

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Krystalizační studie proteinu Tt81 z *Thermococcus*
*thioreducens***

Bakalářská práce

Kristýna Rejžková

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

České Budějovice 2016

Rejžková, K., 2016: Krystalizační studie proteinu Tt81 z *Thermococcus thioireducens*. [Crystallization studies of protein Tt81 from *Thermococcus thioireducens*. Bc. Thesis, in Czech.] – 63 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis is aimed at crystallization study of the newly discovered protein Tt81 from *Thermococcus thioireducens*, which is considered to be the haloacid dehalogenase. The main goal of this work is to get acquainted with methods of protein crystallization and use them for preparation of single monocrystals of the protein Tt81 suitable for X-ray structural analysis. The resulting diffraction data will be used for further research of structure and function of studied protein Tt81.

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 21. 4. 2016

.....

Kristýna Rejžková

Poděkování

Děkuji své školitelce Doc. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Tatyane Prudnikové, Ph.D. za ochotu a trpělivost při vedení celým praktickým experimentem a Mgr. Michalu Kutému, Ph.D. za seznámení s online databázemi proteinů a počítačovými programy pro zobrazování 3D struktur.

Poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu během celého studia.

OBSAH

1. Úvod.....	1
2. Literární přehled.....	2
2.1 Úvod do krystalizace proteinů.....	2
2.2 Princip krystalizace.....	3
2.3 Test před krystalizací.....	4
2.4 Přehled krystalizačních metod.....	5
2.5 Faktory ovlivňující krystalizaci.....	7
2.6 Krystaly proteinů vs. krystaly (an)organických sloučenin.....	9
2.7 Krystalizační testy.....	10
2.8 Makromolekulární databáze.....	12
2.9 Halogenaciddehalogenasy.....	13
2.10 Tt81.....	15
3. Materiál a metody.....	16
3.1 Krystalizace lysozymu.....	16
3.2 Krystalizace Tt81.....	19
3.3 Testování krystalů.....	33
3.4 Anorganické krystaly.....	34
3.5 Získání difrakčních dat.....	34
4. Výsledky.....	35
4.1 Výsledky krystalizace lysozymu.....	35
4.2 Výsledky krystalizace Tt81.....	39
4.3 Výsledky testování krystalů.....	44

4.4 Porovnání anorganických krystalů a krystalů proteinu Tt81	45
4.5 Difrakční záznam.....	47
5. Diskuze.....	48
5.1 Tt81.....	48
5.2 Halogenaciddehalogenasy v RCSB PDB databázi.....	49
6. Závěr.....	50
7. Seznam literatury.....	52
8. Přílohy.....	57
9. Seznam zkratk.....	61

1. Úvod

Proteinová krystalografie je obor zabývající se zkoumáním trojrozměrné struktury biologických makromolekul. Na základě poznání atomární struktury zkoumaných biomakromolekul je možné popsat děje v buňce nebo katalytické reakce. Významnou biofyzikální metodou pro stanovení struktury biologických makromolekul je rentgenová difrakce. Databáze RCSB PDB (Protein Data Bank) ke dni 2. 4. 2016 obsahovala celkem 117 438 struktur, z nichž 89 % bylo určeno právě rentgenovou difrakcí (RCSB PDB, 2016).

Nezbytnou podmínkou k použití rentgenové difrakce je vypěstovat dobře uspořádané krystaly bez defektů, dostatečně velké, které budou po průchodu paprsku rentgenového záření poskytovat difrakční data. Získání krystalů v difrakční kvalitě je nejobtížnějším krokem v celém procesu zjišťování struktury biologických makromolekul.

V teoretické části této práce je popsán princip procesu krystalizace, faktory ovlivňující krystalizaci, stručný přehled krystalizačních metod, porovnání vlastností proteinových a anorganických krystalů, dále základní informace o halogenaciddehalogenasach a studovaném proteinu Tt81 z *Thermococcus thio-reducens*.

Praktická část práce se zabývá krystalizační studií modelového proteinu lysozymu a nově objevené putativní halogenaciddehalogenasy Tt81 izolované z *Thermococcus thio-reducens* a porovnáním proteinových a anorganických krystalů.

Cílem práce bylo:

- zvládnout základní a pokročilé krystalizační metody na modelovém proteinu
- charakterizovat studovaný protein a nalézt krystalizační podmínky pro přípravu proteinových krystalů
- optimalizovat krystalizační podmínky a připravit krystaly studovaného proteinu v difrakční kvalitě
- otestovat připravené krystaly a pokusit se získat difrakční data

2. Literární přehled

2.1 Úvod do krystalizace proteinů

Krystalizace proteinů je obecně velmi komplikovaný proces. Zkušenosti mnoha vědců poukazují na to, že u většiny proteinů je proces získání krystalů obtížný. I v případě, že protein krystalizuje relativně snadno, existuje celá řada parametrů, které je potřeba brát v úvahu. Obtížnost krystalizace proteinů vyplývá z toho, že molekuly proteinů jsou velké, flexibilní, často tvořené několika podjednotkami, relativně chemicky a fyzikálně nestabilní (teplotní nebo světelná citlivost, hydratace, rozklad) a mají dynamické vlastnosti. Pokud se změní roztok, změní se i vlastnosti molekul (např. konformace, náboj, velikost) (Giacovazzo a kol., 2002; Lattman a kol., 2008).

Cílem krystalizačního procesu je získat kvalitní monokrystaly vhodné pro rentgenovou strukturní analýzu – krystaly by měly být alespoň 0,05 mm velké, bez prasklin a defektů (katalog Hampton Research, 2015). Tohoto jevu lze dosáhnout pomalým snižováním rozpustnosti proteinu a dosažením limitního stupně přesycení roztoku postupnou úpravou podmínek (např. pH, teplota, koncentrace jednotlivých komponent v roztoku) (Glusker a kol., 1994).

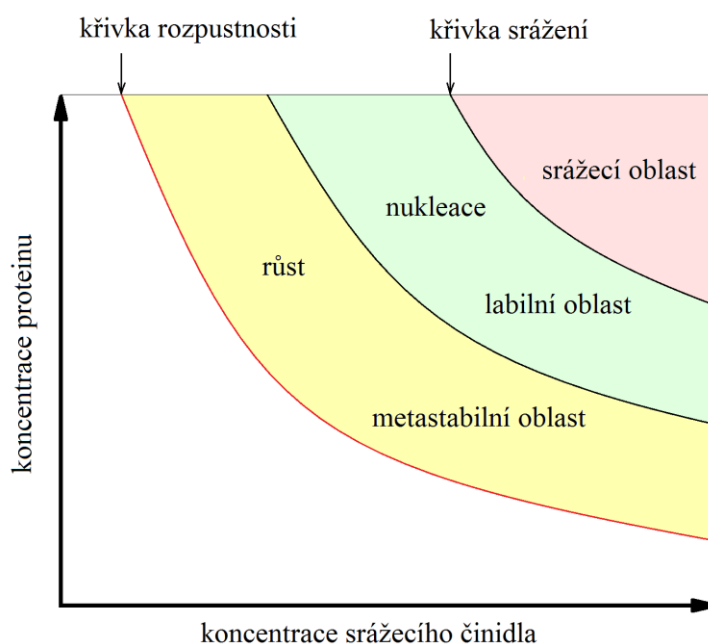
Pro vznik krystalů, tedy přeměnu kapaliny respektive plynu v pevnou fázi, je nutné 1) přesycení roztoku vedoucí ke srážení nebo tvorbě stabilních krystalických jader a 2) teplotní gradient, který má vliv na kondenzaci molekul z plynu nebo na kondenzaci kapaliny (Kutá Smatanová, 2003).

Proces krystalizace se skládá z nukleace, růstu krystalů a ukončení růstu krystalů. Během nukleace dochází ke vzájemnému kontaktu vhodně orientovaných molekul, respektive iontů, za vzniku amorfni sraženiny nebo submikroskopických krystalických jader. Následuje růst krystalů, kdy s povrchem krystalických jader interagují další, vhodně orientované molekuly nebo ionty, a dochází k jejich uspořádání na tomto povrchu. Tato fáze je ovlivněna rychlostí difúze molekul v oblasti růstu krystalů (tzv. difúzní stupeň) a rychlostí odčerpání pevné fáze z roztoku (tzv. depoziční stupeň). Při nízkém depozičním stupni se netvoří růstová centra, růst krystalů je pomalý nebo žádný. Naopak při vysokém depozičním stupni vzniká velké množství krystalických jader, krystaly rostou velmi rychle, jsou malé

a často s různými defekty. Ideální je, když krystaly vznikají z malého počtu stabilních krystalických jader, rostoucích volnou rychlostí bez defektů. Poslední fází je ukončení růstu krystalů, kdy malé krystaly mohou pomalu zvětšovat svůj objem a poskytnout vhodné vzorky pro rentgenovou strukturní analýzu. Může však také dojít ke vzniku velkého množství mikrokystalů, velkých multikrystalických agregátů nebo hydrofobních olejovitých agregátů. Zmíněné agregáty poukazují na to, že nepatrná změna experimentálních podmínek může vést ke vzniku žádoucích monokrystalů (Kutá Smatanová, 2003).

2.2 Princip krystalizace

K vysvětlení vzniku krystalických jader a jejich růstu se používá fázový diagram, který je zobrazen na Obr. 1. Křivka rozpustnosti (červeně) rozděluje diagram na dvě části - oblast bez saturace (bíle) a oblast saturace (barevné oblasti). Každý bod na této křivce odpovídá koncentraci, při které je roztok v rovnováze se srážecím činidlem. V oblasti pod křivkou rozpustnosti nikdy nemůže dojít ke krystalizaci. Nad křivkou je pro danou koncentraci srážecího činidla odpovídající koncentrace proteinu vždy vyšší než při rovnováze. V závislosti na kinetice vedoucí k dosažení rovnovážného stavu a stupni přesycení může být celá tato oblast rozdělena do tří zón – metastabilní, labilní a srážecí (Nemčovičová a Kutá Smatanová, 2012).



Obr. 1: Fázový diagram růstu krystalů.

Ve srážecí zóně je přebytek proteinových molekul, které se oddělují z roztoku a tvoří amorfní sraženiny. V nukleační zóně se molekuly proteinů slučují v krystaly, přičemž v blízkosti srážecí zóny se krystalizace může projevit jako velké množství mikrokystalů, což může být zaměněno se sraženinou. K vypěstování dobře uspořádaných krystalů velkých rozměrů vede tvorba nejlépe jediného jádra v nukleační zóně hned za hranicí metastabilní zóny. Během růstu jádra přechází roztok do metastabilní zóny a žádná další jádra se už neobjeví. Růst jádra se postupně zpomaluje, což pomáhá zabránit tvorbě vad, až do dosažení rovnováhy (Chirgadze, 1998; McPherson, 1990; Stura a kol., 1991).

Pro dosažení nejlepších výsledků by krystaly měly být pěstovány při nižší úrovni přesycení, než je vyžadováno pro tvorbu jader. Vysoké přesycení by vedlo ke vzniku mnoha jader, a tedy mnoha malých krystalů. Snížení stupně přesycení je důležité zejména proto, že zajistí zpomalení krystalizačního procesu, což je klíčovou podmínkou pro vypěstování krystalů s maximálním stupněm uspořádání. Stupeň přesycení lze ovlivnit změnou vlastností rozpouštědla, fyzikálně-chemických podmínek a přidáním aditiv - nejčastěji se používá snížení teploty nebo přidání anorganických a organických látek (např. glycerolu) (Nemčovičová a Kutá Smatanová, 2012).

2.3 Test před krystalizací

Před zahájením samotné krystalizace se provádí pre-krystalizační test ke stanovení vhodné koncentrace vzorku proteinu, což je klíčová krystalizační proměnná. Vzorky s vysokou koncentrací proteinu mohou vést ke vzniku amorfní sraženiny, kdežto následkem hodně zředěných vzorků mohou být jen čiré kapky. Tyto dva výsledky jsou časté pro krystalizační činidla, která nepodněcují krystalizaci, a jsou součástí většiny krystalizačních pokusů. Nicméně optimalizací koncentrace vzorku se počet čirých kapek a amorfních sraženin ve výsledcích může snížit, což vede k efektivnějšímu využití vzorku a zvyšuje šance pro úspěšnou krystalizaci (katalog Hampton Research, 2015).

Existují sady pro pre-krystalizační test, které obsahují 4 unikátní činidla. Nejdříve je vzorek proteinu smíchán se dvěma z nich ke stanovení, zda je koncentrace proteinu vhodná pro krystalizační pokusy. Pokud je protein citlivý na koncentraci soli a polymeru, test se opakuje se zbylými dvěma činidly. Výsledky pre-krystalizačního testu směřují k odpovídající koncentraci vzorku, nebo naznačují, že je třeba vykonat další diagnostické

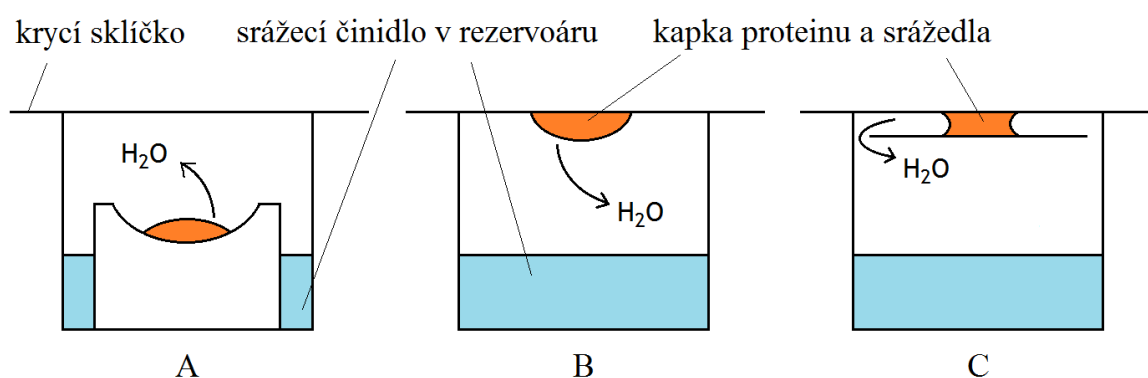
testy - např. nativní gelovou elektroforézou nebo dynamický rozptyl světla (katalog Hampton Research, 2015).

2.4 Přehled krystalizačních metod

Ke krystalizaci proteinů se využívá celá řada metod, jejichž účelem je přivést roztok proteinu do stavu přesycení (supersaturace), kdy dochází ke krystalizaci. Výběr metody je závislý na konečné koncentraci proteinu, iontové síle, koncentraci srážecího činidla a kinetice, při které je dosaženo rovnováhy (Bergfors, 1999). Rozlišují se metody základní, pokročilé a alternativní.

Základní krystalizační metody

Mezi základní krystalizační metody patří metoda sedící, visící a sendvičové kapky (*Sitting/Hanging/Sandwich Drop Vapor Diffusion*), které jsou založeny na difúzi vodních par, což je naznačeno na Obr. 2. Rezervoár je naplněn srážecím činidlem a kapka obsahuje srážedlo (precipitant) a roztok proteinu. V kapce je tedy nižší počáteční koncentrace srážedla než v rezervoáru, což iniciuje difúzi rozpouštědla (vody). Systém tak spěje do rovnovážného stavu a v kapce, kde dochází ke zvyšování koncentrace, vznikají podmínky vhodné pro růst krystalů (katalog Hampton Research, 2015).

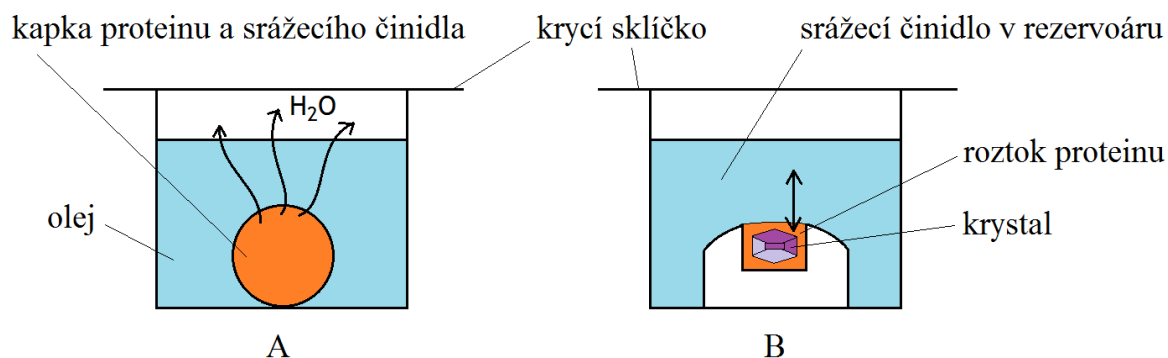


Obr. 2: Schéma krystalizační jamky pro sedící kapku (A), visící kapku (B) a sendvičovou kapku (C). Difúze vodních par je naznačena šipkou.

Další metodou je mikrokrytalizace pod olejem (*Microbatch Under Oil*), při které je kapka proteinu v kombinaci se srážecím činidlem napipetována pod vrstvou oleje - používá se

parafinový a silikonový olej, nebo jejich směs v různém poměru. Olej umožňuje pozvolné odpařování vody (katalog Hampton Research, 2015), což zobrazuje Obr. 3A.

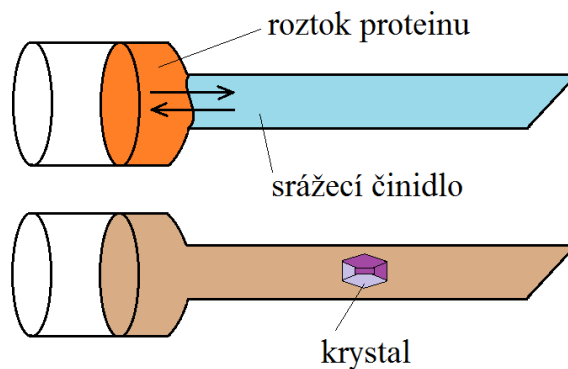
Krystalizace dialýzou (*Dialysis*) je metoda využívající dialyzační knoflík potažený polopropustnou membránou. Knoflík obsahuje vzorek proteinu a je ponořen ve srážecím činidlo. Mezi vzorkem a srážedlem dochází díky polopropustné membráně k výměně malých molekul (katalog Hampton Research, 2015), jak ukazuje Obr. 3B.



Obr. 3: Schéma krystalizační jamky pro metodu mikrokystalizace pod olejem (A) a dialýzu (B). Difúze vodních par (A) a malých molekul (B) je naznačena šipkou.

Pokročilé krystalizační metody

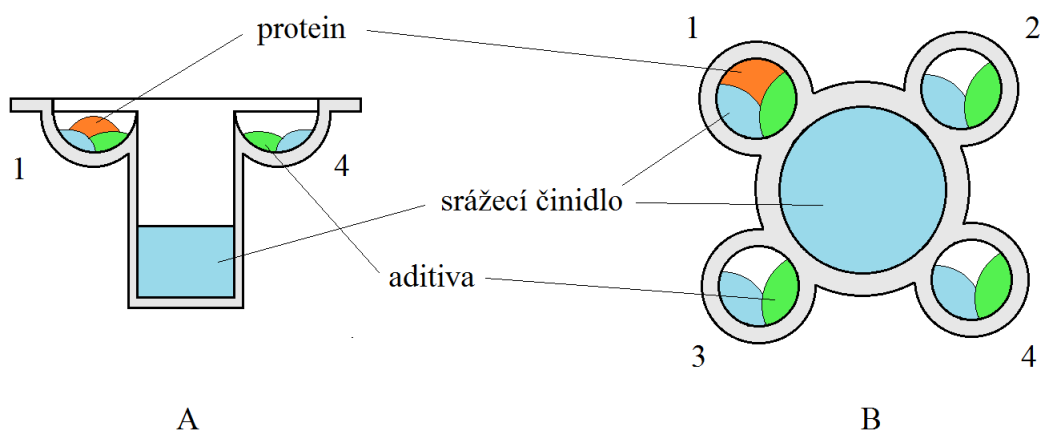
Mezi pokročilé krystalizační metody patří metoda volné difúze (*Free Interface Diffusion*), při které jsou vzorek proteinu a srážecí činidlo umístěny v malých skleněných kapilárách a jsou v přímém kontaktu. Obě komponenty se postupem času promíchávají a krystaly mohou vzniknout v místě původního rozhraní, nebo v místě vyšší či nižší koncentrace proteinu (katalog Hampton Research, 2015). Metoda je zobrazena na Obr. 4.



