodou visící kapky s poměrem 1:1.

Jelikož dochází k rostoucí antimikrobiální rezistanci, dochází ke zkoumání více lytických enzymů. Lytické enzymy, které by byly účinné proti kmeni *A. baumannii* zkoumali Ghose a kol. (2020). Jedná se o gram negativní lytické enzymy LysAB2 a PlyF307, které mají proti kmenům *A. baumannii* velmi významnou *in vitro* baktericidní aktivitu.

Po srovnání podmínek pro krystalizaci lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 a výše uvedeného lytického enzymu PlyB lze říci, že lytické enzymy bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 byly krystalizovány metodou sedící kapky, zatímco lytický enzym PlyB byl krystalizován metodou visící kapky.

Odlišné je i složení krystalizačního roztoku, který také obsahoval 0,1 M CH₃COONa, pH 3,6 s 0,2 M CH₃COONH₄ dále s 32% (w/v) PEG 4000 a 0,1 μl 0,1 M CuCl₂ v případě lytického enzymu PlyB, zatímco u lytických enzymů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 byl použit PEG 3350 o různých koncentracích.

6. Závěr

Teoretická část diplomové práce se věnuje popisu struktury krystalu. Dále se zabývá rentgenovou difrakční analýzou a popisem principu difrakce. Další díl této části se zabývá rentgenovým difrakčním experimentem a fázovým problémem. Dále popisuje, jak lze fázový problém vyřešit. Poslední díl teoretické části se zaměřuje na popis a význam lytických enzymů a poté konkrétně na informace o lytických enzimech bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11.

Praktická část práce popisuje postup při krystalizování lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11. Při krystalizaci byla použita komerčně dostupná sada krystalizačních činidel PEG/Ion 1 a PEG/Ion 2, jejichž složení je uvedeno v Přílohách. Celkem bylo použito 96 různých krystalizačních činidel a testováno 386 různých krystalizačních podmínek. Krystalizace probíhala při 4°C v chladicím zařízení metodou sedící kapky. V případě krystalizace lytického enzymu LysAm24 vznikly krystaly vhodné k rentgenové difrakční analýze ve 2,86 % kapek. U lytického enzymu LysSi3 došlo ke vzniku vhodných krystalů ve 3,65 % kapek. U třetího lytického enzymu LysSt11 vznikly vhodné krystaly ve 2,86 % kapek.

Dalším krokem bylo testování vzniklých krystalů a ověření, že se skutečně jedná o krystaly proteinu, což bylo i jedním z cílů této práce. K otestování krystalů byl použit barvicí test a test drcením. Oba dva testy prokázaly, že se ve všech případech jedná o krystaly proteinu, a že při krystalizaci nedošlo ke vzniku krystalů nežádoucích solí. Závěr praktické části se věnuje poslednímu testování krystalů. Tyto krystaly byly testovány rentgenovou difrakční analýzou, díky které byla získána i difrakční data potřebná pro další určení struktury. Difrakční obrazec byl naměřen s rozlišením 2Å v případě lytického enzymu bakteriofágu LysAm24, 2Å pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 a o rozlišení 1,5Å pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11.

V závěru práce jsou srovnány podmínky krystalizace lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11 a zaznamenány 3D snímky struktury lytického enzymu. Struktura byla určena z difrakčních dat o rozlišení 1,5Å metodou molekulárního nahrazení pomocí homologní struktury 6et6 (Ref.). Následně bylo identifikováno jednoznačné řešení první molekuly a poté upřesněna struktura proteinu. Posledním krokem bylo ověření struktury a výsledné modelování struktury.

