

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Krystalizační studie cukr-fosfatasy DH Tt80
z *Thermococcus kodakarensis* KOD1

Bakalářská práce

Petra Havlíčková

Školitel: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Konzultant: Mgr. Tatyana Prudnikova, Ph.D.

České Budějovice 2017

Havlíčková, P., 2017: Krystalizační studie cukr-fosfatasy DH Tt80 z *Thermococcus kodakarensis* KOD1. [Crystallization studies of sugar-phosphatase from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Bc. Thesis, in Czech.] – 70 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis is aimed at crystallization of the newly discovered and yet uncharacterized protein DH Tt80 from *Thermococcus kodakarensis* KOD1, which is considered to be sugar-phosphatase. The main goal of the thesis is to get acquainted with crystallization methods, prepare suitable monocrystals of protein DH Tt80 for X-ray diffraction analysis and collect diffraction data, which will be used for further research. Another part of this work is focused on phase diagrams of xylanase and thaumatin.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 11. 4. 2017

.....
Petra Havlíčková

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych ráda poděkovala své konzultantce Mgr. Tatyňce Prudnikové, Ph.D. za ochotu, trpělivost a vedení celým praktickým experimentem.

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1. Úvod do krystalizace.....	2
2.2. Proces krystalizace.....	2
2.2.1. Nukleace.....	2
2.2.2. Růst krystalů.....	3
2.2.3. Ukončení růstu krystalů.....	3
2.3. Fázový diagram.....	4
2.4. Pre-krystalizační test.....	6
2.5. Krystalizační metody.....	6
2.5.1. Standardní krystalizační metody.....	6
2.5.1.1. Metody založené na difúzi par.....	7
2.5.1.2. Dávková krystalizace.....	10
2.5.1.3. Mikrokrystalizace pod olejem.....	10
2.5.1.4. Dialýza.....	11
2.5.2. Pokročilé krystalizační metody.....	13
2.5.2.1. Metoda volné difúze.....	13
2.5.2.2. Krystalizace v gelech.....	14
2.5.2.3. Gel Acupuncture Method.....	14
2.5.3. Alternativní krystalizační metody.....	15
2.5.3.1. Očkovací techniky.....	15
2.5.3.2. Aditiva.....	16

2.6. Výsledky krystalizačních experimentů.....	17
2.6.1. Čirá kapka.....	17
2.6.2. Precipitace.....	18
2.6.3. Vytvoření „kůže“.....	19
2.6.4. Fázová separace.....	20
2.6.5. Sferulity.....	20
2.6.6. Krystaly.....	21
2.7. Testy proteinových krystalů.....	21
2.7.1. Test drcením.....	22
2.7.2. Dehydratace.....	22
2.7.3. Dvojlom světla.....	22
2.7.4. Barvicí test.....	22
2.7.5. Zkouška ohněm.....	23
2.7.6. Zesíťování.....	23
2.7.7. Kontrolní test.....	23
2.7.8. SDS-PAGE elektroforéza.....	23
2.7.9. Rentgenová difrakční analýza.....	23
2.8. Modelové proteiny.....	24
2.8.1. Xylanasa.....	24
2.8.2. Thaumatin.....	25
2.9. Cukr-fosfáty.....	25
2.9.1. Protein DH Tt80.....	25
2.10. Makromolekulární databáze.....	26

3. Materiál a metody.....	27
3.1. SDS-PAGE elektroforéza.....	27
3.2. Krystalizace xylanasy.....	28
3.2.1. Podmínky pro krystalizaci.....	28
3.2.2. Příprava krystalizačních roztoků.....	28
3.2.3. Naředění xylanasy.....	29
3.2.4. Vlastní krystalizace xylanasy.....	29
3.3. Krystalizace thaumatinu.....	30
3.3.1. Podmínky pro krystalizaci.....	30
3.3.2. Příprava krystalizačního roztoku.....	31
3.3.3. Naředění thaumatinu.....	31
3.3.4. Vlastní krystalizace thaumatinu.....	31
3.4. Krystalizace proteinu DH Tt80.....	32
3.4.1. Vzorek proteinu DH Tt80.....	32
3.4.2. Krystalizační činidla.....	35
3.4.3. Naředění proteinu DH Tt80.....	35
3.4.4. Vlastní krystalizace proteinu DH Tt80.....	35
3.5. Testy krystalů.....	36
3.6. Difrakční data.....	36
4. Výsledky.....	37
4.1. Výsledky SDS-PAGE elektroforézy.....	37
4.2. Výsledky krystalizace xylanasy.....	38

4.2.1. Výsledky krystalizace xylanasy s použitím krystalizačního činidla K_2HPO_4 o pH 8.....	38
4.2.2. Fázový diagram.....	41
4.2.3. Výsledky krystalizace xylanasy s použitím krystalizačního činidla $(NH_4)_2SO_4$ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3.....	42
4.2.4. Fázový diagram.....	45
4.2.5. Testování krystalů.....	45
4.3. Výsledky krystalizace thaumatinu.....	46
4.3.1. Fázový přechod.....	48
4.3.2. Testování krystalů.....	49
4.4. Výsledky krystalizace proteinu DH Tt80.....	49
4.4.1. Testování krystalů.....	50
4.4.2. Difrakční záznam.....	51
5. Diskuse.....	52
5.1. Xylanasa.....	52
5.2. Thaumatin.....	52
5.3. Cukr-fosfatasy.....	53
6. Závěr.....	55
7. Seznam literatury.....	56
8. Přílohy.....	60
9. Seznam zkratk.....	69

1. Úvod

Rentgenová krystalografie je v současné době jednou z nejvýznamnějších metod, které se používají k určování trojrozměrné struktury proteinů na základě jejich atomárního složení. Nezbytnou a nutnou podmínkou k použití této metody je příprava kvalitního monokrystalu. Proces získání krystalu o vyhovující kvalitě pro rentgenovou difrakci je velmi náročný a závisí na mnoha parametrech.

Proteinová krystalografie nachází uplatnění v mnoha oborech, zejména v medicíně, průmyslu nebo zemědělství. Strukturní studie mají důležitou roli také pro molekulární biologii, enzymologii, farmakologii a další disciplíny jako biochemie a biofyzika (McPherson, 2004).

Bakalářská práce v teoretické části popisuje principy krystalizace, fázový diagram, krystalizační metody, nejčastější možné výsledky krystalizace, testy krystalů, základní informace o studovaných proteinech v rámci této práce a makromolekulární databázi.

Praktická část bakalářské práce je zaměřena na krystalizaci xylanasy a thaumatinu - dvou modelových proteinů a popisem jejich fázových diagramů. V neposlední řadě se zabývá krystalizací nově připravené a doposud necharakterizované cukr-fosfatasy DH Tt80 z *Thermococcus kodakarensis* KOD1.

Cílem bakalářské práce bylo:

1. zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na vybraných modelových proteinech
2. pokusit se zaznamenat fázový diagram krystalizačního procesu na modelových proteinech
3. nalézt a optimalizovat krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů
4. připravit krystaly studovaného proteinu DH Tt80 v difrakční kvalitě
5. otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

2. Literární přehled

2.1. Úvod do krystalizace

Krystalizace je komplikovaný proces, skládající se z hledání individuálních podmínek a parametrů, které ovlivňují vznik krystalů a jejich následnou optimalizaci za účelem získání dostatečně kvalitních krystalů vhodných pro provedení rentgenové difrakční analýzy. Principem tohoto procesu je pozvolné převedení systému do stavu snížené rozpustnosti a následná úprava vlastností systému, z důvodu dosažení limitního stupně přesycení (Kutá Smatanová, 2003).

Makromolekulární krystalizace zahrnuje krystalizaci proteinů, nukleových kyselin, virů a ribozomů. Doposud neexistuje žádná komplexní teorie, která by popisovala, jak přesně lze určitou makromolekulu úspěšně vykrystalizovat, růst makromolekulárních krystalů je z velké části empirický. V důsledku toho krystalizace vyžaduje zkušenosti, intuici a především trpělivost a vytrvalost (McPherson & Gavira, 2014).

Úspěšnost krystalizace závisí na mnoha faktorech (např. teplota, pH, koncentrace), přičemž musí být vždy splněna základní podmínka a tou je supersaturace, tj. přesycení roztoku. Bergfors (1999) stav supersaturace definuje jako nerovnovážný stav, který je charakterizován tendencí formovat pevnou fázi a zároveň zvyšovat poměr této fáze do doby, než je ustálena rovnováha, respektive rovnovážná koncentrace. Vyhovující krystaly pro rentgenovou difrakční analýzu mají rozměry od $10 \mu\text{m}^3$ a více (Chayen, 2004).

2.2. Proces krystalizace

Proces vzniku proteinových krystalů se skládá ze tří fází: nukleace, růstu krystalů a zastavení růstu krystalů.

2.2.1. Nukleace

Nukleace je prvním a zároveň nejsložitějším krokem vzniku krystalů. Kutá Smatanová (2003) popisuje nukleaci jako proces, kdy dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul a při překročení limitu supersaturace se začínají vytvářet stabilní agregáty, v ideálním případě krystalizační jádra.

Nukleace je aktivovaný proces, jelikož nově vznikající jádro musí překonat energetickou bariéru. Toto jádro se nachází v horní části bariéry, která určuje rychlost

nukleace. V horní části bariéry jsou jádra mikroskopická, což činí pozorování nukleace příliš složitě. Tento proces je téměř vždy heterogenní, jádra jsou v kontaktu s povrchem. Nicméně vznik jader může být studován pomocí počítačových simulací (Sear, 2007). Pokud je zformováno jádro, růst krystalu pak následuje spontánně (Chayen, 2004).

2.2.2. Růst krystalů

Růst krystalů je dynamickým procesem, při kterém dochází k interakci vhodně orientovaných molekul s jádrem krystalu a jejich následném uspořádání na povrchu jádra. Růst krystalu závisí na dvou parametrech - difúzním stupni, který popisuje rychlost difúze v oblasti růstu krystalu a depozičním stupni, který popisuje rychlost vyloučení pevné fáze z roztoku. Nejlepší krystaly vznikají z malého počtu jader a rostou volnou rychlostí (Kutá Smatanová, 2003).

Růst krystalů je výrazně prozkoumanějším procesem než nukleace. Již od 19. století bylo známo, že krystaly v roztoku nabývají na velikosti narůstáním. Růstové jednotky se volně pohybují v roztoku a za vhodných podmínek se připojí ke krystalu (García-Ruiz, 2003). Proteinové krystaly rostou hlavně klasickým mechanismem dislokačního růstu, dvojrozměrným, normálním a trojrozměrným růstem (McPherson, 2004).

V ideálním případě rostou kvalitní monokrystaly pro difrakční analýzu z malého počtu malých krystalů, v jiných případech může dojít např. k tvorbě velkého množství mikrokystalů, dendritů, sferulitů, olejových agregátů, amorfních pudrů nebo kapka proteinového roztoku zůstane čirá (Kutá Smatanová, 2003).

Růst proteinových krystalů je ovlivněn celou řadou faktorů, přičemž každý z faktorů je jinak důležitý pro daný protein. Mezi tyto faktory patří např. vliv pH, pufrů, koncentrace srážecího činidla, koncentrace proteinového roztoku a jeho čistota, teplota, substráty, koenzymy, inhibitory nebo také vibrace a zvuk, tlak, aditiva nebo manipulace a čistota práce (Kutá Smatanová, 2003).

2.2.3. Ukončení růstu krystalů

Zastavení růstu krystalů je finální fáze, dochází k ní po ustálení termodynamické rovnováhy nebo při přílišném nahromadění nečistot a defektů na povrchu krystalu (Kierzek & Zielenkiewicz, 2001).

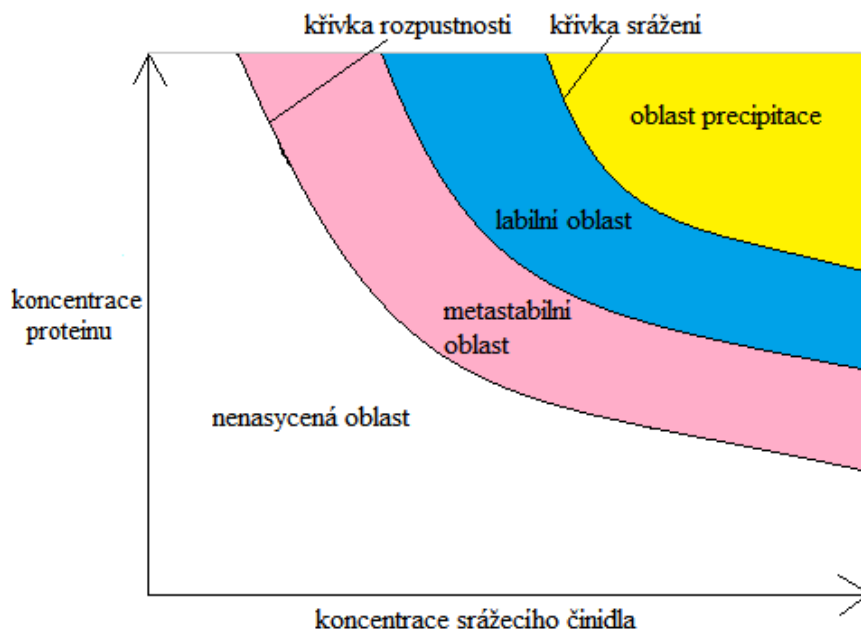
2.3. Fázový diagram

Příklady fázových přechodů vidíme všude kolem nás, např. srážky nebo zmrznutí vody do ledových krystalů (Sear, 2007). Všechny tyto procesy jsou založeny na nukleaci a růstu krystalů stejně jako vznik proteinových krystalů. Protein zůstává v roztoku pouze do určité koncentrace. Pokud je této limitní koncentrace dosaženo, roztok již nezůstává homogenní, nastává změna fáze a protein se vylučuje z roztoku v pevném stavu, ideálně ve formě krystalu (Kutá Smatanová, 2003).

Proces krystalizace je ilustrován fázovým diagramem, který popisuje skupenský stav všech veličin v systému. Pro proteinový roztok jsou těmito veličinami koncentrace proteinu, teplota, srážecí činidlo a jeho vlastnosti, např. pH, koncentrace, pufrů, aditiva. Nejběžnějším typem je 2-D fázový diagram, znázorňující závislost rozpustnosti proteinu na jiném určitém parametru roztoku a to ve většině případů na koncentraci srážecího činidla (Asherie, 2004).

Typický fázový diagram se skládá ze čtyř částí, které reprezentují odlišné stupně přesycení. Tyto oblasti jsou znázorněny na Obr. 1 a Chayen (2004) je popisuje následovně:

- Oblast vysokého přesycení (oblast precipitace, žlutá), kde se protein bude srážet.
- Oblast mírného přesycení (labilní oblast, modrá), kde probíhá spontánní nukleace.
- Oblast nízkého přesycení (metastabilní oblast, fialová), kde již neprobíhá nukleace, krystaly jsou stabilní a mohou růst. Podmínky v této oblasti jsou nejvhodnější pro růst správně uspořádaných krystalů.
- Oblast nenasycení (bílá), kde je protein plně rozpuštěný a nekrystalizuje.



Obrázek 1: Fázový diagram růstu krystalů.

Důležitou součástí fázového diagramu je křivka rozpustnosti, která ilustruje, jak se mění rozpustnost proteínu v závislosti na koncentraci srážecího činidla. Rozpustnost proteínu se obvykle určuje vložení proteinového krystalu do srážecího roztoku, který neobsahuje žádný protein a krystal se v něm začne rozpouštět. Jestliže je objem srážecího roztoku dostatečně malý, krystal se plně nerozpustí, ale rozpouštění ustane, jakmile protein v roztoku dosáhne určité koncentrace. Při dosažení této koncentrace je systém v rovnováze a znamená to, že krystal ztrácí proteinové molekuly stejnou rychlostí, jako je získává. Variací tohoto experimentu je začít v přesyceném roztoku, kde systém dosáhne rovnováhy růstem krystalu. Určení rozpustnosti proteínu touto metodou je ale obtížnější, jelikož povrch krystalu může být postižen nečistotami a nesprávně orientovanými proteiny. Ve stručnosti lze význam křivky rozpustnosti pro proteinové krystaly popsat tak, že krystaly se rozpouští v oblasti nenasycení, kde je koncentrace pod rozpustností proteínu a naopak růst krystalů probíhá v oblasti přesycení (Asherie, 2004).

2.4. Pre-krystalizační test

Pre-krystalizační test se využívá za účelem stanovení vhodné koncentrace proteinového roztoku pro krystalizační experiment. Koncentrace proteinového roztoku je důležitým parametrem, příliš koncentrované vzorky mohou vyústit v amorfni sraženiny, naopak příliš zředěné vzorky poskytují čiré kapky. Provedení tohoto testu před samotnou krystalizací napomáhá v minimalizaci počtu kapek s těmito výsledky (Hampton Research, 2015).

Pre-krystalizační test se provádí pomocí PCT sady, kterou poskytuje společnost Hampton Research (USA). Sada obsahuje 4 unikátní činidla, díky kterým lze vyhodnotit vhodné podmínky pro určitý protein. Nejprve je protein smíchán se dvěma prvními činidly, která diagnostikují, zda je koncentrace proteinu vhodná pro krystalizační účely. Třetí a čtvrté činidlo je využíváno, pokud je protein citlivý na koncentraci soli a polymeru (Hampton Research, 2015).

2.5. Krystalizační metody

Existuje celá řada metod používaných pro uvedení roztoku proteinu do stavu supersaturace, zejména pomalým snižováním koncentrace rozpouštědla (McPherson, 1999). Dosažení stavu supersaturace je nezbytné pro získání proteinových krystalů. Tyto metody se nazývají krystalizační a je možné je rozdělit do tří skupin:

- Standardní (základní) metody
- Pokročilé metody
- Alternativní metody

2.5.1. Standardní krystalizační metody

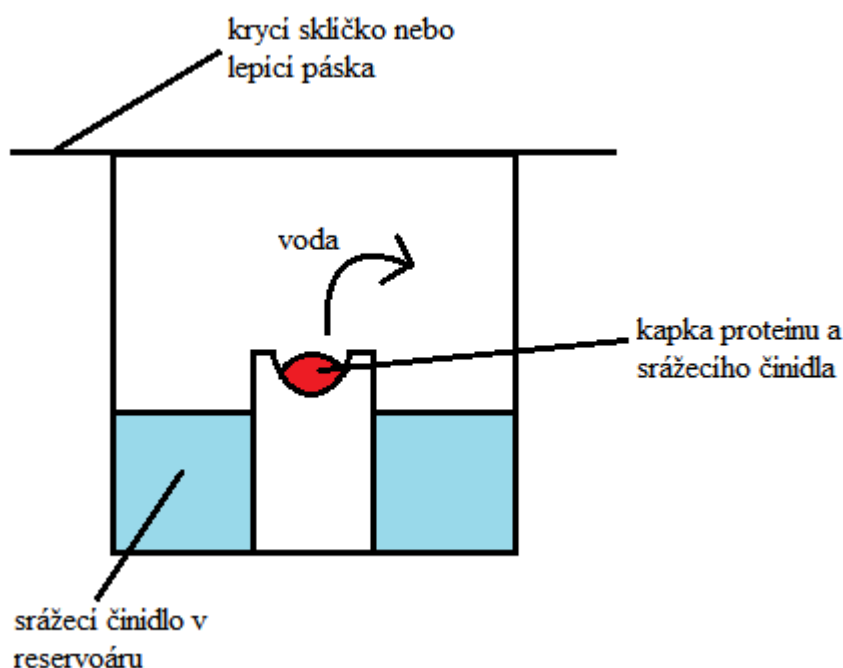
Mezi standardní krystalizační metody patří techniky založené na difúzi par rozpouštědla, konkrétně metoda sedící kapky (*Sitting Drop Vapor Diffusion*), metoda visící kapky (*Hanging Drop Vapor Diffusion*) a metoda sendvičové kapky (*Sandwich Drop Vapor Diffusion*). Dále se do této kategorie řadí dávková krystalizace (*Batch Crystallization*), mikrokrystalizace pod olejem (*Microbatch Under Oil*) a dialýza (*Dialysis*).

2.5.1.1. Metody založené na difúzi par

Principem krystalizačních technik založených na difúzi par je odpařování vody z kapky rozpouštědla, z místa s nižší koncentrací srážecího činidla, do reservoáru, místa s vyšší koncentrací srážecího činidla, přičemž se v kapce zvyšuje koncentrace proteinu a krystaly se formují v okamžiku, kdy je systém v rovnovážném stavu nebo jeho blízkosti, ideálně v nukleační zóně fázového diagramu (Dessau & Modis, 2011). Ve stručnosti lze tyto metody popsat tak, že rovnováha je ustanovena na základě rozdílné koncentrace v kapce a reservoáru pomocí difúze par.