Obr. 4: Schéma skleněné kapiláry pro metodu volné difúze.

Alternativní krystalizační metody

Velký význam u alternativních krystalizačních metod mají různé ligandy, kofaktory a aditiva. Ve skutečnosti jakékoli přidání další látky ke krystalizační směsi vede k novým krystalizačním postupům. Tomčová a Kutá Smatanová (2006) popsaly metodu křížové krystalizace (*Cross-influence Procedure*), kterou lze provést ve formě sedící i visící kapky. Základem této metody je použití několika aditiv, která ovlivňují kvalitu a růst krystalů. Tato aditiva jsou rozmístěna ve čtyřech kapkách. Každá kapka obsahuje srážecí činidlo a vybrané aditivum. V jedné kapce je navíc i roztok proteinu, což je znázorněno na Obr. 5. Aditiva způsobují změny tlaku vodní páry a tím ovlivňují výsledek celé krystalizace (Nemčovičová a Kutá Smatanová, 2012).



Obr. 5: Schéma krystalizační jamky pro metodu křížové krystalizace ve formě sedící kapky. Pohled z boku (A) a shora (B).

2.5 Faktory ovlivňující krystalizaci

Existuje mnoho faktorů majících vliv na průběh krystalizace proteinů (na rychlost růstu a množství krystalů, na jejich velikost a kvalitu). Každý protein je unikátní a stačí změna jediné aminokyseliny, aby se zásadně změnila jeho vlastnosti. Proto podmínky vhodné pro krystalizaci jednoho konkrétního proteinu nemusí být vhodné pro jiný (Giacovazzo a kol., 2002; Lattman a kol., 2008). Nalezení vhodných podmínek pro vypěstování krystalů použitelných pro difrakční analýzu se tak stává poměrně složitou záležitostí (Nemčovičová a Kutá Smatanová, 2012).

Nejdůležitějšími faktory jsou koncentrace proteinu a koncentrace srážecího roztoku (jejich poměr v kapce), teplota a její fluktuace během krystalizace a pH. Významnou roli má použití specifických aditiv, iontová síla, rozpustnost proteinu a jeho čistota, která je ovlivňována manipulací a čistotou práce, tedy lidským faktorem (Kutá Smatanová, 2008). Dále je podstatná viskozita, výběr krystalizační metody a srážecího činidla (organická rozpouštědla, anorganické soli, polyethylenglykoly) (McPherson, 2004).

Teplota

Teplota často působí na nukleaci a růst krystalů manipulací s rozpustností a přesycením vzorku (Garavito, 1991). Ovlivňuje množství, velikost i kvalitu krystalů (Christopher, 1998).

Mnoho proteinů se liší rozpustností v závislosti na teplotě. Při nízké iontové síle se rozpustnost proteinů obvykle zvyšuje se zvyšující se teplotou. Při vysoké iontové síle jsou proteiny obecně méně rozpustné při 25°C než při 4°C (Bergfors, 1999).

Krystalizace proteinů se obvykle provádí při 4°C nebo při pokojové teplotě. Nízká teplota (4°C) je výhodná především pro teplotně labilní proteiny, protože je pomáhá stabilizovat a zabraňuje mikrobiálnímu růstu. Nicméně úspěšné krystalizace byly provedeny v rozsahu teplot od méně než 0°C do přibližně 60°C (Bergfors, 1999).

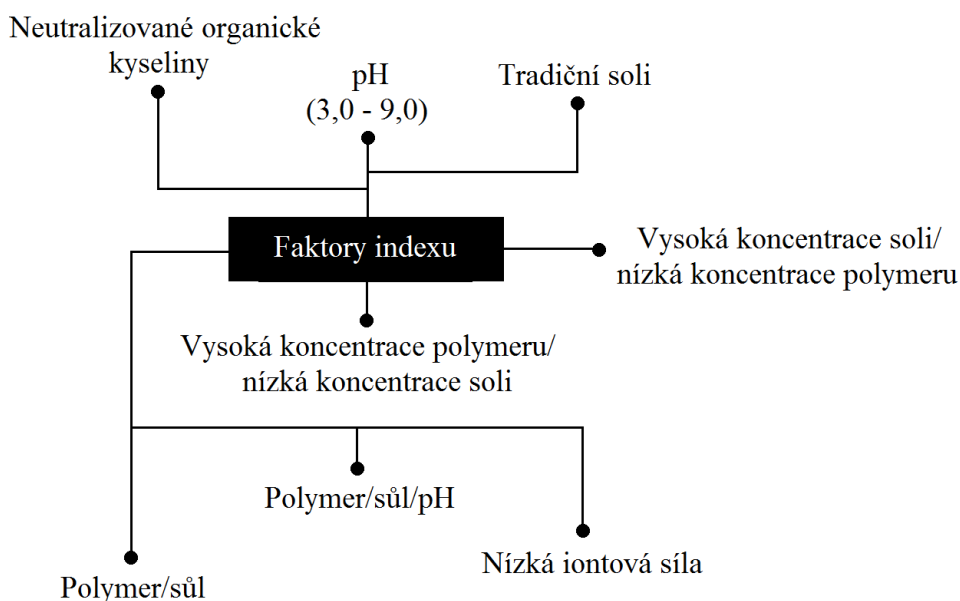
Pufry a pH

K udržování pH se používají různé pufry. Většina proteinových krystalů vzniká při pH 7,0 a směrem k zásaditějšímu i kyselejšímu pH počet krystalů klesá (McPherson a kol., 1995). Přesto se objevují krystaly i při extrémních hodnotách pH (pod 5,0 a nad 9,0), proto je výhodné pracovat s širokým rozsahem pH (Bollag a kol., 1996). Kromě samotného pH je klíčový i výběr pufru. Různé pufry při stejné hodnotě pH mohou vést k odlišným výsledkům (různé kvalitě krystalů). Navíc některé anorganické pufry (především fosfátové) přispívají ke vzniku nežádoucích krystalů soli (Bergfors, 1999).

Krystalizační činidla

K nalezení vhodných krystalizačních podmínek existuje celá řada různých sad krystalizačních činidel. Jednou z těchto sad je Index HR2-144 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] vhodný pro krystalizaci proteinů, peptidů, nukleových kyselin, komplexů a malých molekul rozpustných ve vodě. Index HR2-144 je založený na systému 96 různých

krystalizačních činidel. Obsahuje tradiční soli (např. síran amonný, chlorid sodný), neutralizované organické kyseliny (např. malonát sodný), směsi s vysokou koncentrací soli a nízkou koncentrací polymeru a naopak, činidla s nízkou iontovou silou a zahrnuje činidla s rozsahem pH od 3,0 do 9,0. Výsledkem použití tohoto systému je zjištění, která třída činidel a rozmezí pH je účinná pro produkci krystalů nebo omezení rozpustnosti daného vzorku (katalog Hampton Research, 2015). Faktory Indexu HR2-144 jsou zobrazeny na Obr. 6.



Obr. 6: Faktory systému krystalizačních činidel Index HR2-144 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA].

2.6 Krystaly proteinů vs. krystaly (an)organické

Klasické nízkomolekulární krystaly jsou uspořádané ve formě pravidelné krystalové mřížky, zatímco proteinové krystaly obsahují velkou část molekul (iontů) v neuspořádaném stavu (Marek a Trávníček, 2002). 20-80 % jejich objemu totiž tvoří molekuly rozpouštědla (Kutá Smatanová, 2008). Obecně jsou tedy krystaly proteinů méně uspořádané než anorganické krystaly a tato neuspořádanost společně s dalšími vlastnostmi, jako je gelový charakter, vysoká senzitivita na změnu teploty, pH, druh rozpouštědla a iontovou sílu, způsobují slabé difrakční vlastnosti těchto krystalů (Kutá Smatanová, 2003). Díky vysokému podílu molekul rozpouštědla v proteinových krystalech můžeme předpokládat, že

okolí makromolekuly zabudované v krystalu se příliš neliší od okolí té samé molekuly v roztoku, a tím pádem, že struktura biomolekuly určená z krystalu se příliš neliší od struktury této molekuly v živém organismu (Marek a Trávníček, 2002).

Makromolekulární krystaly jsou na rozdíl od anorganických krystalů spíše menší a mají špatné mechanické vlastnosti. Jsou velmi křehké a citlivé na vnější podmínky. Slabým tlakem se rozpadají, na vzduchu podléhají dehydrataci, což vede k jejich praskání a destrukci, vykazují slabé optické vlastnosti. Na rozdíl od rychle vznikajících krystalů solí, krystaly proteinů rostou několik dní, týdnů i měsíců. Působením radiačního záření dochází k jejich silnému poškození, proto se difrakční data získávají za použití vysokofrekvenčních zdrojů rentgenového záření, tzv. synchrotronů (Kutá Smatanová, 2003).

Při práci s proteinovými krystaly je třeba dbát maximální opatrnosti, vzhledem k jejich křehkosti. K jejich uchování je možné ponechat je v kapkách, ve kterých vznikly, umístěním do tmy, nebo se mohou zmrazit a uchovávat v tekutém dusíku. Správně uskladněné proteinové krystaly pak mohou difraktovat i po několika letech (Kutá Smatanová, 2003).

2.7 Krystalizační testy

Po získání krystalů je nutné ověřit, zda se jedná o krystaly proteinu nebo nežádoucí krystaly solí. Pufry, které se používají ke krystalizaci, jsou často málo koncentrované a nemělo by docházet ke vzniku jejich krystalů. Některé soli (např. síran amonný, fosforečnan draselnosodný) používané ve vyšších koncentracích však mohou krystalizovat místo proteinů. Ke krystalizaci solí dochází především, pokud jsou soli smíchány s precipitačními iontovými pufry (pufry s Ca^{2+}), a organickými molekulami, jejichž působení může vést ke změně rozpustnosti složek krystalizačního roztoku (Kutá Smatanová, 2003). Pro rozlišení krystalů proteinů a solí existuje několik metod:

Dehydratace (*Dehydration*)

Krystaly proteinů obsahují 20-80 % rozpouštědla (Kutá Smatanová, 2008), proto po vyjmutí z kapky snadno podléhají dehydrataci. Naopak anorganické krystaly mají nízký obsah rozpouštědla a po vyjmutí z kapky nedojde k jejich zničení ani změně vzhledu

(katalog Hampton Research, 2015). Tato metoda vede k destrukci, proto se provádí jen při dostatečném množství krystalů.

Fyzická manipulace (*Crush test*)

Další destrukční metodou je fyzická manipulace s krystalem. Při dotyku s jehlou se proteinové krystaly velmi snadno rozpadnou na velké množství malých kusů, zatímco anorganické krystaly se rozpadají jen za použití větší síly a na méně kusů (katalog Hampton Research, 2015).

Dvojlom světla (*Birefringence*)

Krychlové proteinové krystaly pod zkříženými polarizátory vykazují jen slabě dva různé indexy lomu světla, naopak anorganické krystaly silně způsobují dvojlom světla. Dvojlom světla vykazují i některé plastové materiály, proto se tato metoda provádí v celoskleněném prostředí (katalog Hampton Research, 2015).

Absorpce barviva (*Dye test*)

Krystaly proteinů obsahují solventní kanály, kterými do nich mohou pronikat malé molekuly barviva, což způsobí zabarvení krystalů. Anorganické krystaly tyto kanály neobsahují a po přidání barviva se jejich barva nemění (katalog Hampton Research, 2015).

K tomuto testu se využívá modré barvivo Izit HR4-710 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA], které obarví krystaly proteinu přibližně za hodinu po aplikaci do kapky (katalog Hampton Research, 2015).

Kontrolní experiment (*Control experiment*)

Kontrolní experiment spočívá v zopakování postupu, který vedl ke vzniku krystalů. Použije se stejný pufr, krystalizační činidlo a krystalizační metoda. Vzorek proteinu se nahradí destilovanou vodou. V případě, že i bez přítomnosti vzorku proteinu dojde ke vzniku vizuálně podobných krystalů, pravděpodobně se jedná o krystaly soli (katalog Hampton Research, 2015).

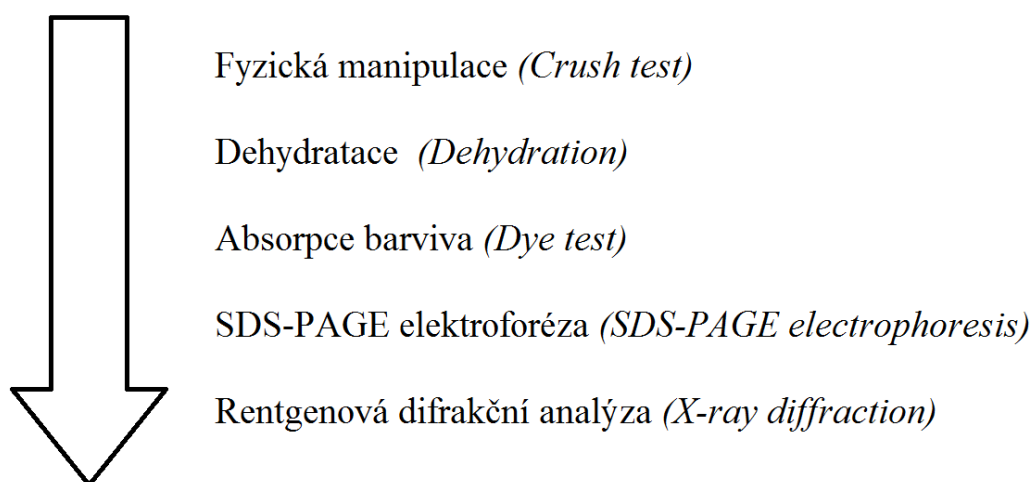
SDS-PAGE elektroforéza (*SDS-PAGE electrophoresis*)

Získané krystaly se rozpustí a provede se SDS-PAGE elektroforéza. Proteinové krystaly zůstanou v gelu v místě odpovídajícím jejich molekulové hmotnosti. Krystaly solí proběhnou celým gelem (katalog Hampton Research, 2015).

Rentgenová difrakční analýza (*X-ray diffraction*)

Získání rentgenových difrakčních snímků je nejspolehlivější metodou k rozlišení krystalů proteinu a solí (Kutá Smatanová, 2003). Pro protein je typický difrakční snímek s velkým množstvím difrakcí umístěných v soustředných kruzích, zatímco pro sůl je typické malé množství difrakcí (Emmer, 2007).

Podle Kuté Smatanové (2003) roste spolehlivost testů k rozlišení krystalů proteinů a solí v pořadí naznačeném šipkou na Obr. 7.



Obr. 7: Rostoucí spolehlivost testů rozlišujících proteinové krystaly a krystaly solí.

2.8 Makromolekulární databáze

Struktury biologických makromolekul, včetně krystalografických informací a rentgenových difrakčních dat, jsou deponovány do online databází. Jedna z nejvíce používaných databází ve strukturní biologii je databáze RCSB PDB (Protein Data Bank), která byla založena v roce 1971 (Henderson a kol., 2012). RCSB PDB je celosvětový zdroj informací o 3D strukturách biologických makromolekul (proteinů, nukleových kyselin, makromolekulárních komplexů). Tato databáze je dostupná pro všechny uživatele zdarma

a její obsah je každý týden aktualizován. K datu 2. 4. 2016 RCSB PDB obsahovala 117 438 struktur biologických makromolekul (RCSB PDB, 2016).

RCSB PDB vytváří nástroje a prostředky pro výzkum a vzdělávání v oblasti molekulární biologie, strukturní biologie, výpočetní biologie aj. Uživatelé databáze pocházejí z různých oblastí vědy - biologie, chemie, fyzika a informatika (Berman a kol., 2014).

Užitečnost a jednotnost dat RCSB PDB umožnily rozvoj dalších databází a informačních zdrojů: databáze zaměřené na malé molekuly a ligandy (ChEMBL, DrugBank, BindingDB, BindingMOAD, PDBBind), databáze s klasifikací proteinových struktur (Cath, SCOP, PDBsum) a speciálně zaměřené databáze (PDBTM - transmembránové proteiny, ArchDB - funkční smyčky ve struktuře, 3did - povrchové interakce protein-protein) (Berman a kol., 2014).

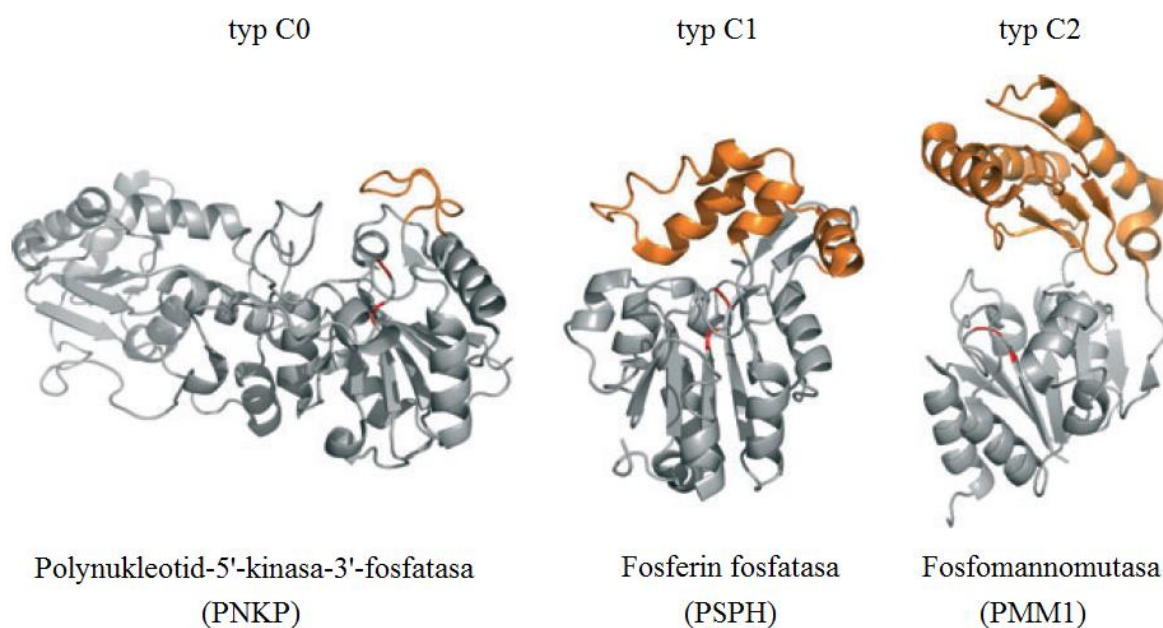
2.9 Halogenaciddehalogenasy

Průmyslová výroba a chemické odvětví jsou zodpovědné za přibývající množství cizorodých látek (xenobiotik) v biosféře. Přestože je metabolická všestrannost mikrobiálních společenstev obrovská, ne vždy se daří xenobiotika degradovat. Např. substituce halogenů může vést ke zvyšování toxicity halogenovaných organických sloučenin (Furukawa, 2006), které představují významnou část průmyslově používaných rozpouštědel, herbicidů a pesticidů. Tyto látky se staly cílem řady bioremediačních výzkumných projektů zaměřených na odstraňování xenobiotik ze zamořených oblastí, například pomocí působení živých organismů. Jako užitečné se prokázaly dehalogenasy, mikrobiální enzymy, schopné štěpit vazbu uhlík-halogen (Weightman a kol., 2002). Dehalogenasy zahrnují několik skupin enzymů mj. halogenaciddehalogenasy.