7. Seznam literatury

- Allegra, G. (1980). Principles of Direct Methods of Phase Determination in Crystal Structure Analysis. In: Ladd, M. F. C., & Palmer, R. A. (1980). *Theory and Practice of Direct Methods in Crystallography*. New York, United States: Springer US.
- Antonova, N. P., Vasina, D. V., Lendel, A. M., Usachev, E. V., Makarov, V. V., Gintsburg, A. L., Tkachuk, A. P., Gushchin, V. A. (2019). Broad Bactericidal Activity of the *Myoviridae* Bacteriophage Lysins LysAm24, LysECD7, and LysSi3 against Gram-Negative ESKAPE Pathogens. *Viruses* 2019, 11(3). 284.
- BioSync. A structural Biologist's Guide to High Energy Data Collection Facilities [online]. 2018. [cit. 11. 9. 2020]. Dostupné z WWW: < <http://biosync.sbkb.org/index.jsp>>.
- Blow, D. M., & Rossmann, M. G. (1961). The Single Isomorphous Replacement Method. *Acta Crystallographica*, 14(11). 1195-1202.
- Bokhoven, C., Schoone, J. C., & Bijvoet, J. M. (1951). The Fourier synthesis of the crystal structure of strychnine sulphate pentahydrate. *Acta Crystallographica*, 4(3). 275-280.
- Bragg, W. H., & Bragg, W. L. (1913). The reflection of X-rays by crystals. *Proceedings of the Royal Society of London*, 88(605). 428-438.
- Canutescu, A. A., Shelenkov, A. A., Dunbrack, R. L. J. (2003). A graph-theory algorithm for rapid protein side-chain prediction. *Protein Sci.* 12. 2001-2014.
- DeLano, W. L. (2002). *PyMOL*. DeLano Scientific, San Carlos, CA, 700.
- Emmer, J. (2007). Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, University of South Bohemia.
- Emsley, P., Cowtan, K. (2004). Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallog. sect. D*, 53. 240-255.
- Entenza, J. M., Loeffler, J. M., Grandgirard, D., Fischetti, V. A., Moreillon, P. (2005). Therapeutic effects of bacteriophage Cpl-1 lysin against *Streptococcus pneumoniae* endocarditis in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49. 4789-4792.
- Ghose, C., Euler, C. W. (2020). Gram-Negative Bacterial Lysins. *Antibiotics*, 9(2). 74.
- Haade a Quibik, Příspěvatelé Wikipedie, (2010). *Wave interference* [online], Wikimedia Commons, the free media repository, [cit. 29. 10. 2020]. Dostupné z

WWW:https://en.wikipedia.org/wiki/Wave_interference#/media/File:Interference_of_two_waves.svg%3E.

Halliday, D., Resnick, R., Walker, J. (2000). *Fyzika 2*. VUTIUM.

Cheng, Q., Nelson, D., Zhu, S., Fischetti, V. A., (2005). Removal of group B streptococci colonizing the vagina and oropharynx of mice with a bacteriophage lytic enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49. 111-117.

Jaroszewski, L., Rychlewski, L., Li, Z., Li, W., Godzik, A. (2005). FFASO3: a server for profile-profile sequence alignments. *Nucl.Acids Res.* 33. W284-W288.

Koonin, E. V., & Tatusov, R. L. (1994). Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity. Application of an iterative approach to database search. *Journal of Molecular Biology*, 244(1). 125-132.

Kratochvíl, B., Hušák, M., Brynda, J., & Sedláček, J. (2008). Co nabízí současná RTG strukturní analýza? *Chemické listy*, 102. 889-901.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. App. Crystallog.* 26. 283-291.

Loeffler, J. M., Nelson, D., Fischetti, V. A. (2001). Rapid killing of *Streptococcus pneumoniae* with a bacteriophage cell wall hydrolase. *Science*, 294. 2170-2172.

Matamp, N., Bhat, S.G. (2019). Phage Endolysins as Potential Antimicrobials against Multidrug Resistant *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*: Current Status of Research and Challenges Ahead. *Microorganisms* 2019, 7(3). 84.

Matthews, B. W. (1968). Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology*, 33. 491-497.