Metoda sedící kapky (*Sitting Drop Vapor Diffusion*)

Provedení metody sedící kapky spočívá v napipetování určitého objemu srážecího činidla (500 - 1000 μl) do reservoáru a umístění kapky proteinu (až 20 μl) a srážecího činidla (až 20 μl) do stojánku uprostřed reservoáru. Celý systém se poté zaizoluje lepicí páskou nebo krycím skličkem, aby bylo umožněno dosažení termodynamické rovnováhy. Schéma metody sedící kapky je znázorněno na Obr. 2.



Obrázek 2: Schéma metody sedící kapky.

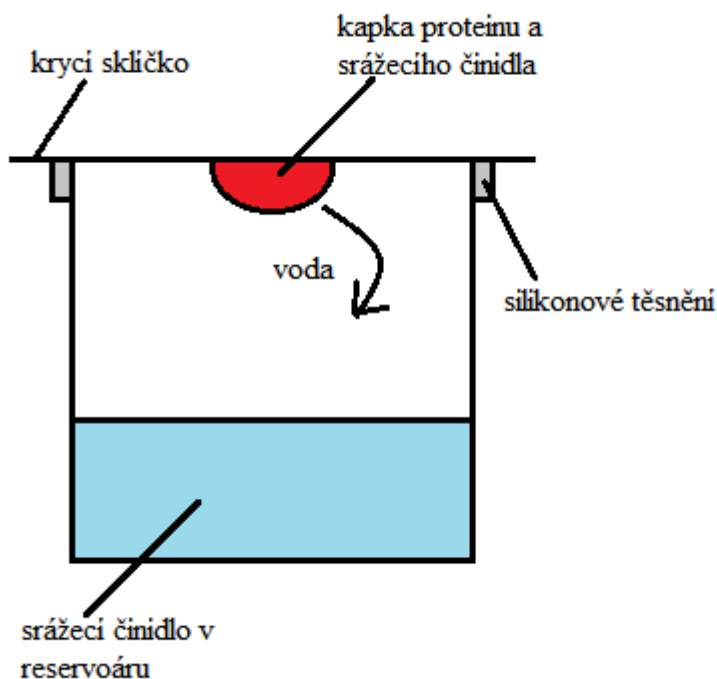
Metoda sedící kapky se využívá v případech, kdy experiment vyžaduje větší objem kapky proteinu a srážecího činidla, než je možné použít v experimentu s visící kapkou. Dále

pak v přítomnosti aditiv, které snižují povrchové napětí kapky, jako jsou detergenty nebo organická rozpouštědla (Bergfors, 1999).

Mezi výhody techniky sedící kapky patří nákladová i časová efektivnost, rychlost a jednoduchost experimentu, umístění kapek ve stabilní poloze vsedě, kompatibilita s gely, možnost použití detergentů a organických a hydrofobních činidel (Hampton Research, 2015). Nevýhodou této metody je, že krystaly mohou někdy příliš přilnout k povrchu, což činí pozdější manipulaci s nimi obtížnou.

Metoda visící kapky (*Hanging Drop Vapor Diffusion*)

Metoda visící kapky se provádí tak, že do reservoáru je napipetován určitý objem srážecího činidla. Kapka směsi proteinu a srážecího činidla je napipetována na skleněné krycí sklíčko, které je následně umístěno nad reservoár a utěsněno pomocí silikonu, čímž je systém izolován a dochází k postupnému ustanovení rovnováhy. Schéma metody visící kapky je znázorněno na Obr. 3.



Obrázek 3: Schéma metody visící kapky.

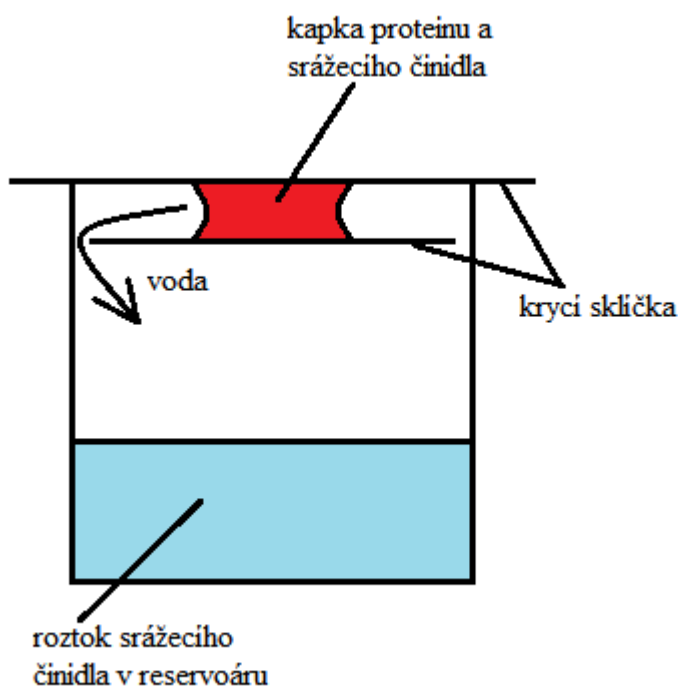
Nejvíce biologických makromolekul bylo vykrystalizováno pomocí metod založených na difúzi par a visící kapka je nejběžnějším používaným typem (McPherson, 1982). Metoda visící kapky je používána v případech, kdy experiment nevyžaduje větší

objem kapky (od několika μl do 20 μl) a zároveň roztok neobsahuje detergenty nebo organická rozpouštědla (Bergfors, 1999).

Jako výhody techniky visící kapky se uvádí nákladová a časová efektivnost, rychlost a jednoduchost experimentu, snadné pozorování krystalů, snadný přístup ke krystalům, kontakt kapky se silikonizovaným povrchem skla a možnost provedení několika pokusů, tj. kapek s jedním reservoárem (Hampton Research, 2015). Nevýhodou této metody je omezený objem kapky, se kterým lze experiment provést.

Metoda sendvičové kapky (*Sandwich Drop Vapor Diffusion*)

Při pokusu provedeným metodou sendvičové kapky, která je znázorněna na Obr. 4, se do reservoáru napipetuje určitý objem srážecího činidla a dále se smíchaný roztok proteinu a srážecího činidla napipetuje doprostřed na spodní silikonizované skličko a poté se umístí vrchní silikonizované skličko nad kapku. Mezi skličky zůstane malý prostor, takže kapka je zde sevřena a tím je vytvořen „sendvič“, podle kterého je tato metoda pojmenována (Hampton Research, 2015).



Obrázek 4: Schéma metody sendvičové kapky.

Tato technika v porovnání se sedící nebo visící kapkou redukuje rychlost odpařování z kapky a poskytuje stabilní prostředí pro růst krystalů (Sun et al., 2010). Používá se

v případech, kdy experiment vyžaduje pomalejší mechanismus ustanovení rovnováhy a speciální optické vlastnosti.

Jako výhoda této techniky se uvádí dobré optické vlastnosti pro pozorování krystalů (McPherson, 1999), nevýhodou je časová náročnost.

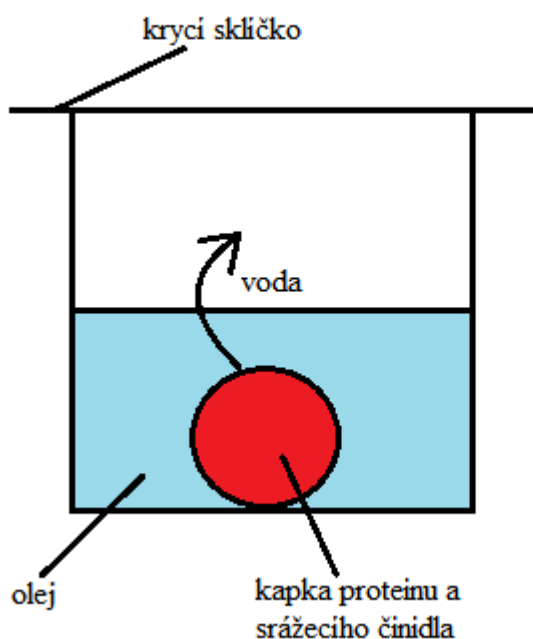
2.5.1.2. Dávková krystalizace (*Batch Crystallization*)

Dávková krystalizace je nejjednodušší a zároveň nejstarší metodou používanou ke krystalizaci proteinů již přes 150 let. Vyžaduje pouze smíchání proteinu a roztoku srážecího činidla a čas, za který se započne spontánní nukleace (McPherson, 1999).

Výhodou dávkové krystalizace je její rychlost a jednoduchost, může být provedena ve větších objemech (od 350 μ l a více) v Petriho misce, kapiláře nebo větším reservoáru (Bergfors, 1999). Nevýhodou je, že při experimentu je najednou testováno pouze úzké rozmezí koncentrace roztoku proteinu a srážecího činidla (Tomčová, 2007).

2.5.1.3. Mikrokrystalizace pod olejem (*Microbatch Under Oil*)

Mikrokrystalizace pod olejem spočívá v napipetování malé kapky směsi roztoku proteinu a srážecího činidla (1 – 2 μ l) pod tenkou vrstvou oleje. Olej zajišťuje malou a pomalou difúzi par. Tato metoda může být prováděna klasicky ručně nebo pomocí robotů, což nabízí vysokou přesnost, rychlost a možnost využití velmi malých objemů kapek (Chayen et al., 1992). Na Obr. 5 je znázorněno schéma mikrokrystalizace pod olejem.



Obrázek 5: Schéma metody krystalizace pod olejem.

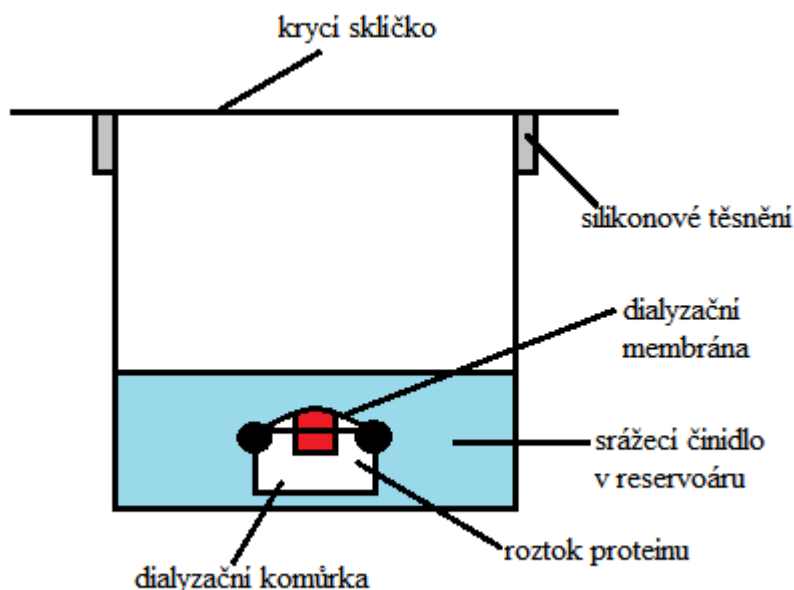
Pro tuto techniku se používají dva typy olejů - parafínový a silikonový. Parafínový olej umožňuje pouze nepatrnou difúzi par, zatímco při použití silikonového oleje difúze par probíhá volně. Různými poměry parafínového a silikonového oleje lze manipulovat difúzi (Bergfors, 1999). Směs parafínového a silikonového oleje 1 : 1 je známá jako Al's Oil, při jejím použití se experiment označuje jako modifikovaná mikrokrytalizace a vyústí v o několik řádů vyšší koncentraci proteinu, jelikož zde není žádné konečné stadium na rozdíl od metod založených na difúzi par (D'Arcy et al., 2004).

Výhodou této techniky je, že přítomnost oleje chrání krystaly před vysoušením, což se může stát v případě technik založených na difúzi par (Chayen, 1997). Dále se jako výhody uvádí jednoduchost a rychlost, nutnost použití velmi malého objemu kapky proteinu a srážecího činidla, minimální povrch interakce se vzorkem, schopnost přesně kontrolovat koncentraci proteinu a srážecího činidla v průběhu experimentu a minimální kondenzaci při kolísání teplot (Hampton Research, 2015). Jako možnou nevýhodu lze uvést v některých případech obtížnou manipulaci s krystaly pod olejem.

2.5.1.4. Dialýza (*Dialysis*)

Dialýza je obměnou metod založených na difúzi par. Při tomto experimentu je roztok proteinu oddělen od roztoku srážecího činidla dialyzační polopropustnou membránou,

tzv. semi-permeabilní membránou. Ta umožňuje průchod malým molekulám, jako jsou soli, různá aditiva a další krystalizační činidla, ale znemožňuje průchod biologických makromolekul. Krystalizace probíhá pronikáním srážecího činidla dovnitř nebo ven ze vzorku, přičemž koncentrace proteinu zůstává konstantní (Hampton Research, 2015). Na Obr. 6 je znázorněno schéma dialýzy.



Obrázek 6: Schéma dialýzy.

Rychlost ustanovení rovnováhy závisí na použitém srážecím činidle, propustnosti dialyzační membrány, molekulové hmotnosti, koncentraci vně a uvnitř membrány, velikosti dialyzačního knoflíku, objemu reservoáru, viskozitě roztoku a na změnách chemicko-fyzikálních parametrů (Thomas et al., 1989).

Dialýza je nejefektivnější metoda pro krystalizaci makromolekul s nízkou iontovou silou (Bergfors, 1999). Její výhodou je možnost snadné změny složení reservoáru jednoduchým přesunutím dialyzačního knoflíku z jedné podmínky do druhé, to znamená, že lze vzorek proteinu opakovaně používat, dokud se nedosáhne správných podmínek pro krystalizaci. Dále lze rychlost ustanovení rovnováhy modulovat na základě změny koncentrace vně a uvnitř membrány. Nevýhodou je, že tuto metodu nelze použít s koncentrovanými roztoky PEGů, které mají tendenci odčerpat všechnu vodu z dialyzačního

knoflíku (komůrky), což má za následek vysrážení proteinu a nemožnost měnit jeho koncentraci (Russo Krauss et al., 2013). Krystalizace dialýzou má několik modifikací:

Makrodialýza (*Macrodialysis*)

Vzorek se vloží do tuby s příslušnou molekulovou hmotností a je dialyzován proti příslušnému roztoku v reservoáru. Pro tuto metodu je typické, že je vyžadováno alespoň 100 µl vzorku a experiment může být proveden s objemem až v řádu litrů (Tomčová, 2007).

Zeppenzauerova metoda

Tato metoda je používána pro mikrolitry vzorku, kdy se využívají silnostěnné mikrokapiláry nebo dialyzační knoflík z plexiskla pokrytý dialyzační membránou (Zeppenzauer, 1971).

Microdialýza (*Microcap Dialysis*)

Při této metodě se využívá vzorek o menším objemu než je 50 µl, který je vložen do skleněné kapiláry, z jedné strany uzavřené voskem a z druhé dialyzační membránou. Celý systém je poté vložen do malé odstředivé zkumavky, která je naplněná srážecím činidlem (Ducruix & Giege, 1992).

Dvojitá dialýza (*Double Dialysis*)

Dialyzační knoflík je umístěn v reservoáru, který je utěsněný dialyzační membránou a tento celý systém je uvnitř jiného dalšího reservoáru. Tato metoda se používá v případech, kdy je žádoucí redukce rychlosti ustálení rovnováhy (Lee & Cudney, 2004).

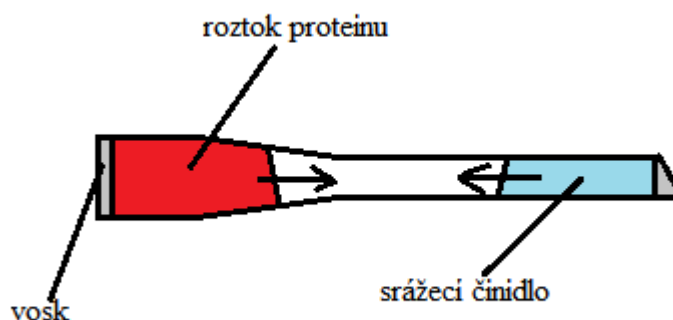
2.5.2. Pokročilé krystalizační metody

Mezi pokročilé krystalizační techniky řadíme např. metodu volné difúze (*Free Interface Diffusion Method*), krystalizaci v gelech (*Crystallization in Gels*) a „Gel Acupuncture Method“ (GAME).

2.5.2.1. Metoda volné difúze (*Free Interface Diffusion Method*)

Tato metoda je založena na volné difúzi mezi koncentrovaným roztokem proteinu a roztokem srážecího činidla. Provádí se nejčastěji ve skleněných kapilárách. Mezi roztoky se nejprve vytvoří rozhraní, poté do sebe oba roztoky začínají difundovat, v oblasti rozhraní vzniká přechodně stadium vysoké supersaturace a indukuje tvorbu nukleačních jader,

ze kterých se po ustanovení rovnováhy formují krystaly (Salemme, 1972). Na Obr. 7 je znázorněno schéma metody volné difúze.



Obrázek 7: Schéma metody volné difúze.

Technika se provádí tak, že se do jednoho konce skleněné kapiláry nasaje roztok proteinu, do druhého konce roztok srážecího činidla a oba konce se utěsní voskem, aby mohlo být dosaženo rovnováhy.

Jako výhodou této metody uvádí Rupp (2010) testování rozsáhlého pokrytí fázového prostoru, tj. mnoha rozdílných podmínek při provedení jednoho experimentu, nevýhodou je jeho náročnost.

2.5.2.2. Krystalizace v gelech (*Crystallization in Gels*)

Gely jsou známy tím, že podporují růst vysoce kvalitních krystalů vhodných pro rentgenovou strukturní analýzu. Konkrétně se používají silikonový, polyakrylamidový a vůbec nejčastěji agarózový gel. Tím, jak krystal roste, odčerpává ve svém okolí matečný roztok a vzniká zóna vyčerpání, zatímco při použití gelu k tomuto jevu nedochází.

Jako výhody použití gelů se uvádí, že udržují krystaly v suspenzi v matečném roztoku, zabraňují sedimentaci, podporují růst krystalů ve třech dimenzích, poskytují mechanickou ochranu a snadnou manipulaci s krystaly (Biertümpfel et al., 2002). Nejen pro tyto výhody bývá tento způsob krystalizace prováděn také v mnoha modifikacích.

2.5.2.3. Gel Acupuncture Method (GAME)

Tato metoda je založena na principu difúze par přes překážku (*Counter Diffusion Method*), kterou v kapiláře představuje gelová vrstva. Provádí se tak, že roztok proteinu je

do kapiláry nasáván pomocí kapilární síly a poté se jeden konec kapiláry uzavře. Druhý otevřený konec kapiláry se umístí do gelu v krystalizačním boxu. Gel zde má nejen stabilizační roli, kdy udržuje kapiláry ve svislé pozici, ale především působí jako transportní systém pro roztok srážecího činidla (Tomčová, 2007).

2.5.3. Alternativní krystalizační metody

Jako alternativní krystalizační metody se označují očkovací techniky (*Seeding Techniques*) nebo použití aditiv (*Additives*).

2.5.3.1. Očkovací techniky (*Seeding Techniques*)

Očkování je technika používaná pro optimalizaci krystalizačních podmínek, jejímž smyslem je získání větších a kvalitnějších krystalů (Kutá Smatanová, 2003). Jedním z problémů krystalizace je, že optimální podmínky pro nukleaci, tj. vznik krystalizačních jader, nejsou ideálními podmínkami pro následný růst krystalů. Důvodem je, že spontánní nukleace nastane pravděpodobněji při vysoké hodnotě přesycení roztoku, na druhé straně pomalý a uspořádaný růst velkých krystalů nastává spíše při nižších hodnotách přesycení (Bergfors, 2003).

Očkování je ideální technikou pro oddělení fáze nukleace a růstu krystalů, jejímž principem je použití dříve vzniklých krystalizačních jader jako krystalizačních zárodků a jejich vložení do nové kapky srážecího roztoku s nižší hodnotou přesycení (Bergfors, 2003).

Očkovací metody se rozdělují na homogenní (*Homogeneous Seeding*), konkrétně makroočkování (*Macroseeding*) a mikroočkování (*Microseeding*), dále na vlasové očkování (*Streak Seeding*), epitaxiální očkování (*Epitaxial Seeding*) a očkování příbuzným krystalem (*Cross Seeding*).

Makroočkování (*Macroseeding*)

Makroočkování je metoda přenosu jednotlivých krystalů o velikosti 5 - 50 μm do nového rovnovážného proteinového roztoku. Spočívá ve vyjmutí krystalu proteinu z původní kapky a jeho následným opakovaným omýváním ve stabilizujících roztocích (např. srážecí roztok v reservoáru). Omytý krystal je poté vložen do nového proteinového roztoku s cílem připravit kvalitní krystal (McPherson, 1999).

Bergfors (2003) uvádí jako nevýhodu makroočkování jeho náročnost.