Nadrodina (*superfamily*) halogenaciddehalogenas (HAD) je tvořena řadou enzymů s různou substrátovou specifitou. Jedná se o jednu z největších nadrodin enzymů. V současnosti je známo více než 130 000 druhů (Pandya a kol., 2014), které se vyskytují ve všech třech doménách živých organismů – *Archaea*, *Bacteria* a *Eukaryota* (Koonin a Tatusov, 1994). Enzymy této nadrodiny katalyzují celou řadu reakcí, mohou mít aktivitu fosfoesterasovou, fosfonatasovou, ATPasovou, dehalogenasovou, fosfomutasovou, i když převážná část z nich (téměř 99 %) jsou fosfotransferasy (Burroughs a kol., 2006), jejichž

sekvenční podobnost je často nižší než 15 % (Seifried a kol., 2012). Necelé 1 % tvoří enzymy katalyzující dehalogenační reakce (Burroughs a kol., 2006).

Společnou vlastností halogenaciddehalogenas je Rossmanova doména, obsažená v jejich struktuře. Ve struktuře enzymů se také vyskytují víčkové (*cap*) domény, které jsou zodpovědné za strukturální a funkční rozmanitost (Allen, 2004; Allen, 2009). Architektura víčkových domén se liší i mezi nejbližšími strukturálními homology (Rao a kol., 2006). V závislosti na přítomnosti, topologii a umístění víčkových domén jsou halogenaciddehalogenasy děleny do tří podrodin (Morais a kol., 2000; Tremblay a kol., 2006; Zhang a kol., 2002). První podrodina obsahuje v jádru Rossmanovy domény malou α -helikální víčkovou doménu vloženou mezi smyčku 1 a smyčku 2 (typ C1), u druhé je větší β -list mezi smyčkou 2 a 3 (typ C2), zatímco u třetí podrodiny žádná vsuvka není (typ C0) (Selengut a Levine, 2000; Shin a kol., 2003). Strukturální diverzita halogenaciddehalogenas je zobrazena na Obr. 8.



Obr. 8: Rentgenová krystalová struktura PNKP (typ C0), PSHP (typ C1) a PMM1 (typ C2). Víčkové domény jsou znázorněny oranžově (*převzato a upraveno z: Seifried a kol., 2013*).

2.10 Putativní halogenaciddehalogenasa Tt81

Mezi experimentálně charakterizovanými a nově sekvenovanými proteiny se standardně porovnává sekvenční podobnost prostřednictvím programu BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul, 1997). V případě, že u nich nelze přesně určit sekvenční podobnost, jsou tyto proteiny označeny jako hypotetické nebo putativní (Huang a kol., 2015). Stejně tomu je v případě proteinu Tt81.

Putativní halogenaciddehalogenasa Tt81 byla objevena v bakteriích druhu *Thermococcus thio-reducens*. Rod *Thermococcus* byl vytvořen v roce 1983 a v roce 2007 zahrnoval 26 platně zveřejněných druhů. Organismy tohoto rodu jsou extrémně teplomilné a anaerobní (Pikuta a kol., 2007). Jejich typickou oblastí výskytu jsou hydrotermální prameny (sopečné fumaroly, gejzíry, hlubinné hydrotermální průduchy), oblasti hluboko pod zemí a ropné vrty (Miroshnichenko a kol., 2001; Stetter a kol., 1993; Takahata a kol., 2000). Většina z nich optimálně roste v neutrálním nebo ve slabě kyselém pH. Bakterie *Thermococcus thio-reducens* byly schopné růst v rozsahu pH 5,0 - 8,5, při teplotním rozmezí 55 - 94°C, za přítomnosti chloridu sodného o koncentraci 1 - 3% (Pikuta a kol., 2007).

Informace, které jsou zatím známy o proteinu Tt81, zahrnují pouze aminokyselinovou a genetickou sekvenci, molekulovou hmotnost, počet a zastoupení jednotlivých aminokyselin a teoretický izoelektrický bod. Všechny tyto informace jsou uvedeny v Přílohách.

3. Materiál a metody

Cílem bakalářské práce bylo nalézt krystalizační podmínky a vykristalizovat nově objevený protein Tt81, který je považován za halogenaciddehalogenasu, ačkoli toto tvrzení zatím nebylo ověřeno.

Práce také zahrnuje krystalizaci modelového proteinu lysozymu, jehož krystalizační podmínky jsou už známé. Lysozym byl využit za účelem seznámení se a zvládnutí základních i pokročilých krystalizačních metod. Ze základních metod byla vyzkoušena metoda sedící kapky, metoda visící kapky a mikrokrystalizace pod olejem. Z pokročilých metod byla vyzkoušena volná difúze v kapilárách. Dalším krokem bylo hledání krystalizačních podmínek proteinu Tt81 z *Thermococcus thio-reducens*, k čemuž byla použita metoda sedící kapky a mikrokrystalizace pod olejem. Kromě proteinových krystalů byly pěstovány i krystaly anorganické pro následné porovnání jejich vlastností a otestování jejich původu. Veškeré výsledky byly zaznamenány a vyfoceny, aby mohlo dojít k náležitému vyhodnocení.

3.1 Krystalizace lysozymu

Příprava krystalizačních roztoků

Pro krystalizaci lysozymu byl připraven 10% roztok chloridu sodného, rozpuštěním této látky v 0,1 M roztoku octanu sodného o pH 4,7. Z tohoto roztoku byla připravena sada roztoků (3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%) přidáním destilované vody v příslušných poměrech. Jako další krystalizační roztoky byly použity již hotové roztoky: 20% PEG 3350 a 14,4% PEG 8000.

Naředění lysozymu

Modelový protein byl z původní koncentrace 100 mg/ml naředěn octanovým pufrům o pH 4,7 na hodnoty: 75 mg/ml, 50 mg/ml a 25 mg/ml pro následné posouzení, která z těchto koncentrací je pro krystalizaci nejvhodnější.

Vlastní krystalizace

Ke krystalizaci lysozymu byla použita metoda sedící a visící kapky, metoda mikrokrystalizace pod olejem a volná difúze v kapilárách. K provedení experimentů byly použity připravené krystalizační roztoky, naředěný lysozym, příslušné krystalizační destičky a automatické mikropipety. Všechny experimenty byly provedeny při pokojové teplotě (20°C).

Metoda sedící kapky

Metodou sedící kapky byly provedeny dva pokusy. Při prvním krystalizačním experimentu byly testovány čtyři různé koncentrace roztoku lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml) a šest koncentrací krystalizačního roztoku chloridu sodného (3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%). Ve druhém pokusu byl použit roztok lysozymu o koncentraci 50 mg/ml a tři různá krystalizační činidla (10% NaCl, 20% PEG 3350, 14,4% PEG 8000). V obou případech byly rezervoáry krystalizačních destiček naplněny 200 μ l daného krystalizačního činidla a kapky obsahovaly 2 μ l roztoku proteinu a 2 μ l roztoku z rezervoáru. V Tab. 1 pro první pokus a v Tab. 2 pro druhý pokus je znázorněno, jak byly roztoky proteinu a krystalizačních činidel pipetovány do krystalizačních destiček.

Tab. 1: Schéma prvního pokusu metodou sedící kapky pro lysozym.

	krystalizační roztok NaCl					
lysozym	3%	4%	5%	6%	7%	8%
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl

Tab. 2: Schéma druhého pokusu metodou sedící kapky pro lysozym.

	krystalizační roztok		
lysozym	10% NaCl	20% PEG 3350	14,4% PEG 8000
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG

Metoda visící kapky

Metoda visící kapky byla použita v případě, při kterém byly testovány tři různá krystalizační činidla (10% NaCl, 20% PEG 3350, 14,4% PEG 8000) a lysozym o koncentraci 50 mg/ml. Rezervoár byl naplněn 200 μ l krystalizačního činidla a kapka obsahovala ve všech případech 2 μ l lysozymu a 2 μ l činidla z rezervoáru. Schéma pokusu je znázorněno v Tab. 3.

Tab. 3: Schéma pokusu metodou visící kapky pro lysozym.

krystalizační roztok	lysozym 50 mg/ml
10% NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
20% PEG 3350	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG
14,4% PEG 8000	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG

Mikrokrystalizace pod olejem

Pro metodu mikrokrystalizace pod olejem byl použit parafinový olej, čtyři různé koncentrace lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml) a jako krystalizační činidlo byl použit roztok chloridu sodného (3% a 8%). Krystalizační destička byla zalita parafinovým olejem, pod jehož vrstvou pak byly napipetovány kapky tak, aby obsahovaly 2 μ l lysozymu a 2 μ l činidla. Schéma pokusu je znázorněno v Tab. 4.

Tab. 4: Schéma pokusu metodou mikrokrytalizace pod olejem pro lysozym.

lysozym	krystalizační roztok	
	3% NaCl	8% NaCl
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl

Volná difúze v kapilárách

Jedinou pokročilou metodou použitou pro krystalizaci lysozymu byla volná difúze. Pro tuto metodu byly použity tři skleněné kapiláry o různém průměru (0,2 mm, 0,5 mm, 1,0 mm). Užší části kapilár byly samovolným vztlínáním naplněny roztokem lysozymu o koncentraci 75 mg/ml, užší konec byl pak utěsněn voskem. Širší části kapilár byly naplněny 30 μ l krystalizačního činidla (3% NaCl) a druhý konec byl také utěsněn voskem. Schéma naplnění kapilár je znázorněno v Tab. 5.

Tab. 5: Schéma pokusu metodou volné difúze v kapilárách pro lysozym.

průměr kapiláry [mm]		
0,2	0,5	1,0
30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml	30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml	30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml

3.2 Krystalizace Tt81

Vzorek proteinu Tt81

Vzorek proteinu Tt81 pro krystalizační experimenty byl připraven v iXpressGenes, Inc. (Huntsville, Alabama, USA).

K namnožení plazmidu a jeho sekvenování byly použity bakterie *Escherichia coli*, kmen DH5 α . Pro genovou expresi proteinu byly použity kmenové buňky *E. coli* BL21

CodonPlus-(DE3)-RIL [Stratagene, La Jolla, CA, USA] a plazmid pET-24a(+) [Novagen, Madison, USA]. Kmeny buněk *E. coli* byly kultivovány v médiu Luria-Bertani s karbenicilinem (100 µg/ml) a chloramfenikolem (35 µg/ml) (dále jen kultivační médium) při 37°C.

Příprava linearizovaného plazmidu

pET3a plazmid [Novagen, Madison, USA] byl dvojitě štěpen pomocí restričních endonukleáz NdeI a BamHI [Promega, Madison, WI, USA]. Rozštěpený plazmid byl purifikován s použitím purifikační soupravy QIAquick PCR [Qiagen, Valencia, CA, USA]. Pro změnu lepivých konců plazmidu na tupé byl použit Klenowův fragment [Promega, Madison, WI, USA] a dále byl plazmid znovu purifikován. Výsledný fragment pET3a byl použit pro homologní rekombinaci.

Klonování a exprese dehalogenasového genu

Hypertermofilní mořský archaeon *Thermococcus thioreducens* byl pěstován pro následnou extrakci genomové DNA. Primery s překrývající se oblastí Pet3a vektoru byly navrženy k amplifikaci dehalogenasového genu z *Thermococcus thioreducens* následovně: forward primer: 5'-ttgtttaactttaagaaggagatatacatATGATAAAGGCCGTGTTCTT-3', reverse primer: 5'-cttccttctgggctttgttagcagccgcatccTCAACCAGCATGAACTTCCT-3'.

100 ng PCR produktu a 20 ng linearizovaného plazmidu Pet3a bylo vloženo do kmene *E. coli* DH5α pro získání expresního plazmidu homologní rekombinací *in vivo*. Pozitivní klony byly potvrzeny DNA sekvenováním. Rekombinantní plazmid byl následně transformován do *E. coli* BL21 (DE3) pro expresi genu. Buňky *E. coli* byly kultivovány ve 100 ml kultivačního média při 37°C po 16-18 hodin, aby se získala startovací kultura. Kultura byla centrifugována, resuspendována ve 4 litrech kultivačního média při 37°C. Genová exprese byla indukována 0,5 mM isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosidem (IPTG), když optická hustota při 600 nm dosáhla hodnoty 0,6. Buňky byly sklizeny po 18 až 20 hodinách indukce při 18°C.

Dehalogenasový gen byl amplifikován z genomové DNA *Thermococcus thioreducens* pomocí PCR s použitím reverse primeru (5'-ttgtttaactttaagaaggagatatacatATGCCGTTTCGAGATAGTTTTT-3') a forward primeru (5'-cttccttctgggctttgttagcagccgcatccTTAATCCTCTACACGCGGTGC-3') (Operon, Huntsville, Alabama, USA). Primery byly navrženy podle přesného srovnání 21 prvních a 21

posledních nukleotidů otevřeného čtecího rámce (*open reading frame*) dehalogenasového genu (velká písmena). Před oligonukleotidové primery byly vloženy sekvenční homology odpovídající 30 a 32 nukleotidům expresního plazmidového vektoru pET3a [Novagen, Madison, USA] (malá písmena) obsahující NdeI a BamHI inzerční místo. K subklonování PCR produktu do pET3a vektoru [Novagen, Madison, USA] použitím homologní rekombinace *in vivo*, bylo vloženo společně 150 ng amplifikovaného genu a 50 ng linearizovaného vektoru pET3a s tupými konci (Novagen) do kmene *E. coli* DH5a a výsledný expresní plazmid byl namnožen prostřednictvím homologní rekombinace *in vivo*. Pozitivní klony byly potvrzeny DNA sekvenováním.

Rekombinantní expresní plazmid byl následně vložen do kmene *E. coli* BL21 (DE3) pro genovou expresi.

Rekombinantní kmeny BL21 (DE3) byly kultivovány ve 100 ml kultivačního média při 37°C po dobu 16 až 18 hodin, aby se získala startovací kultura. Kultura byla odstředěna centrifugou, resuspendována a dále kultivována ve 4 litrech kultivačního média při 37°C. Genová exprese byla indukována 0,5 mM isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosidem (IPTG), když optická hustota při 600 nm dosáhla hodnoty 0,6. Indukce pokračovala při 18°C po dobu 18 až 20 hodin.

Purifikace dehalogenasy

Buňky byly sklizeny centrifugací. Buněčné pelety byly resuspendovány v pufru A (50 mM Tris-acetát, 50 mM síran amonný) a lyzovány sonikací (3 cykly po 45 pulzech) za použití sonikátoru Branson Sonifier 250 [VWR Scientific, West Chester, PA, USA]. Buněčný odpad byl odstraněn centrifugací (17 000 g, 40 min). Supernatant byl zahříván po dobu 30 minut při 75°C a sraženina se odstranila centrifugací (17 000 g, 5 min). Supernatant byl nanesen na aniontovou kolonu BioRad Q sepharose [BioRad, USA] ekvilibrovanou pufrům A. Protein byl následně eluován s gradientem 0,05-1 M síranem amonným v pufru B (50 mM Tris-acetát, 0,5 M síran amonný) pomocí nízko tlakového systému [BioRad, USA]. Eluát obsahující protein s očekávanou molekulovou hmotností byl dále koncentrován za použití koncentrátoru Millipore Ultra. Koncentrovaný protein byl použit pro gelovou chromatografii s použitím gelové filtrační kolony Sephacryl S-200 [GE Healthcare], která byla ekvilibrovaná pufrům C (50 mM HEPES-NaOH, pH 7,5, 100 mM NaCl). Frakce odpovídající hlavnímu píku byly analyzovány použitím SDS-PAGE elektroforézy. Frakce s čistým jediným pruhem při očekávané molekulové hmotnosti byly

shromážděny, sloučeny a koncentrovány pro následnou analýzu enzymatické aktivity a krystalizační experimenty.

Gelová SDS-PAGE elektroforéza

Před zahájením krystalizačních experimentů byla čistota proteinu zkontrolována pomocí gelové SDS-PAGE elektroforézy. Jedná se o biochemickou metodu sloužící k separaci proteinů na základě jejich rozdílné molekulové hmotnosti, s použitím polyakrylamidového gelu a dodecylsírany sodného (SDS). Tato metoda se používá k charakterizaci proteinů - jednak ke stanovení molekulové hmotnosti proteinu, také k určení čistoty proteinu, která je jedním z nejdůležitějších krystalizačních parametrů.

Do sestavené aparatury pro elektroforézu byl mezi dvě sklíčka automatickou pipetou nanesen 10% roztok spodního separačního gelu (*Running Gel Solution*), který obsahoval:

- 4 ml H₂O
- 3,3 ml 30% akrylamidu (směs 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
- 0,004 ml TEMED

Po 30 minutách byl na ztuhlý spodní separační gel nanesen roztok zaostřovacího gelu (*Stacking Gel Solution*), připravený z:

- 1,4 ml H₂O
- 0,33 ml 30% akrylamidu (směs 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
- 0,002 ml TEMED

Do zaostřovacího gelu byl umístěn plastový hřeben pro vytvoření jamek k nanášení vzorků. Po zatuhnutí gelu (po hodině) byl hřeben vyjmut a elektroforetická komora byla naplněna elektrodoým puřrem (*Running Buffer*), který byl řipravený z:

- 1000 ml H₂O
- 15,1 g Tris
- 72 g glycinu
- 5 g SDS

Vzorek proteinu Tt81 byl smřchán v poměru 1:1 a 5:1 se vzorkovým puřrem (*Sample Buffer*) a zahříván po dobu 15 minut při teplotě 65°C. Vzorkový puřr byl řipraven z:

- 24 ml 0,5 M Tris o pH 6,8
- 16 ml glycerolu
- 2 g 10% SDS
- 10 mg 0,1% bromfenolové modři
- 10 ml β-merkapt ethanolu

Do první a druhé jamky byl napipetován řipravený vzorek proteinu Tt81 (5:1 a 1:1). Do třetí jamky byl napipetován standard (*marker*) Unstained Protein Molecular Weight Marker [Thermo Fisher Scientific, Inc., Praha], který slouží k určení molekulové hmotnosti vzorků. Poté byl do aparatury zaveden stejnosměrný elektrický proud o napětí 250 V. Po 30 minutách byla elektroforéza ukončena, gel byl vyjmut z aparatury a vložen do nádoby s roztokem barviva Coomassie Blue (0,5 g Coomassie Blue G-250, 200 ml kyseliny octové, 1800 ml destilované vody). Po obarvení byl gel oplachován odbarvovacím roztokem (*Destaining Solution*) (5000 ml H₂O, 250 ml ethanolu, 350 ml kyseliny octové) a v tomto roztoku byl ještě několik hodin ponechán. Poté byla pořizena fotodokumentace gelu.

Krystalizační řinidla

Pro krystalizaci proteinu Tt81 byla použita sada komerčně dostupných krystalizačních řinidel Index HR2-144 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA], již zmíněná v kapitole 2.5. Složení všech použitých řinidel je uvedeno v Přílohách. Řinidla říslo 15 a 16 nebyla k dispozici.

Naředění proteinu Tt81

Původní koncentrace vzorku proteinu Tt81 byla přibližně 40 mg/ml. Protein byl ředěn až v průběhu pokusů, protože se objevila precipitace, nejdříve na koncentraci přibližně 20 mg/ml a později na 10 mg/ml. K jeho naředění byl použit 0,1 M roztok MES o pH 6,0.