McGowan, S., Buckle, A. M., Mitchell, M. S., Hoopes, J. T., Gallagher, D. T., Heselpoth, R. D., Whisstock, J. C. (2012). X-ray crystal structure of the streptococcal specific phage lysin PlyC. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(31). 12752-12757.

McPherson, A. (2002). *Introduction to macromolecular crystallography*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons.

Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Dodson, E. J. (1997). Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallog. Sect. D*, 53. 240-255.

Navaza, J. (1994). AMoRe: an Automated Package for Molecular Replacement. *Acta Crystallographica*, A50. 157-163.

Nelson, D., Loomis, L., Fischetti, V. A., (2001). Prevention and elimination of upper respiratory colonization of mice by group A streptococci by using a bacteriophage lytic enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 98. 4107-4117.

Nordmann, Příspěvatelé Wikipedie, (2007). *Huygensův princip* [online], Wikipedie: Otevřená encyklopedie, [cit. 29. 10. 2020]. Dostupné z WWW:<https://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Huygens%C5%AFv_princip&oldid=15390656>

Porter, C. J., Schuch, R., Pelzek, A. J., Buckle, A. M., McGowan, S., Wilce, M. C. J., Rossjohn, J., Russell, R., Nelson, D., Fischetti, V. A., Whisstock, J. C. (2006). The 1,6 Å Crystal Structure of the Catalytic Domain of PlyB, a Bacteriophage Lydin Active Against *Bacillus anthracis*. *Journal of Molecular Biology*, 366. 540-550.

Projan, S. J., (2003). Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? *Curr. Opin. Microbiol.*, 6. 427-430.

Rappaport, T. S. (2002). *Wireless communications: Principle and practice*. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall.

RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. [cit. 20. 9. 2020] Dostupné z WWW: <<http://www.rcsb.org/>>.

Rhodes, G. (2006). *Crystallography Made Crystal Clear*. San Diego, United States: Elsevier Science Publishing Co Inc.

Rossmann, M. G. (1972). *The Molecular Replacement Method*. New York, United States: Gordon & Breach.

Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography: Principles, Practice, and Application to Structural Biology*. New York, United States: Garland Science.

Schmidberger, J. W., Wilce, J. A., Tsang, J. S. H., & Wilce, M. C. J. (2007). Crystal Structures of the Substrate Free-enzyme, and Reaction Intermediate of the HAD Superfamily

- Member, Haloacid Dehalogenase DehIVa from *Burkholderia cepacia* MBA4. *Journal of Molecular Biology*, 368(3). 706-717.
- Schuch, R., Nelson D., Fischetti, V. A., (2002). A bacteriolytic agent that detects and kills *Bacillus anthracis*. *Nature*, 418. 884-889.
- Schmidberger, J. W., Wilce, J. A., Tsang, J. S. H., & Wilce, M. C. J. (2007). Crystal Structures of the Substrate Free-enzyme, and Reaction Intermediate of the HAD Superfamily Member, Haloacid Dehalogenase DehIVa from *Burkholderia cepacia* MBA4. *Journal of Molecular Biology*, 368(3). 706-717.
- Soda, K., Kurihara, T., Liu, J.-Q., Nardi-Dei, V., Park, C., Miyagi, M., Tsunasawa, S., & Esaki, N. (1996). Bacterial 2-haloacid dehalogenases: Structures and catalytic properties. *Pure and Applied Chemistry*, 68(11). 2097-2103.
- Taylor, G. (2003). The phase problem. *Acta Crystallographica*, 59(11). 1881-1890.
- Terwilliger, T. C. (1994). MAD Phasing: Treatment of Dispersive Differences as Isomorphous Replacement Information. *Acta Crystallographica*, D50. 17-23.
- Vagin, A., Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallog.*, 30. 1022-1025.
- Valvoda, V., Polcarová, M., & Lukáč, P. (1992). *Základy strukturní analýzy*. Praha, Česká republika: Karolinum Praha.
- Vávra, V., & Losos, Z. Multimediální studijní texty z mineralogie pro bakalářské studium [online]. 2006. [cit. 8. 10. 2020]. Dostupné z WWW: <<http://mineralogie.sci.muni.cz/>>.
- Walmagh, M., Briers, Y., dos Santos, S.B., Azeredo, J., 2012. Lavigne, R. Characterization of modular bacteriophage endolysins from myoviridae phages OBP, 201Q2-1 and PVP-SE1. *PLoS ONE*, 7, e36991.
- Židek, L. (2015). *Strukturní biochemie*. Skripta. Brno: Masarykova univerzita.