Mikroočkování (*Microseeding*)

Mikroočkování je metoda přenosu mikrokryсталů do nového rovnovážného proteinového roztoku. Spočívá v rozdrčení malých krystalů (např. ve skleněné zkumavce) a vytvoření ředící řady očkovacího roztoku (*Seeding Stock*), který je následně ředěn, a jeho různé koncentrace jsou pipetovány do nového rovnovážného roztoku proteinu, přičemž správná koncentrace očkovacího roztoku vede ke vzniku menšího počtu větších krystalů (McPherson, 1999).

Podle Bergfors (2003) je nevýhodou mikroočkování obtížnost kontroly počtu mikrokryсталů, které jsou do nového rovnovážného proteinového roztoku přeneseny.

Vlasové očkování (*Streak Seeding*)

Vlasové očkování spočívá v použití zvířecích chlupů nebo vousů (např. kočičích vousů), se kterými se z krystalu uvolní krystalizační zárodky. Krystalizační zárodky zůstávají uchycené na vousu a jsou přeneseny do nového rovnovážného proteinového roztoku tím, že se přes kapku roztoku přejede vousem. Na jednom vousu je zpravidla dostatek krystalizačních zárodků pro očkování 3 - 6 kapek (Bergfors, 1999).

Epitaxiální očkování (*Epitaxial Seeding*)

Heterogenní nukleace je principem epitaxiálního očkování, kdy se využívají materiály, které snižují energii potřebnou pro nukleaci. Nukleační materiály usnadňují proces krystalizace svým vhodným povrchem, řadí se sem např. sklo, syntetické polymery, různé minerály a vůbec nejpoužívanější vlákno celulózy, které se většinou do kapky nedostane záměrně, ale nedopatřením z oblečení (McPherson, 1999).

Očkování příbuzným krystalem (*Cross Seeding*)

Očkování příbuzným krystalem spočívá v tom, že jako krystalizační zárodky jsou do nového roztoku proteinu přenášeny krystalizační zárodky podobného proteinu. Při této metodě se spoléhá na podobné vlastnosti proteinu a hledání krystalizačních podmínek není tak zdlouhavé (Bergfors, 1999).

2.5.3.2. Aditiva (*Additives*)

Alternativní přístupy ke krystalizaci proteinů vedly ke snaze posílit mezimolekulární interakce mezi makromolekulami, zvýšit stabilitu konformace proteinu a snížit mezimolekulární interakce mezi makromolekulami a rozpouštědlem. Látky, které tyto

výhody při krystalizaci poskytují, jsou nízkomolekulární sloučeniny a nazývají se aditiva (McPherson et al., 2011).

McPherson et al. (2011) jako příklady přirozených aditiv uvádí kofaktory, inhibitory, substrátové skupiny, prostetické skupiny nebo ionty kovů (např. Ca^{2+}). Navázáním těchto aditiv dochází ke vzniku stabilnější konformace proteinu. Jako další skupinu aditiv uvádí detergenty, které mají vliv na rozpustnost proteinu, čehož se využívá např. při krystalizaci membránových proteinů.

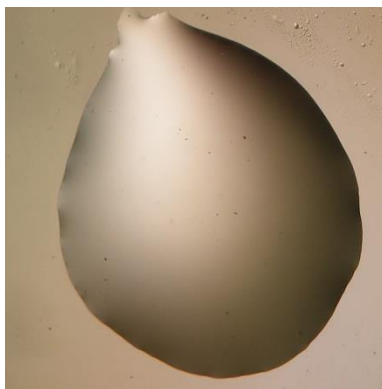
2.6. Výsledky krystalizačních experimentů

Pozorování a vyhodnocování krystalizačních experimentů není vždy zcela jasné a vyžaduje určitou zkušenost. Je doporučeno průběžně kontrolovat kapky až do té doby, než vyschnou. Krystalizace je vysoce individuální proces a krystaly se mohou objevit již za pár minut od provedení experimentu nebo až po uplynutí delší doby, např. po roce (Hampton Research, 2015). V kapce lze pozorovat několik odlišných výsledků v závislosti na fázovém diagramu, v následujícím textu jsou uvedeny nejčastější z nich.

2.6.1. Čirá kapka (*Clear drop*)

Čirá kapka ilustruje stav, kdy je vzorek proteinu zcela v roztoku. Důvodem může být, že se systém nachází v nenasycené nebo metastabilní oblasti. Přesto, že kapka nacházející se v těchto oblastech vypadá zcela stejně, termodynamický stav těchto kapek je ale odlišný a je velmi užitečné tyto dva stavy od sebe rozlišit, což se provádí pozorováním kapek, které jsou si chemicky podobné. (Luft et al., 2011).

Jestliže kapka zůstává čirá, stejně jako na Obr. 8, důvodem je nejčastěji nízká koncentrace proteinu nebo srážecího činidla, tzn. systém je v nenasycené oblasti. Jiným vysvětlením je, že systém ještě nedosáhl rovnováhy, pokud kapka zůstává čirá i po uplynutí třech až čtyřech týdnů po provedení experimentu, je doporučeno zvýšit koncentraci proteinového roztoku nebo srážecího činidla (Hampton Research, 2015).



Obrázek 8: Čirá kapka (foto autor).

2.6.2. Precipitace (*Precipitation*)

Precipitát je v kapce pozorovatelný jako zrnitá oblast. Je výsledkem toho, že systém je ve stavu o mnoho řádů vyššího přesycení, než jakého je potřeba k růstu monokrystalů. Další možností je, že protein zdenaturoval nebo je heterogenní (Hampton Research, 2015). Precipitaci lze rozdělit na dva druhy - „špatnou“ precipitaci, která je typicky amorfní a „dobrou“ precipitaci, která je mikrokrytalická (Luft et al., 2011).

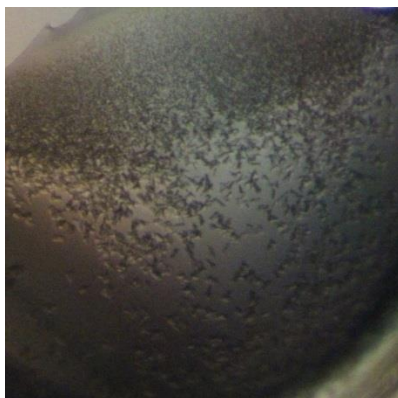
Amorfní precipitace, která je na Obr. 9, má většinou hnědou barvu, neobsahuje hrany, nebude do sebe vázat barviva a nebude ani sloužit jako dobré krystalizační zárodky pro techniku očkování. Tento typ precipitace se objevuje kvůli nepřirozenému shlukování proteinu (Krebs et al., 2007).



Obrázek 9: Amorfní precipitace (převzato z Bergfors, dostupné online).

Mikrokrytalický precipitát, který je na Obr. 10, má často „písečný“ vzhled, absorbuje barviva a dá se úspěšně použít jako krystalizační zárodky. Objevuje se při shlukování proteinu, kdy jsou chemické podmínky příznivé tomu, že přirozená konformace

proteinu zůstává netknutá. Mikrokrystaly často vedou k získání krystalů za potřeby minimálního množství optimalizačních kroků (Luft et al., 2011). Mikrokrystaly lze nejpohodlněji od amorfního precipitátu odlišit použitím zkřížených polarizátorů, mikrokrystaly budou vykazovat dvojlom světla a jevit se jako světlá lesklá místa (Hampton Research, 2015).

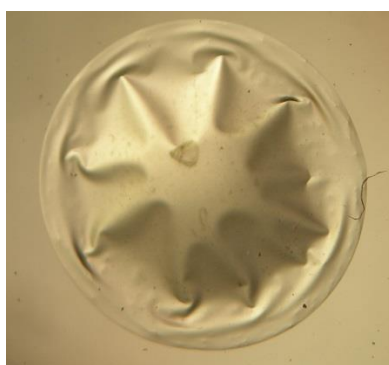


Obrázek 10: Mikrokrystalický precipitát (foto autor).

Jestliže se v kapce nachází amorfní precipitát, je doporučeno snížit koncentraci proteinu nebo srážecího činidla (Hampton Research, 2015).

2.6.3. Vytvoření „kůže“ (*Skin formation*)

Zformování „kůže“ na kapce se pod mikroskopem jeví jako zvrásnělý plastový obal, stejně jako na Obr. 11, a často indikuje zdenaturovaný nebo zoxidovaný protein (Luft et al., 2011). Krystaly často v tomto prostředí nevznikají, „kůže“ ale může být odstraněna např. jehlou a v experimentu lze dále pokračovat (Hampton Research, 2015).

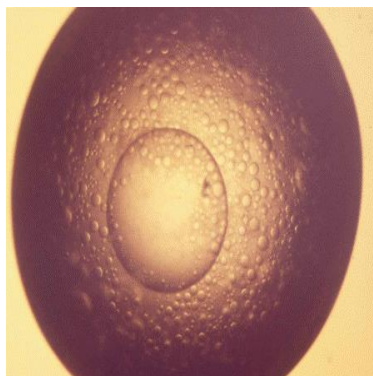


Obrázek 11: Vytvoření „kůže“ na kapce (foto autor).

2.6.4. Fázová separace (*Phase separation*)

Fázová separace je stav, kdy se v kapce formují malé olejové kapénky. Tyto oblasti mají zvýšenou koncentraci proteinového roztoku a představují příznivé podmínky pro krystalizaci, ale vyžadují optimalizaci. Zároveň s optimalizací by měla být pozorována původní kapka, jelikož se krystaly mohou vytvořit v průběhu času (Qiagen, 2010).

Experimentální zjištění ukazují, že fázová separace se nachází v metastabilní oblasti fázového diagramu, tudíž tento stav představuje vhodné podmínky pro růst krystalů, komponenty fázové separace jsou také úspěšně využívány v očkovacích technikách. Další možností, jak zvýšit pravděpodobnost tvorby krystalů ze stavu fázové separace, která je na Obr. 12, je snižováním teploty systém dovést do stavu ještě vyššího přesycení, tj. labilní oblasti, kde se zvýší přitažlivost mezi molekulami proteinu, zároveň ale tento proces závisí na rozpustnosti proteinu a srážecího činidla (Dumetz et al., 2008).

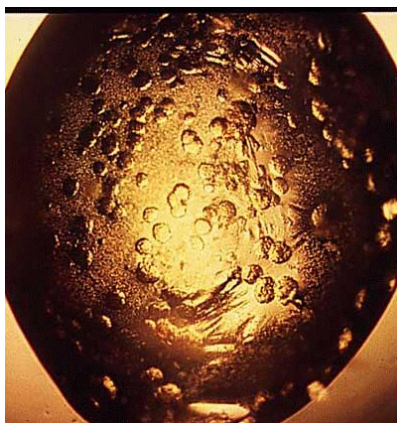


Obrázek 12: Fázová separace (převzato z Bergfors, dostupné online).

2.6.5. Sferulity (*Spherulites*)

V kapce může v závislosti na podmínkách vzniknout několik typů proteinových útvarů, které ale nejsou vhodné pro provedení difrakčního experimentu, např. sferulity.

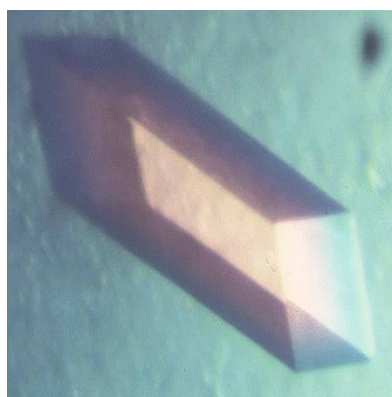
Sferulity, nacházející se na Obr. 13, mohou v kapce vypadat jako kapičky nebo shluky. Pokud se použijí zkřížené polarizátory, vykazují dvojlom světla. Tyto útvary v kapce jsou dobrým začátkem pro optimalizaci krystalizace. Sferulity jsou úspěšně používány v očkovacích technikách. Pro přiblížení podmínek, které podporují formování krystalů, je doporučeno snížit koncentraci proteinového roztoku či srážecího činidla nebo navýšit objem kapky. Výhodné je také použití aditiv a inhibitorů (Bergfors, 1999).



Obrázek 13: Sferulity (převzato z Bergfors, dostupné online).

2.6.6. Krystaly (*Crystals*)

V kapce lze najít velké množství proteinových útvarů, které ovšem nejsou vhodné pro provedení difrakčního experimentu. Nejideálnějším výsledkem krystalizace je nalézt v kapce dostatečně velký, kvalitní a pravidelně uspořádaný monokrystal. Nejlepší monokrystaly rostou z malého počtu jader v metastabilní oblasti fázového digramu. Pokud vzniknou menší, dobře difraktující krystaly, je na místě optimalizovat podmínky pro dosažení vzniku většího a vhodnějšího krystalu (Qiagen, 2010).



Obrázek 14: Monokrystal (převzato z Bergfors, dostupné online).

2.7. Testy proteinových krystalů

Pokud jsou získány z kapky proteinového roztoku smíchaného se srážecím činidlem krystaly, není zde ještě stoprocentní jistota, že se opravdu jedná o krystaly proteinu. Z tohoto důvodu je nutné provést test krystalu. Existuje několik druhů testů, přičemž některé jsou spolehlivé více a jiné méně. Většina z nich je destruktivních. Definitivním testem je difrakční analýza.

2.7.1. Test drčením (*Crush test*)

Krystal je umístěn pod mikroskop, kde se pomocí jehly rozbije. Proteinové krystaly se chovají spíše jako uspořádané gely a již po slabém doteku jehlou se rozpadají na více malých kusů. Krystaly soli se mohou také rozpadat, ale za použití výrazně větší síly na málo kusů, mají také vyšší hustotu než proteinové krystaly a po rozpadnutí tyto kusy rychle padají na dno kapky (Hampton Research, 2015). Tento test může být ale značně zavádějící, jelikož některé makromolekulární krystaly odolávají mechanickému manipulování více než jiné a provedení testu je značně znesnadněné, pokud se jedná o velmi malé krystaly (Raghunathan et al., 2010).

2.7.2. Dehydratace (*Dehydration*)

Krystal je vyjmut z kapky a ponechán na vzduchu. Proteinové krystaly typicky obsahují velké množství rozpouštědla a po odstranění z kapky na vzduchu rychle vysychají a rozkládají se. Na druhé straně krystaly soli obsahují pouze zanedbatelné množství rozpouštědla a na vzduchu zůstávají neporušené (Hampton Research, 2015). Dehydratace také v některých případech podporuje krystalizaci matečného roztoku (Raghunathan et al., 2010).

2.7.3. Dvojlom světla (*Birefringence*)

Při umístění krystalu pod zkřížené polarizátory poskytují proteinové krystaly pouze slabý dvojlom světla, zatímco krystaly soli vykazují tuto vlastnost velmi silně. Určitou nevýhodou tohoto testu je, že některé plastové materiály vykazují dvojlom světla, proto musí být prováděn pouze ve skleněném prostředí (Hampton Research, 2015).

2.7.4. Barvicí test (*Dye test*)

Provedení barvicího testu spočívá v přidání malého množství (1 μ l) methylenové modře, látky známé pod názvem IZIT, do kapky s krystalem. IZIT je nízkomolekulární barvivo, komerčně poskytované firmou Hampton Research (USA), které asi po hodině po aplikaci poskytne informaci o povaze krystalu. Pokud se jedná o proteinový krystal, molekuly barviva se dostanou do solventních kanálek a obarví krystal modře. V případě krystalu soli zůstane krystal nedotčený (Hampton Research, 2015). Na druhou stranu se může stát, že pokud se makromolekulární krystaly nacházející v některých chemických podmínkách, zvláště při nízkém pH, do sebe váží barvivo příliš pomalu nebo vůbec (Eckert

et al., 2003). Některé chemické podmínky jsou také příznivé tomu, že IZIT sám krystalizuje a vytváří malé jehličky (Burkinsky & Poulsen, 2001).

2.7.5. Zkouška ohněm (*Trial by fire*)

Kapka obsahující krystal je přenesena na skleněné krycí sklíčko a umístěna nad Bunsenův hořák a ponechána zde do té doby, dokud není zhruba polovina kapaliny odpařena. Proteinové krystaly jsou zničeny, zatímco krystaly soli zůstanou neporušeny (Hampton Research, 2015).

2.7.6. Zesíťování (*Crosslinking*)

Krystaly jsou přeneseny do 2% roztoku glutaraldehydu nebo je tento roztok přidáný rovnou do kapky. Proteinové krystaly buď zachovají svůj tvar a zežloutnou nebo vytvoří gelovitou hmotu. Krystaly soli buď zachovají svůj tvar, ale nezežloutnou nebo se v průběhu času rozpustí. Tento test se neprovádí při použití činidel jako je Tris nebo amonné soli, které výsledky testu ovlivňují (Hampton Research, 2015).

2.7.7. Kontrolní test (*Control test*)

Kontrolní test spočívá v přesném zopakování celého experimentu, ovšem bez proteinového roztoku, který je nahrazen destilovanou vodou. Pokud se krystaly neobjeví, je to signál, že se jedná o proteinové krystaly, na druhé straně při vzniku podobných krystalů jako v předchozím případě, se s vysokou pravděpodobností jedná o krystaly soli (Hampton Research, 2015).

2.7.8. SDS- PAGE elektroforéza (*SDS-PAGE electrophoresis*)

Krystaly se vyjmou z kapky, rozpustí a je provedena SDS-PAGE elektroforéza. Pokud je poté v gelu proužek, který odpovídá molekulové hmotnosti krystalizovaného proteinu, jedná se o proteinové krystaly. Krystaly soli v opačném případě projdou celým gelem (Hampton Research, 2015). Nevýhodou této metody je, že vyžaduje určité množství krystalů a protein může být zároveň ztracen v průběhu testu (Raghunathan et al., 2010).

2.7.9. Rentgenová difrakční analýza (*X-ray diffraction analysis*)

Difrakční experiment je nejspolehlivějším testem, který definitivně rozliší proteinové krystaly od krystalů soli. Bergfors (1999) charakterizuje difrakční obrazec proteinu velkým

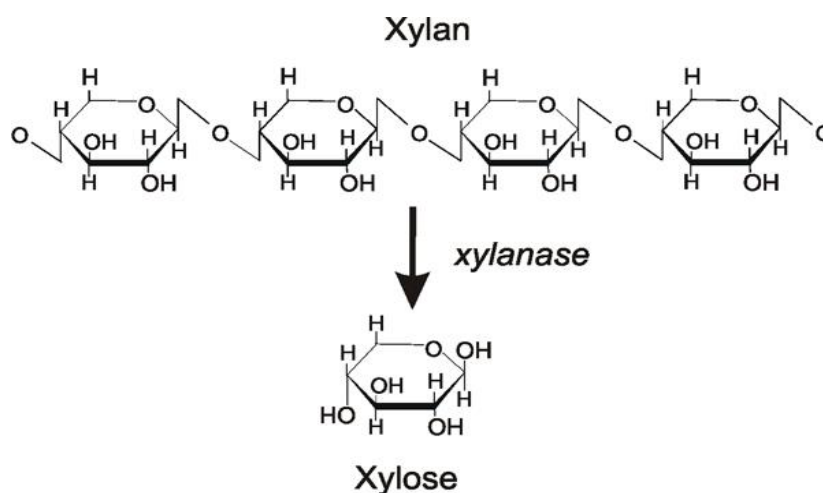
počtem difrakcí v soustředných kruzích, difrakční obrazec soli se skládá naopak z malého počtu difrakcí.

2.8. Modelové proteiny

Termínem modelové proteiny se v rentgenové krystalografii označují proteiny, u kterých jsou dobře známy podmínky, za nichž krystalizují. Do této skupiny patří mimo jiné lysozym, což je enzym obsažený např. ve sliznicích, slinách nebo slzách a chrání organismus před bakteriálními buňkami. Pro krystalizaci a zachycení fázového diagramu modelových proteinů v rámci této práce byly vybrány dva proteiny, a to konkrétně xylanasa a thaumatin, které jsou podrobněji popsány v textu níže.

2.8.1. Xylanasa

Xylanasy jsou hojně rozšířené enzymy, které katalyzují hydrolýzu glykosidových vazeb v β -1,4-xylanu a tím jej degradují na xylosu (Beg et al., 2001). Substrátem pro xylanasu je xylan, který je nejdůležitějším polysacharidem v rostlinné buňce a tvoří hlavní složku hemicelulózy, která společně s celulózou a ligninem tvoří hlavní složky stěny rostlinné buňky (Collins et al., 2005). Pro provedení krystalizačního experimentu v rámci této práce byla vybrána xylanasa z *Trichoderma longibrachiatum*, což je houba hojně rozšířená po celém světě, hlavně v oblastech teplejšího klimatu (Samuels et al., 2012). Xylanasy jsou využívány pro výrobu buničiny, přípravu krmiv pro zvířata, potravinářském nebo papírenském průmyslu (Tomčová, 2010). Na Obr. 15 je znázorněna degradace xylanu enzymem xylanasou na xylosu.



Obrázek 15: Účinek xylanasy v rostlinné buňce (převzato z Held, 2012).