Vlastní krystalizace

Pro krystalizaci proteinu Tt81 byla využita metoda sedící kapky a metoda krystalizace pod olejem. Krystalizační experimenty probíhaly při pokojové teplotě (20°C).

Metoda sedící kapky

Krystalizace metodou sedící kapky byla provedena v 9 krystalizačních destičkách Linbro [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] (I až IX), přičemž každá obsahuje 24 jamek (u krystalizačních destiček I a II bylo využito jen 12 jamek). Pro krystalizaci byl použit protein Tt81 o přibližné koncentraci 40 mg/ml (I. destička), 20 mg/ml (II., III., IV. a V. destička) a 10 mg/ml (VI., VII., VIII. a IX. destička). Krystalizačními činidly byla činidla ze sady Index HR2-144 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] - celkem 94 činidel. Rezervoáry destiček byly naplněny 500 μ l jednotlivých krystalizačních činidel a kapky obsahovaly 1 μ l nebo 2 μ l proteinu Tt81 a 1 μ l činidla z rezervoáru. Poměr v kapkách byl tedy 1:1 nebo 2:1. V následujících tabulkách (Tab. 6 až 14) jsou znázorněny schémata krystalizačních destiček I až IX. Krystalizační činidla jsou uváděna číselně, jejich složení je uvedeno v Přílohách.

Tab. 6: Schéma krystalizační destičky I, metoda sedící kapky, Tt81.

	krystalizační činidlo č.:		
Tt81 40 mg/ml	1	2	3
	2 μ l Tt81 + 1 μ l 1	2 μ l Tt81 + 1 μ l 2	2 μ l Tt81 + 1 μ l 3
	4	5	6
	2 μ l Tt81 + 1 μ l 4	2 μ l Tt81 + 1 μ l 5	2 μ l Tt81 + 1 μ l 6
	7	8	9
	2 μ l Tt81 + 1 μ l 7	2 μ l Tt81 + 1 μ l 8	2 μ l Tt81 + 1 μ l 9
	10	11	12
	2 μ l Tt81 + 1 μ l 10	2 μ l Tt81 + 1 μ l 11	2 μ l Tt81 + 1 μ l 12
	2:1		

Tab. 7: Schéma krystalizační destičky II, metoda sedící kapky, Tt81.

	krystalizační činidlo č.:		
	1	2	3
Tt81 20 mg/ml	1 μ l Tt81 + 1 μ l 1	1 μ l Tt81 + 1 μ l 2	1 μ l Tt81 + 1 μ l 3
	4	5	6
	1 μ l Tt81 + 1 μ l 4	1 μ l Tt81 + 1 μ l 5	1 μ l Tt81 + 1 μ l 6
	7	8	9
	1 μ l Tt81 + 1 μ l 7	1 μ l Tt81 + 1 μ l 8	1 μ l Tt81 + 1 μ l 9
	10	11	12
	1 μ l Tt81 + 1 μ l 10	1 μ l Tt81 + 1 μ l 11	1 μ l Tt81 + 1 μ l 12
		1:1	

Tab. 8: Schéma krystalizační destičky III, metoda sedící kapky, Tt81.

	krystalizační činidlo č.:					
	13		14		15	
Tt81 20 mg/ml	1 μ l Tt81 + 1 μ l 13	2 μ l Tt81 + 1 μ l 13	1 μ l Tt81 + 1 μ l 14	2 μ l Tt81 + 1 μ l 14	/	
	16		17		18	
	/		1 μ l Tt81 + 1 μ l 17	2 μ l Tt81 + 1 μ l 17	1 μ l Tt81 + 1 μ l 18	2 μ l Tt81 + 1 μ l 18
	19		20		21	
	1 μ l Tt81 + 1 μ l 19	2 μ l Tt81 + 1 μ l 19	1 μ l Tt81 + 1 μ l 20	2 μ l Tt81 + 1 μ l 20	1 μ l Tt81 + 1 μ l 21	2 μ l Tt81 + 1 μ l 21
	22		23		24	
	1 μ l Tt81 + 1 μ l 22	2 μ l Tt81 + 1 μ l 22	1 μ l Tt81 + 1 μ l 23	2 μ l Tt81 + 1 μ l 23	1 μ l Tt81 + 1 μ l 24	2 μ l Tt81 + 1 μ l 24
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1

Tab. 9: Schéma krystalizační destičky IV, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 20 mg/ml		25		26		27	
		1 µl Tt81 + 1 µl 25	2 µl Tt81 + 1 µl 25	1 µl Tt81 + 1 µl 26	2 µl Tt81 + 1 µl 26	1 µl Tt81 + 1 µl 27	2 µl Tt81 + 1 µl 27
		28		29		30	
		1 µl Tt81 + 1 µl 28	2 µl Tt81 + 1 µl 28	1 µl Tt81 + 1 µl 29	2 µl Tt81 + 1 µl 29	1 µl Tt81 + 1 µl 30	2 µl Tt81 + 1 µl 30
		31		32		33	
		1 µl Tt81 + 1 µl 31	2 µl Tt81 + 1 µl 31	1 µl Tt81 + 1 µl 32	2 µl Tt81 + 1 µl 32	1 µl Tt81 + 1 µl 33	2 µl Tt81 + 1 µl 33
		34		35		36	
		1 µl Tt81 + 1 µl 34	2 µl Tt81 + 1 µl 34	1 µl Tt81 + 1 µl 35	2 µl Tt81 + 1 µl 35	1 µl Tt81 + 1 µl 36	2 µl Tt81 + 1 µl 36
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 10: Schéma krystalizační destičky V, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 20 mg/ml		37		38		39	
		1 µl Tt81 + 1 µl 37	2 µl Tt81 + 1 µl 37	1 µl Tt81 + 1 µl 38	2 µl Tt81 + 1 µl 38	1 µl Tt81 + 1 µl 39	2 µl Tt81 + 1 µl 39
		40		41		42	
		1 µl Tt81 + 1 µl 40	2 µl Tt81 + 1 µl 40	1 µl Tt81 + 1 µl 41	2 µl Tt81 + 1 µl 41	1 µl Tt81 + 1 µl 42	2 µl Tt81 + 1 µl 42
		43		44		45	
		1 µl Tt81 + 1 µl 43	2 µl Tt81 + 1 µl 43	1 µl Tt81 + 1 µl 44	2 µl Tt81 + 1 µl 44	1 µl Tt81 + 1 µl 45	2 µl Tt81 + 1 µl 45
		46		47		48	
		1 µl Tt81 + 1 µl 46	2 µl Tt81 + 1 µl 46	1 µl Tt81 + 1 µl 47	2 µl Tt81 + 1 µl 47	1 µl Tt81 + 1 µl 48	2 µl Tt81 + 1 µl 48
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 11: Schéma krystalizační destičky VI, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		49		50		51	
		1 µl Tt81 + 1 µl 49	2 µl Tt81 + 1 µl 49	1 µl Tt81 + 1 µl 50	2 µl Tt81 + 1 µl 50	1 µl Tt81 + 1 µl 51	2 µl Tt81 + 1 µl 51
		52		53		54	
		1 µl Tt81 + 1 µl 52	2 µl Tt81 + 1 µl 52	1 µl Tt81 + 1 µl 53	2 µl Tt81 + 1 µl 53	1 µl Tt81 + 1 µl 54	2 µl Tt81 + 1 µl 54
		55		56		57	
		1 µl Tt81 + 1 µl 55	2 µl Tt81 + 1 µl 55	1 µl Tt81 + 1 µl 56	2 µl Tt81 + 1 µl 56	1 µl Tt81 + 1 µl 57	2 µl Tt81 + 1 µl 57
		58		59		60	
		1 µl Tt81 + 1 µl 58	2 µl Tt81 + 1 µl 58	1 µl Tt81 + 1 µl 59	2 µl Tt81 + 1 µl 59	1 µl Tt81 + 1 µl 60	2 µl Tt81 + 1 µl 60
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 12: Schéma krystalizační destičky VII, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		61		62		63	
		1 µl Tt81 + 1 µl 61	2 µl Tt81 + 1 µl 61	1 µl Tt81 + 1 µl 62	2 µl Tt81 + 1 µl 62	1 µl Tt81 + 1 µl 63	2 µl Tt81 + 1 µl 63
		64		65		66	
		1 µl Tt81 + 1 µl 64	2 µl Tt81 + 1 µl 64	1 µl Tt81 + 1 µl 65	2 µl Tt81 + 1 µl 65	1 µl Tt81 + 1 µl 66	2 µl Tt81 + 1 µl 66
		67		68		69	
		1 µl Tt81 + 1 µl 67	2 µl Tt81 + 1 µl 67	1 µl Tt81 + 1 µl 68	2 µl Tt81 + 1 µl 68	1 µl Tt81 + 1 µl 69	2 µl Tt81 + 1 µl 69
		70		71		72	
		1 µl Tt81 + 1 µl 70	2 µl Tt81 + 1 µl 70	1 µl Tt81 + 1 µl 71	2 µl Tt81 + 1 µl 71	1 µl Tt81 + 1 µl 72	2 µl Tt81 + 1 µl 72
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 13: Schéma krystalizační destičky VIII, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		73		74		75	
		1 µl Tt81 + 1 µl 73	2 µl Tt81 + 1 µl 73	1 µl Tt81 + 1 µl 74	2 µl Tt81 + 1 µl 74	1 µl Tt81 + 1 µl 75	2 µl Tt81 + 1 µl 75
		76		77		78	
		1 µl Tt81 + 1 µl 76	2 µl Tt81 + 1 µl 76	1 µl Tt81 + 1 µl 77	2 µl Tt81 + 1 µl 77	1 µl Tt81 + 1 µl 78	2 µl Tt81 + 1 µl 78
		79		80		81	
		1 µl Tt81 + 1 µl 79	2 µl Tt81 + 1 µl 79	1 µl Tt81 + 1 µl 80	2 µl Tt81 + 1 µl 80	1 µl Tt81 + 1 µl 81	2 µl Tt81 + 1 µl 81
		82		83		84	
		1 µl Tt81 + 1 µl 82	2 µl Tt81 + 1 µl 82	1 µl Tt81 + 1 µl 83	2 µl Tt81 + 1 µl 83	1 µl Tt81 + 1 µl 84	2 µl Tt81 + 1 µl 84
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 14: Schéma krystalizační destičky IX, metoda sedící kapky, Tt81.

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		85		86		87	
		1 µl Tt81 + 1 µl 85	2 µl Tt81 + 1 µl 85	1 µl Tt81 + 1 µl 86	2 µl Tt81 + 1 µl 86	1 µl Tt81 + 1 µl 87	2 µl Tt81 + 1 µl 87
		88		89		90	
		1 µl Tt81 + 1 µl 88	2 µl Tt81 + 1 µl 88	1 µl Tt81 + 1 µl 89	2 µl Tt81 + 1 µl 89	1 µl Tt81 + 1 µl 90	2 µl Tt81 + 1 µl 90
		91		92		93	
		1 µl Tt81 + 1 µl 91	2 µl Tt81 + 1 µl 91	1 µl Tt81 + 1 µl 92	2 µl Tt81 + 1 µl 92	1 µl Tt81 + 1 µl 93	2 µl Tt81 + 1 µl 93
		94		95		96	
		1 µl Tt81 + 1 µl 94	2 µl Tt81 + 1 µl 94	1 µl Tt81 + 1 µl 95	2 µl Tt81 + 1 µl 95	1 µl Tt81 + 1 µl 96	2 µl Tt81 + 1 µl 96
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Mikrokrystalizace pod olejem

Pro mikrokrystalizaci pod olejem byly použity dvě krystalizační destičky Douglas Vapor Batch Plate [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] (I a II), vhodné pro tuto metodu, které obsahují každá po 96 jamkách. Obě destičky byly zality parafinovým olejem. Pod olej byl napipetován protein Tt81 o koncentraci 10 mg/ml (1 μ l nebo 2 μ l) a 1 μ l krystalizačního činidla (94 činidel ze sady Index HR2-144). Poměr v kapkách byl tedy 1:1 nebo 2:1. Vzhledem k velkému počtu jamek je schéma destiček znázorněno ve více tabulkách. Tab. 15 až 18 ukazují krystalizační destičku I a Tab. 19 až 22 odpovídají destičce II. Krystalizační činidla jsou uváděna číselně, jejich složení je uvedeno v Přílohách.

Tab. 15: Schéma krystalizační destičky I, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (1/4).

		krystalizační činidlo č.:					
		1		2		3	
Tt81 10 mg/ml		1 μ l Tt81 + 1 μ l 1	2 μ l Tt81 + 1 μ l 1	1 μ l Tt81 + 1 μ l 2	2 μ l Tt81 + 1 μ l 2	1 μ l Tt81 + 1 μ l 3	2 μ l Tt81 + 1 μ l 3
		4		5		6	
		1 μ l Tt81 + 1 μ l 4	2 μ l Tt81 + 1 μ l 4	1 μ l Tt81 + 1 μ l 5	2 μ l Tt81 + 1 μ l 5	1 μ l Tt81 + 1 μ l 6	2 μ l Tt81 + 1 μ l 6
		7		8		9	
		1 μ l Tt81 + 1 μ l 7	2 μ l Tt81 + 1 μ l 7	1 μ l Tt81 + 1 μ l 8	2 μ l Tt81 + 1 μ l 8	1 μ l Tt81 + 1 μ l 9	2 μ l Tt81 + 1 μ l 9
		10		11		12	
		1 μ l Tt81 + 1 μ l 10	2 μ l Tt81 + 1 μ l 10	1 μ l Tt81 + 1 μ l 11	2 μ l Tt81 + 1 μ l 11	1 μ l Tt81 + 1 μ l 12	2 μ l Tt81 + 1 μ l 12
		1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1

Tab. 16: Schéma krystalizační destičky I, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (2/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		13		14		15	
		1 µl Tt81 + 1 µl 13	2 µl Tt81 + 1 µl 13	1 µl Tt81 + 1 µl 14	2 µl Tt81 + 1 µl 14	/	
		16		17			
		/		1 µl Tt81 + 1 µl 17	2 µl Tt81 + 1 µl 17	1 µl Tt81 + 1 µl 18	2 µl Tt81 + 1 µl 18
				19		20	
		1 µl Tt81 + 1 µl 19	2 µl Tt81 + 1 µl 19	1 µl Tt81 + 1 µl 20	2 µl Tt81 + 1 µl 20	1 µl Tt81 + 1 µl 21	2 µl Tt81 + 1 µl 21
		22		23		24	
		1 µl Tt81 + 1 µl 22	2 µl Tt81 + 1 µl 22	1 µl Tt81 + 1 µl 23	2 µl Tt81 + 1 µl 23	1 µl Tt81 + 1 µl 24	2 µl Tt81 + 1 µl 24
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 17: Schéma krystalizační destičky I, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (3/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		25		26		27	
		1 µl Tt81 + 1 µl 25	2 µl Tt81 + 1 µl 25	1 µl Tt81 + 1 µl 26	2 µl Tt81 + 1 µl 26	1 µl Tt81 + 1 µl 27	2 µl Tt81 + 1 µl 27
		28		29		30	
		1 µl Tt81 + 1 µl 28	2 µl Tt81 + 1 µl 28	1 µl Tt81 + 1 µl 29	2 µl Tt81 + 1 µl 29	1 µl Tt81 + 1 µl 30	2 µl Tt81 + 1 µl 30
		31		32		33	
		1 µl Tt81 + 1 µl 31	2 µl Tt81 + 1 µl 31	1 µl Tt81 + 1 µl 32	2 µl Tt81 + 1 µl 32	1 µl Tt81 + 1 µl 33	2 µl Tt81 + 1 µl 33
		34		35		36	
		1 µl Tt81 + 1 µl 34	2 µl Tt81 + 1 µl 34	1 µl Tt81 + 1 µl 35	2 µl Tt81 + 1 µl 35	1 µl Tt81 + 1 µl 36	2 µl Tt81 + 1 µl 36
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 18: Schéma krystalizační destičky I, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (4/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		37		38		39	
		1 µl Tt81 + 1 µl 37	2 µl Tt81 + 1 µl 37	1 µl Tt81 + 1 µl 38	2 µl Tt81 + 1 µl 38	1 µl Tt81 + 1 µl 39	2 µl Tt81 + 1 µl 39
		40		41		42	
		1 µl Tt81 + 1 µl 40	2 µl Tt81 + 1 µl 40	1 µl Tt81 + 1 µl 41	2 µl Tt81 + 1 µl 41	1 µl Tt81 + 1 µl 42	2 µl Tt81 + 1 µl 42
		43		44		45	
		1 µl Tt81 + 1 µl 43	2 µl Tt81 + 1 µl 43	1 µl Tt81 + 1 µl 44	2 µl Tt81 + 1 µl 44	1 µl Tt81 + 1 µl 45	2 µl Tt81 + 1 µl 45
		46		47		48	
		1 µl Tt81 + 1 µl 46	2 µl Tt81 + 1 µl 46	1 µl Tt81 + 1 µl 47	2 µl Tt81 + 1 µl 47	1 µl Tt81 + 1 µl 48	2 µl Tt81 + 1 µl 48
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 19: Schéma krystalizační destičky II, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (1/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		49		50		51	
		1 µl Tt81 + 1 µl 49	2 µl Tt81 + 1 µl 49	1 µl Tt81 + 1 µl 50	2 µl Tt81 + 1 µl 50	1 µl Tt81 + 1 µl 51	2 µl Tt81 + 1 µl 51
		52		53		54	
		1 µl Tt81 + 1 µl 52	2 µl Tt81 + 1 µl 52	1 µl Tt81 + 1 µl 53	2 µl Tt81 + 1 µl 53	1 µl Tt81 + 1 µl 54	2 µl Tt81 + 1 µl 54
		55		56		57	
		1 µl Tt81 + 1 µl 55	2 µl Tt81 + 1 µl 55	1 µl Tt81 + 1 µl 56	2 µl Tt81 + 1 µl 56	1 µl Tt81 + 1 µl 57	2 µl Tt81 + 1 µl 57
		58		59		60	
		1 µl Tt81 + 1 µl 58	2 µl Tt81 + 1 µl 58	1 µl Tt81 + 1 µl 59	2 µl Tt81 + 1 µl 59	1 µl Tt81 + 1 µl 60	2 µl Tt81 + 1 µl 60
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 20: Schéma krystalizační destičky II, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (2/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		61		62		63	
		1 µl Tt81 + 1 µl 61	2 µl Tt81 + 1 µl 61	1 µl Tt81 + 1 µl 62	2 µl Tt81 + 1 µl 62	1 µl Tt81 + 1 µl 63	2 µl Tt81 + 1 µl 63
		64		65		66	
		1 µl Tt81 + 1 µl 64	2 µl Tt81 + 1 µl 64	1 µl Tt81 + 1 µl 65	2 µl Tt81 + 1 µl 65	1 µl Tt81 + 1 µl 66	2 µl Tt81 + 1 µl 66
		67		68		69	
		1 µl Tt81 + 1 µl 67	2 µl Tt81 + 1 µl 67	1 µl Tt81 + 1 µl 68	2 µl Tt81 + 1 µl 68	1 µl Tt81 + 1 µl 69	2 µl Tt81 + 1 µl 69
		70		71		72	
		1 µl Tt81 + 1 µl 70	2 µl Tt81 + 1 µl 70	1 µl Tt81 + 1 µl 71	2 µl Tt81 + 1 µl 71	1 µl Tt81 + 1 µl 72	2 µl Tt81 + 1 µl 72
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 21: Schéma krystalizační destičky II, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (3/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		73		74		75	
		1 µl Tt81 + 1 µl 73	2 µl Tt81 + 1 µl 73	1 µl Tt81 + 1 µl 74	2 µl Tt81 + 1 µl 74	1 µl Tt81 + 1 µl 75	2 µl Tt81 + 1 µl 75
		76		77		78	
		1 µl Tt81 + 1 µl 76	2 µl Tt81 + 1 µl 76	1 µl Tt81 + 1 µl 77	2 µl Tt81 + 1 µl 77	1 µl Tt81 + 1 µl 78	2 µl Tt81 + 1 µl 78
		79		80		81	
		1 µl Tt81 + 1 µl 79	2 µl Tt81 + 1 µl 79	1 µl Tt81 + 1 µl 80	2 µl Tt81 + 1 µl 80	1 µl Tt81 + 1 µl 81	2 µl Tt81 + 1 µl 81
		82		83		84	
		1 µl Tt81 + 1 µl 82	2 µl Tt81 + 1 µl 82	1 µl Tt81 + 1 µl 83	2 µl Tt81 + 1 µl 83	1 µl Tt81 + 1 µl 84	2 µl Tt81 + 1 µl 84
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

Tab. 22: Schéma krystalizační destičky II, mikrokrystalizace pod olejem, Tt81 (4/4).

		krystalizační činidlo č.:					
Tt81 10 mg/ml		85		86		87	
		1 µl Tt81 + 1 µl 85	2 µl Tt81 + 1 µl 85	1 µl Tt81 + 1 µl 86	2 µl Tt81 + 1 µl 86	1 µl Tt81 + 1 µl 87	2 µl Tt81 + 1 µl 87
		88		89		90	
		1 µl Tt81 + 1 µl 88	2 µl Tt81 + 1 µl 88	1 µl Tt81 + 1 µl 89	2 µl Tt81 + 1 µl 89	1 µl Tt81 + 1 µl 90	2 µl Tt81 + 1 µl 90
		91		92		93	
		1 µl Tt81 + 1 µl 91	2 µl Tt81 + 1 µl 91	1 µl Tt81 + 1 µl 92	2 µl Tt81 + 1 µl 92	1 µl Tt81 + 1 µl 93	2 µl Tt81 + 1 µl 93
		94		95		96	
		1 µl Tt81 + 1 µl 94	2 µl Tt81 + 1 µl 94	1 µl Tt81 + 1 µl 95	2 µl Tt81 + 1 µl 95	1 µl Tt81 + 1 µl 96	2 µl Tt81 + 1 µl 96
	1:1	2:1	1:1	2:1	1:1	2:1	

3.3 Testování krystalů

Po získání krystalů bylo nutno dokázat, zda se jedná o krystaly proteinu nebo o krystaly solí vzniklé z použitých krystalizačních činidel. Za tímto účelem byly provedeny dva testy - test fyzické manipulace (*Crush test*) a absorpce barviva (*Dye test*).