8. Přílohy

8.1 Složení krystalizačních činidel použitých pro krystalizaci lytických enzymů

PEG/Ion Screen™ - HR2-126 Scoring Sheet	
1.	0.2 M Sodium fluoride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
2.	0.2 M Potassium fluoride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
3.	0.2 M Ammonium fluoride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
4.	0.2 M Lithium chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
5.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
6.	0.2 M Sodium chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
7.	0.2 M Calcium chloride dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
8.	0.2 M Potassium chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
9.	0.2 M Ammonium chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
10.	0.2 M Sodium iodide, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
11.	0.2 M Potassium iodide, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
12.	0.2 M Ammonium iodide, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
13.	0.2 M Sodium thiocyanate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
14.	0.2 M Potassium thiocyanate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
15.	0.2 M Lithium nitrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
16.	0.2 M Magnesium nitrate hexahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
17.	0.2 M Sodium nitrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
18.	0.2 M Potassium nitrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
19.	0.2 M Ammonium nitrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
20.	0.2 M Magnesium formate dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
21.	0.2 M Sodium formate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
22.	0.2 M Potassium formate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
23.	0.2 M Ammonium formate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
24.	0.2 M Lithium acetate dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
25.	0.2 M Magnesium acetate tetrahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
26.	0.2 M Zinc acetate dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
27.	0.2 M Sodium acetate trihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
28.	0.2 M Calcium acetate hydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
29.	0.2 M Potassium acetate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
30.	0.2 M Ammonium acetate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
31.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
32.	0.2 M Magnesium sulfate heptahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	0.2 M Sodium sulfate decahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
34.	0.2 M Potassium sulfate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
35.	0.2 M Ammonium sulfate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
36.	0.2 M Sodium tartrate dibasic dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
38.	0.2 M Ammonium tartrate dibasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
39.	0.2 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
40.	0.2 M Sodium phosphate dibasic dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	0.2 M Potassium phosphate monobasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	0.2 M Potassium phosphate dibasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	0.2 M Ammonium phosphate monobasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	0.2 M Ammonium phosphate dibasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	0.2 M Lithium citrate tribasic tetrahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
47.	0.2 M Potassium citrate tribasic monohydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
48.	0.2 M Ammonium citrate dibasic, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350

PEG/Ion 2 Screen™ - HR2-098 Scoring Sheet

1.	0.1 M Sodium malonate pH 4.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
2.	0.2 M Sodium malonate pH 4.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
3.	0.1 M Sodium malonate pH 5.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
4.	0.2 M Sodium malonate pH 5.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
5.	0.1 M Sodium malonate pH 6.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
6.	0.2 M Sodium malonate pH 6.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
7.	0.1 M Sodium malonate pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
8.	0.2 M Sodium malonate pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
9.	4% v/v Tacsimate™ pH 4.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
10.	8% v/v Tacsimate™ pH 4.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
11.	4% v/v Tacsimate™ pH 5.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
12.	8% v/v Tacsimate™ pH 5.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
13.	4% v/v Tacsimate™ pH 6.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
14.	8% v/v Tacsimate™ pH 6.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
15.	4% v/v Tacsimate™ pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
16.	8% v/v Tacsimate™ pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
17.	4% v/v Tacsimate™ pH 8.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
18.	8% v/v Tacsimate™ pH 8.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
19.	0.1 M Succinic acid pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
20.	0.2 M Succinic acid pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
21.	0.1 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
22.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
23.	0.1 M DL-Malic acid pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
24.	0.2 M DL-Malic acid pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
25.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
26.	0.2 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
27.	0.1 M Sodium formate pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
28.	0.2 M Sodium formate pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
29.	0.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
30.	0.2 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
31.	2% v/v Tacsimate™ pH 4.0, 0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6, 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
32.	2% v/v Tacsimate™ pH 5.0, 0.1 M Sodium citrate tribasic dihydrate pH 5.6, 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	2% v/v Tacsimate™ pH 6.0, 0.1 M BIS-TRIS pH 6.5, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
34.	2% v/v Tacsimate™ pH 7.0, 0.1 M HEPES pH 7.5, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
35.	2% v/v Tacsimate™ pH 8.0, 0.1 M Tris pH 8.5, 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
36.	(0.07 M Citric acid, 0.03 M BIS-TRIS propane / pH 3.4), 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	(0.06 M Citric acid, 0.04 M BIS-TRIS propane / pH 4.1), 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
38.	(0.05 M Citric acid, 0.05 M BIS-TRIS propane / pH 5.0), 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
39.	(0.04 M Citric acid, 0.06 M BIS-TRIS propane / pH 6.4), 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
40.	(0.03 M Citric acid, 0.07 M BIS-TRIS propane / pH 7.6), 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	(0.02 M Citric acid, 0.08 M BIS-TRIS propane / pH 8.8), 16% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	0.02 M Calcium chloride dihydrate, 0.02 M Cadmium chloride hydrate, 0.02 M Cobalt(II) chloride hexahydrate, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	0.01 M Magnesium chloride hexahydrate, 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate 0.1 M HEPES sodium pH 7.0, 15% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	0.02 M Zinc chloride, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	0.15 M Cesium chloride, 15% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	0.2 M Sodium bromide, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350
47.	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 12% w/v Polyethylene glycol 3,350
48.	1% w/v Tryptone, 0.001 M Sodium azide, 0.05 M HEPES sodium pH 7.0, 20% w/v Polyethylene glycol 3,350

8.2 Schéma krystalizace lytických enzymů bakteriofágů LysAm24, LysSi3 a LysSt11

Na následujících tabulkách je schematicky znázorněna krystalizace lytických enzymů metodou sedící kapky. Tab. II, III, IV, V znázorňují krystalizaci enzymu LysAm24, Tab VI, VII, VIII, IX znázorňují krystalizaci LysSi3 a Tab. X, XI, XII, XIII znázorňují krystalizaci enzymu LysSt11. Reservoár obsahoval vždy 100 μ l krystalizačního činidla.

Tab. II: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 1 až 24.

LysAm24
PEG/Ion 1
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. III: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 25 až 48.

LysAm24
PEG/Ion 1
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 25		činidlo č. 26		činidlo č. 27		činidlo č. 28	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 29		činidlo č. 30		činidlo č. 31		činidlo č. 32	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 33		činidlo č. 34		činidlo č. 35		činidlo č. 36	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 37		činidlo č. 38		činidlo č. 39		činidlo č. 40	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 41		činidlo č. 42		činidlo č. 43		činidlo č. 44	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 45		činidlo č. 46		činidlo č. 47		činidlo č. 48	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. IV Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 1 až 24.

LysAm24
PEG/Ion 2
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. V: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysAm24 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 25 až 48.

LysAm24
PEG/Ion 2
100 µl

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 25		činidlo č. 26		činidlo č. 27		činidlo č. 28	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 29		činidlo č. 30		činidlo č. 31		činidlo č. 32	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 33		činidlo č. 34		činidlo č. 35		činidlo č. 36	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 37		činidlo č. 38		činidlo č. 39		činidlo č. 40	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 41		činidlo č. 42		činidlo č. 43		činidlo č. 44	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 45		činidlo č. 46		činidlo č. 47		činidlo č. 48	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. VI Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 1 až 24.

LysSi3
PEG/Ion 1
100 μl

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. VII: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 25 až 48.

LysSi3							
PEG/Ion 1							
100 µl							
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 25		činidlo č. 26		činidlo č. 27		činidlo č. 28	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 29		činidlo č. 30		činidlo č. 31		činidlo č. 32	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 33		činidlo č. 34		činidlo č. 35		činidlo č. 36	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 37		činidlo č. 38		činidlo č. 39		činidlo č. 40	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 41		činidlo č. 42		činidlo č. 43		činidlo č. 44	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 45		činidlo č. 46		činidlo č. 47		činidlo č. 48	
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	

Tab. VIII: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 1 až 24.

LysSi3
PEG/Ion 2
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. IX: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSi3 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 25 až 48.

LysSi3							
PEG/Ion 2							
100 µl							
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 25		činidlo č. 26		činidlo č. 27		činidlo č. 28	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 29		činidlo č. 30		činidlo č. 31		činidlo č. 32	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 33		činidlo č. 34		činidlo č. 35		činidlo č. 36	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 37		činidlo č. 38		činidlo č. 39		činidlo č. 40	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 41		činidlo č. 42		činidlo č. 43		činidlo č. 44	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 45		činidlo č. 46		činidlo č. 47		činidlo č. 48	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. X: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 1 až 24.

LysSt11
PEG/Ion 1
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. XI: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 1, činidlo číslo 25 až 48.

LysSt11
PEG/Ion 1
100 μ l

1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 25				činidlo č. 26				činidlo č. 27				činidlo č. 28			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 29				činidlo č. 30				činidlo č. 31				činidlo č. 32			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 33				činidlo č. 34				činidlo č. 35				činidlo č. 36			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 37				činidlo č. 38				činidlo č. 39				činidlo č. 40			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 41				činidlo č. 42				činidlo č. 43				činidlo č. 44			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 45				činidlo č. 46				činidlo č. 47				činidlo č. 48			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	

Tab. XII: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 1 až 24.

LysSt11
PEG/Ion 2
100 μ l

1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 1		činidlo č. 2		činidlo č. 3		činidlo č. 4	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 5		činidlo č. 6		činidlo č. 7		činidlo č. 8	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 9		činidlo č. 10		činidlo č. 11		činidlo č. 12	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 13		činidlo č. 14		činidlo č. 15		činidlo č. 16	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 17		činidlo č. 18		činidlo č. 19		činidlo č. 20	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2
1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1	1 : 1	3 : 1
činidlo č. 21		činidlo č. 22		činidlo č. 23		činidlo č. 24	
2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2	2 : 1	3 : 2

Tab. XIII: Schéma krystalizační destičky pro lytický enzym bakteriofágu LysSt11 s krystalizačním činidlem PEG/Ion 2, činidlo číslo 25 až 48.

LysSt11
PEG/Ion 2
100 μ l

1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 25				činidlo č. 26				činidlo č. 27				činidlo č. 28			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 29				činidlo č. 30				činidlo č. 31				činidlo č. 32			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 33				činidlo č. 34				činidlo č. 35				činidlo č. 36			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 37				činidlo č. 38				činidlo č. 39				činidlo č. 40			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		1 : 3		1 : 1		1 : 3		1 : 1		1 : 3		1 : 1		1 : 3	
činidlo č. 41				činidlo č. 42				činidlo č. 43				činidlo č. 44			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	
1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1		1 : 1		3 : 1	
činidlo č. 45				činidlo č. 46				činidlo č. 47				činidlo č. 48			
2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2		2 : 1		3 : 2	