2.8.2. Thaumatin

Thaumatocin je sladce chutnající a chuť zvýrazňující protein izolovaný z afrického stromu *Thaumatococcus daniellii* (Bartoszewski et al., 2003). Plody ze zmíněného stromu jsou využívány místními domorodci pro maskování kyselé příchutě palmového vína a ovocných nápojů (van der Wel & Loeve, 1972). Thaumatin je v porovnání se sacharózou o několik tisíc řádů sladší, slouží jako náhražka cukru a používá se jako látka zvýrazňující chuť v potravinářském průmyslu (Ko et al., 1994).

2.9. Cukr-fosfatasy

Cukr-fosfatasy náleží do nadrodiny haloacid dehalogenáz (*HAD superfamily*), kam se řadí např. fosfatasy, fosfotransferasy nebo dehalogenasy. Enzymy z této nadrodiny se účastní mnoha procesů v buňce, od syntézy aminokyselin až po detoxifikaci (Koonin & Tatusov, 1994).

Hydrolasy jsou v rámci HAD nadrodiny enzymy, které pomocí vody katalyzují chemickou reakci - hydrolýzu vazeb v molekule. Jestliže hydrolasy katalyzují reakce na esterových vazbách, nazývají se esterasy a do této skupiny se řadí i fosfatasy, které katalyzují reakci odstraňující fosfát z molekuly.

Cukr-fosfatasy (EC 3.1.3.23), systematicky pojmenované cukr-fosfát fosfohydrolasy, katalyzují reakci na monoesterových vazbách, kdy je cukr-fosfát molekula hydrolyzována a výsledkem je molekula cukru a fosfát (BRENDA - The Comprehensive Enzyme Information System, 2017).

Pro enzymy s předpovídanou nebo známou fosfohydrolasovou aktivitou je typická HD doména (Nagata, 2008). Tyto enzymy se podílí mimo jiné na metabolismu nukleových kyselin nebo na přenosu signálu. Je předpokládáno, že koordinace dvojmocných kationtů je nezbytná pro aktivitu těchto enzymů, neboť všechny vysoce konzervované oblasti v HD nadrodině jsou histidiny nebo kyseliny asparagové (Aravind & Koonin, 1998).

2.9.1. Protein DH Tt80

Protein DH Tt80 je protein považovaný za cukr-fosfatasu a vyizolovaný z bakterie *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Tato bakterie byla poprvé izolována ze solfatary na Kodakara Islands v Japonsku, nejprve byla označena jako *Pyrococcus* sp. KOD1, ovšem detailnější fylogenetické výzkumy později prokázaly, že se jedná o rod *Thermococcus*

(Atomi et al., 2004). *Thermococcus kodakarensis* KOD1 je hypertermofilní, anaerobní, heterotrofní bakterie, která produkuje sirovodík a rychle se množí na organických substrátech, které obsahují elementární síru (Morikawa et al., 1994). Při absenci síry je místo sirovodíku produkován vodík. Růst bakterií probíhá v teplotním rozmezí od 60°C do 100°C, přičemž optimální teplota je 85°C (Atomi et al., 2004).

Protein DH Tt80 je dosud nepříliš prostudovaný, proto jsou informace o něm omezené pouze na počet aminokyselin, molekulovou hmotnost, teoretický isoelektrický bod, složení aminokyselin, genetickou a aminokyselinovou sekvenci, které jsou zahrnuty v Přílohách.

2.10. Makromolekulární databáze

Makromolekulární databáze jsou online zdrojem informací nejen o strukturách, ale obsahují také krystalografická data. Jedna z nejpoužívanějších databází je The Protein Data Bank - RCSB PDB. The Protein Data Bank byla založena v roce 1972 s cílem zvyšovat a usnadnit dostupnost těchto informací, standardizovat je, poskytovat atomové souřadnice a další údaje z krystalografických studií (Bernstein et al., 1977). Obsah databáze je pravidelně aktualizován a k datu 11. 4. 2017 databáze obsahovala 128 962 struktur (RSCB PDB, 2017).

3. Materiál a metody

Cílem této bakalářské práce bylo pokusit se zaznamenat fázový diagram krystalizačního procesu na vybraných modelových proteinech – xylanase a thaumatínu, a nalézt a optimalizovat krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů proteinu DH Tt80. Po provedení krystalizačních experimentů byly všechny výsledky vyfotografovány pro pozdější vyhodnocení.

3.1. SDS-PAGE elektroforéza

SDS-PAGE elektroforéza je biochemická metoda, která slouží nejen k rozdělení proteinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti, ale také umožňuje posoudit jejich čistotu a ta je jedním z nejdůležitějších faktorů pro úspěšnou krystalizaci. Před zahájením krystalizačních experimentů byla provedena gelová SDS-PAGE elektroforéza xylanasy, thaumatínu a proteinu DH Tt80.

10% roztok spodního separačního gelu (*Running Gel Solution*) obsahoval následující chemikálie: 3,3 ml H₂O; 4 ml 30% směsi akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu; 2,5 ml 1,5 M Tris o pH 8,8; 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10% APS a 0,004 ml TEMED. Tento roztok byl pomocí automatické mikropipety nanesen mezi sklíčka do sestavené aparatury pro elektroforézu a po 30 minutách zpolymerizoval.

Na zpolymerizovaný spodní separační gel byl automatickou mikropipetou nanesen roztok zaostřovacího gelu (*Stacking Gel Solution*), který byl připraven z následujících chemikálií: 1,4 ml H₂O; 0,33 ml 30% směsi akrylamidu a N,N'-metylen-bis-akrylamidu; 0,25 ml 1,0 M Tris o pH 6,8; 0,02 ml 10% SDS; 0,02 ml 10% APS a 0,002 TEMED. Do tohoto roztoku byl ihned po nanesení umístěn plastový hřeben, který slouží k vytvoření jamek pro nanášení vzorku proteinů. Zpolymerizování zaostřovacího gelu trvalo hodinu a poté byl plastový hřeben vyjmut.

Elektroforetická komora byla naplněna elektrodovým puřem (*Running Buffer*), který byl připraven z následujících chemikálií: 1000 ml H₂O; 15,1 g Tris, 72 g glycinu a 5 g SDS.

Následně byl připraven vzorkový puř (*Sample Buffer*) z následujících chemikálií: 24 ml 0,5 M Tris o pH 6,8; 16 ml glycerolu; 2 g 10% SDS; 10 mg 0,1% bromfenolové modři a 10 ml β -merkaptoethanolu. Proteiny byly smíchány se vzorkovým puřem následovně:

- xylanasa: 0,5 μ l xylanasy + 2,5 μ l vzorkového pufru + 7 μ l destilované vody
- thaumatin: 0,5 μ l thaumatinu + 2,5 μ l vzorkového pufru + 7 μ l destilované vody
- protein DH Tt80: 1 μ l DH Tt80 + 2,5 μ l vzorkového pufru + 6,5 μ l destilované vody

Takto smíchané proteiny se vzorkovým pufrům byly zahřívány při teplotě 65°C po dobu 15 minut.

Do první jamky byl napipetován standard (*Marker*), Unstained Protein Molecular Weight Marker, komerčně poskytovaný firmou Thermo Fisher Scientific (USA), o objemu 10 μ l. Tento standard slouží jako ukazatel molekulové hmotnosti pro proteiny od 14,4 kDa do 116 kDa. Vzorky proteinů byly pipetovány vždy o objemu 10 μ l do jamek v následujícím pořadí: do třetí jamky byla napipetována xylanasa, do páté thaumatin a do šesté protein DH Tt80.

Po nanesení vzorků byla elektroforetická aparatura napojena na stejnosměrný elektrický proud o napětí 250 V po dobu 30 minut. Následně byl gel vyjmut a ponechán přes noc v nádobě s roztokem barviva Coomassie Brilliant Blue. Druhý den byl gel omýván a ponechán několik hodin v odbarvovacím roztoku (*Destaining Solution*) o následujícím složení: 5000 ml H₂O, 250 ml ethanolu, 350 ml kyseliny octové. Po vyjmutí z odbarvovacího roztoku byl gel vyfotografován pro pozdější vyhodnocení.

3.2. Krystalizace xylanasy

3.2.1. Podmínky pro krystalizaci

Xylanasa nejlépe krystalizuje při koncentraci proteinového roztoku 2 - 17 mg/ml technikou visící kapky. Jako srážecí činidlo se používá 0,6 - 1,7 M K₂HPO₄ o pH 7 - 8 nebo 0,45 - 1,0 M (NH₄)₂SO₄ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3 (Hampton Research, 2015). V roztoku obsahujícím fosfát rozpustnost krystalů klesá s rostoucí teplotou, přičemž v roztoku (NH₄)₂SO₄ je efekt opačný (Hampton Research, 2015).

3.2.2. Příprava krystalizačních roztoků

Pro krystalizaci xylanasy byly připraveny dva roztoky, konkrétně roztok 1: 2 M K₂HPO₄ o pH 8, toto bylo upraveno 80% H₃PO₄ a roztok 2: 3 M (NH₄)₂PO₄ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3, toto bylo upraveno kyselinou citronovou. Z těchto roztoků byly připraveny přidáním destilované vody sady roztoků o různé koncentraci- 2 M; 1,5 M; 1 M a 0,6 M K₂HPO₄ a 1,7 M; 1 M a 1,7 M (NH₄)₂SO₄.

3.2.3. Naředění xylanasy

Jelikož modelový protein xylanasa krystalizuje z roztoků o koncentraci v rozmezí 2-17 mg/ml, xylanasa byla naředěna fosfátovým pufrem následovně: 15 mg/ml, 10 mg/ml a 5 mg/ml.

3.2.4. Vlastní krystalizace xylanasy

Pro krystalizaci xylanasy byla zvolena metoda visící kapky. Použity byly krystalizační roztoky a proteinové roztoky zmíněné v textu výše, automatické mikropipety a krystalizační destičky určené pro provedení metody visící kapky.

V případě tohoto experimentu metodou visící kapky byly testovány tři koncentrace xylanasy (15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml), čtyři koncentrace srážecího roztoku 1: 2 M; 1,5 M; 1 M a 0,6 M K_2HPO_4 a tři koncentrace srážecího roztoku 2: 1,7 M; 1 M a 0,45 M $(NH_4)_2HPO_4$. Příslušné srážecí činidlo bylo napipetováno pokaždé do reservoáru o objemu 500 μ l, kapky byly napipetovány v poměru 2 μ l příslušného srážecího činidla a 2 μ l proteinového roztoku. Celý pokus byl proveden při pokojové teplotě (20°C). V Tab. 1 je znázorněno, jak byly jednotlivé roztoky pipetovány do krystalizační destičky, písmena s číslicí (A1, A2 atd.) vyjadřují označení jamky v krystalizační destičce.

Tabulka 1: Schéma krystalizace xylanasy metodou visící kapky.

kapka- proteinový roztok + roztok srážecího činidla (2 μ l + 2 μ l)					
A1	A2	A3	A4	A5	A6
5 mg/ml xylanasa + 2 M K ₂ HPO ₄	5 mg/ml xylanasa + 1,5 M K ₂ HPO ₄	5 mg/ml xylanasa + 0,45 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5 mg/ml xylanasa + 1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5 mg/ml xylanasa + 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5 mg/ml xylanasa + 0,6 M K ₂ HPO ₄
B1	B2	B3	B4	B5	B6
15 mg/ml xylanasa + 2 M K ₂ HPO ₄	15 mg/ml xylanasa + 1 M K ₂ HPO ₄	15 mg/ml xylanasa + 0,6 M K ₂ HPO ₄	15 mg/ml xylanasa + 0,45 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15 mg/ml xylanasa + 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15 mg/ml xylanasa + 1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄
C1	C2	C3	C4	C5	C6
10 mg/ml xylanasa + 2 M K ₂ HPO ₄	10 mg/ml xylanasa + 1,5 M K ₂ HPO ₄	10 mg/ml xylanasa + 0,6 M K ₂ HPO ₄	10 mg/ml xylanasa + 0,45 M (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mg/ml xylanasa + 1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄	10 mg/ml xylanasa + 1 M K ₂ HPO ₄
D1	D2	D3	D4	D5	D6
5 mg/ml xylanasa + 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	15 mg/ml xylanasa + 1,5 M K ₂ HPO ₄	10 mg/ml xylanasa + 1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	5 mg/ml xylanasa + 2 M K ₂ HPO ₄	10 mg/ml xylanasa + 0,6 M K ₂ HPO ₄	15 mg/ml xylanasa + 0,45 M (NH ₄) ₂ SO ₄

3.3. Krystalizace thaumatínu

3.3.1. Podmínky pro krystalizaci

Thaumatín nejlépe krystalizuje z proteinových roztoků o koncentraci 50 mg/ml metodou visící kapky. Jako srážecí činidlo se používá 24% roztok vinanu sodného s 15% PEGem v 0,1 M BisTris propanu o pH 6,6. Doporučené poměry v kapce jsou 6 μ l roztoku thaumatínu a 4 μ l srážecího roztoku, doporučené variace tohoto experimentu jsou následující: měnit poměry roztoků v kapce a objemy srážecího činidla v reservoáru (Rigaku).

3.3.2. Příprava krystalizačního roztoku

Pro krystalizaci thaumatinu byl připravený 24% roztok vinanu sodného s 15% PEGem v 0,1 M BisTris propanu o pH 6,6, toto bylo upraveno 18% roztokem HCl.

3.3.3. Naředění thaumatinu

Za účelem provedení krystalizačního experimentu s thaumatinem byl protein naředěn na čtyři koncentrace destilovanou vodou, konkrétně na 80 mg/ml, 60 mg/ml, 50 mg/ml a 20 mg/ml.

3.3.4. Vlastní krystalizace thaumatinu

Pro krystalizaci thaumatinu byla zvolena metoda visící kapky. Byly použity srážecí roztok a proteinový roztok zmíněné v textu výše, automatické mikropipety a krystalizační destičky určené pro provedení metody visící kapky.

V případě tohoto experimentu metodou visící kapky byly testovány čtyři koncentrace thaumatinu (80 mg/ml, 60 mg/ml, 50 mg/ml, 20 mg/ml) a jedna koncentrace srážecího roztoku, konkrétně 24% vinan sodný s 15% PEGem v 0,1 M BisTris propanu o pH 6,6. Srážecí činidlo bylo napipetováno do reservoáru v objemech 750 μ l, 500 μ l, 250 μ l, kapky byly napipetovány dvěma různými způsoby, konkrétně v poměru 6 μ l proteinového roztoku a 4 μ l srážecího činidla nebo v poměru 4 μ l proteinového roztoku a 6 μ l srážecího činidla. Celý pokus byl proveden při pokojové teplotě (20°C). V Tab. 2 je znázorněno, v jakých objemech a poměrech byly jednotlivé roztoky pipetovány do krystalizační destičky, písmena s číslicí (A1, A2 atd.) vyjadřují označení jamky v krystalizační destičce.

Tabulka 2: Schéma krystalizace thaumatinu metodou visící kapky.

	srážecí roztok: 24% vinan sodný + 15% PEG v 0,1 M BisTris propanu					
	A1	A2	A3	A4	A5	A6
80 mg/ml thaumatin	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙
reservoár	750 μ l	750 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l	250 μ l
	B1	B2	B3	B4	B5	B6
60 mg/ml thaumatin	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙
reservoár	750 μ l	750 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l	250 μ l
	C1	C2	C3	C4	C5	C6
50 mg/ml thaumatin	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙
reservoár	750 μ l	750 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l	250 μ l
	D1	D2	D3	D4	D5	D6
20 mg/ml thaumatin	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙	6 μ l thaum. + 4 μ l sráž. ⊙	4 μ l thaum. + 6 μ l sráž. ⊙
reservoár	750 μ l	750 μ l	500 μ l	500 μ l	250 μ l	250 μ l

3.4. Krystalizace proteinu DH Tt80

3.4.1. Vzorek proteinu DH Tt80

Používaný vzorek proteinu DH Tt80 pro krystalizační experimenty byl připraven v iXpressGenes, Inc. (Huntsville, Alabama, USA).

Pro namnožení plazmidu a sekvenování byla použita bakterie *Escherichia coli*, kmen DH5 α . *E. Coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIL buňky (Stratagene, LaJolla, CA, USA)

a plazmidy pET-24a(+) (Novagen) byly použity pro genovou expresi. Buňky byly kultivovány v médiu Luria-Bertani s karbenicilem o koncentraci 100 µg/ml a chloramfenikolem o koncentraci 35 mg/ml při teplotě 37°C.

Příprava linearizovaného plazmidu proběhla následovně. pET3 plazmid (Novagen, Madison, USA) byl dvojitě štěpen za využití restrikčních endonukleas NdeI a BamHI (Promega, Madison, WI, USA). Takto rozštěpený plazmid byl purifikován za použití QIAquick PCR purifikační sady (Quiagen, Valencia, CA, USA). Pro změnu lepivých konců plazmidu na tupé byl využit Klenowův fragment (Promega, Madison, WI, USA) a plazmid byl dále purifikován pomocí již zmíněné purifikační sady. Výsledný pET3a fragment byl použit pro homologní rekombinaci.

Klonování a exprese cukr-fosfatasového genu proběhla následovně. Hypertermofilní bakterie *Thermococcus kodakarensis* KOD1 byla pěstována pro vyjmutí genomu. Primery s překrývajícími se oblastmi Pet3a vektoru byly navrženy, aby amplifikovaly cukr-fosfatasový gen z *Thermococcus kodakarensis* KOD1 následovně: forward primer: 5'-tttgttaactttaagaaggagatatacatATGATAAAGGCCGTGTTCTT-3' a reverse primer: 5'-cttccttcgggctttgtagcagccggatccTCAACCAGCATGAACTTCCT-3'.

10 ng PCR produktu a 20 ng linearizovaného plazmidu Pet3a byly vneseny do *E. coli*, kmenu DH5α, aby bylo dosaženo exprese plazmidu pomocí homologní rekombinace *in vivo*. Pozitivní klony byly vyjmuty pomocí DNA sekvenování. Rekombinantní expresní plazmid byl vnesen do *E. coli* BL21(DE3) pro genovou expresi. Buňky *E. coli* byly kultivovány v 100 ml Luria-Bertani médiu s karbenicilem o koncentraci 100 µg/ml a chloramphenicolem o koncentraci 35 µg/ml při teplotě 37°C po dobu 16-18 hodin za účelem získání startovací kultury. Startovací kultura byla centrifugována, rozpuštěna ve 4 litrech Luria-Bertani média s karbenicilem o koncentraci 100 µg/ml a chloramphenicolem o koncentraci 35 µg/ml a dále kultivována za teploty 37°C. Genová exprese byla vyvolána za pomoci 0,5 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) v okamžiku, kdy optická hustota při 600 nm dosáhla hodnoty 0,6. Buňky byly sklizeny po 18-20 hodinách od vyvolání genové exprese při teplotě 18°C.

Cukr-fosfatasový gen byl amplifikován z *Thermococcus kodakarensis* KOD1 genomu pomocí PCR za použití forward primeru 5'-tttgttaactttaagaaggagatatacatATGCCGTTTCGAGATAGTTTTT- 3' a reverse primeru 5'-cttccttcgggctttgtagcagccggatccTTAATCCTCTACACGCGGTGC- 3'. Primery byly navrženy dle prvních a posledních 21 nukleotidů cukr-fosfatasového genu otevřeného

čtecího řetězce. Oligonukleotidové primery byly vytvořeny na základě sekvence homologní k 30 a 32 nukleotidům expresního plazmidového vektoru pET3a (Novagen), obsahující NdeI a BamHI inzerční místa. Pro subklonování PCR produktu do pET3a vektoru (Novagen) byla použita *in vivo*_homologní rekombinace, k níž došlo následovně: 150 ng amplifikovaného genu, 50 ng linearizovaného plazmidu, pET3a vektor s tupými konci (Novagen) byly vloženy do kmene DH5α *E. coli*. Pozitivní klony byly potvrzeny pomocí DNA sekvenování.

Následně byl rekombinantní expresní plazmid vnesen do kmene BL21(DE3) *E. coli* pro genovou expresi.

Rekombinantní kmeny BL21(DE3) byly kultivovány ve 100 ml Luria-Bertani médiu s karbenicilinem o koncentraci 100 µg/ml a chloramphenicolem o koncentraci 35 µg/ml při teplotě 37°C po dobu 16-18 hodin. Tím byla získána startovací kultura, která byla centrifugována, resuspendována a dále kultivována ve 4 litrech Luria-Bertani média s karbenicilinem o koncentraci 100 µg/ml a chloramphenicolem o koncentraci 35 µg/ml při teplotě 37°C. Genová exprese byla vyvolána za pomoci 0,5 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidu (IPTG) v okamžiku, kdy optická hustota při 600 nm dosáhla hodnoty 0,6. Indukce dále pokračovala po dobu 18 - 20 hodin při 18°C.