Fyzická manipulace

Krystaly byly přímo v jamkách krystalizačních destiček pod mikroskopem podrobeny fyzické manipulaci jehlou. O proteinových krystalech je známo, že se po dotyku jehlou velmi snadno rozpadají na velké množství drobných kusů, naopak krystaly solí se rozpadají jen za použití značné síly a na malé množství kusů.

Absorpce barviva

Do kapek obsahujících krystaly bylo mikropipetou přidáno modré barvivo Izit HR4-710 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Objem přidaného barviva byl vždy

desetkrát menší než původní objem celé kapky - pokud kapka obsahovala 1 μl proteinu a 1 μl krystalizačního činidla (tedy celkem 2 μl), byly přidány 0,2 μl barviva. Barvivo se nechalo hodinu působit. Pokud po této době došlo k zabarvení krystalů, jednalo se o krystaly proteinu.

3.4 Anorganické krystaly

Pro porovnání s proteinovými krystaly byly vypěstovány krystaly těchto anorganických sloučenin: chlorid draselný, chlorid sodný, pentahydrát síranu měďnatého, heptahydrát síranu železnatého, trihydrát octanu sodného. Tyto sloučeniny byly rozpouštěny v destilované vodě a zahřívány, dokud nebylo dosaženo přesyceného stavu. Takto připravené roztoky byly nality do Petriho misek a ponechány bez víček, aby docházelo k odpařování vody. Z roztoku chloridu sodného, chloridu draselného a trihydrátu octanu sodného byly mikropipetou odebrány 3 μl do krystalizačních destiček, vhodných pro metodu sedící kapky, s rezervoáry naplněnými destilovanou vodou, pro snadnější sledování pod mikroskopem a možnost vyzkoušení testu obarvením krystalů barvivem Izit HR4-710 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA].

3.5 Získání difrakčních dat

Vypěstované krystaly proteinu Tt81 byly podrobeny rentgenové strukturní analýze na zdroji synchrotronového záření BESSY-II na vědeckém pracovišti Helmholtz Zentrum Berlin (HZB) v německém Berlíně.

4. Výsledky

Tato kapitola obsahuje výsledky krystalizačních experimentů, výsledky testování krystalů, porovnání připravených anorganických krystalů se získanými krystaly proteinu Tt81 a difrakční snímek získaný z připravených krystalů proteinu Tt81.

Průběh krystalizace byl pozorován u lysozymu i proteinu Tt81 po týdnu od provedení prvních experimentů. Po této době byla pořízena fotodokumentace, fotoaparátem Olympus SZX9 [Olympus, Praha] připevněným k mikroskopu, při zvětšení 450x.

U lysozymu jsou uvedeny veškeré výsledky s přehledným shrnutím formou tabulek, ve kterých jsou růžově vyznačeny podmínky, které vedly k tvorbě krystalů, a fotografie krystalů. U proteinu Tt81 jsou uvedeny pouze krystalizační podmínky, které vedly k tvorbě krystalů o dostatečné velikosti pro rentgenovou difrakci, z důvodu lepší přehlednosti vzhledem k množství vyzkoušených krystalizačních podmínek.

4.1 Výsledky krystalizace lysozymu

Výsledky metody sedící kapky

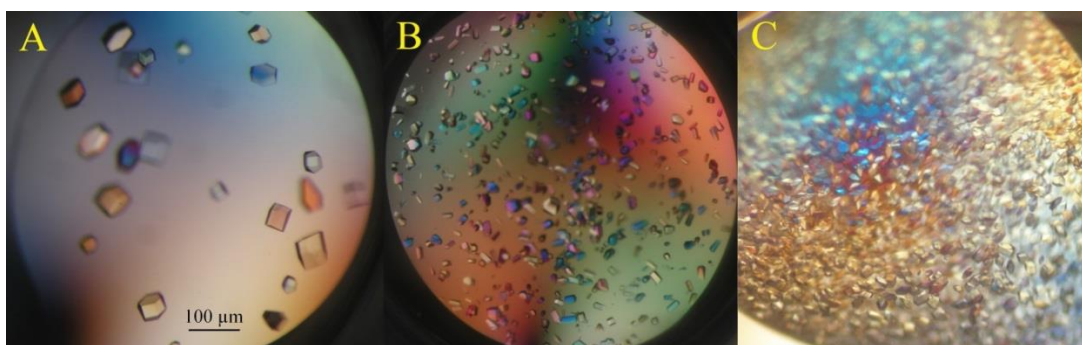
Lysozym metodou sedící kapky krystalizoval ve většině jamek. Krystaly vznikaly za použití všech koncentrací lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml i 100 mg/ml) i všech koncentrací krystalizačního roztoku chloridu sodného (3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 10%). Velikost a množství vzniklých krystalů se lišily v závislosti na koncentraci lysozymu. Méně větších krystalů vzniklo při použití lysozymu o koncentraci 25 mg/ml. Se zvyšující se koncentrací lysozymu se velikost krystalů zmenšila a jejich množství značně vzrostlo, což je patrné z pořízených fotografií (Obr. 9). Roztoky PEGu 3350 a 8000 nevedly k tvorbě krystalů. Výsledky obou pokusů metodou sedící kapky pro lysozym jsou zaznamenány v Tab. 23 a 24.

Tab. 23: Výsledky prvního pokusu metodou sedící kapky pro lysozym. Růžově podmínky, kdy došlo k růstu krystalů.

	krystalizační roztok NaCl					
lysozym	3%	4%	5%	6%	7%	8%
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl

Tab. 24: Výsledky druhého pokusu metodou sedící kapky pro lysozym. Růžově podmínky, kdy došlo k růstu krystalů.

	krystalizační roztok		
lysozym	10% NaCl	20% PEG 3350	14,4% PEG 8000
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG



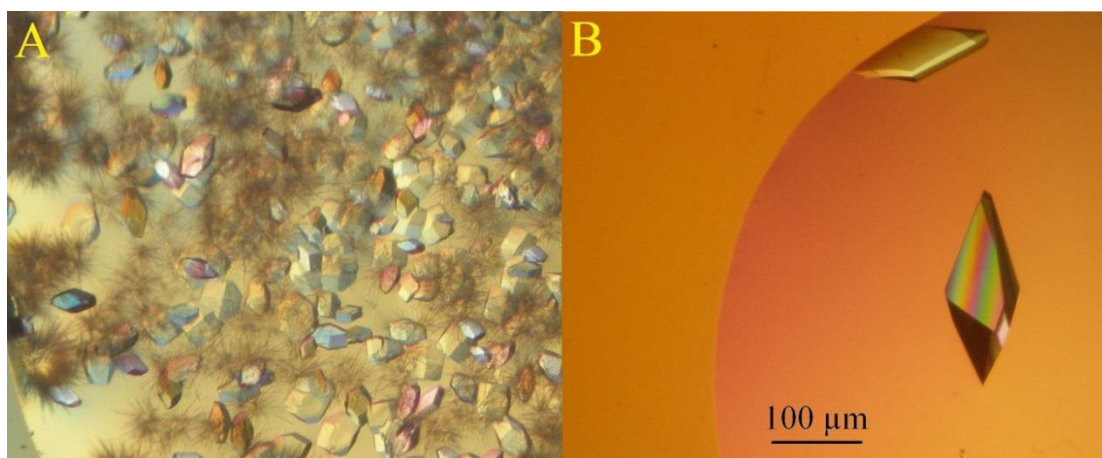
Obr. 9: Krystaly lysozymu, sedící kapka, 2 μ l lysozym (25 mg/ml) + 2 μ l 7% NaCl (A), 2 μ l lysozym (50 mg/ml) + 2 μ l 5% NaCl (B), 2 μ l lysozym (100 mg/ml) + 2 μ l 7% NaCl (C).

Výsledky metody visící kapky

Metodou visící kapky, kdy byla použita koncentrace lysozymu 50 mg/ml a tři různá krystalizační činidla, vznikly krystaly z 10% roztoku chloridu sodného (velké množství malých krystalů - Obr. 10A) a z 20% roztoku PEGu 3350 (dva velké krystaly - Obr. 10B). Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 25.

Tab. 25: Výsledky pokusu metodou visící kapky pro lysozym. Růžově podmínky, kdy došlo k růstu krystalů.

	lysozym 50 mg/ml
10% NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
20% PEG 3350	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG
14,4% PEG 8000	2 μ l lysozym + 2 μ l PEG



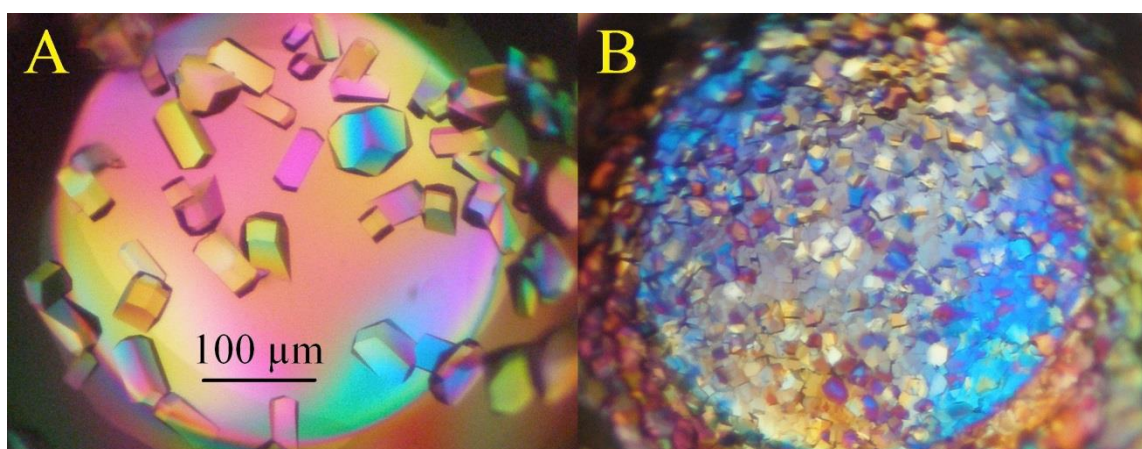
Obr. 10: Krystaly lysozymu, visící kapka, 2 μ l lysozym (50 mg/ml) + 2 μ l 10% NaCl (A), 2 μ l lysozym (100 mg/ml) + 2 μ l 20% PEG 3350 (B).

Výsledky mikrokrytalizace pod olejem

U mikrokrytalizace pod olejem byl jako nejvhodnější krystalizační činidlo indikován 8% roztok chloridu sodného. Ze čtyř koncentrací lysozymu (25 mg/ml, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml) krystaly nevznikly pouze při koncentraci 25 mg/ml. U ostatních koncentrací krystaly vznikly a podobně jako u metody sedící kapky se velikost krystalů zmenšovala se zvyšující se koncentrací lysozymu a množství krystalů se zvyšovalo (Obr. 11). 3% roztok chloridu sodného nevedl ke vzniku krystalů u žádné ze čtyř koncentrací lysozymu. Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 26.

Tab. 26: Výsledky pokusu metodou mikrokrystalizace pod olejem pro lysozym. Růžově podmínky, kdy došlo k růstu krystalů.

lysozym	krystalizační roztok	
	3% NaCl	8% NaCl
25 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
50 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
75 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl
100 mg/ml	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl	2 μ l lysozym + 2 μ l NaCl



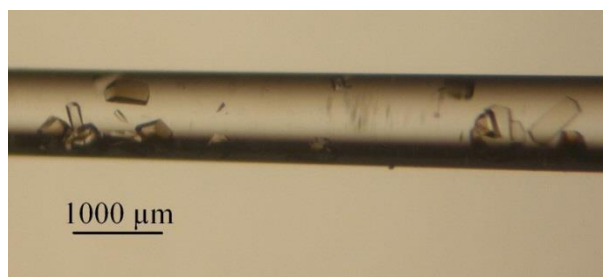
Obr. 11: Krystaly lysozymu, mikrokrystalizace pod olejem, 2 μ l lysozym (50 mg/ml) + 2 μ l 8% NaCl (A), 2 μ l lysozym (100 mg/ml) + 2 μ l 8% NaCl (B).

Výsledky volné difúze v kapilárách

Ve třech kapilárách o různých průměrech (0,2 mm, 0,5 mm a 1,0 mm) byla použita stejná koncentrace lysozymu (75 mg/ml) a stejné krystalizační činidlo (3% NaCl). Krystaly vznikly ve všech třech případech (Obr. 12). Výsledky jsou zaznamenány v Tab. 27.

Tab. 27: Výsledky pokusu metodou volné difúze v kapilárách pro lysozym. Růžově podmínky, kdy došlo k růstu krystalů.

průměr kapiláry [mm]		
0,2	0,5	1,0
30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml	30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml	30 μ l 3% NaCl + lysozym 75 mg/ml

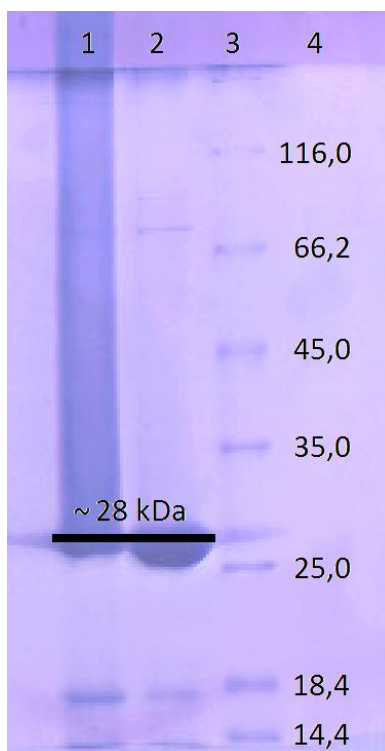


Obr. 12: Krystaly lysozymu, volná difúze v kapiláře o průměru 1,0 mm, lysozym (75 mg/ml) + 30 μl 3% NaCl.

4.2 Výsledky krystalizace Tt81

Výsledky gelové SDS-PAGE elektroforézy

Provedením gelové SDS-PAGE elektroforézy byla zjištěna čistota a molekulární hmotnost proteinu Tt81. Vzorek proteinu Tt81 byl čistý a tedy vhodný pro krystalizační experimenty. Srovnáním se známými molekulárními hmotnostmi jednotlivých složek standardu byla stanovena molekulární hmotnost proteinu Tt81 přibližně na 28 kDa (Obr. 13).



Obr. 13: Gelová SDS-PAGE elektroforéza: sloupce 1 a 2 - protein Tt81 (5:1 a 1:1), sloupec 3 - standard, sloupec 4 - stupnice standardu v jednotkách kDa.

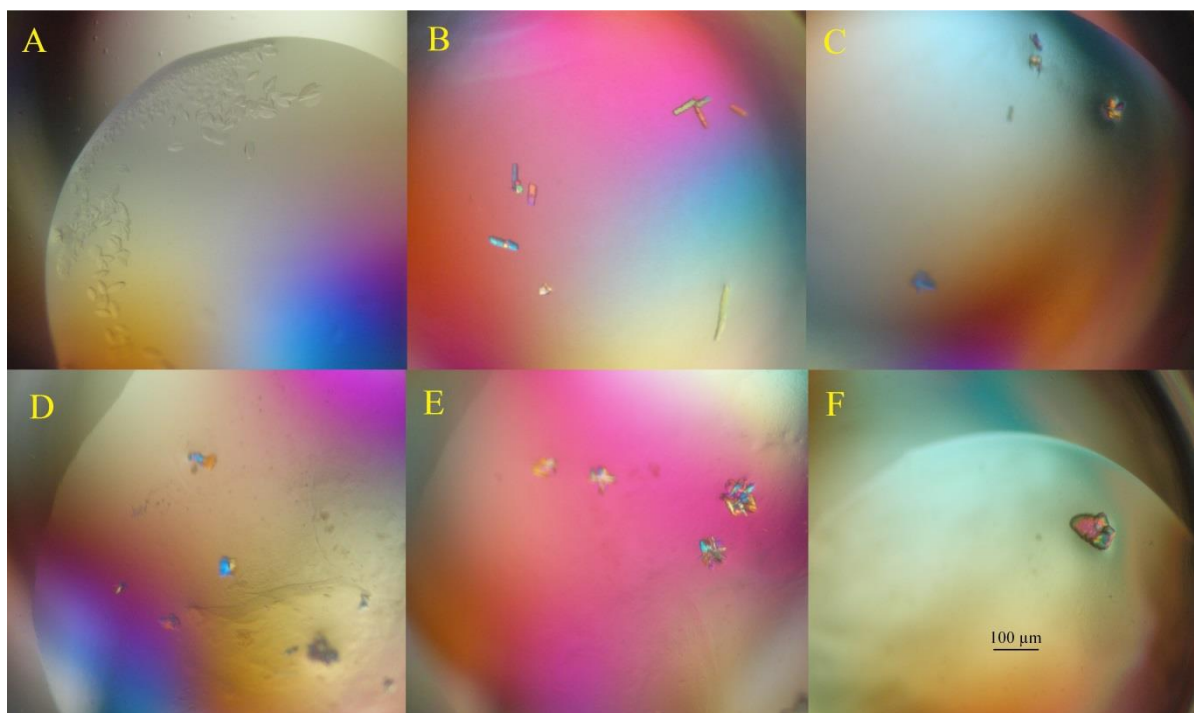
Výsledky metody sedící kapky

Krystalizace proteinu Tt81 metodou sedící kapky proběhla v devíti krystalizačních destičkách. V krystalizační destičce I, kde byla použita koncentrace Tt81 40 mg/ml, vznikl jediný krystal, nevhodný pro rentgenovou difrakci, a v jedné jamce se objevila vysoká precipitace. Z toho důvodu byl protein pro další pokusy (krystalizační destičky II, III, IV a V) naředěn na koncentraci 20 mg/ml. Při této koncentraci se také v několika případech objevily sraženiny proteinu, proto byl protein dále naředěn na 10 mg/ml (krystalizační destičky VI, VII, VIII a IX).

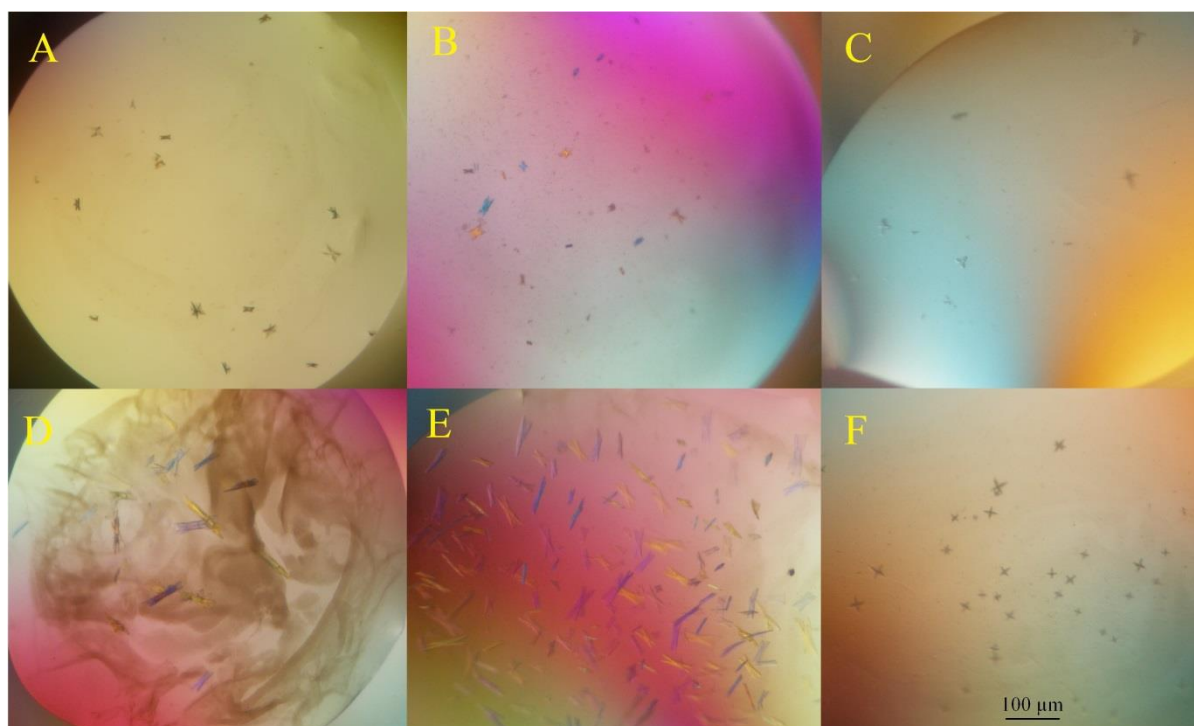
Nejlepších výsledků (krystalů o velikosti vhodné pro rentgenovou difrakci) bylo dosaženo v krystalizačních destičkách V, VI, VIII a IX za krystalizačních podmínek shrnutých v Tab. 28. Zde jsou uvedeny i odkazy na obrázky krystalů. V ostatních destičkách vznikaly krystaly také, ale většinou se jednalo o velké množství mikrokystalů, nevhodných pro difrakční měření a pro řešení struktury proteinu.

Tab. 28: Krystalizační podmínky vedoucí k dosažení nejlepších výsledků metodou sedící kapky pro protein Tt81.

krystalizační destička	koncentrace Tt81	krystalizační činidlo	poměr v kapce	obrázek
V	20 mg/ml	39	1:1	14-A
V	20 mg/ml	48	1:1	14-B
V	20 mg/ml	48	2:1	14-C
VI	10 mg/ml	49	1:1	14-D
VI	10 mg/ml	49	2:1	14-E
VI	10 mg/ml	54	2:1	14-F
VIII	10 mg/ml	74	1:1	15-A
VIII	10 mg/ml	74	2:1	15-B
VIII	10 mg/ml	76	1:1	15-C
VIII	10 mg/ml	82	1:1	15-D
VIII	10 mg/ml	82	2:1	15-E
IX	10 mg/ml	85	1:1	-
IX	10 mg/ml	92	2:1	15-F



Obr. 14: Krystaly Tt81, metoda sedící kapky (1/2).



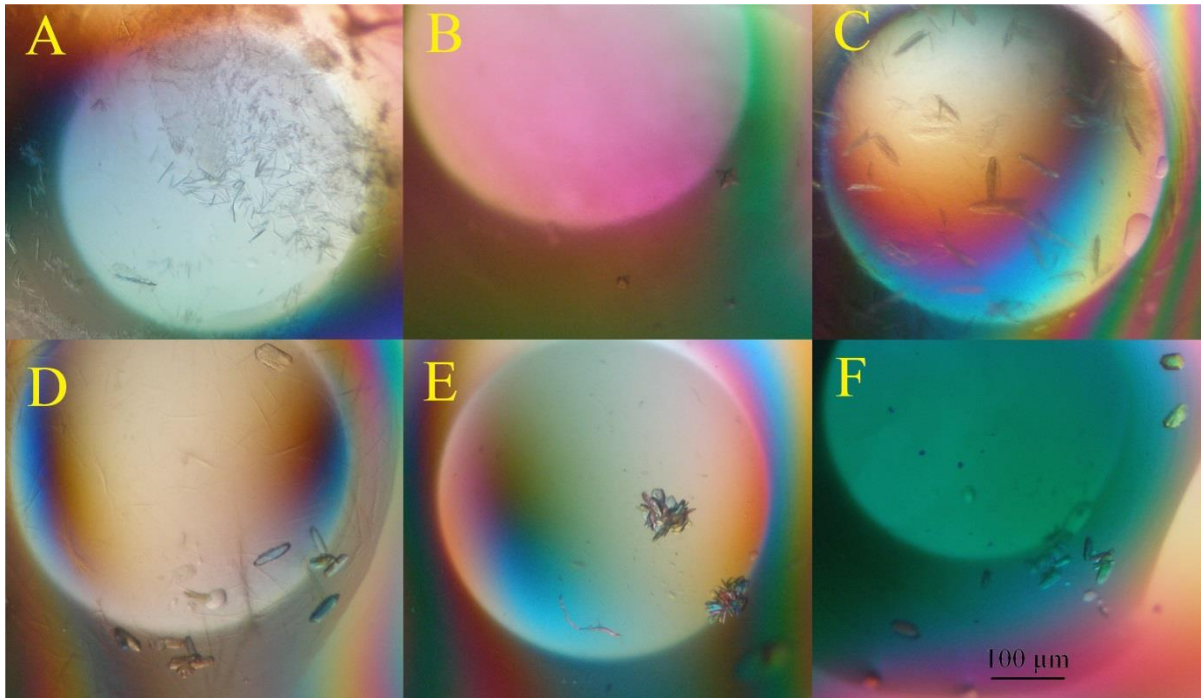
Obr. 15: Krystaly Tt81, metoda sedící kapky (2/2).

Výsledky mikrokrystalizace pod olejem

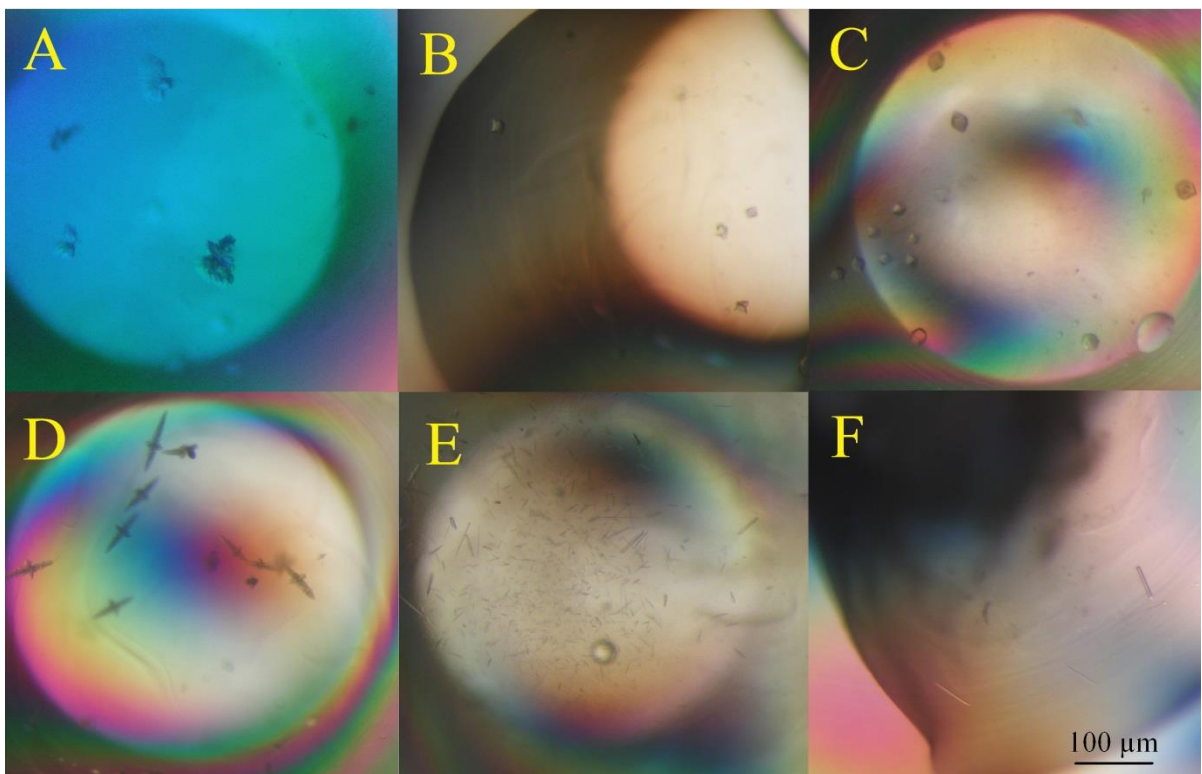
Pro mikrokrystalizaci pod olejem byly použity dvě krystalizační destičky (I a II) o 96 jamkách. Po předchozích pokusech metodou sedící kapky byla zvolena koncentrace proteinu Tt81 10 mg/ml. Krystalizační podmínky, při kterých bylo dosaženo nejlepších výsledků, jsou shrnuty v Tab. 29, která odkazuje na obrázky krystalů. Krystaly vznikaly i při dalších podmínkách, nejčastěji se však jednalo o velké množství mikrokrystalů.

Tab. 29: Krystalizační podmínky vedoucí k dosažení nejlepších výsledků metodou mikrokrystalizace pod olejem pro protein Tt81.

krystalizační destička	koncentrace Tt81	krystalizační činidlo	poměr v kapce	obrázek
I	10 mg/ml	1	1:1	16-A
I	10 mg/ml	46	1:1	16-B
I	10 mg/ml	47	2:1	16-C
I	10 mg/ml	48	1:1	16-D
I	10 mg/ml	48	2:1	16-E
II	10 mg/ml	49	1:1	16-F
II	10 mg/ml	49	2:1	17-A
II	10 mg/ml	67	1:1	17-B
II	10 mg/ml	70	2:1	17-C
II	10 mg/ml	74	2:1	17-D
II	10 mg/ml	78	2:1	-
II	10 mg/ml	83	2:1	17-E
II	10 mg/ml	85	2:1	17-F
II	10 mg/ml	95	1:1	-



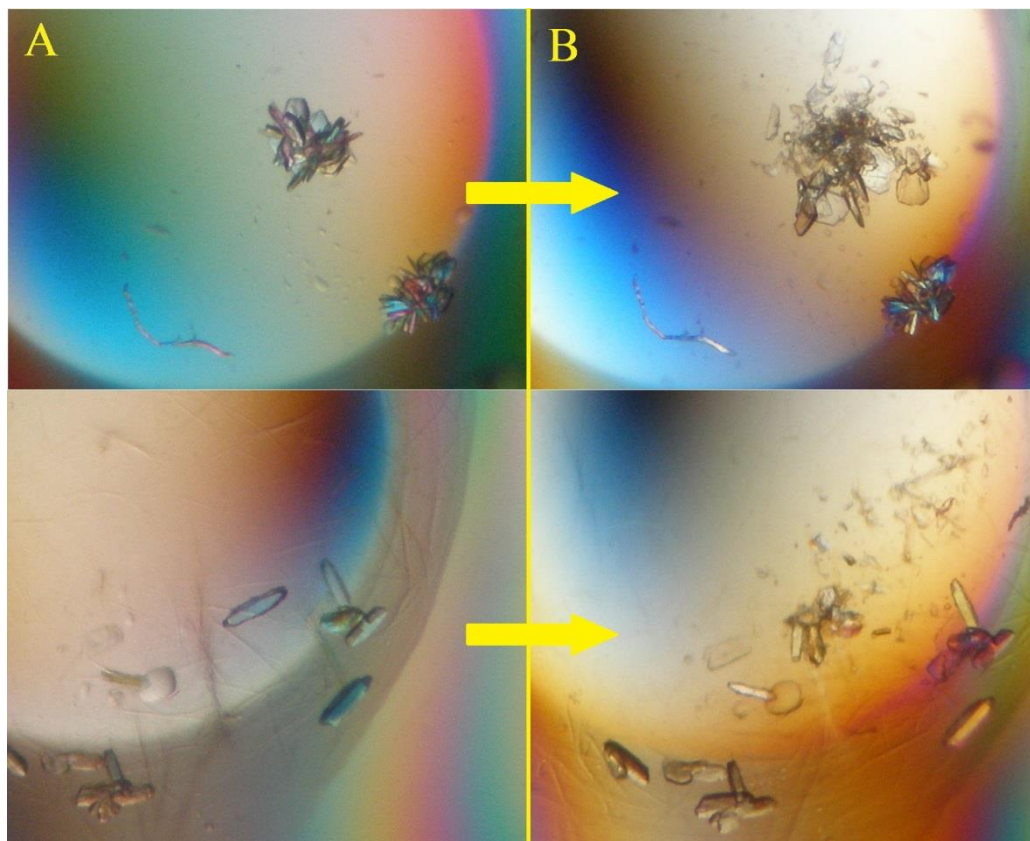
Obr. 16: Krystaly Tt81, mikrokrystalizace pod olejem (1/2).



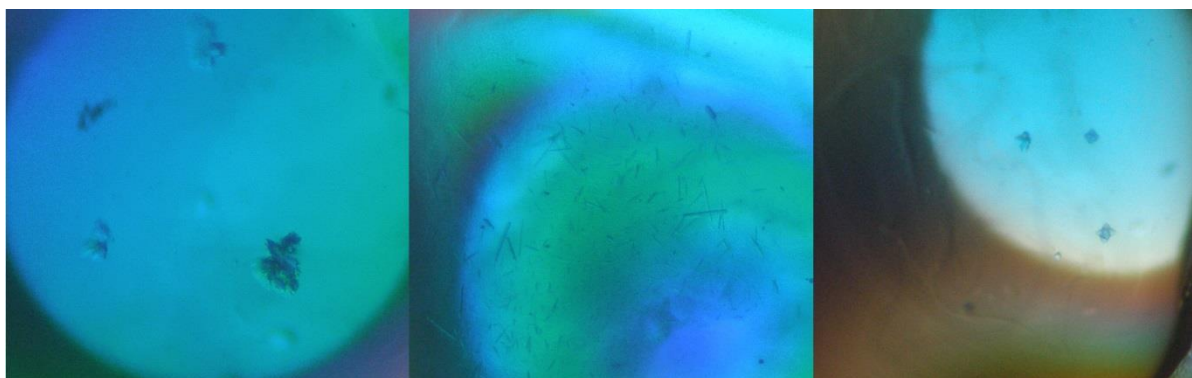
Obr. 17: Krystaly Tt81, mikrokrystalizace pod olejem (2/2).

4.3 Výsledky testování krystalů

Provedením fyzické manipulace (*Crush test*) a zkoušky absorpce barviva (*Dye test*) bylo prokázáno, že vypěstované krystaly jsou opravdu krystaly proteinu Tt81. Výsledky testů jsou zobrazeny na následujících fotografiích (Obr. 18 a 19).



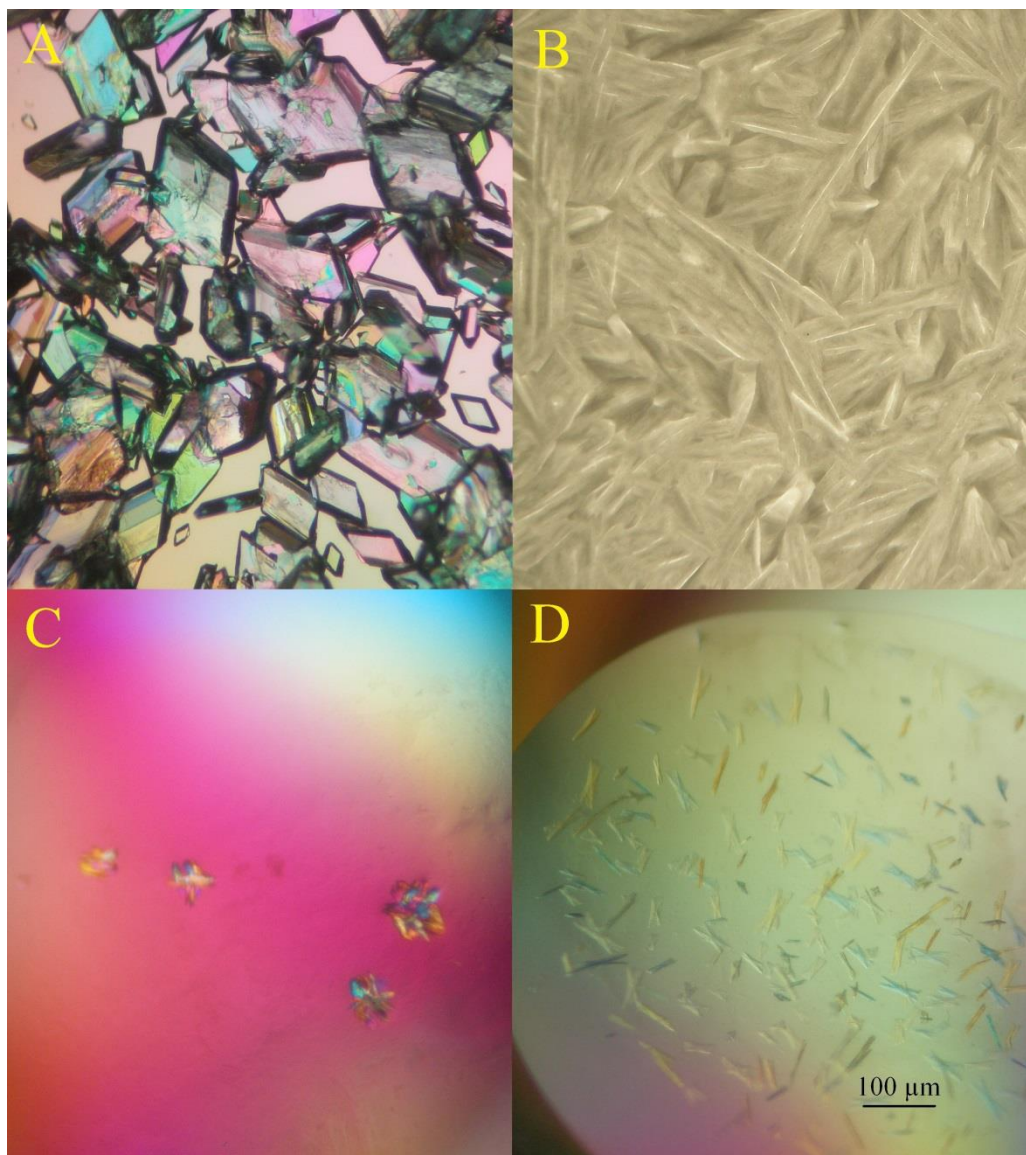
Obr. 18: Krystaly proteinu Tt81 před (A) a po (B) testu fyzické manipulace.