Purifikace cukr-fosfatasy proběhla následovně. Buňky byly sklizeny pomocí centrifugace. Buněčný pelet byl resuspendován v pufru A, který se skládal z 50 mM Tris-acetátu a 50 mM síranu amonného. Dále byl lyzován sonifikací (3 cykly, 45 pulzů) za použití Branson Sonifier 250 (VWR Scientific, West Chester, PA, USA). Buněčný odpad byl odstraněn pomocí centrifugace (17000 g, 40 minut). Supernatant byl zahříván na teplotu 75°C po dobu 30 minut a sraženina byla odstraněna centrifugací (17,000 g, 5 minut). Supernatant byl nanesen na aniontovou kolonu BioRad Q sepharose column (BioRad, USA), která byla ekvilibrována pufrům A. Protein byl eluován s 0,5 - 1 M sulfátem amonným v pufru B, který se skládal z 50 mM Tris-acetátu a 0,5 mM sulfátu amonného, za pomoci BioRad nízkotlakového systému (BioRad, USA). Eluát s proteinem o očekávané molekulové hmotnosti byl dále koncentrován za využití Millipore Ultra koncentrátoru. Koncentrovaný protein byl dále použit pro gelovou chromatografii za využití Sepharacryl S-200 gelové filtrační kolony (GE Healthcare), ekvilibrované pufrům C, který se skládal z 50 mM HEPES-NaOH o pH 7,5 a 100 mM NaCl. Frakce, které odpovídaly hlavnímu píku, byly podrobeny gelové SDS-PAGE elektroforéze. Frakce s čistým jedním pruhem o očekávané molekulové hmotnosti byly shromážděny, sloučeny a koncentrovány za účelem dalších analýz enzymatické aktivity a pro krystalizační účely.

3.4.2. Krystalizační činidla

Pro krystalizaci byla zvolena sada krystalizačních roztoků SaltRx, komerčně poskytovaná firmou Hampton Research (USA). Sada SaltRx se skládá z 96 unikátních krystalizačních roztoků obsahujících soli, kterých je 26 a podmínky se mění za využití jejich různých koncentrací, různých pufrů a různých hodnot pH v rozmezí 4,6 - 8,5 (Hampton Research, 2015).

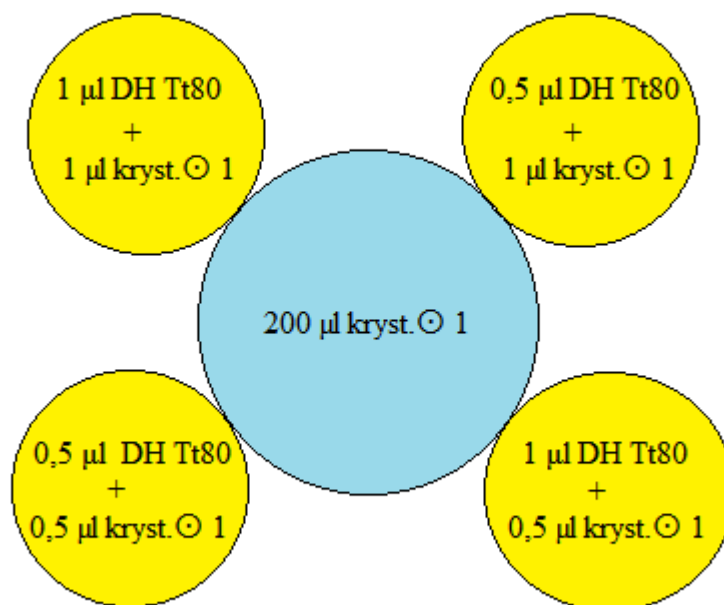
3.4.3. Naředění proteinu DH Tt80

Pro zjištění vhodné koncentrace proteinu pro krystalizační experimenty byla použita PCT sada, komerčně poskytovaná firmou Hampton Research (USA). Původní koncentrace proteinu byla asi 20 mg/ml, jelikož se při použití této koncentrace objevila precipitace, byl protein naředěn na 10 mg/ml, což vedlo opět k precipitaci a dalšímu ředění. Finální koncentrace proteinu byla 6 mg/ml. K ředění proteinu DH Tt80 byl použit 50 μ M roztok Tris-HCl o pH 7,5.

3.4.4. Vlastní krystalizace proteinu DH Tt80

Pro krystalizaci proteinu DH Tt80 byla zvolena metoda sedící kapky. Byla použita sada krystalizačních činidel SaltRx, proteinový roztok o koncentraci 6 mg/ml, automatické mikropipety a 4 krystalizační destičky určené pro provedení krystalizačního experimentu metodou sedící kapky. Každá destička obsahovala 24 jamek sloužící jako reservoár pro srážecí činidla, kolem každého reservoáru byly 4 jamky pro napipetování kapky proteinového roztoku a srážecího činidla, celkem tedy 96 podmínek na každou destičku.

V případě tohoto experimentu byla testována jedna koncentrace proteinového roztoku DH Tt80 (6 mg/ml) a 96 různých krystalizačních činidel ze sady SaltRx. Do každého reservoáru bylo pipetováno 200 μ l krystalizačního činidla a do jamek kolem reservoáru byly pipetovány kapky proteinového roztoku a krystalizačního roztoku vždy v následujících poměrech - 1 μ l + 1 μ l; 0,5 μ l + 1 μ l; 0,5 μ l + 0,5 μ l; 1 μ l + 0,5 μ l. Celkem bylo tímto způsobem otestováno všech 96 roztoků ze sady, které jsou značeny číselně a uvedeny v Přílohách, stejně jako podrobné schéma celé krystalizace proteinu DH Tt80. Pro přehlednost je na Obr. 16 uvedeno schéma první krystalizační jamky s použitím prvního krystalizačního činidla, tytéž poměry se opakovaly u všech následujících jamek. Celkem byly použity 4 krystalizační destičky, tudíž bylo otestováno 384 krystalizačních podmínek. Celý experiment byl proveden při pokojové teplotě (asi 20 °C).



Obrázek 16: Schéma krystalizační jamky při krystalizačním experimentu s proteinem DH Tt80.

3.5. Testy krystalů

Po získání krystalů byly vybrané krystaly otestovány pomocí testu absorpce barviva. Bylo použito modré barvivo IZIT HR4-710 a červené barvivo imperiální červeň (*Eosin Scarlet*), obě komerčně poskytované firmou Hampton Research (USA).

Ke krystalům byl automatickou mikropipetou přidán 1 µl barviva, které se nechalo působit asi hodinu a jestliže se došlo ke zbarvení krystalů, jednalo se o proteinové krystaly.

3.6. Difrakční data

Získané monokrystaly proteinu DH Tt80 byly otestovány pomocí rentgenové difrakční analýzy na synchrotronu BESSY-II provozovaným Joint Berlin MX-Laboratory (Berlin-Adlershof, Německo).

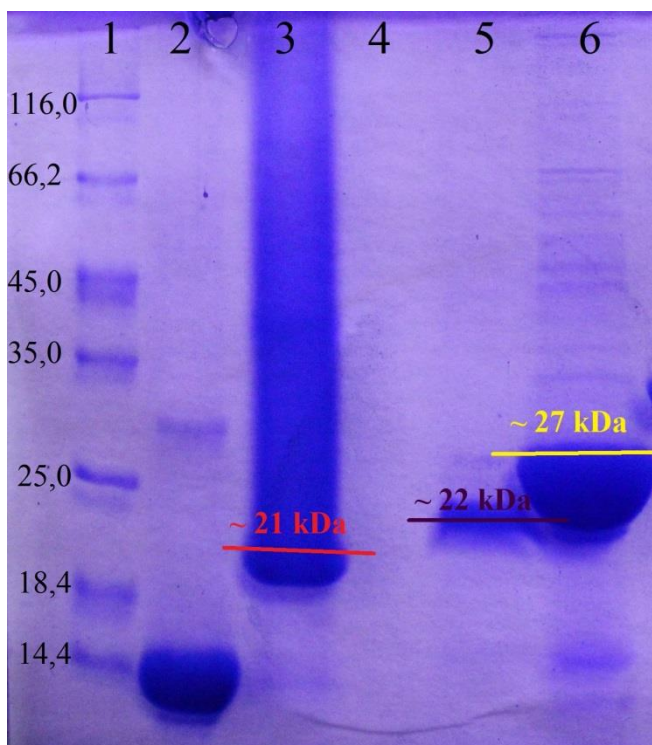
4. Výsledky

Tato část bakalářské práce se zabývá výsledky všech provedených experimentů v rámci této práce – SDS-PAGE elektroforézy, krystalizačních experimentů, popisem fázových diagramů a fázových přechodů modelových proteinů, testováním krystalů a difrakčním snímkem proteinu DH Tt80.

Všechny snímky byly pořízeny fotoaparátem Olympus, který byl součástí mikroskopu SZX9, při zvětšení 450x.

4.1. Výsledky SDS-PAGE elektroforézy

Provedení SDS-PAGE elektroforézy, jejíž výsledek je na Obr. 17, potvrdilo dostatečnou čistotu studovaných proteinů pro krystalizační experimenty. Zároveň srovnáním se standardem byly stanoveny jejich molekulární hmotnosti. Molekulární hmotnost xylanasy byla stanovena na 21 kDa (červeně), thaumatinu na 22 kDa (fialově) a proteinu DH Tt80 na 27 kDa (žlutě).



Obrázek 17: Gelová SDS-PAGE elektroforéza: sloupec 1 – standard v jednotkách kDa, sloupec 3 – xylanasa, sloupec 5 – thaumatin, sloupec 6 – protein DH Tt80, (sloupec 2 – modelový protein lysozym, sloupec 4 – prázdný).

4.2. Výsledky krystalizace xylanasy

Pro krystalizaci xylanasy metodou visící kapky byly použity dva odlišné krystalizační roztoky o rozdílných koncentracích:

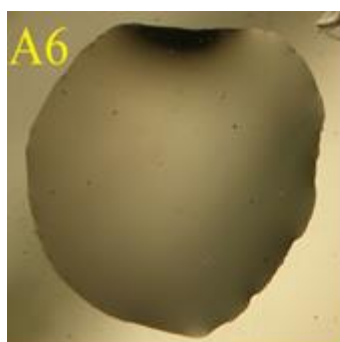
- roztok 1: K_2HPO_4 o pH 8
- roztok 2: $(NH_4)_2SO_4$ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3

Vzhledem k použití dvou krystalizačních roztoků jsou výsledky rozděleny do dvou částí, stejně jako jsou popsány dva fázové diagramy.

4.2.1. Výsledky krystalizace xylanasy s použitím krystalizačního činidla K_2HPO_4 o pH 8

Pro krystalizaci xylanasy byly zvoleny roztoky o koncentraci 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, sady krystalizačních roztoků o pH 8 byly zvoleny následovně: 2 M; 1,5 M; 1 M a 0,6 M roztok K_2HPO_4 . Tyto kapky po provedení krystalizačního experimentu zůstaly buď čiré, obsahovaly precipitát, mikrokrystaly nebo krystaly proteinu.

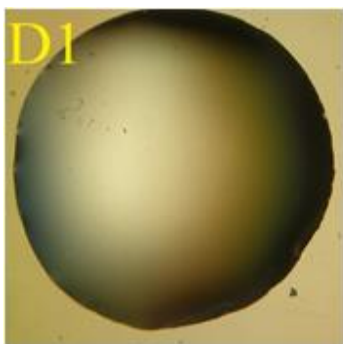
Fotografie byly pořízeny dva týdny po provedení experimentu a následující Obrázky 18 - 29 jsou řazeny vždy od nejnižší koncentrace proteinu a nejnižší koncentrace krystalizačního roztoku až po ty nejvyšší. V kapce jsou vždy 2 μ l roztoku xylanasy a 2 μ l K_2HPO_4 . V pravém horním rohu je označení jamky v krystalizační destičce.



5 mg/ml xylanasa + 0,6 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

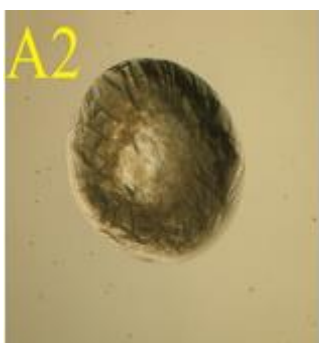
Obrázek 18: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A6.



5 mg/ml xylanasa + 1 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

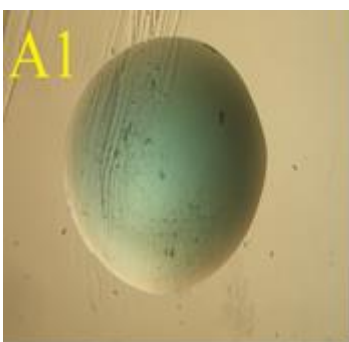
Obrázek 19: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce D1.



5 mg/ml xylanasa + 1,5 M K_2HPO_4

ZFORMOVÁNÍ KŮŽE

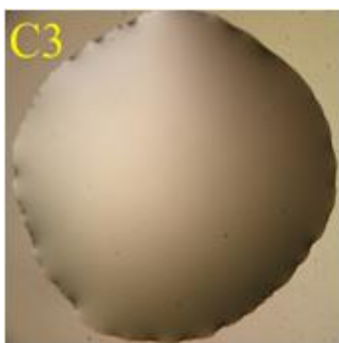
Obrázek 20: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A2.



5 mg/ml xylanasa + 2 M K_2HPO_4

MIKROKRISTALY

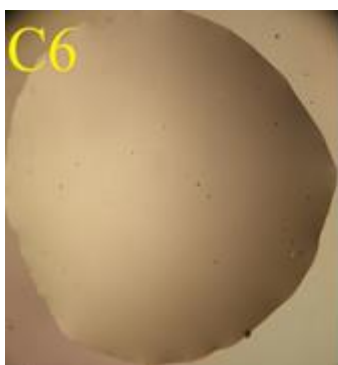
Obrázek 21: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A1.



10 mg/ml xylanasa + 0,6 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

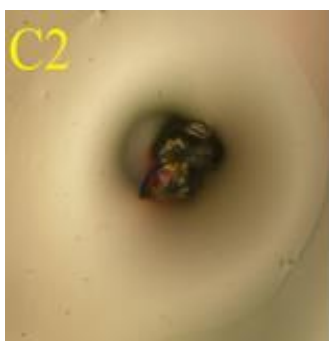
Obrázek 22: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C3.



10 mg/ml xylanasa + 1 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

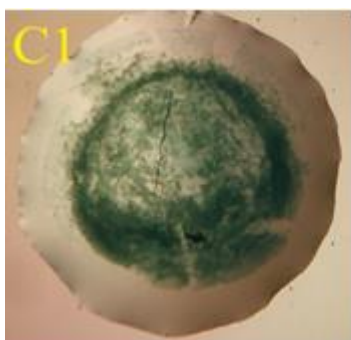
Obrázek 23: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C6.



10 mg/ml xylanasa + 1,5 M K_2HPO_4

KRYSTAL

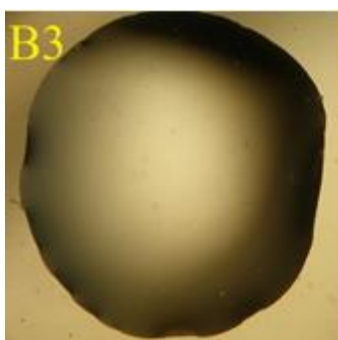
Obrázek 24: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C2.



10 mg/ml xylanasa + 2 M K_2HPO_4

PRECIPITACE

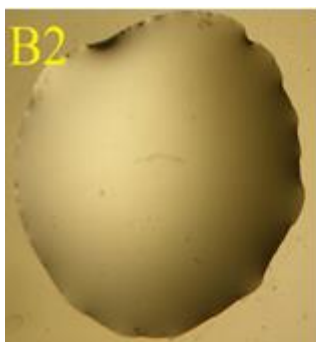
Obrázek 25: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C1.



15 mg/ml xylanasa + 0,6 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

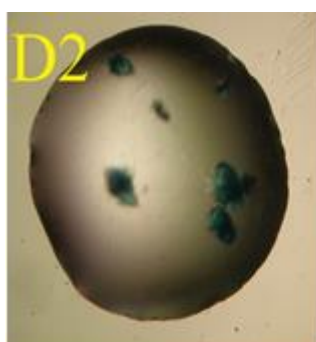
Obrázek 26: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce B3.



15 mg/ml xylanasa + 1 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

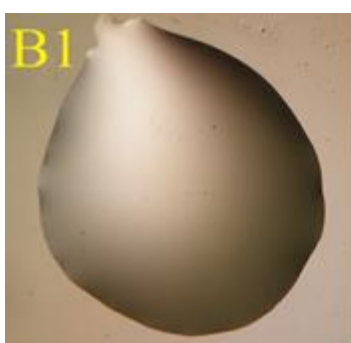
Obrázek 27: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce B2.



15 mg/ml xylanasa + 1,5 M K_2HPO_4

KRYSTALY

Obrázek 28: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce D2.



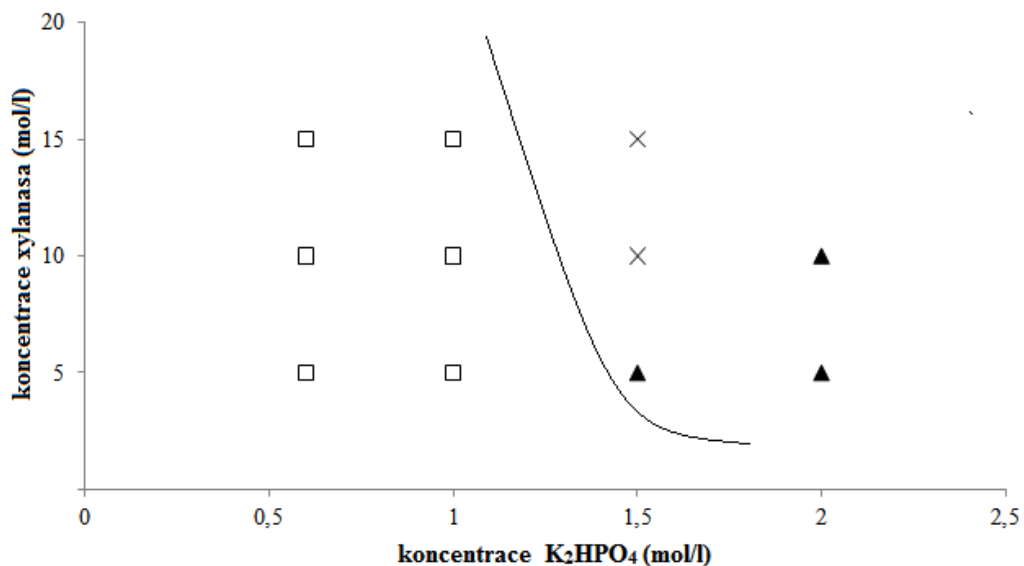
15 mg/ml xylanasa + 2 M K_2HPO_4

ČIRÁ KAPKA

Obrázek 29: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce B1.

4.2.2. Fázový diagram

Ze získaných výsledků krystalizace xylanasy byl vytvořen následující fázový diagram, který je na Obr. 30.

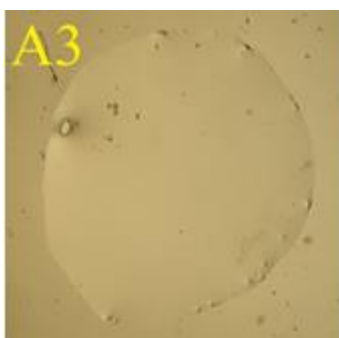


Obrázek 30: Fázový diagram xylanasy v závislosti na koncentraci srážecího činidla K_2HPO_4 . Prázdný čtverec reprezentuje čirou kapku, křížek krystaly a plný trojúhelník precipitaci, zformování kůže nebo mikrokrystaly. Křivka představuje srážecí křivku.

4.2.3. Výsledky krystalizace xylanasy s použitím krystalizačního činidla $(NH_4)_2SO_4$ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3

Pro krystalizaci xylanasy byly zvoleny roztoky proteinu o koncentraci 15 mg/ml, 10 mg/ml, 5 mg/ml, sady krystalizačních roztoků o pH 4,3 byly zvoleny následovně: 0,45 M; 1 M a 1,7 M roztok $(NH_4)_2SO_4$ v 0,1 M citrátu sodném. Tyto kapky po provedení krystalizačního experimentu zůstaly buď čiré nebo se na kapce zformovala kůže.

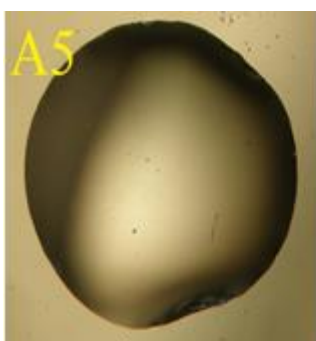
Fotografie byly pořízeny dva týdny po provedení experimentu a následující Obrázky 31 - 39 jsou řazeny vždy od nejnižší koncentrace proteinu a nejnižší koncentrace krystalizačního roztoku až po ty nejvyšší. V kapce jsou vždy 2 μ l roztoku xylanasy a 2 μ l $(NH_4)_2SO_4$ v 0,1 M citrátu sodném. V pravém horním rohu je označení jamky v krystalizační destičce.



5 mg/ml xylanasa + 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

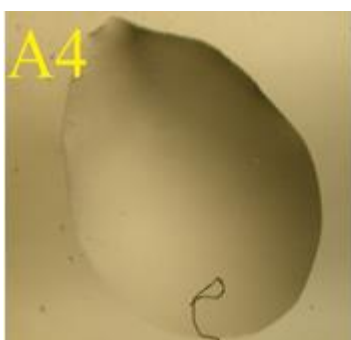
Obrázek 31: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A3.



5 mg/ml xylanasa + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

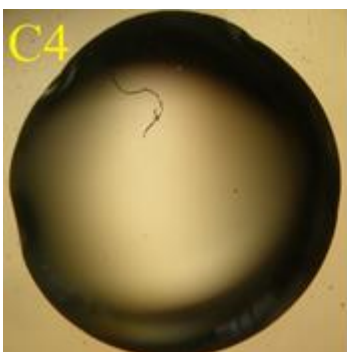
Obrázek 32: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A5.



5 mg/ml xylanasa + 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

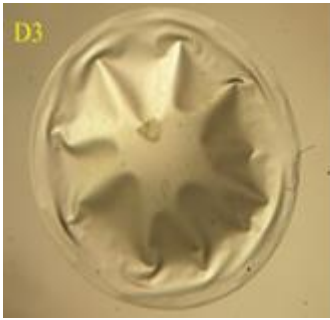
Obrázek 33: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce A4.



10 mg/ml xylanasa + 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

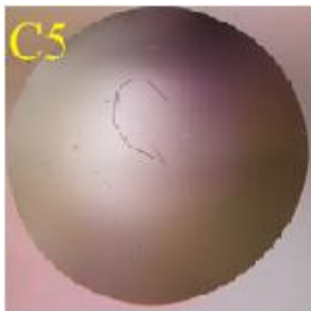
Obrázek 34: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C4.



10 mg/ml xylanasa + 1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ZFORMOVÁNÍ KŮŽE

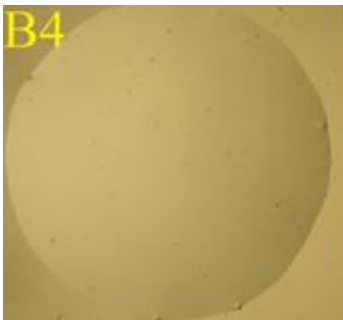
Obrázek 35: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce D3.



10 mg/ml xylanasa + 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

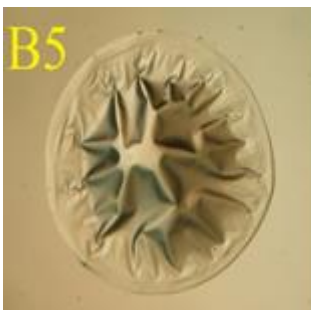
Obrázek 36: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce C5.



15 mg/ml xylanasa + 0,45 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

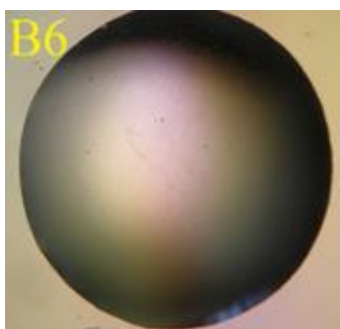
Obrázek 37: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce B4.



15 mg/ml xylanasa + 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ZFORMOVÁNÍ KŮŽE

Obrázek 38: Výsledky krystalizace xylanasy v jamce B5.



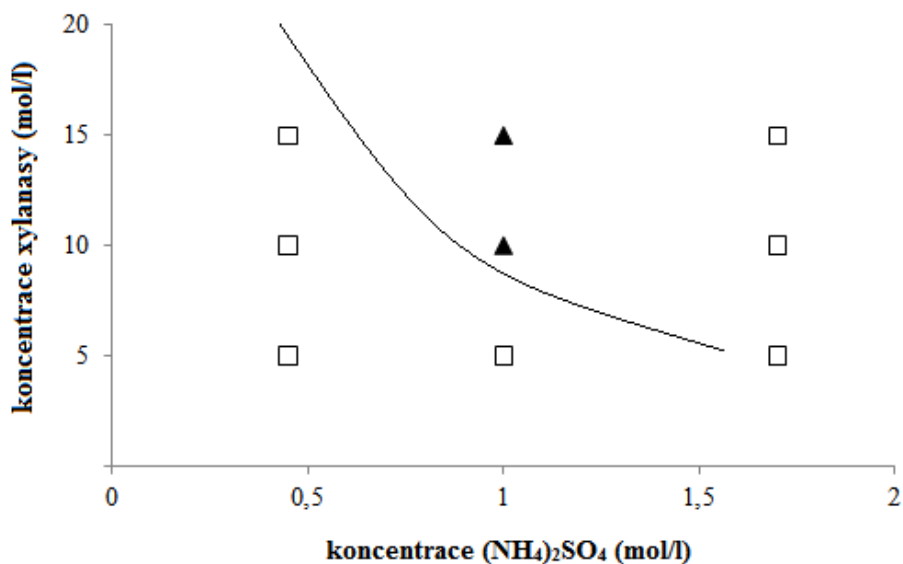
15 mg/ml xylanasa + 1,7 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

ČIRÁ KAPKA

Obrázek 39: Výsledek krystalizace xylanasy v jamce B6.

4.2.4. Fázový diagram

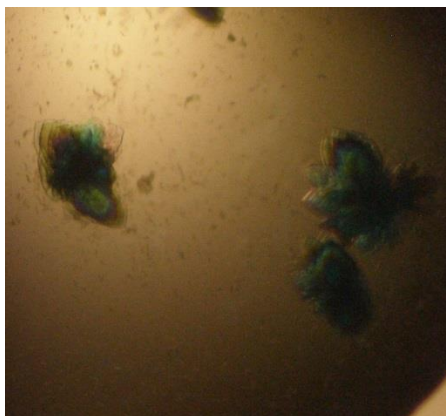
Ze získaných výsledků krystalizace xylanasy byl vytvořen následující fázový diagram, který je na Obr. 40.



Obrázek 40: Fázový diagram xylanasy v závislosti na koncentraci srážecího činidla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Prázdný čtverec reprezentuje čirou kapku, plný trojúhelník zformování kůže. Křivka představuje srážecí křivku.

4.2.5. Testování krystalů

Krystaly byly otestovány pomocí testu absorpce barviva. Asi po hodině od přidání 1 μl modrého barviva IZIT se krystaly zbarvily modře. Tím bylo prokázáno, že se jedná o krystaly xylanasy, což je zdokumentováno na Obr. 41.

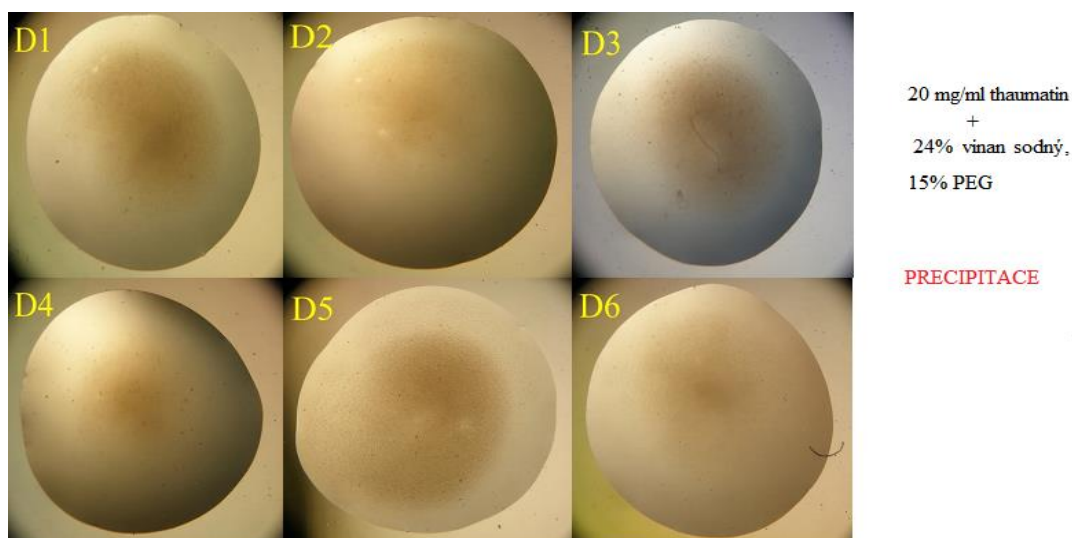


Obrázek 41: Krystaly xylanasy po provedení testu absorpce barviva IZITu.

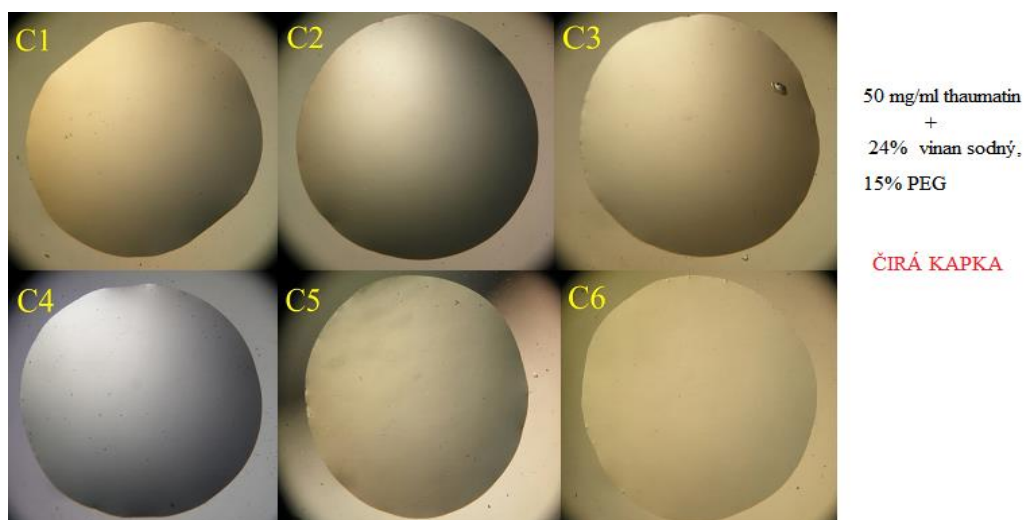
4.3. Výsledky krystalizace thaumatinu

Pro krystalizaci thaumatinu byly zvoleny proteinové roztoky o koncentraci 80 mg/ml, 60 mg/ml, 50 mg/ml a 20 mg/ml. Jako krystalizační roztok byl použitý 24% vnan sodný s 15% PEGem v 0,1 M BisTris propanu o pH 6,6. Podmínky byly měněny variací objemu krystalizačního roztoku v reservoáru a poměrem proteinového a krystalizačního roztoku v kapce. Kapky po provedení krystalizačního experimentu zůstaly buď čiré, obsahovaly precipitát, mikrokrystaly nebo krystaly proteinu.

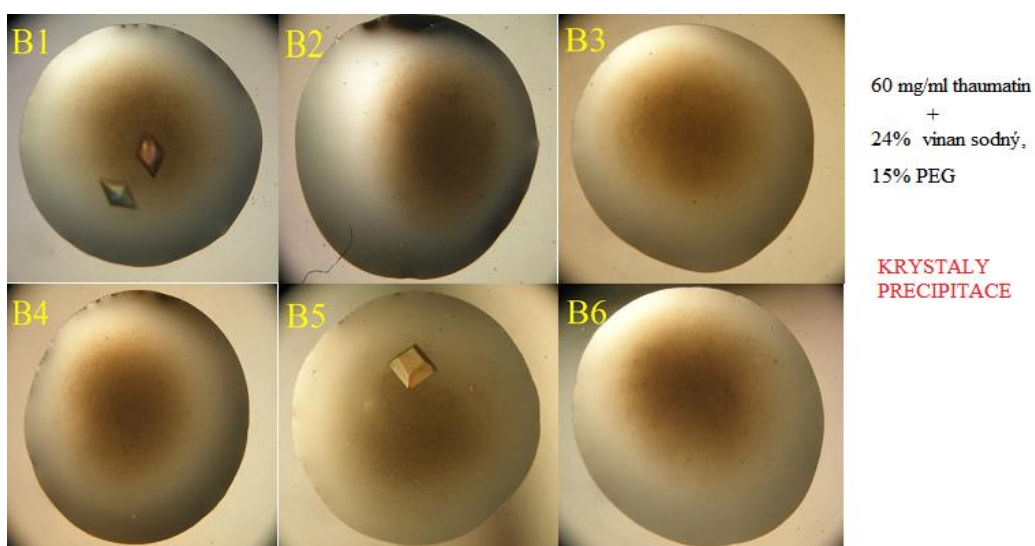
Fotografie byly pořízeny dva týdny po provedení experimentu a následující Obrázky 42-45 jsou řazeny vždy od nejnižší koncentrace proteinu až po ty nejvyšší.



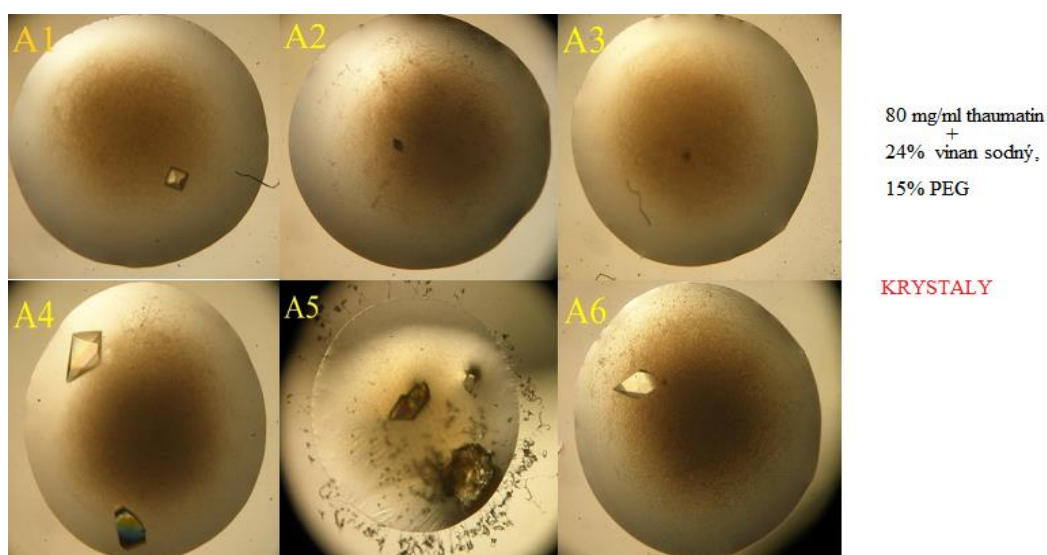
Obrázek 41: Výsledky krystalizace thaumatinu v jamkách D1-D6.



Obrázek 42: Výsledky krystalizace thauMATINU v jamkách C1-C6.



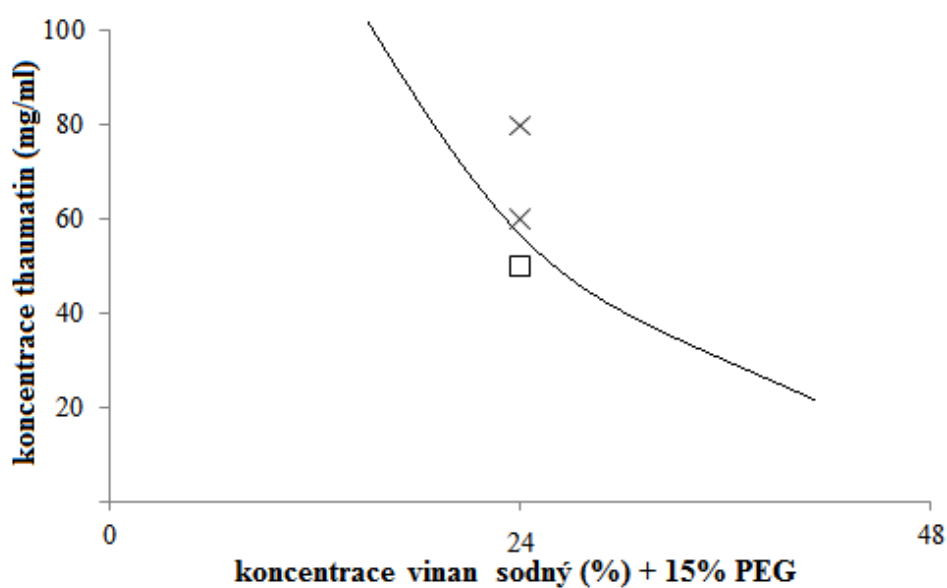
Obrázek 43: Výsledky krystalizace thauMATINU v jamkách B1-B6.



Obrázek 44: Výsledky krystalizace thauMATINU v jamkách A1-A6.

4.3.1. Fázový přechod

Ze získaných výsledků krystalizace thauMATINU byl vytvořen následující fázový přechod, který je na Obr. 45.



Obrázek 45: Zobrazení fázového přechodu závislosti koncentrace thauMATINU na 24% vInAnu sodném s 15% PEGem. Prázdný čtverec reprezentuje čistou kapku a křížek podmínky, při nichž se objevily krystaly. Křivka představuje srážecí křivku.

4.3.2. Testování krystalů

Modelový protein thaumatin je známý tím, že v přítomnosti vinných iontů relativně rychle vznikají jeho krystaly. V rámci této práce byl pro přípravu srážecího roztoku použit L-vinan sodný, v jehož přítomnosti se formují krystaly thaumatinu bypyramidového tvaru (Asherie et al., 2008). Všechny vzniklé krystaly měly bypyramidový tvar, tudíž se s jistotou jednalo o krystaly proteinu.

4.4. Výsledky krystalizace proteinu DH Tt80

Pro krystalizaci proteinu DH Tt80 byla zvolena metoda sedící kapky. Celkem byly využity 4 krystalizační destičky, každá obsahující 96 krystalizačních jamek, a 96 krystalizačních činidel ze sady SaltRx. Celkem bylo otestováno 384 krystalizačních podmínek. Některé podmínky vedly ke vzniku krystalů, při jiných podmínkách vznikly mikrokrystaly, dendrity, fázové separace nebo kapka zůstala čirá. V Přílohách jsou uvedeny tabulky, kde jsou podrobná schémata krystalizace proteinu DH Tt80, odlišná zbarvení jednotlivých buněk reprezentují odlišné stavy proteinových kapek při vyhodnocování experimentu.

V destičce I zůstala ve 48 případech kapka čirá, 40 kapek obsahovalo precipitaci, mikrokrystaly nebo fázovou separaci a v 8 kapkách vznikly krystaly, přičemž nejvhodnější krystaly vznikly s použitím krystalizačních činidel 6 a 23.

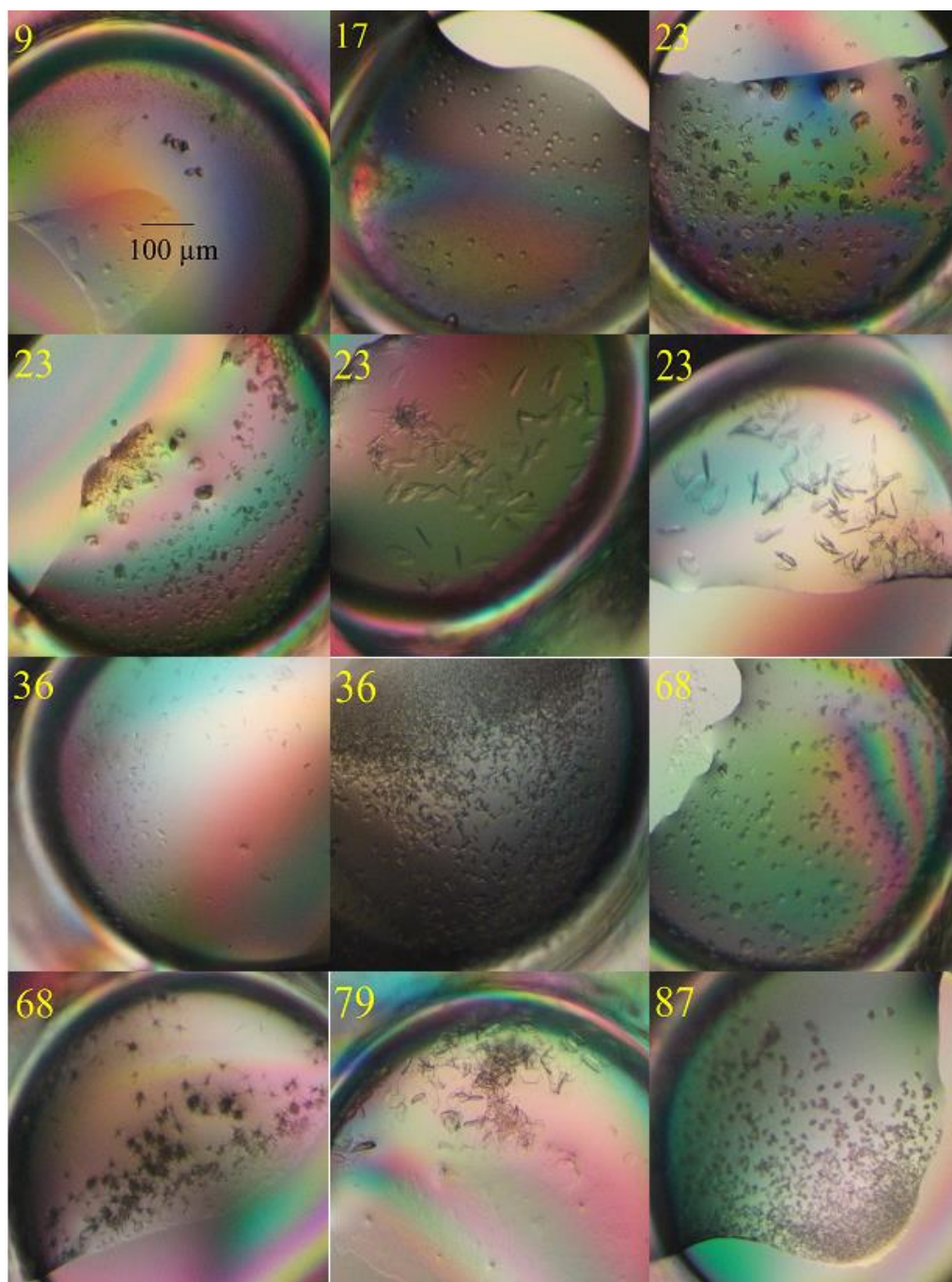
V destičce II bylo 68 čirých kapek, 24 kapek obsahovalo precipitaci, mikrokrystaly nebo fázovou separaci a ve 4 kapkách vznikly krystaly s použitím krystalizačního činidla 37.

Destička III obsahovala 32 čirých kapek, 64 kapek obsahovalo precipitaci, mikrokrystaly, fázovou separaci nebo dendrity, vhodné krystaly nevznikly ani v jednom případě.

V destičce IV zůstalo 68 kapek čirých, 24 kapek obsahovalo precipitaci, mikrokrystaly, fázovou separaci nebo dendrity a ve 4 kapkách vznikly vhodné krystaly s použitím krystalizačního činidla 79.

Z celkového počtu 384 krystalizačních podmínek vznikly vhodné krystaly přímo pro rentgenovou difrakční analýzu v 16 případech (4%), 152 kapek (40%) obsahovalo buď precipitaci, mikrokrystaly, fázovou separaci nebo dendrity, tyto stavy představují dobré podmínky pro další optimalizaci za účelem získání vhodných krystalů pro difrakční

experiment. Kapka zůstala čirá ve 216 podmínkách (56%). Na Obr. 46 jsou vybrané výsledky krystalizace proteinu DH Tt80, v pravém horním rohu jsou čísla krystalizačních roztoků, které jsou uvedeny v Přílohách.

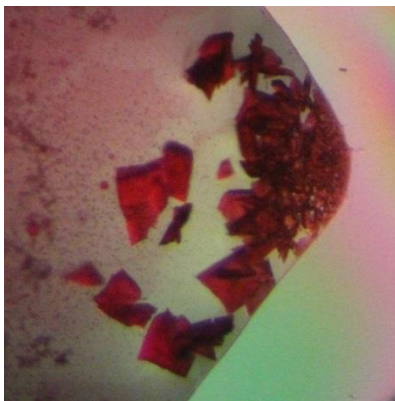


Obrázek 46: Vybrané výsledky krystalizace proteinu DH Tt80.

4.4.1. Testování krystalů

Krystaly byly podrobeny testu absorpce barviva za využití červeného barviva imperiální červeň (*Eosin Scarlet*). Asi po hodině od přidání barviva byly krystaly červeně

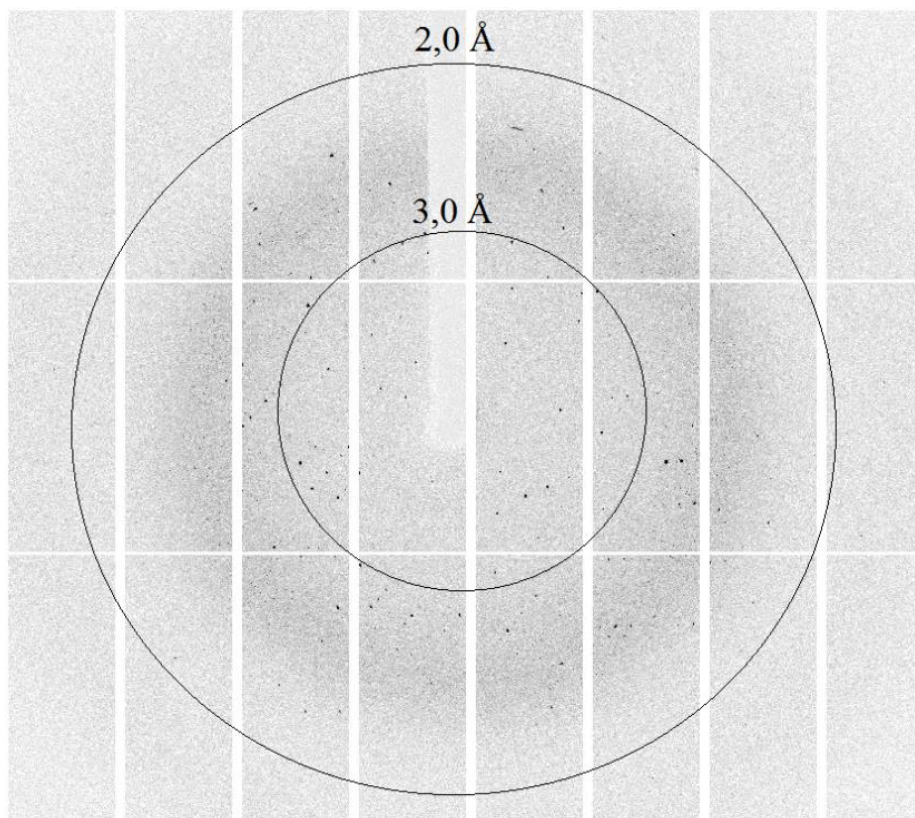
zabarvené, což ověřilo jejich proteinový původ. Na Obr. 47 je výsledek testování krystalů s použitím krystalizačního činidla číslo 37.



Obrázek 47: Krystaly proteinu DH Tt80 po testu absorpce barviva imperiální červeň.

4.4.2. Difrakční záznam

Pomocí rentgenové difrakční analýzy byly získány difrakční snímky proteinu DH Tt80 o rozlišení 2,2 Å (Obr. 48).



Obrázek 48: Difrakční záznam proteinu DH Tt80.

5. Diskuse

5.1. Xylanasa

SDS-PAGE elektroforéza potvrdila dostatečnou čistotu vzorku xylanasy pro krystalizační účely, ke kterým byla zvolena metoda visící kapky za využití dvou krystalizačních roztoků, konkrétně K_2HPO_4 o pH 8 a $(NH_4)_2PO_4$ v 0,1 M citrátu sodném o pH 4,3. Byly testovány různé koncentrace proteinového a srážecího roztoku. Z výsledků krystalizace byly popsány dva fázové diagramy.

Jako vzorek xylanasy byl v případě této práce použit roztok o původní koncentraci 36 mg/ml v 0,18 M sodnodraselnofosfátovém pufru o pH 7 a ve 43% glycerolu, komerčně poskytovaný firmou Hampton Research (USA). Moiseeva & Allaire (2004) krystalizovali xylanasu za použití stejného komerčně dodávaného vzorku. Pokusy o krystalizaci xylanasy o koncentracích 10 – 20 mg/ml za použití 1,2 M K_2HPO_4 a 0,85 M $(NH_4)_2PO_4$ jako srážecích roztoků nebyly úspěšné. Dále byl zaměněn pufr za 0,01 M Tris-HCl o pH 7,5; krystalizace za využití stejných srážecích roztoků jako v předchozím případě byla opět neúspěšná. Hledání nových krystalizačních podmínek bylo uskutečněno za využití metody visící kapky. Krystaly byly získány při smíchání 2 μ l proteinového roztoku s 2 μ l roztoku A2 z PCT sady, poskytované firmou Hampton Research (USA), nebo při smíchání 2 μ l proteinového roztoku a 2 μ l krystalizačního roztoku číslo 6 z krystalizační sady Crystal Screen 1 (Hampton Research, USA), který obsahoval 30% PEG a 0,2 M $MgCl_2$ v Tris pufru o pH 8,5. Optimalizace krystalizačních podmínek ukázala, že krystaly xylanasy lze vypěstovat za dva dny při pokojové teplotě za použití různě procentních PEGů v 0,1 M Tris pufru o pH 8,5 nebo 0,2 M $MgCl_2$ nebo $CaCl_2$.

Sugahara et al. (2001) vykrytalizovali xylanasu pomocí metody mikrokrytalizace pod olejem za využití srážecího činidla 30% PEGu 4000 a 0,2 M acetátu sodného o pH 8,5 za teploty 293 K. Pomocí rentgenové difrakční analýzy získali difrakční záznam o rozlišení 1,2 Å a vyřešili proteinovou strukturu.

5.2. Thaumatin

SDS-PAGE elektroforéza potvrdila dostatečnou čistotu vzorku thaumatinu pro krystalizační účely, ke kterým byla zvolena metoda visící kapky za využití 24% vinanu sodného s 15% PEGem v 0,1 M Bis-Tris propanu o pH 6,6 jako srážecího roztoku.

Při krystalizačním experimentu byly testovány různé koncentrace proteinového roztoku. Z výsledků krystalizace byl popsán fázový diagram.

Tsekova et al. (2012) provedla krystalizační experiment s thaumatinem o koncentraci 16-30 mg/ml, kdy jako srážecí roztok byl použit 0,34 M vinan draselnosodný v 50 mM PIPES o pH 6,8. Byla zvolena metoda visící kapky. Zároveň byly testovány různé povrchy pro krystalizaci. Objem kapky proteinového a srážecího roztoku byl 2-5 μ l a objem srážecího roztoku v reservoáru 200-500 μ l. Celý experiment byl proveden při teplotě 18°C. V případě krystalizace thaumatinu na skleněném povrchu se ukázalo, že snížení koncentrace proteinového roztoku nepotlačí nukleaci, ale pouze omezí velikost krystalů, což může vést k většímu počtu menších krystalů, např. krystalizace thaumatinu o koncentraci 26 mg/ml poskytovala pouze krystaly menší než 10 μ m. Nejlepší krystaly o velikosti 500 μ m vznikly na povrchu, který obsahoval fenylové skupiny. Nejpravděpodobnější vysvětlení tohoto jevu je, že fenylové skupiny potlačují nukleaci a menší hustota krystalizačních jader na povrchu dovoluje krystalům narůst do větších rozměrů.

Masuda et al. (2011) krystalizovali thaumatin metodou visící kapky. Kapky byla vytvořena smícháním 5 μ l proteinového roztoku o koncentraci 10 – 100 mg/ml a 5 μ l srážecího činidla, které se skládalo z 0,1 M ADA; 0,5-1,0 M vinanu sodnodraselného o pH 6,5 - 6,8 a 10% nebo 25% glycerolu. Získali difrakční záznam o rozlišení 1,1 Å a vyřešili proteinovou strukturu.

5.3. Cukr-fosfatasy

V rámci této bakalářské práce byl krystalizován metodou sedící kapky doposud necharakterizovaný a nestudovaný protein DH Tt80, který je považovaný za cukr-fosfatasu. Z tohoto důvodu byla pro krystalizaci zvolena krystalizační sada SaltRx, komerčně poskytovaná firmou Hampton Research (USA). V kombinaci s 96 krystalizačními činidly ze sady, obsahující různé soli a pufrů o různém pH, a zároveň různými poměry proteinový roztok-krystalizační roztok bylo otestováno celkem 384 podmínek, 4% kapek poskytlo dostatečné krystaly pro provedení difrakčního experimentu.

K datu 11. 4. 2017 obsahovala PDB databáze 40 struktur, které při porovnání s aminokyselinovou sekvencí proteinu DH Tt80 vykazovaly shodu. Nejvyšší shodu, konkrétně 72%, vykazoval protein PH1952 z *Pyrococcus horikoshii* OT3, který by mohl sloužit jako model pro řešení struktury proteinu DH Tt80. Protein PH1952 je hydrolasa, která byla vykrystalizována pomocí mikrokystalizace pod olejem při pH 6,8; při teplotě

291 K a za použití PEGu 4000, HEPES a chloridu hořečnatého. Pomocí rentgenové difrakční analýzy byl získán difrakční záznam o rozlišení 1,85 Å a vyřešena proteinová struktura (RSCB PDB, 2017).

K datu 11. 4. 2017 obsahovala PDB databáze 121 struktur pod názvem „sugar-phosphatase“. Níže jsou popsány dva typy, které by dále mohly sloužit jako modely pro řešení struktury našeho proteinu.

Guggisberg et al. (2014) krystalizovali cukr-fosfatasu PfHAD1 z *Plasmodium falciparum* metodou visící kapky při teplotě 291 K za použití 20% PEGu 8000 a 0,1 M HEPES o pH 7,5. Pomocí rentgenové difrakční analýzy byl získán difrakční záznam o rozlišení 2,05 Å a vyřešena proteinová struktura, přičemž bylo prokázáno, že se jedná o cukr-fosfatasu, která reguluje methylerithritol fosfátovou dráhu u malarických parazitů.

Fieulaine et al. (2005) krystalizovali sacharosa-fosfatasu ze *Synechocystis sp.* PCC6803 metodou sedící kapky. Kapka se skládala vždy z 2 µl proteinového roztoku o koncentraci 10 mg/ml a 2 µl srážecího činidla. Krystaly vznikly za použití dvou srážecích činidel, konkrétně 3,8 M formátu sodného a 100 mM NaCl bez využití pufru a 3,0 M formátu sodného v 100 mM Tris-Cl⁻ o pH 8. Pomocí rentgenové difrakční analýzy byl získán difrakční obrazec o rozlišení 1,4 Å a zároveň prokázáno, že tento enzym uvolňuje molekuly sacharosy v buňkách sinic.

6. Závěr

Tato bakalářská práce v teoretické části popisuje proces krystalizace, stručně charakterizuje fázový diagram a zabývá se základními, pokročilými a alternativními krystalizačními metodami. Dále se zaměřuje na nejčastější možné výsledky krystalizace a testy proteinových krystalů. Jsou zde uvedeny základní informace o proteinech studovaných v rámci této práce. Závěr je věnován základním informacím o RCSB PDB databázi.

Jedním z cílů bylo popsat fázové diagramy dvou modelových proteinů, konkrétně xylanasy a thaumatinu. Nejprve byly vzorky charakterizovány pomocí SDS-PAGE elektroforézy. Podmínky pro krystalizaci obou zmíněných proteinů jsou dobře známy. Při krystalizačním experimentu metodou visící kapky byly použity různé koncentrace proteinového a srážecího roztoku, z výsledků byly poté popsány fázové diagramy a fázový přechod.

Hlavním cílem práce byla krystalizace proteinu DH Tt80 z *Thermococcus kodakarensis* KOD1. Vzorek byl nejprve charakterizován pomocí SDS-PAGE elektroforézy a poté byl krystalizován metodou sedící kapky. Pro krystalizaci byla použita komerčně dostupná sada krystalizačních činidel SaltRx. Celkem bylo testováno 386 krystalizačních podmínek. Kompletní krystalizační experiment s proteinem DH Tt80 je shrnut v Tab. 3 - 6 v Přílohách. Dále byly krystaly otestovány pomocí barvicího testu. Finálním krokem bylo otestování krystalu rentgenovou difrakční analýzou, která poskytla difrakční obrazec o rozlišení 2,2 Å. Naměřená difrakční data budou dále použita pro bližší charakteristiku a určení trojrozměrné struktury proteinu DH Tt80 a zároveň prokázání faktu, že se v tomto případě s určitostí jedná o cukr-fosfatasu.

7. Seznam literatury

- Aravind, L. & Koonin, E. V. (1998). The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends Biochem. Sci.*, 23 (12). 469-72.
- Asherie, N. (2004). Protein crystallization and phase diagrams. *Methods*, 34 (3). 266-272.
- Asherie, N., Ginsberg, C., Greenbaum, A., Blass, S. & Knafo, S. (2008). Effects of protein purity and precipitant stereochemistry on the crystallization of thaumatin. *Crystal Growth & Design*, 8 (12). 4200-4207.
- Atomi, H., Fukui, T., Kanai, T., Morikawa, M. & Imanaka, T. (2004). Description of *Thermococcus kodakarensis* sp. nov., a well studied hyperthermophilic archeon previously reported as *Pyrococcus* sp. KOD1. *Archaea*, 1 (4), 263-267.
- Bartoszewski, G., Nirdziela, A., Szawacka, M. & Niemirowicz-Szczytt, K. (2003). Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gen from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breeding*, 122. 347-351.
- Beg, Q. K., Kapoor, M., Mahajan, L. & Hoondal G. S. (2001). Microbial xylanases and their industrial applications: A review. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 56 (3-4). 326-338.
- Bergfors, T. M. (1999). Protein Crystallization: Techniques, Strategies and Tips. La Jolla, USA: International University Line.
- Bergfors, T. M. (2003). Seeds to crystals. *Journal of Structural Biology* 142 (1). 66-76.
- Bergfors, T. Protein Crystallization. Crystallization Tutorials. [online, cit. 2017-02-19]. Dostupné z WWW: <http://xray.bmc.uu.se/terese/tutorials.html>.
- Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, J. B. & Meyer, E. F. (1977). The Protein Data Bank. A Computer-based archival file for macromolecular structures. *European Journal of Biochemistry*, 80 (2). 319-324.
- Biertumpfel, C., Basquin, J., Suck, D. & Sauter, C. (2002). Crystallization of biological macromolecules using agarose gel. *Acta Crystalligraphica Section D*, 58 (10). 1657-1659.
- BRENDA- The Comprehensive Enzyme Information System [online, cit. 2017-02-19]. Dostupné z WWW: <<http://www.brendaenzymes.org/enzyme.php?ecno=3.1.3.23>>.
- Burkunsky, J. T. & Poulsen, J. C. N. (2001). pH, conductivity and long-term stability in the Crystal Screen solutions. *Journal of Applied Crystallography*, 34 (4). 533-534.
- Collins, T., Gerday, C. & Feller, G. (2005). Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. *FEMS Microbiology Reviews*, 29 (1). 3-23.
- D'Arcy, A., Mac Sweeney, A. & Haber, A. (2004). Practical aspect of using the microbatch method in screening conditions for protein crystallization. *Methods*, 34 (3). 323-328.

- Decruix, A. & Giege, R. (1992). *Crystallization of Nucleic Acids and Proteins: A Practical Approach*. Oxford University Press, Oxford.
- Dessau, M. A. & Modis, Y. (2011). Protein crystallization for X-ray crystallography. *Journal of Visualized Experiments*, (47). 2285.
- Dumetz, A. C., Chockla, A. M., Kaler, E. W. & Lenhoff, A. M. (2008). Protein phase behavior in aqueous solutions: Crystallization, liquid-liquid phase separation, gels, and aggregates. *Biophysical Journal*, 94 (2). 570-583.
- Eckert, K., Ernst, H. A., Schneider, E., Larsen, S. & Lo Leggio, L. (2003). Crystallization and preliminary X-ray analysis of *Alicyclobacillus acidocaldarius* endoglucanase CelA. *Acta Crystallographica Section D*, 59. 139-141.
- Fieulaine, S., Lunn, J. E., Borel, F. & Ferrer, J. L. (2005). The structure of a cyanobacterial sucrose-phosphatase reveals the sugar tongs that release free sucrose in the cell. *The Plant Cell*, 17 (7). 2049-2058.
- García-Ruiz, J. M. (2003). Nucleation of protein crystals. *Journal of Structural Biology*, 142 (1). 22-31.
- Guggisberg, A. M., Park, J., Edwards, R. L., Kelly, M. R., Hodge, D. M., Tolia, N. H. & Odom, A. R. (2014). A sugar phosphatase regulates the methylerythritol phosphate (MEP) pathway in malaria parasites. *Nature Communications*, 5. 4467.
- Hampton Research (2015). *Crystallization: Research Tools*. Aliso Viejo, USA: Hampton Research Corp.
- Held, P. (2012). Enzymatic Digestion of Polysaccharides (Part II). BioTek. Dostupné z WWW: <http://www.biotek.com/resources/articles/enzymatic-digestion-of-polysaccharides-2.html>
- Chayen, N. E. (1997). The role of oil in macromolecular crystallization. *Structure*, 5 (10). 1269-1274.
- Chayen, N. E. (2004). Methods for separating nucleation and growth in protein crystallization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 88 (3). 329-337.
- Chayen, N. E. (2004). Turning protein crystallization from art into a science. *Structural Biology*, 14. 577-583.
- Chayen, N. E., Shaw Stewart, P. D. & Blow, D. M. (1992). Microbatch crystallization under oil - a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *Journal of Crystal Growth*, 122. 176-180.
- Kierzek, A. M. & Zielenkiewicz, P. (2001). Models of protein crystal growth. *Biophysical Chemistry*, 91 (1). 1-20.
- Ko, T. P., Day, J., Greenwood, A. & McPherson, A. (1994). Structures of three crystal forms of the sweet protein thaumatin. *Acta Crystallographica Section D*, 50 (6). 813-825.

- 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.
- Krebs, M. R. H., Devlin, G. L. & Donald, A. M. (2007). Protein particulates: Another generic form of protein aggregation? *Biophysical Journal*, 92 (4). 1336-1342.
- Kutá Smatanová, I. (2003). Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi [online]. In: Krystalografická společnost. [cit. 2017-01-13]. Dostupné z WWW: <<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>>.
- Lee, S. S. & Cudney, R. (2004). A modified microdialysis button for use in protein crystallization. *Journal of Applied Crystallography*, 37 (3). 504-505.
- Luft, J. R., Wolfley, J. R. & Snell, E. M. (2011). What's in a drop? Correlating observations and outcomes to guide macromolecular crystallization experiments. *Crystal Growth & Design*, 11 (3). 651-663.
- Masuda, T., Ohta, K., Mikami, B. & Kitabatake, N. (2011). High-resolution structure of the recombinant sweet-tasting protein thaumatin I. *Acta Crystallographica Section F*, 67 (6). 652-658.
- McPherson, A. & Gavira, J. A. (2014). Introduction to protein crystallization. *Acta Crystallographica Section F*, 70 (1). 2-20.
- McPherson, A. (1982). *Preparation and Analysis of Protein Crystals*. Wiley Interscience, New York, John Wiley and Sons.
- McPherson, A. (1999). *Crystallization of Biological Macromolecules*. New York, Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34 (3). 254-265.
- McPherson, A., Nguyen, C., Cudney, R. & Larson, S. B. (2011). The role of small molecule additives and chemical modification in protein crystallization. *Crystal Growth & Design*, 11 (5). 1469-1474.
- Moiseva, N. & Allaire, M. (2004). Crystals of family xylanase II from *Trichoderma longibrachiatum* that diffract to atomic resolution. *Acta Crystallographica Section D*, 60 (7). 1275-1277.
- Morikawa, M., Izawa, Y., Rashid, N., Hoaki, T., & Imanaka, T. (1994). Purification and characterization of thermostable thiol protease from a newly isolated hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (12). 4559-4566.
- Nagata, M., Kaito, C. & Sekimizu, K. (2008). Phosphodiesterase activity of CvfA is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (4). 2176-83.
- Qiagen (2010). *Critical factors for successful protein crystallization*. Qiagen, Germany.

Raghunathan, K., Harris, P. T. & Arvidson, D. N. (2010). Trial by fire: are the crystals macromolecules? *Acta Crystallographica Section F*, 66 (5). 615-620.

RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>.

Rigaku. Crystallization recipes [online]. Dostupné z WWW: <<https://www.rigaku.com/en/products/protein/recipes>>.

Rupp, B. (2010). *Biomolecular Crystallography. Principles, Practise, and Application to Structural Biology*. Garland Science, Taylor & Francis Group.

Russo Krauss, I., Merlino, A., Vergara, A. & Sica, F. (2013). An overview of biological macromolecule crystallization. *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (6): 11643-11691.

Salemme, F. R. (1972). A free interface diffusion technique for the crystallization of proteins for X-ray crystallography. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 151 (2). 533-539.

Samuels, G. J., Ismael, A., Temesgen, M. B., Szakacs, G., Druzhinina, I. S., Kubicek, C. P. & Jaklitsch, W. M. (2012). The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma* a revision with new species. *Fungal Diversity*, 55 (1). 77-108.

Sear, R. P. (2007). Nucleation: theory and applications to protein solutions and colloidal suspensions. *Journal of Physics*, 19 (3). 28.

Sugahara, M., Kageyama-Morikawa, Y. & Kunishima, N. (2011). Packing space expansion of protein crystallization screening with synthetic zeolite as heteroepitaxial nucleant. *Crystal Growth & Design*, 11 (4). 110-120.

Sun, L., Li, J., Xu, C., Yu, F., Zhou, H., Tang, L. & He, J. (2010). The sandwich method for protein crystallization and its effect on crystal growth. *Acta Biochemica et Biophysica Sinica*, 42 (5). 332-336.

Thomas, D. M., Robx, A. & Rice, D. W. (1989). A novel dialysis procedure for the crystallization of proteins. *Protein Engineering*, 2 (6). 489-491.

Tomčová, I. (2007). *New Alternative Crystallization Techniques*. Doctoral Thesis. České Budějovice: University of South Bohemia.

Tsekova, D. S., Williams, D. R. & Heng, J. Y. Y. (2012). Effect of surface chemistry on novel templates on crystallization of proteins. *Chemical Engineering Science*, 77. 201-206.

van der Wel, H. & Loeve, K. (1972). Isolation and characterization of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *European Journal of Biochemistry*, 31 (2). 221-225.

Zeppenauer, M. (1971). Formation of large crystals. *Methods Enzymology*, 22. 53.

8. Přílohy

Informace o proteinu DH Tt80

Aminokyselinová sekvence:

MLRKIGLIFDMDGVIYRGSEPIEGARELINFLKEVGIPFIFLTNNSTRDPAMYREKLLSI
GIDVPEEVIVTSGLATRLYMERHFEPGNV FVIGGEGLHREMERLGGWIVGIEEARKG
AWRQVRYVVVGLDPDMTYEKLKYATLAIRNGARFITNPDTTYPAEGLYPGAGSII
AALKASTGKEPLIIGKPNEPAYEVARSKLDGVDEIWMVGDRLDTDILFAKRFGMKA
VMVLTWVGKHAAGR

Genetická sekvence:

ATGCTGAGGAAAATCGGCCTCATCTTCGACATGACGGCGTAATCTACCGCGGAA
GCGAGCCCATTGAAGGTGCCCGCGAGCTGATAAACTTTCTGAAGGTGGGCATTC
CCTTCATTTTCCTCACCAACAACCTCGACCAGAGACCCCGCCATGTACCGGGAAA
AGTTGCTCTCTATAGGCATCGACGTCCCAGAGGAGGTTATAGTCACCTCAGGCC
TCGCCACGAGGCTGTACATGGAACGGCACTTCGAACCCGGAAATGTCTTCGTCA
TCGGCGGGGAGGGGCTCCACAGGGAGATGGAGCGCCTCGGCTGGGGAATCGTG
GGCATCGAAGAGGCAAGAAAAGGTGCCTGGAGGCAAGTCCGCTATGTCGTCGT
CGGCCTCGATCCAGACATGACCTACGAGAAGCTCAAGTACCCGGCTGAAGAGG
GCTCTACCCCGGCGCCGGTTCAATAATAGCCGCGCTGAAGGCGTCAACCGGAAA
GGAACCCCTGATAATAGGCAAGCCAAACGAGCCCGCGTACGAGGTGGCAAGGA
GCAAGCTCGACGGTGTGATGAGATATGGATGGTCGGCGACAGGCTCGATACCG
ACATCCTCTTCGCCAAGCGCTTCGGCATGAAGGCGGTGATGGTTCTGACTTGGG
GTAAGCACGCTGAAGGACGTTAA

Počet aminokyselin: 243

Zastoupení aminokyselin:

Ala (A)	18	7,4 %	Lys (K)	13	5,3 %
Arg (R)	18	7,4 %	Met (M)	9	3,7 %
Asn (N)	7	2,9 %	Phe (F)	9	3,7 %
Asp (D)	12	4,9 %	Pro (P)	12	4,9 %
Cys (C)	0	0,0 %	Ser (S)	7	2,9 %
Gln (Q)	1	0,4 %	Thr (T)	12	4,9 %
Glu (E)	22	9,1 %	Trp (W)	4	1,6 %
Gly (G)	28	11,5 %	Tyr (Y)	9	3,7 %
His (H)	3	1,2 %	Val (V)	17	7,0 %
Ile (I)	21	8,6 %	Pyl (O)	0	0,0 %
Leu (L)	21	8,6 %	Sec (U)	0	0,0 %

Molekulová hmotnost: 27077,3 Da

Teoretický izoelektrický bod: 5,78

Celkový počet atomů: 3841

Vzorec: C₁₂₂₂H₁₉₃₄N₃₂₈O₃₄₈S₉

Atomové složení:

Uhlík	C	1222
Vodík	H	1934
Dusík	N	328
Kyslík	O	348
Síra	S	9

Seznam krystalizačních činidel ze sady SaltRx

Well #	Salt	Well #	Buffer \diamond
1. (A1)	1.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	1. (A1)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
2. (A2)	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0	2. (A2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
3. (A3)	1.5 M Ammonium chloride	3. (A3)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
4. (A4)	1.5 M Ammonium chloride	4. (A4)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
5. (A5)	1.5 M Ammonium chloride	5. (A5)	0.1 M Tris pH 8.5
6. (A6)	3.5 M Ammonium chloride	6. (A6)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
7. (A7)	3.5 M Ammonium chloride	7. (A7)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
8. (A8)	3.5 M Ammonium chloride	8. (A8)	0.1 M Tris pH 8.5
9. (A9)	2.2 M Sodium chloride	9. (A9)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
10. (A10)	2.2 M Sodium chloride	10. (A10)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
11. (A11)	2.2 M Sodium chloride	11. (A11)	0.1 M Tris pH 8.5
12. (A12)	3.2 M Sodium chloride	12. (A12)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
13. (B1)	3.2 M Sodium chloride	13. (B1)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
14. (B2)	3.2 M Sodium chloride	14. (B2)	0.1 M Tris pH 8.5
15. (B3)	1.0 M Ammonium citrate dibasic	15. (B3)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
16. (B4)	1.8 M Ammonium citrate dibasic	16. (B4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
17. (B5)	1.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	17. (B5)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
18. (B6)	2.0 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	18. (B6)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
19. (B7)	0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate	19. (B7)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
20. (B8)	0.7 M Sodium citrate tribasic dihydrate	20. (B8)	0.1 M Tris pH 8.5
21. (B9)	1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	21. (B9)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
22. (B10)	1.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	22. (B10)	0.1 M Tris pH 8.5
23. (B11)	0.4 M Magnesium formate dihydrate	23. (B11)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
24. (B12)	0.4 M Magnesium formate dihydrate	24. (B12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
25. (C1)	0.4 M Magnesium formate dihydrate	25. (C1)	0.1 M Tris pH 8.5
26. (C2)	0.7 M Magnesium formate dihydrate	26. (C2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
27. (C3)	2.0 M Sodium formate	27. (C3)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
28. (C4)	2.0 M Sodium formate	28. (C4)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
29. (C5)	2.0 M Sodium formate	29. (C5)	0.1 M Tris pH 8.5
30. (C6)	3.5 M Sodium formate	30. (C6)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
31. (C7)	3.5 M Sodium formate	31. (C7)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
32. (C8)	3.5 M Sodium formate	32. (C8)	0.1 M Tris pH 8.5
33. (C9)	1.2 M DL-Malic acid pH 7.0	33. (C9)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
34. (C10)	2.2 M DL-Malic acid pH 7.0	34. (C10)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
35. (C11)	1.4 M Sodium malonate pH 7.0	35. (C11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
36. (C12)	2.4 M Sodium malonate pH 7.0	36. (C12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
37. (D1)	2.5 M Ammonium nitrate	37. (D1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
38. (D2)	2.5 M Ammonium nitrate	38. (D2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
39. (D3)	2.5 M Ammonium nitrate	39. (D3)	0.1 M Tris pH 8.5
40. (D4)	6.0 M Ammonium nitrate	40. (D4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
41. (D5)	6.0 M Ammonium nitrate	41. (D5)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
42. (D6)	6.0 M Ammonium nitrate	42. (D6)	0.1 M Tris pH 8.5
43. (D7)	1.5 M Sodium nitrate	43. (D7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
44. (D8)	1.5 M Sodium nitrate	44. (D8)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
45. (D9)	1.5 M Sodium nitrate	45. (D9)	0.1 M Tris pH 8.5
46. (D10)	4.0 M Sodium nitrate	46. (D10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
47. (D11)	4.0 M Sodium nitrate	47. (D11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
48. (D12)	4.0 M Sodium nitrate	48. (D12)	0.1 M Tris pH 8.5

Well #	Salt	Well #	Buffer ◊
49.(E1)	1.0 M Ammonium phosphate monobasic	49.(E1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
50.(E2)	1.8 M Ammonium phosphate monobasic	50.(E2)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
51.(E3)	1.5 M Ammonium phosphate dibasic	51.(E3)	0.1 M Tris pH 8.5
52.(E4)	2.4 M Ammonium phosphate dibasic	52.(E4)	0.1 M Tris pH 8.5
53.(E5)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0	53.(E5)	None
54.(E6)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9	54.(E6)	None
55.(E7)	1.0 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2	55.(E7)	None
56.(E8)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 5.0	56.(E8)	None
57.(E9)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 6.9	57.(E9)	None
58.(E10)	1.8 M Sodium phosphate monobasic monohydrate, Potassium phosphate dibasic / pH 8.2	58.(E10)	None
59.(E11)	0.5 M Succinic acid pH 7.0	59.(E11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
60.(E12)	1.0 M Succinic acid pH 7.0	60.(E12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
61.(F1)	1.5 M Ammonium sulfate	61.(F1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
62.(F2)	1.5 M Ammonium sulfate	62.(F2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
63.(F3)	1.5 M Ammonium sulfate	63.(F3)	0.1 M Tris pH 8.5
64.(F4)	2.5 M Ammonium sulfate	64.(F4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
65.(F5)	2.5 M Ammonium sulfate	65.(F5)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
66.(F6)	2.5 M Ammonium sulfate	66.(F6)	0.1 M Tris pH 8.5
67.(F7)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	67.(F7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
68.(F8)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	68.(F8)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
69.(F9)	0.8 M Lithium sulfate monohydrate	69.(F9)	0.1 M Tris pH 8.5
70.(F10)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate	70.(F10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
71.(F11)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate	71.(F11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
72.(F12)	1.5 M Lithium sulfate monohydrate	72.(F12)	0.1 M Tris pH 8.5
73.(G1)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate	73.(G1)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
74.(G2)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate	74.(G2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
75.(G3)	1.0 M Magnesium sulfate hydrate	75.(G3)	0.1 M Tris pH 8.5
76.(G4)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate	76.(G4)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
77.(G5)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate	77.(G5)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
78.(G6)	1.8 M Magnesium sulfate hydrate	78.(G6)	0.1 M Tris pH 8.5
79.(G7)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic	79.(G7)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
80.(G8)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic	80.(G8)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
81.(G9)	0.7 M Ammonium tartrate dibasic	81.(G9)	0.1 M Tris pH 8.5
82.(G10)	1.0 M Ammonium tartrate dibasic	82.(G10)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
83.(G11)	1.3 M Ammonium tartrate dibasic	83.(G11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
84.(G12)	1.4 M Ammonium tartrate dibasic	84.(G12)	0.1 M Tris pH 8.5
85.(H1)	0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	85.(H1)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
86.(H2)	1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	86.(H2)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
87.(H3)	0.6 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	87.(H3)	0.1 M Tris pH 8.5
88.(H4)	1.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	88.(H4)	0.1 M Tris pH 8.5
89.(H5)	0.5 M Potassium thiocyanate	89.(H5)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
90.(H6)	0.5 M Potassium thiocyanate	90.(H6)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
91.(H7)	0.5 M Potassium thiocyanate	91.(H7)	0.1 M Tris pH 8.5
92.(H8)	4.0 M Ammonium acetate	92.(H8)	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.6
93.(H9)	4.0 M Ammonium acetate	93.(H9)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
94.(H10)	4.0 M Ammonium acetate	94.(H10)	0.1 M Tris pH 8.5
95.(H11)	35% v/v Tacsimate pH 7.0	95.(H11)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0
96.(H12)	60% v/v Tacsimate pH 7.0	96.(H12)	0.1 M BIS-TRIS propane pH 7.0

Detailní schéma krystalizačního experimentu s proteinem DH Tt80

Následující tabulky jsou schémata krystalizace proteinu DH Tt80 metodou sedící kapky, celkem byly použity 4 krystalizační destičky, dále značené římskými číslicemi. Tab. 3, 4, 5 a 6 představují schémata krystalizačních destiček s použitím krystalizačních roztoků SaltRx, značených číselně, koncentrace proteinu DH Tt80 je ve všech případech 6 mg/ml. Uprostřed je uvedeno číselné označení krystalizačního roztoku v reservoáru, konkrétně bylo pipetováno vždy 200 μ l. Dvě horní a dvě dolní políčka představují krystalizační jamky, ve kterých jsou vždy uvedeny poměry proteinu DH Tt80 a příslušného krystalizačního roztoku, vždy stejného jako v reservoáru, v μ l. Objem roztoku Tt80 v μ l je v tabulkách vyznačen červeně, objem krystalizačního roztoku v μ l je uveden černě. Modře jsou zvýrazněny buňky, ve kterých zůstala kapka čirá, zelené buňky označují to, že došlo v kapce ke vzniku mikrokrystalů, precipitace, dendritů nebo fázové separace, žlutě jsou zvýrazněny buňky, ve kterých došlo v kapce ke vzniku krystalů vhodných pro rentgenovou difrakční analýzu.

Tabulka 3: Schéma krystalizační destičky I.

1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 1		⊙ 2		⊙ 3	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 4		⊙ 5		⊙ 6	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 7		⊙ 8		⊙ 9	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 10		⊙ 11		⊙ 12	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 13		⊙ 14		⊙ 15	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 16		⊙ 17		⊙ 18	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 19		⊙ 20		⊙ 21	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 22		⊙ 23		⊙ 24	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5

Tabulka 4: Schéma krystalizační destičky II.

1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 25		⊙ 26		⊙ 27	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 28		⊙ 29		⊙ 30	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 31		⊙ 32		⊙ 33	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 34		⊙ 35		⊙ 36	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 37		⊙ 38		⊙ 39	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 40		⊙ 41		⊙ 42	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 43		⊙ 44		⊙ 45	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 46		⊙ 47		⊙ 48	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5

Tabulka 5: Schéma krystalizační destičky III.

1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 49		⊙ 50		⊙ 51	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 52		⊙ 53		⊙ 54	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 55		⊙ 56		⊙ 57	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 58		⊙ 59		⊙ 60	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 61		⊙ 62		⊙ 63	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 64		⊙ 65		⊙ 66	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 67		⊙ 68		⊙ 69	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 70		⊙ 71		⊙ 72	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5

Tabulka 6: Schéma krystalizační destičky IV.

1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 73		⊙ 74		⊙ 75	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 76		⊙ 77		⊙ 78	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 79		⊙ 80		⊙ 81	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 82		⊙ 83		⊙ 84	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 85		⊙ 86		⊙ 87	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 88		⊙ 89		⊙ 90	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 91		⊙ 92		⊙ 93	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5
1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1	1 : 1	0,5 : 1
⊙ 94		⊙ 95		⊙ 96	
0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5	0,5 : 0,5	1 : 0,5

9. Seznam zkratek

APS – peroxodisíran amonný

Bis-Tris – Bis-Tris methan

DNA – deoxyribonukleotidová kyselina

HAD - enzymová nadrodina halogenaciddehalogenas

HEPES - 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethansulfonová kyselina

PCR – polymerázová řetězová reakce, metoda sloužící k namnožení určitého úseku DNA

PEG – polyethyenglykol

RCSB PDB - „Protein Data Bank“

SDS – dodecyl síran sodný

SDS-PAGE – elektroforéza v polyakrilamidovém gelu za přítomnosti dodecyl síranu sodného

TEMED – tetramethylethylenediamin

Tris - tris(hydroxymethyl)aminomethan

Aminokyseliny:

Ala (A) - alanin

Lys (K) - lysin

Arg (R) - arginin

Met (M) - methionin

Asn (N) - asparagin

Phe (F) - fenylalanin

Asp (D) - kyselina asparagová

Pro (P) - prolin

Cys (C) - cystein

Ser (S) - serin

Gln (Q) - glutamin

Thr (T) - threonin

Glu (E) - kyselina glutamová

Trp (W) - tryptofan

Gly (G) - glycin

Tyr (Y) - tyroxin

His (H) - histidin

Val (V) - valin

Ile (I) - izoleucin

Pyl (O) - pyrolysin

Leu (L) - leucin

Sec (U) - selenocystein

Nukleové báze:

A - adenin

G - guanin

C - cytosin

T - thymin