Obr. 19: Krystaly proteinu Tt81 po testu absorpce barviva.

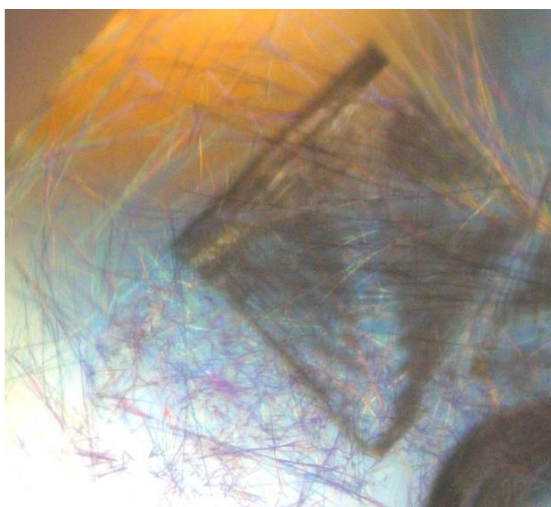
4.4 Porovnání anorganických krystalů a krystalů proteinu Tt81

Anorganické krystaly (krystaly chloridu draselného, chloridu sodného, pentahydrátu síranu měďnatého, heptahydrátu síranu železnatého a trihydrátu octanu sodného) se podařilo vypěstovat během jedné hodiny a ihned byla pořízena jejich fotodokumentace, zatímco krystaly proteinu Tt81 rostly minimálně týden. Obecně platí, že proteinové krystaly jsou menší než krystaly anorganické, což bylo potvrzeno. Na Obr. 20 jsou zobrazeny krystaly pentahydrátu síranu měďnatého a trihydrátu octanu sodného a pro porovnání velikosti krystaly proteinu Tt81.

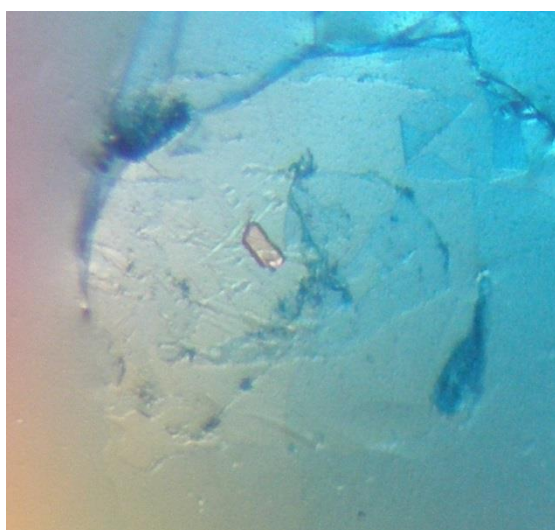


Obr. 20: Porovnání velikosti anorganických a proteinových krystalů. Krystaly pentahydrátu síranu měďnatého (A), trihydrátu octanu sodného (B) a proteinu Tt81 (C a D).

Anorganické krystaly byly pro porovnání také podrobeny testování o jejich původu. Při dotyku jehlou se nerozpadly ani nepoškodily. Po přidání barviva Izit HR4-710 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA] do kapek s roztoky anorganických sloučenin (chlorid sodný, chlorid draselný, trihydrát octanu sodného) došlo k nežádoucímu vykrystalizování molekul barviva (Obr. 21), což se může stát, pokud jsou připraveny vhodné krystalizační podmínky pro tuto látku. Pro kompletní porovnání je přidána fotografie anorganického krystalu po přidání barviva (Obr. 22). Tento krystal zůstal neobarvený, čímž bylo prokázáno, že se jedná o krystal soli.



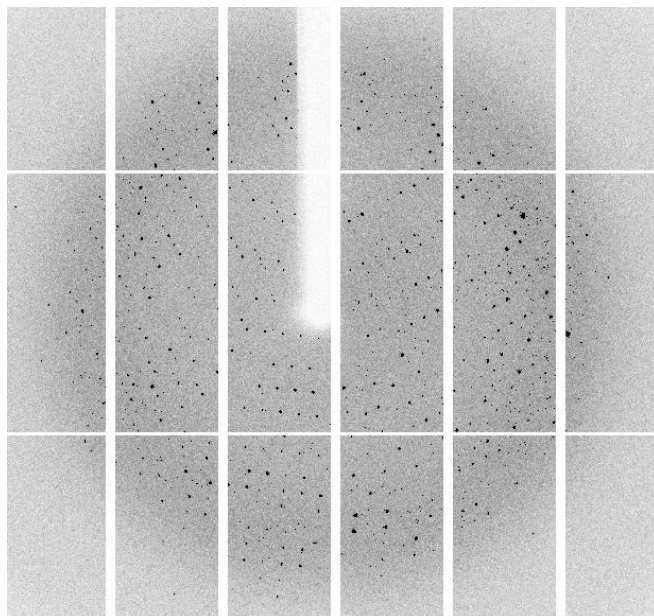
Obr. 21: Nežádoucí krystalizace molekul barviva při prokazování krystalu soli.



Obr. 22: Prokázaný krystal soli neabsorbující barvivo.

4.5 Difrakční záznam

Monokrystalovou rentgenovou strukturální analýzou se podařilo získat difrakční snímky proteinu Tt81 s rozlišením do 2,5 Å (Obr. 23).



Obr. 23: Difrakční záznam proteinu Tt81.

5. Diskuze

Vzhledem k velkému množství faktorů ovlivňujících krystalizační proces, výběr krystalizační strategie není jednoduchý. V úvahu by mělo být bráno i množství vzorku, které je k dispozici. Úspěch krystalizace závisí především na stavu studovaného proteinu, ale také na výběru krystalizační metody. Pokud je protein schopný krystalizace, tak ke krystalizaci pravděpodobně dojde, záleží především na vytrvalosti výzkumníka. V opačném případě, kdy protein krystalizovat nemůže (např. z důvodu glykosylace nebo proteolytické degradace atd.), bude krystalizace neúspěšná, i když bude vyzkoušena celá řada krystalizačních podmínek (Bergfors, 1999).

5.1 Tt81

Provedením gelové SDS-PAGE elektroforézy bylo zjištěno, že vzorek proteinu Tt81 je dostatečně čistý pro krystalizační experimenty. Vzorek byl testován ve dvou různých koncentracích (20 mg/ml a 8 mg/ml), což je patrné na výsledném gelu (Obr. 13, sloupce 1 a 2). Z gelu je patrné, že čím vyšší je koncentrace proteinu, tím tmavší je zbarvení sloupce.

Pro krystalizaci proteinu Tt81 byla vybrána komerčně dostupná sada krystalizačních činidel označených názvem Index HR2-144 [Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA]. Bylo to z důvodu, že se jedná o nově objevený protein, u něhož zatím nejsou známy krystalizační podmínky. Sada Index obsahuje 96 činidel s různým obsahem solí, pufrů a srážedel v rozmezí pH 3,0 - 9,0.

Kvůli omezenému množství vzorku proteinu Tt81 byly pro krystalizaci vybrány dvě metody - metoda sedící kapky a mikrokrystalizace pod olejem, které jsou obě snadno proveditelné a časově nenáročné. Pro jejich realizaci stačí malé množství vzorku. Metoda sedící kapky je proveditelná s kapkou o objemu 0,1 - 40 μ l (katalog Hampton Research, 2015) a mikrokrystalizace pod olejem umožňuje využití kapky o objemu menším než 2 μ l (Bergfors, 1999).

Kombinací metod, krystalizačních činidel a poměru protein-činidlo v kapce bylo testováno 376 různých krystalizačních podmínek. Ve 27 případech vznikly krystaly o dostatečné velikosti pro rentgenovou strukturní analýzu (13 případů metodou sedící kapky a 14 případů mikrokrystalizací pod olejem - viz Tab. 28 a 29). Největší krystaly získané

metodou sedící kapky dosáhly velikosti 130x20x20, 110x20x20 a 100x40x30 [μm] (krystalizační činidla č. 48, 54, 82). Metodou mikrokrytalizace pod olejem krystaly dosáhly maximální velikosti 90x50x50 [μm] (krystalizační činidla č. 48, 74). Oběma metodami vznikly krystaly ve tvaru jehliček, dvojrozměrných destiček a trojrozměrné krystaly. V dalších 76 krystalizačních jamkách se objevily mikrokrystaly nevhodné pro rentgenovou difrakční analýzu. Krytalizace byla úspěšná přibližně ve 27 % krystalizačních jamek (7 % nejlepší výsledky a 20 % mikrokrystaly). 16 % jamek obsahovalo precipitát (sraženinu). Zbylé jamky obsahovaly číré kapky nebo fázové rozhraní (pozorovatelné jako malé kapky).

5.2 Halogenaciddehalogenasy v RCSB PDB databázi

Querellou a kol. (2010) uvádí, že většina dehalogenas byla izolována ze suchozemských živočichů, avšak o oceánech je známo, že obsahují různé halogenované sloučeniny (Field a kol., 1995; Valverde a kol., 2004). Hojnost organohalogenů v mořském prostředí činí z řas a mořských mikroorganismů potenciální zdroj nových dehalogenas (Huang a kol., 2011).

PDB databáze obsahovala ke dni 2. 4. 2016 celkem 21 položek pod názvem „haloacid dehalogenase“ a „L-haloacid dehalogenase“, což neodpovídá počtu enzymů z nadrodiny halogenaciddehalogenas, u kterých je známa struktura, protože se často jedná o konformery téhož enzymu. Dostupné jsou zatím pouze dvě publikace: 1) Jaudzems a kol., 2015 (DOI 10.1007/s10858-014-9886-3) a 2) Novak a kol., 2013 (DOI 10.1111/febs.12177).

DehRh**b**

Novak a kol. (2013) se zabývali studiem putativní L-halogenaciddehalogenasy DehRh**b** izolované z rodu bakterií *Rhodobacteraceae*.

Pro krytalizaci DehRh**b** byla použita metoda mikrokrytalizace pod olejem při teplotě 18°C. Poměr vzorku studovaného proteinu a krystalizačních činidel v kapce byl 1:1. Koncentrace proteinu DehRh**b** byla 10 mg/ml a krystalizační činidla obsahovala 0,2 M LiCl, 0,1 M Tris/HCl (pH 8,0) a 20% PEG 6000 (Novak a kol., 2013).

Difrakční data získaná z krystalů DehRh**b** byla východiskem pro vyřešení struktury proteinu. DehRh**b** byla prokázána jako L-halogenaciddehalogenasa s potenciálem pro využití jako komerční biokatalyzátor (Novak a kol., 2013).

6. Závěr

Teoretická část práce se zabývá principem procesu krystalizace, včetně faktorů ovlivňujících růst krystalů. Stručně jsou popsány základní, pokročilé a alternativní krystalizační metody a také krystalizační testy sloužící k určení původu krystalů. Dále jsou uvedeny rozdíly mezi proteinovými a anorganickými krystaly a základní informace o RCSB PDB databázi. Závěr teoretické části práce je věnován základním poznatkům o rodině enzymů halogenaciddehalogenas a nově připravenému enzymu Tt81, izolovanému z bakterií *Thermococcus*.

Součástí praktické části práce bylo seznámení se a zvládnutí základních a pokročilých krystalizačních metod. Za tímto účelem byl použit modelový protein lysozym, jehož krystaly se podařilo připravit metodou sedící a visící kapky, mikrokrytalizací pod olejem i volnou difúzí v kapilárách.

Hlavním cílem práce byla krystalizace proteinu Tt81 z *Thermococcus thio-reducens*. Nejdříve byl vzorek proteinu Tt81 charakterizován pomocí gelové SDS-PAGE elektroforézy, čímž byla stanovena molekulární hmotnost přibližně 28 kDa, a bylo prokázáno, že čistota vzorku je vhodná pro krystalizační experimenty. Následovaly krystalizační pokusy metodou sedící kapky a mikrokrytalizace pod olejem, při teplotě 20°C, s použitím 94 různých krystalizačních činidel. Testováno bylo 376 různých krystalizačních podmínek a byly nalezeny podmínky vhodné pro krystalizaci studovaného proteinu. Testováním připravených krystalů pomocí fyzické manipulace a absorpcí barviva bylo prokázáno, že se jedná o krystaly proteinu a ne o krystaly soli. Optimální podmínky vedoucí k tvorbě dostatečně velkých krystalů pro rentgenovou difrakční analýzu byly shrnuty v Tab. 28 a 29. Velikost krystalů však není jedinou podmínkou nutnou pro úspěšnou difrakci. Kvalita krystalů byla potvrzena až samotnou rentgenovou difrakcí v průběhu měření krystalů na zdroji synchrotronového záření, kdy se podařilo zaznamenat difrakční data vhodná k vyřešení struktury proteinu.

Mimo vytyčené cíle se práce zabývala přípravou anorganických krystalů a porovnáním jejich vlastností s vlastnostmi proteinových krystalů. Názorně tak byly doplněny teoretické poznatky uvedené v kapitole 2.6.

Naměřená difrakční data jsou nezbytným východiskem pro další výzkum, který bude zaměřen na objasnění trojrozměrné struktury proteinu Tt81. Zároveň by mělo být prokázáno, zda protein Tt81 patří do nadrodiny halogenaciddehalogenas.

7. Seznam literatury

Allen, K. N., & Dunaway-Mariano, D. (2004). Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold. *Trends in Biochemical Sciences*, 29(9). 495-503.

Allen, K. N., & Dunaway-Mariano, D. (2009). Markers of fitness in a successful enzyme superfamily. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(6). 658-665.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17). 3389-3402.

Bergfors, T. M. (1999). *Protein Crystallization: Techniques, Strategies, and Tips*. La Jolla, USA: International University Line.

Berman, H. M., Kleywegt, G. J., Nakamura, H., & Markley, J. L. (2014). The Protein Data Bank archive as an open data resource. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 28(10). 1009-1014.

Bollag, D. M., Rozycki, M. D., & Edelstein, S. J. (1996). *Protein Methods*. New York, USA: Wiley-Liss, Inc.

Burroughs, A. M., Allen, K. N., Dunaway-Mariano, D., & Aravind, L. (2006). Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes. *Journal of Molecular Biology*, 361(5). 1003-1034.

Chirgadze, D. (2001). Protein Crystallisation in Action [online]. In: *Crystallographic X-ray Facility*. [cit. 2016-02-10]. Dostupné z WWW: <http://www.xray.bioc.cam.ac.uk/xray_resources/whitepapers/xtal-in-action/index.html>.

Christopher, G. K., Phipps, A. G., & Gray, R. J. (1998). Temperature-dependent solubility of selected proteins. *Journal of Crystal Growth*, 191(4). 820-826.

Emmer, J. (2007). *Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from Rhodococcus rhodochrous*. Diplomová práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita.

Field, J. A., Verhagen, F. J. M., & de Jong, E. (1995). Natural organohalogen production by *Basidiomycetes*. *Trends Biotechnol*, 13(11). 451-456.

- Furukawa, K. (2006). Oxygenases and dehalogenases: molecular approaches to efficient degradation of chlorinated environmental pollutants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70(10). 2335-2348.
- Garavito, R. M., & Picot, D. (1991). Crystallization of Membrane-Proteins - a Minireview. *Journal of Crystal Growth*, 110 (1-2). 89-95.
- Giacovazzo, C., Monsaco, H. L., Artioli, G., Viterbo, D., Ferraris, G., Gilli, G., Zanotti, G., & Catti, M. (2002). *Fundamentals of Crystallography*. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Glusker, J. P., Lewis, M., & Rossi, M. (1994). *Crystal Structure Analysis for Chemist and Biologist*. New York, USA: VCH Publishers, Inc.
- Hampton Research (2015). *Crystallization: Research Tools*. Aliso Viejo, USA: Hampton Research Corp.
- Henderson, R., Sali, A., Baker, M. L., Carragher, B., Devkota, B., Downing, K. H., Egelman, E. H., Feng, Z., Frank, J., Grigorieff, N., Jiang, W., Ludtke, S. J., Medalia, O., Penczek, P. A., Rosenthal, P. B., Rossmann, M. G., Schmid, M. F., Schroder, G. F., Steven, A. C., Stokes, D. L., Westbrook, J. D., Wriggers, W., Yang, H., Young, J., Berman, H. M., Chiu, W., Kleywegt, G. J., & Lawson, C. L. (2012). Outcome of the first electron microscopy validation task force meeting. *Structure*, 20(2). 205-214.
- Huang, H., Pandya, C., Liu, C., Al-Obaidi, N. F., Wang, M., Zheng, L., Keating, S. T., Aono, M., Love, J. D., Evans, B., Seidel, R. D., Hillerich, B. S., Garforth, S. J., Almo, S. C., Mariano, P. S., Dunaway-Mariano, D., Allen, K. N., & Farelli, J. D. (2015). Panoramic view of a superfamily of phosphatases through substrate profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(16). E1974-E1983.
- Huang, J., Xin, Y., Cao, X. P., & Zhang, W. (2011). Phylogenetic diversity and characterization of 2-haloacid degrading bacteria from the marine sponge *Hymeniacidon perlevis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(8). 1787-1994.
- 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.

Kutá Smatanová, I. (2003). Krystalizace biologických makromolekul od teorie k praxi [online]. In: *Krystalografická společnost*. [cit. 2016-01-15]. Dostupné z WWW: <<https://www.xray.cz/kryst/difrakce/iva/krystalizace.htm>>.

Kutá Smatanová, I. (2008). *Crystallization techniques in protein crystallography*. Habilitační práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.

Lattman, E., Loll P. J., & Loll, P. (2008). *Protein crystallography: a concise guide*. Baltimore, USA: Johns Hopkins University Press.

Marek, J., & Trávníček, Z. (2002). *Monokrystalová rentgenová strukturní analýza*. Olomouc, ČR: Univerzita Palackého v Olomouci.

McPherson, A. (1990). Current approaches to macromolecular crystallization. *European Journal of Biochemistry*, 189(1). 1-23.

McPherson, A., Malkin, A. I., & Kuznetsov, A. G. (1995). The science of macromolecular crystallization. *Structure*, 3(8). 759-768.

McPherson, A. (2004). Introduction to protein crystallization. *Methods*, 34(3). 254-265.

Miroshnichenko, M. L., Hippe, H., Stackebrandt, E., Kostrikina, N. A., Chernyh, N. A., Jeanthon, C., Nazina, T. N., Belyaev, S. S., & Bonch-Osmolovskaya, E. A. (2001). Isolation and characterization of *Thermococcus sibiricus* sp. nov. from a Western Siberia high-temperature oil reservoir. *Extremophiles*, 5(2). 85-91.

Morais, M. C., Zhang, W., Baker, A. S., Zhang, G., Dunaway-Mariano, D., & Allen, K. N. (2000). The crystal structure of *Bacillus cereus* phosphonoacetaldehyde hydrolase: insight into catalysis of phosphorus bond cleavage and catalytic diversification within the HAD enzyme superfamily. *Biochemistry*, 39(34). 10385-10396.

Nemčovičová, I., & Kutá Smatanová, I. (2012). Alternative Protein Crystallization Technique: Cross-Influence Procedure (CIP). In: E. Borisenko (Ed.), *Crystallization and Materials Science of Modern Artificial and Natural Crystals* (pp. 249-276). Rijeka, Chorvatsko: InTech.

Novak, H. R., Sayer, C., Isupov, M. N., Paszkiewicz, K., Gotz, D., Mearns Spragg, A., & Littlechild, J. A. (). Marine *Rhodobacteraceae* L-haloacid dehalogenase contains a novel His/Glu dyad that could activate the catalytic water. *FEBS Journal*, 280 (7). 1664-1680.

- Pandya, C., Dunaway-Mariano, D., Xia, Y., & Allen, K. N. (2014). Structure-guided approach for detecting large domain inserts in protein sequences as illustrated using the haloacid dehalogenase superfamily. *Proteins*, 82(9). 1896-1906.
- Pikuta, E. V., Marsic, D., Itoh, T., Bej, A. K., Tang, J., Whitman, W. B., Ng, J. D., Garriott, O. K., & Hoover, R. B. (2007). *Thermococcus thioireducens* sp. nov., a novel hyperthermophilic, obligately sulfur-reducing archaeon from a deep-sea hydrothermal vent. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt 7). 1612-1618.
- Querellou, J., Børresen, T., Boyen, C., Dobson, A., Höfle, M., Ianora, A., Jaspars, M., Kijjoe, A., Olafsen, J., Rigos, G., & Wijffels, R. (2010). *Marine biotechnology: A New Vision and Strategy for Europe: Marine Board-ESF Postition Paper 15*. Beernem, Belgie: European Science Foundation.
- Rao, K. N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J. B., Burley, S. K., & Swaminathan, S. (2006). Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: biochemical and biological implications. *Protein Science*, 15(7). 1735-1744.
- RCSB PDB: Protein Data Bank [online]. Dostupné z WWW: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>.
- Seifried, A., Schultz, J., & Gohla, A. (2013). Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS Journal*, 280(2). 549-571.
- Selengut, J. D., & Levine, R. L. (2000). MDP-1: a novel eukaryotic magnesium-dependent phosphatase. *Biochemistry*, 39(28). 8315-8324.
- Shin, D. H., Roberts, A., Jancarik, J., Yocota, H., Kim, R., Wemmer, D. E., & Kim, S. H. (2003). Crystal structure of a phosphatase with a unique substrate binding domain from *Thermotoga maritime*. *Protein Science*, 12(7). 1464-1472.
- Stetter, K. O., Huber, R., Blochl, E., Kurr, M., Eden, R. D., Fielder, M., Cash, H., & Vance, I. (1993). Hyperthermophilic archaea are thriving in deep North Sea and Alaskan oil reservoirs. *Nature*, 365(6448). 743-745.
- Stura, E. A., Nemerow, G. R., & Wilson, I. A. (1992). Strategies in the crystallization of glycoproteins and protein complexes crystallization. *Journal of Crystal Growth*, 122(1-4). 273-285.

- Takahata, Y., Nishijima, M., Hoaki, T., & Maruyama, T. (2000). Distribution and physiological characteristics of hyperthermophiles in the kubiki oil reservoir in Niigata, Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(1). 73-79.
- Tomčová, I., Branca, R. M. M., Bodó, G., Bagyinka, Cs., & Kutá Smatanová, I. (2006). Cross-crystallization method used for the crystallization and preliminary diffraction analysis of a novel di-haem cytochrome c4. *Acta Crystallographica Section F*, 62(8). 820-824.
- Tremblay, L. W., Dunaway-Mariano, D., & Allen, K. N. (2006). Structure and activity analyses of *Escherichia coli* K-12 NagD provide insight into the evolution of biochemical function in the haloalkanoic acid dehalogenase superfamily. *Biochemistry*, 45(4). 1183-1193.
- Valverde, C., Orozco, A., Becerra, A., Jeziorski, M. C., Villalobos, B., & Solis, J. C. (2004). Halometabolites and cellular dehalogenase systems: an evolutionary perspective. *International Review of Cytology Journal*, 234. 143-199.
- Weightman, A. J., Topping, A. W., Hill, K. E., Lee, L. L., Sakai, K., Slater, J. H., & Thomas, A. W. (2002). Transposition of DEH, a broad-host-range transposon flanked by IS_{Ppu12}, in *Pseudomonas putida* is associated with genomic rearrangements and dehalogenase gene silencing. *Journal Bacteriol*, 184(23). 6581-6591.
- Zhang, G., Mazurkie, A. S., Dunaway-Mariano, D., & Allen, K. N. (2002). Kinetic evidence for a substrate-induced fit in phosphonoacetaldehyde hydrolase catalysis. *Biochemistry*, 41(45). 13370-13377.

8. Přílohy

Informace o proteinu Tt81

aminokyselinová sekvence:

MIKAVFFDLDDTLVDTSRLAEMARRNAIENMVRHGLPVDFDTAYHELLELINEYGS
NFSRHFDYLLRRLDLPNNPKWIAAGVIA YHNTKFAYLKSVRGARRVLELKKSGYK
LGIITDGDPIKQWEKVIRLELDDYFDGVFISDYLGVKKPHPKIFQKALRKMVPEGE
AIMVGDRLYSDIYGAKQVGMKTAWFKYGYADRELEYLEYADFTVERLEDVLDV
VRGLNLEEEERADKEVHAG

genetická sekvence:

ATGATAAAGGCCGTGTTCTTTGACCTGGACGACACGCTCGTGGACACGAGCAGG
CTGGCCGAGATGGCGCGCCGAAACGCCATAGAGAACATGGTACGCCATGGCCT
GCCGGTCGATTTTGATACCGCCTATCATGAGCTCCTTGAGCTGATAAACGAATAC
GGGAGCAATTTTTCGAGGCACTTTGACTACCTGCTCAGGCGCCTCGACCTTCAA
ACAACCCCAAATGCATAGCCGCCGGGGTTATAGCGTACCACAACACGAAGTTCG
CCTACCTGAAGAGCGTCCGCGGTGCCAGGAGAGTCCTCCTTGAGCTGAAGAAGT
CGGGCTATAAGCTTGGCATAATAACCGATGGTGACCCGATAAAGCAGTGGGAG
AAGGTAATCCGCCTCGAACTGGACGACTACTTCGACGGCGTCTTCATCTCGGAC
TACCTCGGCGTTAAGAAGCCGCACCCCAAGATATTTTCAGAAAGCCCTGAGGAAG
ATGGGCGTTGAACCCGGCGAAGCCATAATGGTGGGCGACAGGCTGTACTCCGAC
ATTTACGGTGCCAAGCAAGTGGGCATGAAGACCGCATGGTTTTAAATACGGCAA
TATGCTGACAGGGAGCTGGAATACCTTGAGTACGCCGACTTTACAGTGGAGAGA
CTTGAGGACGTCCTGGATGTAGTCAGGGGGCTGAACCTTGAAGAGGAAGAGCGT
GCAGATAAGGAAGTTCATGCTGGTTGA

počet aminokyselin: 242

zastoupení jednotlivých aminokyselin:

Ala (A)	18	7,4 %	Lys (K)	19	7,9 %
Arg (R)	17	7,0 %	Met (M)	6	2,5 %
Asn (N)	8	3,3 %	Phe (F)	11	4,5 %
Asp (D)	21	8,7 %	Pro (P)	7	2,9 %
Cys (C)	0	0,0 %	Ser (S)	7	2,9 %
Gln (Q)	3	1,2 %	Thr (T)	7	2,9 %
Glu (E)	20	8,3 %	Trp (W)	3	1,2 %
Gly (G)	17	7,0 %	Tyr (Y)	14	5,8 %
His (H)	6	2,5 %	Val (V)	18	7,4 %
Ile (I)	13	5,4 %	Pyl (O)	0	0,0 %
Leu (L)	27	11,2 %	Sec (U)	0	0,0%

molekulová hmotnost: 28034,1 Da**teoretický izoelektrický bod: 5,76**

Seznam a obsah použitých krystalizačních činidel pro krystalizaci proteinu Tt81

Tube #	Salt	Tube #	Buffer \diamond	Tube #	Precipitant
1.	None	1.	0.1 M Citric acid pH 3.5	1.	2.0 M Ammonium sulfate
2.	None	2.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	2.	2.0 M Ammonium sulfate
3.	None	3.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	3.	2.0 M Ammonium sulfate
4.	None	4.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	4.	2.0 M Ammonium sulfate
5.	None	5.	0.1 M HEPES pH 7.5	5.	2.0 M Ammonium sulfate
6.	None	6.	0.1 M Tris pH 8.5	6.	2.0 M Ammonium sulfate
7.	None	7.	0.1 M Citric acid pH 3.5	7.	3.0 M Sodium chloride
8.	None	8.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	8.	3.0 M Sodium chloride
9.	None	9.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	9.	3.0 M Sodium chloride
10.	None	10.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	10.	3.0 M Sodium chloride
11.	None	11.	0.1 M HEPES pH 7.5	11.	3.0 M Sodium chloride
12.	None	12.	0.1 M Tris pH 8.5	12.	3.0 M Sodium chloride
13.	None	13.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	13.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
14.	None	14.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	14.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
15.	None	15.	0.1 M HEPES pH 7.5	15.	0.5 M Magnesium formate dihydrate
16.	None	16.	0.1 M Tris pH 8.5	16.	0.3 M Magnesium formate dihydrate
17.	None	17.	None - pH 5.6	17.	1.26 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.14 M Potassium phosphate dibasic
18.	None	18.	None - pH 6.9	18.	0.49 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 0.91 M Potassium phosphate dibasic
19.	None	19.	None - pH 8.2	19.	0.056 M Sodium phosphate monobasic monohydrate 1.344 M Potassium phosphate dibasic
20.	None	20.	0.1 M HEPES pH 7.5	20.	1.4 M Sodium citrate tribasic dihydrate
21.	None	21.	None	21.	1.8 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0
22.	None	22.	None	22.	0.8 M Succinic acid pH 7.0
23.	None	23.	None	23.	2.1 M DL-Malic acid pH 7.0
24.	None	24.	None	24.	2.8 M Sodium acetate trihydrate pH 7.0
25.	None	25.	None	25.	3.5 M Sodium formate pH 7.0
26.	None	26.	None	26.	1.1 M Ammonium tartrate dibasic pH 7.0
27.	None	27.	None	27.	2.4 M Sodium malonate pH 7.0
28.	None	28.	None	28.	35% v/v Tacsimate™ pH 7.0
29.	None	29.	None	29.	60% v/v Tacsimate™ pH 7.0
30.	0.1 M Sodium chloride	30.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	30.	1.5 M Ammonium sulfate
31.	0.8 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	31.	0.1 M Tris pH 8.5	31.	0.5% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
32.	1.0 M Ammonium sulfate	32.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	32.	1% w/v Polyethylene glycol 3,350
33.	1.1 M Sodium malonate pH 7.0	33.	0.1 M HEPES pH 7.0	33.	0.5% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
34.	1.0 M Succinic acid pH 7.0	34.	0.1 M HEPES pH 7.0	34.	1% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
35.	1.0 M Ammonium sulfate	35.	0.1 M HEPES pH 7.0	35.	0.5% w/v Polyethylene glycol 8,000
36.	15% v/v Tacsimate™ pH 7.0	36.	0.1 M HEPES pH 7.0	36.	2% w/v Polyethylene glycol 3,350
37.	None	37.	None	37.	25% w/v Polyethylene glycol 1,500
38.	None	38.	0.1 M HEPES pH 7.0	38.	30% v/v Jeffamine® M-600® pH 7.0
39.	None	39.	0.1 M HEPES pH 7.0	39.	30% v/v Jeffamine® ED-2001 pH 7.0
40.	None	40.	0.1 M Citric acid pH 3.5	40.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
41.	None	41.	0.1 M Sodium acetate trihydrate pH 4.5	41.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
42.	None	42.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	42.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
43.	None	43.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	43.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
44.	None	44.	0.1 M HEPES pH 7.5	44.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
45.	None	45.	0.1 M Tris pH 8.5	45.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
46.	None	46.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	46.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
47.	None	47.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	47.	28% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
48.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	48.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	48.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol

Tube #	Salt	Tube #	Buffer \diamond	Tube #	Precipitant
49.	0.2 M Calcium chloride dihydrate	49.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	49.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
50.	0.2 M Ammonium acetate	50.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	50.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
51.	0.2 M Ammonium acetate	51.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	51.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
52.	0.2 M Ammonium acetate	52.	0.1 M HEPES pH 7.5	52.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
53.	0.2 M Ammonium acetate	53.	0.1 M Tris pH 8.5	53.	45% v/v (+/-)-2-Methyl-2,4-pentanediol
54.	0.05 M Calcium chloride dihydrate	54.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	54.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
55.	0.05 M Magnesium chloride hexahydrate	55.	0.1 M HEPES pH 7.5	55.	30% v/v Polyethylene glycol monomethyl ether 550
56.	0.2 M Potassium chloride	56.	0.05 M HEPES pH 7.5	56.	35% v/v Pentaerythritol propoxylate (5/4 PO/OH)
57.	0.05 M Ammonium sulfate	57.	0.05 M BIS-TRIS pH 6.5	57.	30% v/v Pentaerythritol ethoxylate (15/4 EO/OH)
58.	None	58.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	58.	45% v/v Polypropylene glycol P 400
59.	0.02 M Magnesium chloride hexahydrate	59.	0.1 M HEPES pH 7.5	59.	22% w/v Poly(acrylic acid sodium salt) 5,100
60.	0.01 M Cobalt(II) chloride hexahydrate	60.	0.1 M Tris pH 8.5	60.	20% w/v Polyvinylpyrrolidone K 15
61.	0.2 M L-Proline	61.	0.1 M HEPES pH 7.5	61.	10% w/v Polyethylene glycol 3,350
62.	0.2 M Trimethylamine N-oxide dihydrate	62.	0.1 M Tris pH 8.5	62.	20% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
63.	5% v/v Tacsimate™ pH 7.0	63.	0.1 M HEPES pH 7.0	63.	10% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 5,000
64.	0.005 M Cobalt(II) chloride hexahydrate 0.005 M Nickel(II) chloride hexahydrate 0.005 M Cadmium chloride hydrate 0.005 M Magnesium chloride hexahydrate	64.	0.1 M HEPES pH 7.5	64.	12% w/v Polyethylene glycol 3,350
65.	0.1 M Ammonium acetate	65.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	65.	17% w/v Polyethylene glycol 10,000
66.	0.2 M Ammonium sulfate	66.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	66.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
67.	0.2 M Ammonium sulfate	67.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	67.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
68.	0.2 M Ammonium sulfate	68.	0.1 M HEPES pH 7.5	68.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
69.	0.2 M Ammonium sulfate	69.	0.1 M Tris pH 8.5	69.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
70.	0.2 M Sodium chloride	70.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	70.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
71.	0.2 M Sodium chloride	71.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	71.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
72.	0.2 M Sodium chloride	72.	0.1 M HEPES pH 7.5	72.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
73.	0.2 M Sodium chloride	73.	0.1 M Tris pH 8.5	73.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
74.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	74.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	74.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
75.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	75.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	75.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
76.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	76.	0.1 M HEPES pH 7.5	76.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
77.	0.2 M Lithium sulfate monohydrate	77.	0.1 M Tris pH 8.5	77.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
78.	0.2 M Ammonium acetate	78.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	78.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
79.	0.2 M Ammonium acetate	79.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	79.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
80.	0.2 M Ammonium acetate	80.	0.1 M HEPES pH 7.5	80.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
81.	0.2 M Ammonium acetate	81.	0.1 M Tris pH 8.5	81.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
82.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	82.	0.1 M BIS-TRIS pH 5.5	82.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
83.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	83.	0.1 M BIS-TRIS pH 6.5	83.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
84.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	84.	0.1 M HEPES pH 7.5	84.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
85.	0.2 M Magnesium chloride hexahydrate	85.	0.1 M Tris pH 8.5	85.	25% w/v Polyethylene glycol 3,350
86.	0.2 M Potassium sodium tartrate tetrahydrate	86.	None	86.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
87.	0.2 M Sodium malonate pH 7.0	87.	None	87.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
88.	0.2 M Ammonium citrate tribasic pH 7.0	88.	None	88.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
89.	0.1 M Succinic acid pH 7.0	89.	None	89.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
90.	0.2 M Sodium formate	90.	None	90.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
91.	0.15 M DL-Malic acid pH 7.0	91.	None	91.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
92.	0.1 M Magnesium formate dihydrate	92.	None	92.	15% w/v Polyethylene glycol 3,350
93.	0.05 M Zinc acetate dihydrate	93.	None	93.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
94.	0.2 M Sodium citrate tribasic dihydrate	94.	None	94.	20% w/v Polyethylene glycol 3,350
95.	0.1 M Potassium thiocyanate	95.	None	95.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000
96.	0.15 M Potassium bromide	96.	None	96.	30% w/v Polyethylene glycol monomethyl ether 2,000

9. Seznam zkratek

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

další zkratky:

3did - „three-dimensional interacting domains“, databáze interakcí proteinů, pro které je známá 3D struktura s vysokým rozlišením

ArchDB - databáze zaměřená na strukturní klasifikaci smyček získaných ze známých proteinových struktur

ATP - adenosintrifosfát

BindingDB - chemická databáze naměřených vazebných afinit, zaměřená na interakce proteinů a na malé molekuly s vlastnostmi léků

BindingMOAD - „Mother of All Databases“, databáze zaměřená na protein-ligand komplexy

BLAST - „The Basic Local Alignment Search Tool“, nástroj k vyhledávání podobných oblastí biologických sekvencí

ChEMBL - chemická databáze molekul s biologickou aktivitou a vlastnostmi léků

DNA - deoxyribonukleová kyselina, nukleová kyselina nesoucí genetické informace

HAD - označení enzymové nadrodiny halogenaciddehalogenas

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

IPTG - isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid

MES - 2-(N-morfolino)-ethansulfonová kyselina

PCR - polymerázová řetězová reakce, metoda namnožení konkrétního úseku DNA

PDBBind - databáze obsahující naměřené vazebné afinity, především protein-ligand komplexů dostupných z databáze RCSB PDB

PDBsum - databáze poskytující přehled 3D makromolekulárních struktur uložených v databázi RCSB PDB

PDBTM - „Protein Data Bank of Transmembrane proteins“, databáze shrnující transmembránové proteiny z databáze RCSB PDB

PEG - polyethylenglykol, číslo následující za zkratkou PEG udává průměrnou molární hmotnost v g/mol

PMM1 - fosfomannomutasa

PNKP - polynukleotid-5'-kinasa-3'-fosfatasa

PSHP - fosferin fosfatasa

RCSB PDB - „Protein Data Bank“, online databáze makromolekulárních struktur

SCOP - „Structural Classification of Proteins“, databáze zaměřená na klasifikaci proteinových strukturních domén na základě podobnosti jejich struktur a sekvencí aminokyselin

SDS-PAGE - elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného