

Jihočeský univerzita v Českých Budějovicích

Fakulta rybářství a ochrany vod

Ústav chemie a biochemie

Diplomová práce

**Strukturní studie mutantní varianty
halogenalkandehalogenasy DhaA106**

Autor práce: Bc. Pavel Malcher

Vedoucí práce: Mgr. Michal Kutý, PhD.

Konzultant práce: Doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, PhD.

Studijní program a obor: zootechnika, rybářství

Forma studia: prezenční

Ročník studia: 2014/2015

České Budějovice, 2015

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

V Českých Budějovicích 1. 5. 2015

.....

Pavel Malcher

Poděkování

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

Pavel Malcher

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Pavel MALCHER
Osobní číslo: V13N013P
Studijní program: N4103 Zootechnika
Studijní obor: Rybářství
Název tématu: Strukturní charakterizace vybrané mutantní formy halogenalkandehalogenasy DhaA
Zadávající katedra: Ústav komplexních systémů

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

Halogenalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které katalyzují hydrolytické štěpení vazby mezi halogenem a uhlíkem. Výsledkem uvedené dehalogenační reakce je tvorba primárního alkoholu a halogenidového iontu. Halogenalkandehalogenasy se vyznačují poměrně vysokou detoxifikační schopností. Halogenalkandehalogenasa DhaA izolovaná z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 a její mutantní varianty mohou být použity k detoxikaci průmyslových polutantů, např. 1,2,3-trichloropropanu (TCP). Pro poznání strukturně-funkční podstaty katalytického účinku halogenalkandehalogenasy byla realizována krystalografická analýza několika mutantních forem DhaA v jejich nativní formě a také s vybranými substráty. Diplomová práce bude zaměřena na pokračování ve výzkumu některé z mutantních forem halogenalkandehalogenasy DhaA izolované z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. Mutantní varianta DhaA31 byla úspěšně vykrytalizována v rámci bakalářské práce. Protože již bylo připraveno několik různých mutantních forem enzymu DhaA, cílem práce bude z difrakčních dat vyřešit strukturu nové mutantní formy a porovnat ji s již dříve studovanou variantou DhaA31. K tomu budou využity nástroje proteinové krystalografie a molekulárního modelování.

Rozsah grafických prací: 3-10
Rozsah pracovní zprávy: 50-70 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná
Seznam odborné literatury:

Tratsiak, K., Degtjarik, O., Drienovska, I., Chrast, L., Rezacova, P., Kutý, M., Chaloupkova, R., Damborsky J. and Kuta Smatanova, J., 2013. Crystallographic analysis of new psychrophilic haloalkane dehalogenases: DpcA from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 and DmxA from *Marinobacter* sp. ELB17. *Acta Cryst.* F69, 683-688s.

Lahoda, M., Chaloupkova, R., Stsiapanava, A., Damborsky, J. and Kuta Smatanova, I., 2011. Crystallization and crystallographic analysis of the *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 DhaA mutant DhaA31 and its complex with 1,2,3-trichloropropane. *Acta Cryst* F67, 397-400 (2011).

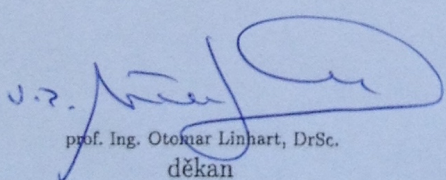
Stsiapanava, A., Chaloupkova, R., Fortova, A., Brynda, J., Weiss, M., Damborsky J. and Kuta Smatanova, I.: Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild type haloalkane dehalogenase DhaA and the variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Cryst* F67, 253-257s.

Stsiapanava, A., Dohnalek, J., Gavira, J. A., Kutý, M., Koudelakova, T., Damborsky, J. and Kuta Smatanova, I., 2008. Atomic resolution studies of haloalkane dehalogenases DhaA04, DhaA14 and DhaA15 with engineered access tunnels. *Acta Cryst* D66, 962-969 (2010).


Stsiapanava, A., Koudelakova, T., Lapkouski, M., Pavlova, M., Damborsky J. and Kuta Smatanova I.: Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultrahigh resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Cryst.* F64, 137-140s.

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Michal Kutý, Ph.D.
Ústav komplexních systémů
Konzultant diplomové práce: doc. Mgr. Ivana Kutá Smatanová, Ph.D.
Ústav komplexních systémů

Datum zadání diplomové práce: 14. února 2014
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2015


prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.
děkan

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


Ing. Petr Císař, Ph.D.
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2014

Obsah

1. Úvod.....	7
2. Literární přehled.....	8
2.1. Dehalogenasy - definice, funkce a rozdělení	8
2.1.1. Halogenalkandehalogenasy (rodina α/β -HF).....	8
2.1.2. Haloaciddehalogenasy (rodina HAD)	10
2.1.3. Haloalkoholdehalogenasy (rodina SDR).....	12
2.1.4. Tautomerasy (rodina 4-OT).....	14
2.1.5. Ostatní dehalogenasy	16
2.2. Halogenalkandehalogenasy	16
2.2.1. Funkce	16
2.2.2. Struktura	17
2.2.3. Katalytická reakce	19
2.2.4. Substrátová specifita.....	19
2.2. Halogenalkandehalogenasa DhaA.....	20
2.2.1. Funkce enzymu DhaA	20
2.3. Mutantní varianty enzymu DhaA.....	21
3. Metodika	24
3.1. Krystalizace enzymu DhaA106.....	24
3.2. Sběr dat pro difrakční analýzu	25
3.3. Difrakční analýza	25
3.4. Zpracování dat, řešení a validace struktury.....	25
3.4.1. Zpracování dat	25
3.4.2. Úprava struktury	26
3.4.3. Ověření upraveného enzymu DhaA106	39
3.4.4. Validace struktury.....	40

3.4.5. Zobrazení molekulární struktury v programu VMD	41
3.5. Měření vzdáleností v aktivním místě v programu VMD	42
3.6. Simulace interakce proteinu DhaA106 se substrátem	43
4. Výsledky	45
4.1. Krystalizace proteinu DhaA106	45
4.2. Difrakční analýza	45
4.3. Modelování proteinu DhaA106	47
4.4. Rafinace molekulární struktury enzymu DhaA106	47
4.5. Validace enzymu DhaA106	47
4.6. Zobrazení aktivního místa a celého enzymu DhaA106	49
4.7. Simulace proteinu DhaA106 se substrátem	51
5. Diskuze	53
5.1. Krystalizace	53
5.2. Difrakční analýza	55
5.3. Rafinace, validace a úprava struktury DhaA106	56
5.4. Charakteristika aktivního místa proteinu DhaA106	56
5.5. Simulace interakce proteinu DhaA106 se substrátem	57
6. Závěr	59
7. Seznam použité literatury	60
8. Přílohy	70
9. Abstrakt (česky)	71
10. Abstrakt (anglicky)	72

1. Úvod

Halogenalkandehalogenasy jsou mikrobiální enzymy, které hydrolyticky štěpí vazbu mezi uhlíkem a halogenem halogenovaných organických sloučenin, z nichž mnohé patří mezi významné průmyslové polutanty. Výsledným produktem této reakce je alkohol a halogenidový aniont. Halogenalkandehalogenasa DhaA izolovaná z bakterie *Rhodococcus rhodochour* NCIMB 13064 společně s jejími mutantními variantami může být použita pro detoxikaci mnoha průmyslových polutantů, mezi něž patří i karcinogenní sloučenina 1,2,3-trichlorpropan (TCP). Základní varianta DhaA není schopna uvedenou toxickou látku odbourávat v průmyslovém měřítku, proto byly vytvořeny mutantní varianty pro urychlení detoxikační reakce TCP. Pro pochopení strukturně-funkční podstaty enzymatické dehalogenační reakce byly provedeny krystalografické analýzy nativních a mutantních forem enzymů a také enzymů s vybranými substráty.

Cílem této práce byly krystalizační studie mutantní varianty enzymu dehalogenázy DhaA106. Ze získaných difrakčních dat bylo nezbytné vyřešit molekulární strukturu enzymu pomocí nástrojů proteinové krystalografie a molekulárního modelování. Výsledkem práce je simulace působení enzymu DhaA106 se substrátem 1,2-dibromethanem a porovnání charakteristik enzymu s mutantní dehalogenasou DhaA31 a dalšími mutantními variantami.

2. Literární přehled

2.1. Dehalogenasy - definice, funkce a rozdělení

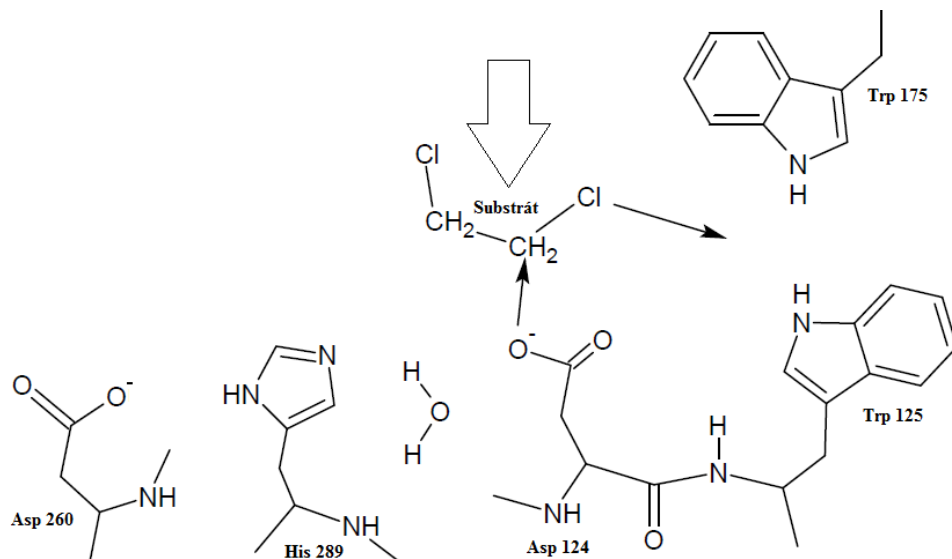
Halogenované organické sloučeniny tvoří velmi důležitou a různorodou skupinu environmentálních chemikálií (Janssen a kol., 2001). Pro některé aerobní organismy mohou halogenované sloučeniny sloužit jako zdroj uhlíku a energie (van Hylckama Vlieg a kol., 2001). Organismy štěpící halogenované sloučeniny mají pro degradaci zmíněných sloučenin speciální enzymatický aparát, jimž jsou schopny degradovat halogenové sloučeniny. Tyto enzymy se nazývají dehalogenasy a jsou klíčovým katalyzátorem při degradaci halogenovaných sloučenin. V budoucnosti mohou být tyto enzymy velmi ceněné v biotransformaci některých polutantů půd, povrchových a podzemních vod (Janssen a kol., 2005; van Hylckama Vlieg a kol., 2001).

Zmíněné enzymy katalyzují klíčovou reakci při odstranění halogenu, kdy při této reakci dojde k uvolnění halogenidu, který je většinou zodpovědný za toxicitu původní sloučeniny (Janssen a kol., 2001).

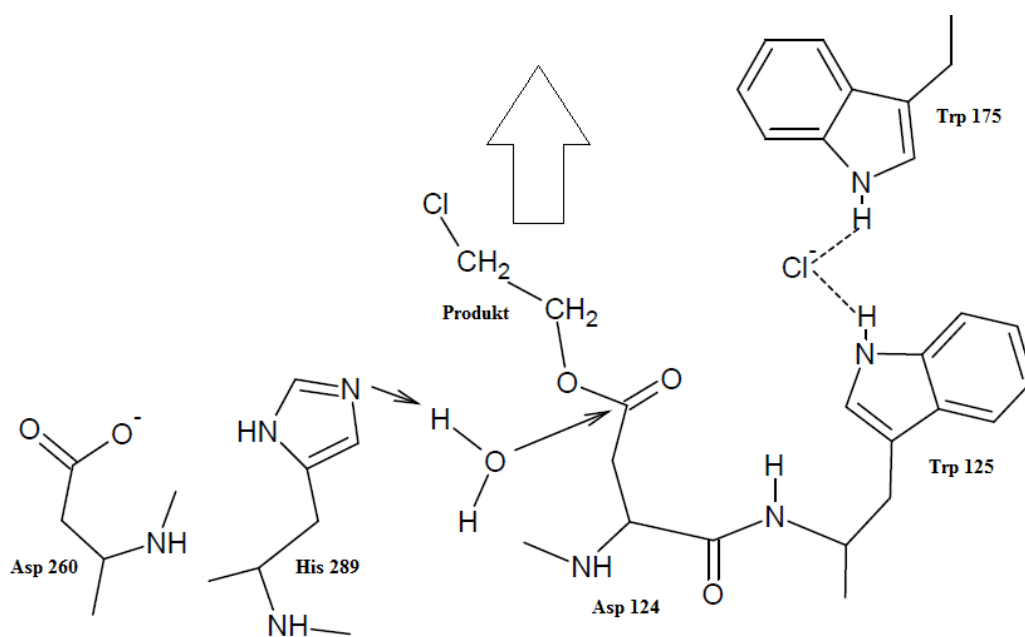
Jejich mechanismus a struktura jsou dobře popsány pouze u některých nadrodin (van Hylckama Vlieg a kol., 2001).

2.1.1. Halogenalkandehalogenasy (rodina α/β -HF)

Halogenalkandehalogenasy náleží do rodiny α/β hydrolas (α/β -HF) (Janssen a kol., 2005, Ollis a kol., 1992). Do rodiny α/β hydrolas náleží také řada lipas, acetylcholinsteras, esteras a jiných enzymů, avšak tyto enzymy štěpí především nehalogenované sloučeniny (Janssen a kol., 2005). Halogenalkandehalogenasy hydrolyticky štěpí vazbu uhlík-halogen, za uvolnění halogenidu a namísto něj se na substrát naváže hydroxylová skupina z molekuly vody, čímž vznikne alkohol, jako výsledný produkt (Janssen a kol., 2001). Schéma reakce v katalytickém místě enzymu je uvedeno na příkladu enzymu Dh1A (Obrázek č.1, 2).



Obrázek č.1: Zahájení katalytické reakce, vstupující substrát (2-chlorethan) reaguje s Asp 124 za vzniku esterické vazby, současně se odštěpí chlorid, který se nekovalentně naváže mezi aminokyseliny Trp 175 a Trp 125 (převzato od Janssen a kol., 2005).



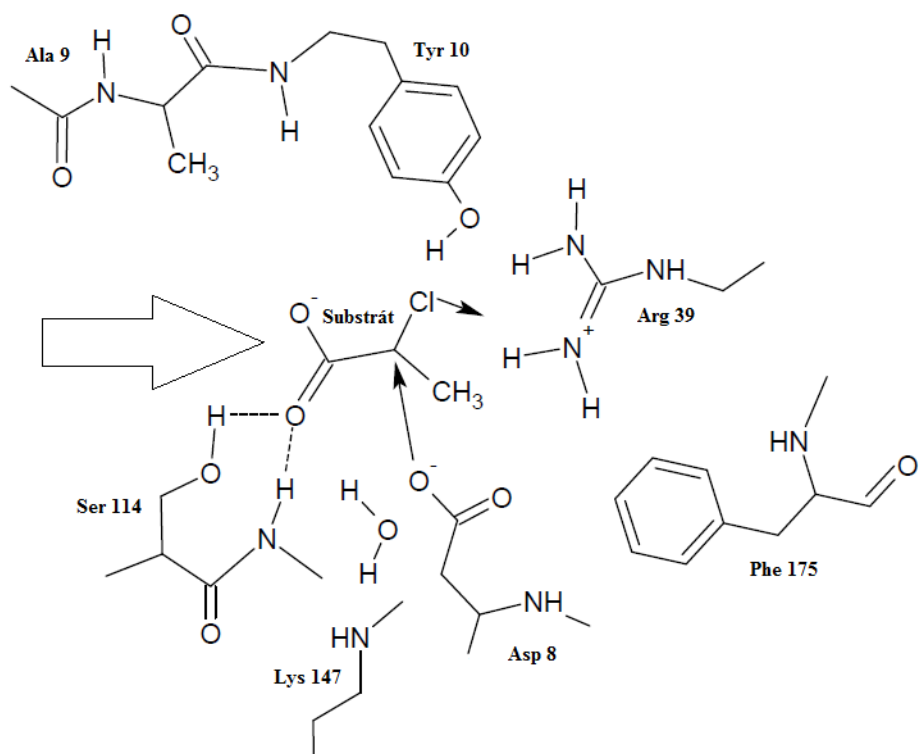
Obrázek č.2: Hydrolytické štěpení esterické vazby s následným uvolněním vzniklého alkoholu (produktu) z aktivního místa, chlorid je navázán nekovalentní interakcí mezi Trp 175 a Trp 125 až do příchodu dalšího substrátu (převzato od Janssen a kol., 2005).

Halogenalkandehalogenasy se podle způsobu jejich izolace rozdělují do dvou tříd a to na ty, které byly izolovány z bakterií rodu *Rhodococcus* také na ty z rodu *Xanthobacter* (Newman a kol., 1999). Na základě fylogenetické analýzy byly

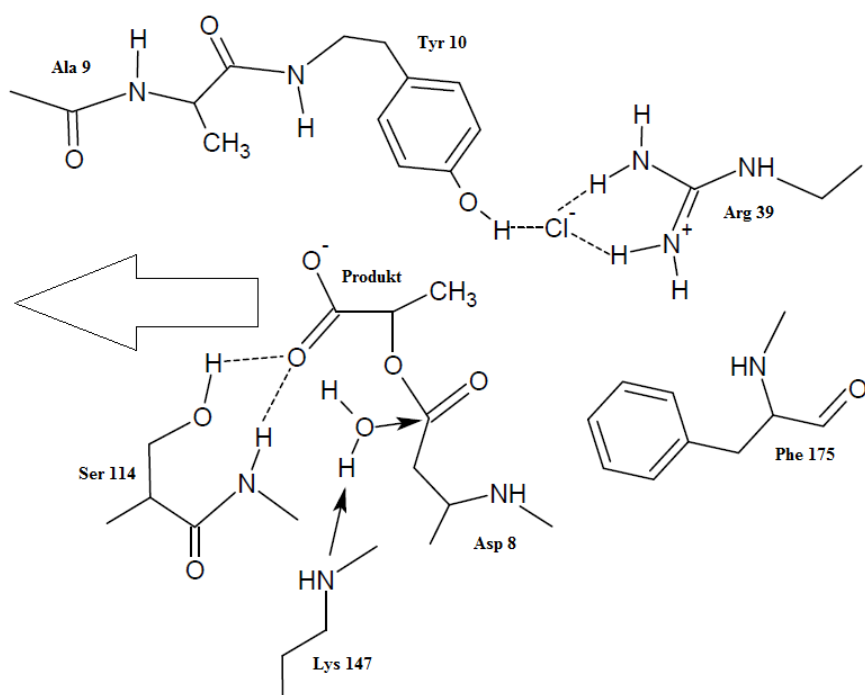
halogenalkandehalogenasy rozděleny do tří podrodin (HLD-I, HLD-II a HLD-III) (Chovancová a kol., 2007). Halogenalkandehalogenasy sdílejí 30 % identické sekvence aminokyselin (Newman a kol., 1999), zbylých 70 % sekvence nemá podobnost, ačkoli mají společného předka a velmi podobnou strukturu (Damborsky a kol., 2010; Janssen a kol., 2001). Tato homologní sekvence aminokyselin je spojena s téměř identickou strukturou hlavní domény enzymu. Jistá odlišnost je popsána především u cap domény a aktivního místa, které obsahuje u každého enzymu různou katalytickou triádu, jinak řečeno tři aminokyseliny, které zajišťují katalytickou reakci a přeměnu substrátu na produkt (Newman a kol., 1999). Detailně jsou haloalkandehalogenasy popsány v kapitole 1.2.

2.1.2. Haloaciddehalogenasy (rodina HAD)

Poměrně početná rodina alifatických dehalogenas (HAD) s různorodou substrátovou specifitou jsou haloaciddehalogenasy (Koonin a Tatusov, 1994). Tyto enzymy jsou rozděleny do dvou skupin (Hisano a kol., 1996), a to do skupiny I a II (Janssen a kol., 2001). Strukturou jsou velmi odlišné od halogenalkandehalogenas, ale jsou velmi podobné fosfatasam (Janssen a kol., 2001; Janssen a kol., 2005). Jejich funkce je spojena s detoxikací xenobiotik a jejich vedlejších metabolických produktů (Koonin a Tatusov, 1994). Haloaciddehalogenasy obsahují stejně jako halogenalkandehalogenasy nukleofilní aspartát, který se podílí na formování kovalentního meziprojektu nukleofilní substitucí. Na štěpení substrátu se podílí pentáda aminokyselin v aktivním místě enzymu a dvě další aminokyseliny: arginin a lysin. Arginin slouží společně s tyrozinem k navázání halogenidu. Lysin působí jako katalytická báze potřebná ke štěpení meziprojektu (Janssen a kol., 2005). Příkladem haloaciddehalogenas jsou například 2-haloacidehalogenasy, které štěpí vazbu uhlík-halogen u 2-halogenalkanových kyselin, výsledný produkt je pak 2-hydroxyalkanová kyselina (Kurihara a kol., 2000). Celé schéma reakce v katalytickém místě enzymu je uvedeno na obrázku č.3 a 4 na příkladu enzymu Dh1B.



Obrázek č.3: Navázání substrátu 2-chlorpropanové kyseliny do katalytického místa, substrát se navazuje druhým uhlíkem na Asp 8 za vzniku esteru jako meziproductu (převzato od Janssen a kol., 2005).

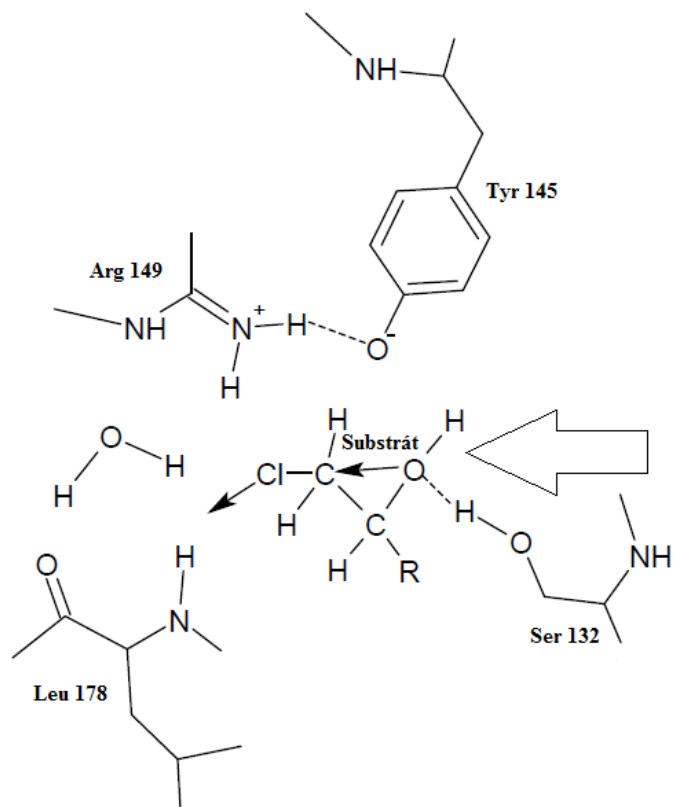


Obrázek č.4: Meziproduct je štěpen hydrolyzou za účasti katalytické báze lysinu, chlorid je navázán nekovalentně mezi Tyr 10 a Arg 39. Výsledná 2-hydroxypropanová kyselina opouští katalytické centrum (převzato od Janssen a kol., 2005).

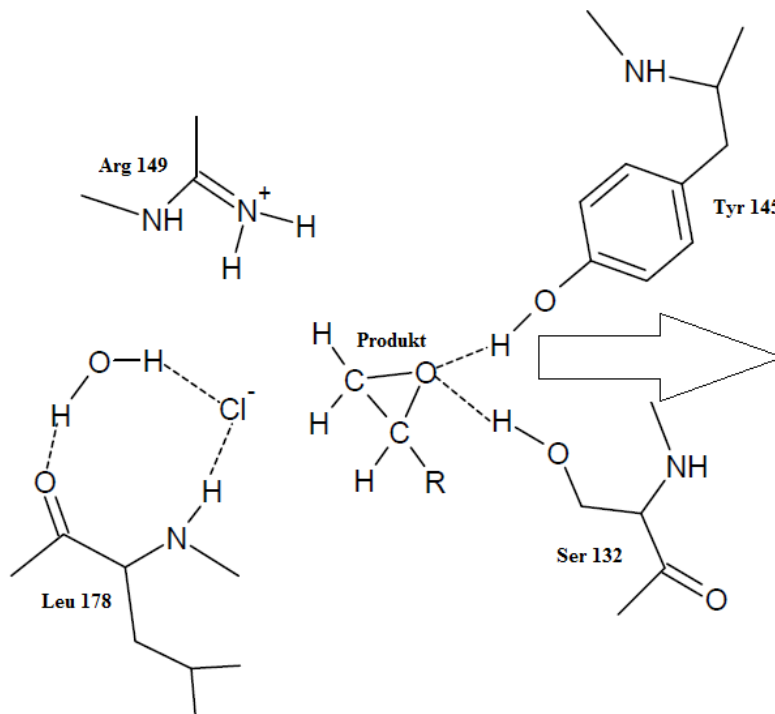
2.1.3. Haloalkoholdehalogenasy (rodina SDR)

Třetí rodinou alifatických dehalogenas představují haloalkoholdehalogenasy (de Jong a kol., 2003). Tyto enzymy lze nalézt v některých bakteriích využívajících haloalkoholy jako zdroj energie a uhlíku (Janssen a kol., 2006). Haloalkoholdehalogenasy katalyzují reakce vytěsnění halogenu z haloalkoholu, za vzniku epoxidu jako finálního produktu (van Hylckama Vlieg a kol., 2001), přičemž nedochází k tvorbě meziproduktů (Janssen a kol., 2005). Dehalogenasy této rodiny jsou strukturně velmi podobné, nicméně jejich substrátová specifita je odlišná (van Hylckama Vlieg a kol., 2001). V aktivním místě se nachází tetřada aminokyselin, která uvolňuje proton a halogenid ze substrátu (haloalkoholu) a vylučuje z aktivního místa epoxid jako produkt reakce. V haloalkoholdehalogenasach jsou zastoupeny aminokyseliny v tetřadě Ser, Tyr, Arg a Asp a v ostatních enzymech SDR superrodiny v tetřadě Ser, Tyr, Lys a Asp (Janssen a kol., 2006). V celém katalytickém cyklu je nejpomalejším krokem uvolnění halogenidu z aktivního místa (Tang a kol., 2003). Celé schéma reakce v katalytickém místě enzymu je uvedeno na obrázku č.5 a 6 na příkladu enzymu HheC.

Na základě rentgenové strukturní analýzy bylo zjištěno, že haloalkoholdehalogenasy náleží do SDR rodiny (Janssen a kol., 2006). Celá SDR rodina je charakteristická krátkým řetězcem (van Hylckama Vlieg a kol., 2001). Některé klíčové dehalogenasy z této rodiny byly studovány a byla u nich vyřešena struktura a popsán mechanismus reakcí v aktivním místě (Copley, 1998). Janssen a kol. (2005) uvádí jako příklad enzymy HheA, HheB a HheC. Hlavní sloučeniny, které degradují, jsou halopropanoly a 1,2-dibromethan (Castro a Bartnicki, 1968), ale jsou také schopny katalyzovat i opačné reakce (Assis a kol., 1998). Zájem o haloalkoholdehalogenasy je vysoký z hlediska produkce opticky čistých epoxidů a alkoholů (Kasai a kol., 1998).



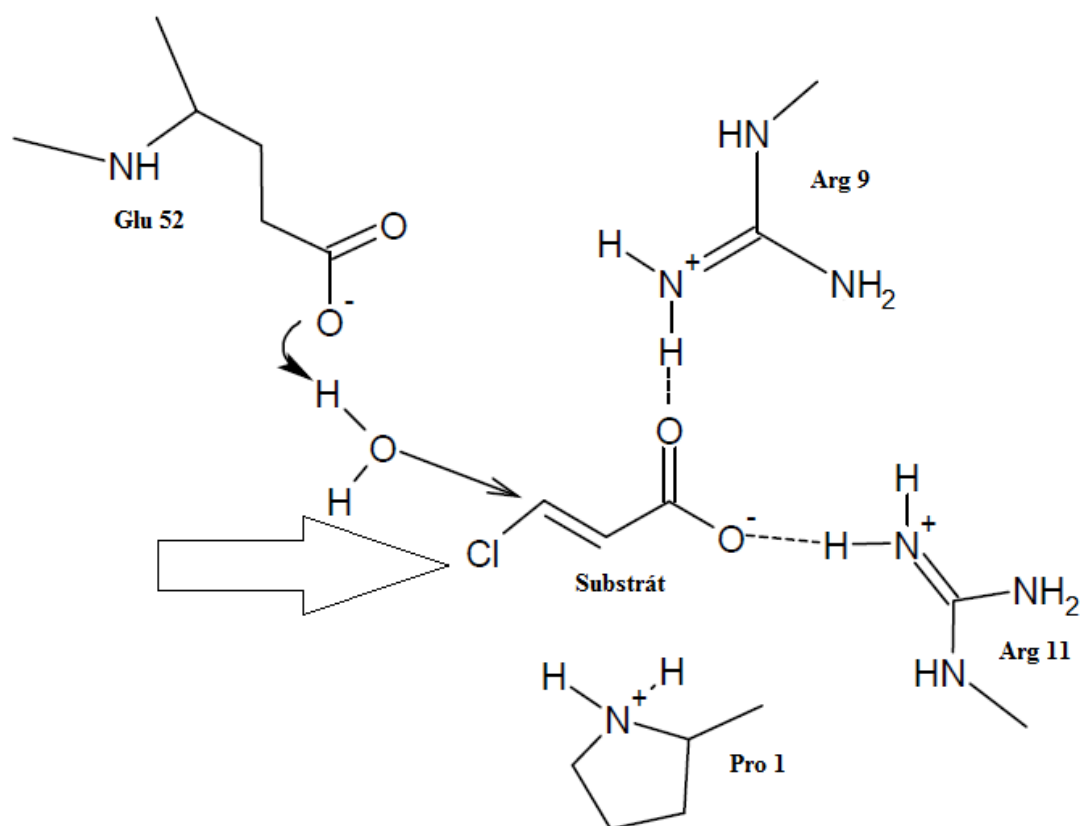
Obrázek č.5: Navázání 1-chloropropanolu (substrátu) do katalytického centra enzymu (převzato od Janssen a kol., 2005).



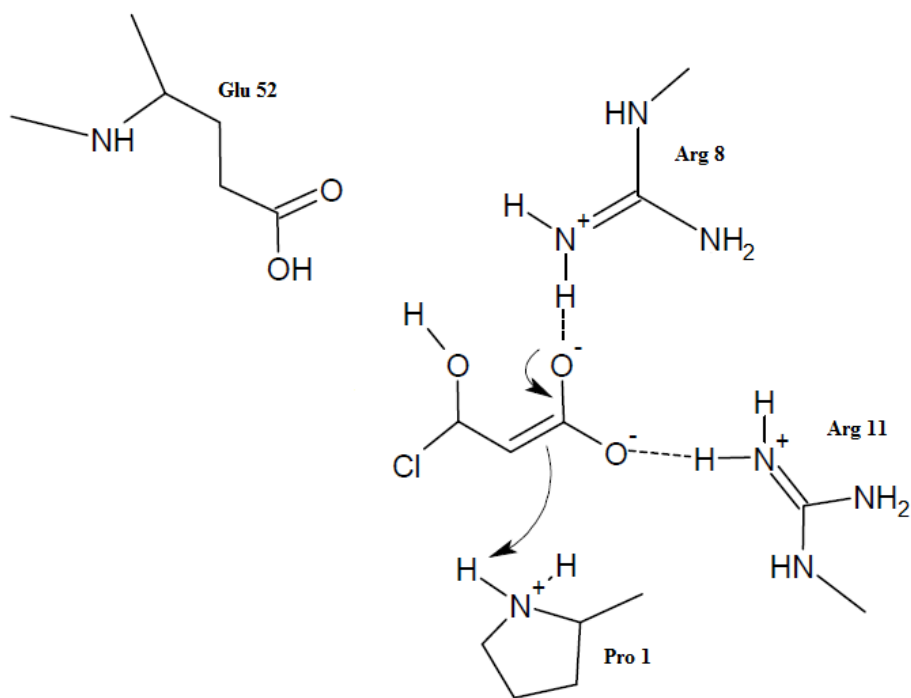
Obrázek č.6: Vznik epoxidu (produktu), odštěpení chloridu, který je nekovalentně navázán mezi molekulu vody a Leu 178 (převzato od Janssen a kol., 2005).

2.1.4. Tautomerasy (rodina 4-OT)

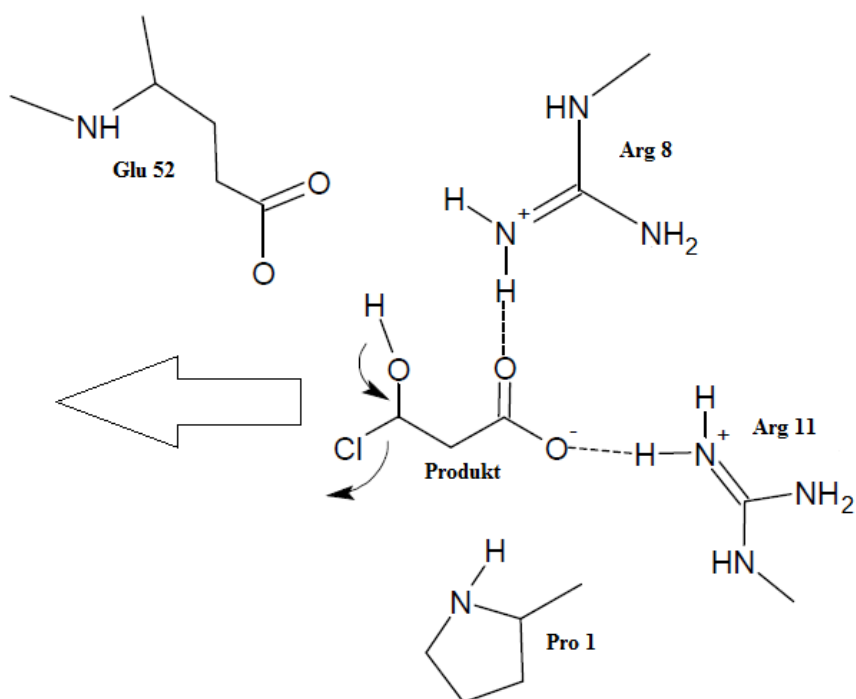
Enzymy této rodiny se vyznačují prstencovou hexamerní strukturou, která je tvořena trimery dimerů. Tyto enzymy jsou přítomny v bakteriích, které degradují nematocid 1,3-dichlorpropen (Janssen a kol., 2005). Při dehalogenaci nedochází k tvorbě meziproductu (de Jong a kol., 2004). Hlavním zástupcem je 3-chlorakrylová kyselina dehalogenasa (CaaD) (Janssen a kol., 2005). Celé schéma reakce v katalytickém místě enzymu je uvedeno na obrázku č.7, 8 a 9 na příkladu enzymu CaaD.



Obrázek č.7: Navázání substrátu 3-chlorprop-2-enové kyseliny do katalytického místa enzymu a interakce molekuly vody se substrátem s následným současným přesunem dvojných vazeb substrátu (převzato od Janssen kol., 2005).



Obrázek č.8: Zánik dvojné vazby a vznik nestabilní 3-hydroxy-3-chlorpropanové kyseliny (převzato od Janssen kol., 2005).



Obrázek č.9: Rozpad nestabilního meziproduktu dehalogenace 3-hydroxy-3-trichlorpropanové kyseliny na chlorid a na 3-oxopropanovou kyselinu jako produkt reakce (převzato od Janssen kol., 2005).

2.1.5. Ostatní dehalogenasy

U ostatních dehalogenas dosud nebyla vyřešena strukturní data a jejich mechanismus dehalogenace je odvozen pouze od podobných enzymů (Leisinger a kol., 1994). Většina těchto dehalogenas štěpí aromatické halogenové sloučeniny. K dehalogenaci halogenovaného substrátu dochází před, během, nebo po rozštěpení hlavního aromatického řetězce (Janssen a kol., 2001). Mezi další dehalogenasy štěpící aromatické sloučeniny patří 4-chlorbenzoyl-CoA dehalogenasa (CbzA) z *Pseudomonas* sp., která je společně s dalšími dvěma enzymy schopna degradovat 4-chlorbenzoát (Benning a kol., 1998). Při reakci nejprve dochází ke konjugaci s koenzymem A a následně dojde k uvolnění halogenidu. Uvedená dehalogenasa náleží do rodiny enoyl hydratasy (ECH) (Janssen a kol., 2005). Další podobnou dehalogenasou štěpící aromatické halogenové sloučeniny je tetrachlorohydrochinondehalogenasa, která katalyzuje reakci substituce chloru vodíkem ve sloučenině pentachlorofenolu (Kiefer a Copley, 2002). Poslední významnější dehalogenasa je AtzA, která se podílí na degradaci atrazinu (Seffernick a kol., 2001).

2.2. Halogenalkandehalogenasy

První halogenalkandehalogenasa byla již v roce 1985 izolovaná z bakterie *Xanthobacter autotrophicus* (Keuning a kol., 1985). Do roku 2010 bylo izolováno a popsáno celkem 14 enzymů typu halogenalkandehalogenas (Damborský a kol., 2010). Patří mezi ně například DhIA z *X. autotrophicus* (Franken a kol., 1991), DhaA z *Rhodococcus* sp. (Newman a kol., 1999), LinB z *Sphingobium japonicum* (Marek a kol., 2000), DmbA z *Mycobacterium tuberculosis* (Mazumdar a kol., 2008), DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* (Prokop a kol., 2009) a další jejich strukturní údaje jsou uloženy v proteinové databázi (Damborský a kol., 2010).

2.2.1. Funkce

Hydrolytické halogenalkandehalogenasy jsou enzymy skupiny hydrolas. Stejně jako u jiných enzymů jejich funkce spojena především s biokatalýzou chemických reakcí, konkrétně halogenalkanů na odpovídající alkohol, nebo halogenid (Newman a kol.,

1999; Janssen a kol., 1985). Tyto hydrolytické reakce jsou nevratné (Kulakova a kol., 1995) a dají se aplikovat například při bioremediaci polutantů v životním prostředí (Stucki a Thuer, 1995), nebo biosnímání toxických chemických látek (Campbell a kol., 2006).

Halogenalkandehalogenasy jsou stejně jako jiné enzymy substrátově specifické, katalyzují reakce chlorovaných, brómovaných a jodovaných sloučenin alkanů, alkenů, alkoholů, éterů, esterů, acetamidů, acetonitrilů a cykloalkanů (Damborsky a kol., 2001). Výzkum halogenalkandehalogenas je zaměřen především na možnou sanaci lokalit kontaminovaných halogenidovými rozpouštědly a jiných halogenidových sloučenin vznikajících jako vedlejší produkt při chemických procesech (Janssen a kol. 1985; Schindler a kol., 1999). Jako příklad uvádí Schindler a kol. (1999) vznik 1,2-dichlorpropanu, 1,2,3-trichlorpropanu a 1,2-dichlorbutanu při výrobě komerčních epoxidů, nebo některých pesticidů. Organismy využívají tyto halogenalkandehalogenasy jako zdroj uhlíku (Janssen a kol., 2005). Významné jsou enzymy z rodu *Rhodococcus*, které mají substrátovou specifitu mnohem širší ve srovnání s enzymy z rodu *Xanthobacter*, jsou tedy schopny navázat substrát s delším lineárním nebo sekundárním řetězcem, ale také i cyklické alkylhalogenidy (Schindler a kol. 1999). Navíc, enzymy z rodu *Rhodococcus* nejsou inhibovány nekompetitivní inhibicí produktem (Kulakova a kol., 1995).

2.2.2. Struktura

Struktura celé řady halogenalkandehalogenas byla podrobně zkoumána pomocí proteinové krystalografie (Liu a kol., 2007), bodových mutací (Pries a kol., 1995), enzymatické kinetiky (Bosma a kol., 2003) i molekulárního modelování (Bohac a kol., 2002).

Struktura halogenalkandehalogenas se skládá ze tří hlavních částí: hlavní domény, víčkové tzv. cap domény a aktivního místa (Damborsky a kol., 2010). Mezi hlavní doménou a cap doménou je aktivní místo, které společně s cap doménou a tunely spojujícími povrch a aktivní místo, určuje substrátovou specifitu (Pries a kol., 1994; Klvana a kol., 2009; Damborský a kol., 2010). Aktivní místo obsahuje katalytické aminokyseliny, které jsou charakteristické pro jednotlivé enzymy. Halogenalkandehalogenasy obsahují tři základní aminokyseliny (tzv. triádu) a dvě

aminokyseliny, které stabilizují halogenid v aktivním místě enzymu. Soubor těchto pěti aminokyselin se označuje jako katalytická pentáda (Damborsky a kol., 2010). Pentáda se liší v každé podrodině halogenalkandehalogenas:

- u podrodiny HLD-I pentádu představují aminokyseliny: triáda Asp, His, Asp a dva zbývající Trp,
- u HLD-II: triáda Asp, His, Glu a zbývající Asn, Trp,
- u HLD-III: triáda Asp, His, Asp a zbývající Asn, Trp (Chovancová a kol., 2007).

Celé aktivní místo je buď hydrofobní dutina (u enzymu Dh1A) nebo hydrofobní kapsa (u enzymů DhaA, LinB, DmbA a DbjA). Aktivní místa halogenalkandehalogenas se liší svým objemem (Dh1A < DhaA < DmbA < DbjA) (Damborsky a kol., 2010).

Do aktivního místa ústí tunely, které spojují aktivní místo s povrchem enzymu (Klvana a kol., 2009). U Dh1A je aktivní místo umístěno hluboko v jádře enzymu, které je s povrchem spojeno velmi úzkým tunelem s omezenou dostupností, zvláště pak pro molekuly vody (Verschueren a kol., 1993a). U DhaA a LinB je aktivní místo přístupnější, substrát do něj vstupuje hlavním a vedlejším tunelem (Petrek a kol., 2006). U DmbA a DbjA je aktivní místo nejpřístupnější, hlavní a vedlejší tunel je zde mnohem širší (Prokop a kol., 2008). Tunely jsou velmi důležitým strukturálním rysem halogenalkandehalogenas (Marek a kol., 2000). Jsou důležité jak pro substrátovou specifitu, tak i pro celý katalytický cyklus. Substrátovou specifitu určuje především velikost, tvar, fyzikálně-chemické vlastnosti a dynamické chování (Chaloupková a kol., 2003; Damborský a kol., 2010). Pro katalytický cyklus mají tunely zásadní význam především pro navázání substrátu, katalytické molekuly vody, uvolnění halogenového iontu a alkoholu (produktu) (Damborský a kol., 2010). Tunely halogenalkandehalogenas mohou být permanentní, nebo indukované (Klvana a kol., 2009). Permanentní tunely lze lokalizovat v krystalických strukturách bez substrátu, oproti tomu indukované tunely lze lokalizovat pouze ve strukturách enzymu s navázaným substrátem (Damborský a kol., 2010).

Cap doména se skládá z několika α -šroubovic spojených smyčkami (Kmunicek a kol., 2001). Hlavní doména je tvořena většinou osmi paralelními β -listy, které lemují α -šroubovice, které slouží jako opora pro katalytické aminokyseliny (Verschueren a kol., 1993c).

2.2.3. Katalytická reakce

Katalytická reakce je zahájena navázáním substrátu do aktivního místa enzymu. Kyslík z karboxylové skupiny aminokyseliny triády napadá uhlík substrátu (halogenované sloučeniny), na kterém je navázán halogen, který je následně vytěsněn a navázán mezi dvě aminokyseliny stabilizující halogenid v aktivním místě (Damborský a kol., 2010). Tyto dva kroky jsou velice rychlé a způsobují hromadění meziprojektu. Následně je vzniklý meziprojekt (alkyl-enzym) hydrolyzován molekulou vody, kterou aktivuje histidin. Molekula vody nukleofilně napadá vazbu meziprojektu za uvolnění finálního produktu (alkoholu) a stabilizaci náboje (Janssen a kol., 2005; Damborský a kol., 2010).

2.2.4. Substrátová specifita

Halogenalkandehalogenasy jsou široce specifické enzymy (Damborský a kol., 2010). Podle Damborského a kol. (2001) jsou halogenalkandehalogenasy schopny štěpit více než sto chlorovaných, bromovaných a jodovaných sloučenin, dále pak halogenalkany, halogenalkeny, halogenalkoholy, halogenethery, halogenestery, haloacetamidy, haloacetonitrily a cyklohaloalkany. Primárně je specifita dána cap doménou, sekundární specifitu určují tunely a aktivní místo (Damborský a kol., 2010).

Při degradaci halogenovaných sloučenin je prvním a zásadním krokem dehalogenace, kterou katalyzují enzymy halogenalkandehalogenasy. Mezi dvě základní podmínky, které rozhodují o tom, zda bude sloučenina degradována, jsou substrát a hromadění meziprojektu (Janssen a kol., 2005). Velikost substrátu (délka řetězce, konformace apod.) rozhoduje o tom, zda substrát bude navázán do aktivního místa či nikoli. Hromaděním toxických meziprojektů se značně snižuje rychlost reakce, tento problém vzniká většinou u substrátů obsahujících více než jeden halogen (Janssen a kol., 2005; van Hylckama Vlieg a kol., 2000).

Mezi významné substráty patří například 1,2,3-trichlorpropan, 1,3-dichlorpropylen, 1,2-dibromethan (Janssen a kol., 2001; Janssen a kol., 2005).

2.2. Halogenalkandehalogenasa DhaA

DhaA je významný enzym z rodiny halogenalkandehalogenas (Stsiapanava a kol., 2008), který byl izolován z grampozitivní bakterie *Rhodococcus rhodochrous* (Kulaková a kol., 1997). Celý enzym se skládá z 293 aminokyselin (Koudelakova a kol., 2013). V aktivním místě enzymu se nachází katalytická pentáda aminokyselin, kterou tvoří triáda aminokyselin: kyselina asparagová, histidin, glutamin a dvě aminokyseliny, které stabilizují halogenid, asparagin a tryptofan (Pavlova a kol., 2009). Do aktivního místa ústí několik tunelů (Stsiapanava a kol., 2008).

2.2.1. Funkce enzymu DhaA

Enzym DhaA je schopen detoxikace karcinogenu 1,2,3-trichlorpropan (TCP) na netoxický alkohol 2,3-dichlorpropan-1-ol (Bosma a kol., 1999; Schindler a kol., 1999). TCP vzniká při výrobě, zpracování a použití rozpouštědel a extrakčních činidel. Tato sloučenina se vyskytuje v nízkých koncentracích v povrchových a podpovrchových vodách (Damborský a kol., 2010; Yujing a Mellouki, 2001). Odhadovaný poločas rozpadu jak uvádí Yujing a Mellouki (2001) je více než sto let.

Odbourávání TCP pomocí divoké formy enzymu DhaA je příliš pomalé, aby se mohlo využít v průmyslovém měřítku, proto je většina vědeckých studií zaměřena na mutantní varianty enzymu, které jeho aktivitu několikanásobně zvyšují (Lahoda a kol., 2011). Některé mutantní formy DhaA, jako je například DhaA12, mohou rychle odbourávat i 1,3-dibrompropan (Emmer 2007).

Reakce je zahájena proniknutím substrátu (TCP), do aktivního místa enzymu dvěma hlavními tunely spojující aktivní místo s vnějším prostředím. Po průniku substrátu je zahájena reakce dehalogenace, která je katalyzována dehalogenasou DhaA. Po nekovalentním navázání halogenového substrátu dochází nejprve ke vzniku substrát-enzymového komplexu, který je následně napadán kyselinou asparagovou (Asp 106), za vzniku esteru jako meziprojektu. Současně se rozštěpí vazba mezi uhlíkem a halogenem, který se nekovalentně naváže jako halogenid mezi asparagin (Asn 41) a tryptofan (Trp 107). Uvedený meziprojekt je následně hydrolyticky rozložen molekulou vody za vzniku alkoholu jako výsledného produktu (Schindler a kol., 1999; Pavlova a kol., 2009).

2.3. Mutantní varianty enzymu DhaA

Činnost a specifita halogenalkandehalogenas není efektivní pro průmyslové využití (Swanson, 1999), mnoho studií je proto zaměřeno na vylepšení jejich vlastností pomocí různých metod. Jednou z nich je například mutagenese struktury enzymu (Chaloupková a kol., 2003), která je aplikována na základě poznání krystalové struktury a následného počítačového modelování (Banas a kol., 2006).

Mutagenese helogenalkandehalogenas se provádí podle Damborského a kol. (2010) z důvodů: (1) rozšíření selektivity na substráty, ze kterých lze vytvořit hodnotné produkty, (2) zvýšení odolnosti k organickým rozpouštědlům při jejich dekontaminaci, (3) zrychlení reakce přeměny nebezpečných substrátů v neškodný produkt, (4) rozšíření rozsahu pH pro optimální činnost enzymu a (5) posílení stability.

TCP je vysoce rezistentní vůči přirozené degradaci za aerobních podmínek, proto se nabízí možnost vytvořit pomocí genového inženýrství dehalogenasu DhaA s vylepšenou konverzí a rychlejší degradací této škodlivé látky (Damborský a kol., 2010). První mutantní variantu vytvořil Gray a kol. (2001) substitucí fenylalaninu na pozici 176. Tato varianta byla 4 krát účinnější vůči konverzi TCP ve srovnání s divokou formou DhaA (Gray a kol., 2001). Další mutantní variantu vytvořil Bosma a kol. (2002), která měla 3,5 krát větší účinnost vůči konverzi TCP než původní divoký typ (Bosma a kol., 2002). Do roku 2009 bylo vytvořeno v kombinaci pokročilých počítačových metod a modelování dalších 25 enzymových variant s vyšší aktivitou vůči TCP (Pavlová a kol., 2009).

DhaA je enzym s vysokým potenciálem pro biokatalýzu (Janssen, 2007). Celý biokatalytický proces závisí na kombinaci reakční rychlosti biokatalyzátoru, tedy rychlosti přeměny substrátu na produkt, a jeho stabilitě (Damborský a kol., 2010). Rychlost enzymatické reakce závisí na teplotě, pH, koncentrace substrátu, přítomnost inhibitorů, nebo aktivátorů atd. Na základě Arrheniova vztahu se rychlost enzymatické reakce přibližně zdvojnásobí o každých 10 °C zvýšení teploty. Předmětem mutagenese enzymu bylo proto zvýšit jeho stabilitu a tím posílit jeho odolnost vůči vyšším teplotám (Damborský a kol., 2010). Gray a kol. (2001) se jako první pokoušeli zvýšit stabilitu DhaA enzymu vůči vyšším teplotám a tím současně urychlit celý katalytický proces přeměny TCP, k čemuž použili metodu zvanou „Gene Site Saturation Mutagenesis“. Touto metodou bylo nalezeno osm bodových mutací v proteinové sekvenci pro zvýšení termostability enzymu DhaA. Kombinací těchto osmi mutací byl vytvořen enzym s

30 000 krát vyšším poločasem rozpadu při 55 °C (Gray a kol., 2001). Termostabilita je měřena stanovením enzymové aktivity při zvýšených teplotách (Damborský a kol., 2010).

Na základě kinetických analýz bylo zjištěno, že mutantní formy DhaA zlepšily štěpení a určující krok k tvorbě produktů (Pavlova a kol., 2009), což vede k urychlení reakce a zvýšení účinnosti detoxikace TCP. Některé mutantní formy byly podrobeny difrakční analýze (Klvana a kol., 2009) a v mnoha případech byly vyřešeny jejich 3D molekulární struktury. Pozice aminokyselin pro mutagenezi enzymu jsou vybírány podle výsledků počítačových programů na základě struktury celého enzymu (Lahoda a kol., 2011). Do dnešní doby bylo zkonstruováno mnoho mutací DhaA s výše uvedeným cílem (Banas a kol., 2006).

Mutantní forma DhaA31 je vůbec nejlépe zkonstruovaná varianta, která vykazuje přibližně 32x vyšší katalytickou aktivitu a zároveň 26x vyšší katalytickou účinnost pro TCP při pH 8,6 a teplotě 37 °C než původní divoký typ tohoto enzymu (Pavlova a kol., 2009). Rychlost katalytické reakce DhaA je dána rychlostní kinetickou konstantou k_{cat} $1,26s^{-1}$, zatímco u divoké formy má rychlost katalytické reakce pouze k_{cat} $0,08 s^{-1}$ (Lahoda a kol., 2011, 2014). Na rozdíl od divoké formy jsou u DhaA31 velké aromatické aminokyseliny na dvou ze tří pozic a ve dvou modifikovaných polohách v cíleném místě mutageneze. Tyto bodové mutace zvyšují aktivitu vůči substrátu (TCP) snížením přístupnosti aktivního místa molekulám vody, čímž je podpořena tvorba aktivovaného komplexu (Lahoda a kol., 2011).

Další mutantní varianty uvádí Koudeláková a kol. (2013), přičemž tyto varianty byly připraveny substitucí na specifických místech polypeptidového řetězce (Tabulka č.1). V tabulce jsou tučně označeny aminokyseliny, které byly dosazeny substitucí. Aminokyseliny na pozici 148, 171, 172 a 176 jsou součástí tunelu ústícího do aktivního místa enzymu. Právě náhradou těchto aminokyselin vznikla nejrychlejší mutantní varianta DhaA80, která přemění substrát dibromethan za 0,25 sekund na produkt brómethanol (Koudeláková a kol., 2013).

Tabulka č.1: Pozice mutací aminokyselin a rychlost reakce přeměny substrátu dibromethanu u vybraných mutantních variant DhaA v porovnání s divokým typem (převzato od Koudeláková a kol.2013).

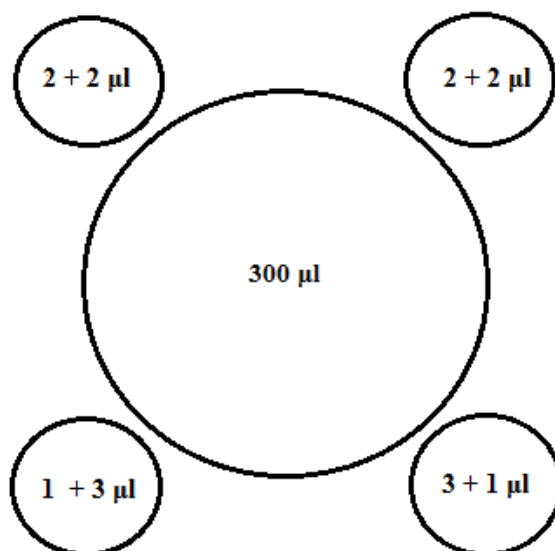
DhaA	Pozice v primární sekvenci proteinu											k_{cat} [s⁻¹]
	78	80	95	148	171	172	176	227	240	291	292	
DhaA	Asp	Phe	Leu	Thr	Gly	Ala	Cys	Asn	Trp	Pro	Ala	2,25 ± 0,13
DhaA57	Asp	Phe	Val	Thr	Gly	Val	Cys	Asn	Trp	Pro	Ala	0,50 ± 0,02
DhaA60	Asp	Phe	Val	Thr	Gly	Ala	Cys	Asn	Trp	Pro	Ala	
DhaA61	Asp	Phe	Leu	Thr	Gly	Val	Cys	Asn	Trp	Pro	Ala	1,01 ± 0,04
DhaA63	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Val	Phe	Thr	Tyr	Ala	Gly	0,72 ± 0,06
DhaA80	Asp	Phe	Leu	Leu	Gln	Val	Phe	Asn	Trp	Pro	Ala	0,25 ± 0,02
DhaA82	Gly	Ser	Leu	Thr	Gly	Ala	Cys	Thr	Tyr	Ala	Gly	
DhaA85	Asp	Phe	Leu	Leu	Val	Val	Phe	Asn	Trp	Pro	Ala	0,36 ± 0,04
DhaA88	Asp	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	Phe	Asn	Trp	Pro	Ala	0,86 ± 0,44

3. Metodika

3.1. Krystalizace enzymu DhaA106

Krystalizace enzymu DhaA106 byla provedená metodou sedící kapky (sitting-drop vapor diffusion). Pro experimenty byla zvolena krystalizační destička CombiClover crystallization plates (Emerald BioStructures, WA, USA), která je určena speciálně pro tuto metodu. Destička má 24 otvorů, okolo každého otvoru jsou čtyři menší otvory pro umístění kapek. Do hlavního otvoru se aplikovalo vždy 300 μl srážecího roztoku. Do prvních dvou malých otvorů bylo aplikováno 2 krát 2 μl srážecího roztoku a 2 μl roztoku proteinu. Do třetího otvoru se aplikovaly 3 μl roztoku proteinu a 1 μl srážecího roztoku. Do čtvrtého otvoru byl aplikován 1 μl roztoku proteinu a 3 μl srážecího roztoku (Obrázek č.10).

Pro prvotní krystalizační experimenty byly nejdříve použity komerční srážecí roztoky z kitu „Crystal Screen kit“ HR2 - 110 od firmy Hampton Research (Aliso Viejo, USA). Tyto srážecí roztoky byly použity pro vyhledání optimálního srážecího roztoku pro krystalizaci proteinu DhaA106. Následně byl připraven srážecí roztok složený z: 0,1M octanu sodného o pH 4,6; 0,2 M octanu amonného a 35 % PEG (polyetylen glykolu). Koncentrace roztoku enzymu DhaA106 byla 11,6 mg.l^{-1} v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5.



Obrázek č.10: Schéma hlavního otvoru a postranních otvorů při krystalizaci enzymu DhaA106 pomocí metody sedící kapky.

3.2. Sběr dat pro difrakční analýzu

Po krystalizaci byly vybrány nejvhodnější krystaly enzymu DhaA106, které odpovídaly cíleným vlastnostem. Mezi tyto vlastnosti náleží především velikost a tvar. U enzymu DhaA106 byly použity tyčinkové krystaly, které jsou pro difrakční analýzu vhodné a pro tento protein charakteristické. Velikost použitých krystalů pro pozdější difrakční analýzu byla 0,08 x 0,38 x 0,018 mm. Tyto krystaly byly zmrazeny v tekutém dusíku pro uchování do následující difrakční analýzy.

3.3. Difrakční analýza

Difrakční analýza byla provedena na difrakčním přístroji s rotující anodou Nonius FR591 (Bruker-Nonius) a MAR345 detektorem na Ústavu molekulární genetiky AV ČR v Praze. Bylo použito rentgenové záření o vlnové délce 1,542 Å. Krystaly byly umístěny v nylonové smyčce od firmy Hampton Research (Hampton Research, Aliso Viejo, USA). Jako kryoprotektant byl použit perfluoropolyetherový olej od firmy Hampton Research (Hampton Research, Aliso Viejo, USA), do kterého se krystaly umístily na pár vteřin před difrakcí. Bylo nasbíráno 500 záznamů s oscilačním úhlem 0,5 ° se vzdáleností krystalu od detektoru 107,95 mm a expozicí po dobu 1 minuty.

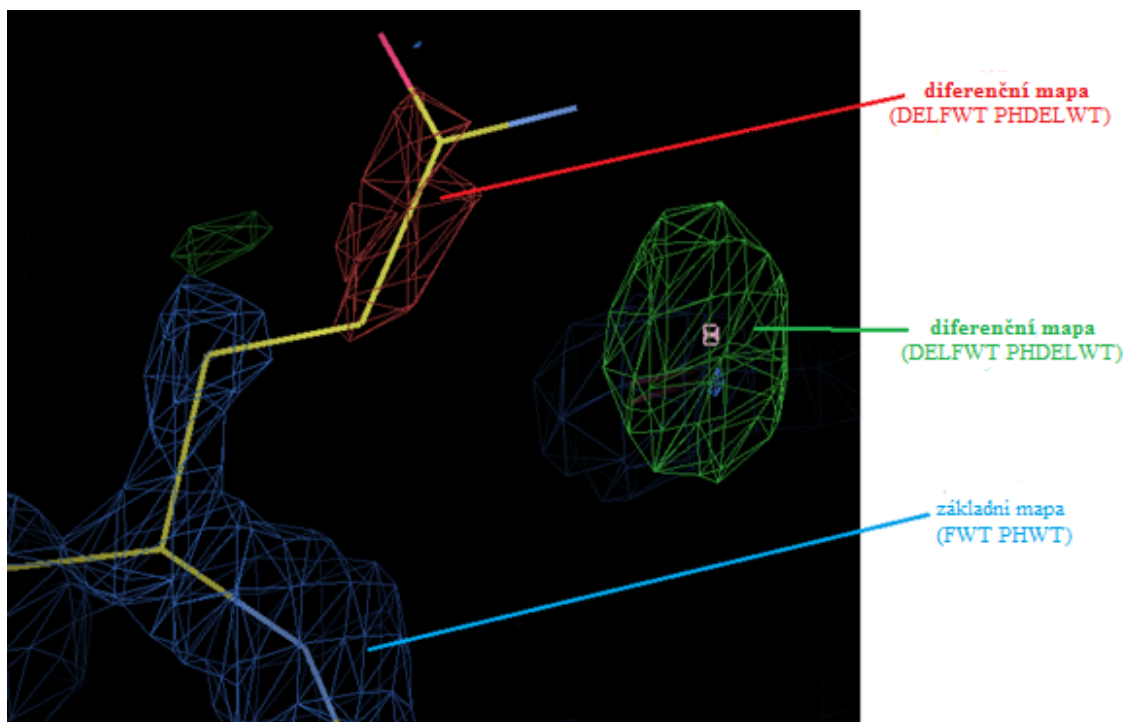
3.4. Zpracování dat, řešení a validace struktury

3.4.1. Zpracování dat

Výchozí data pro modelování mutantního proteinu DhaA106 byla získána po zpracování difrakčních dat v programu xdsapp GUI (Krug a kol., 2012), kde byla vytvořena mapa elektronové hustoty, do které se následně vložila modelová struktura proteinu pomocí programu MolRep (Vagin a Teplyakov, 1997). Takto vznikly soubory pdb (struktura proteinu) a mtz (mapa elektronové hustoty). Tyto soubory byly následně vloženy do programu WinCoot (Emsley a kol., 2010), kde probíhala úprava celé struktury proteinu podle mapy elektronové hustoty. Následně byla upravená struktura zpracována v programu CCP4 (Murshudov a kol., 2011), kdy bylo po rafinaci zjištěno o kolik se změnila její kvalita.

3.4.2. Úprava struktury

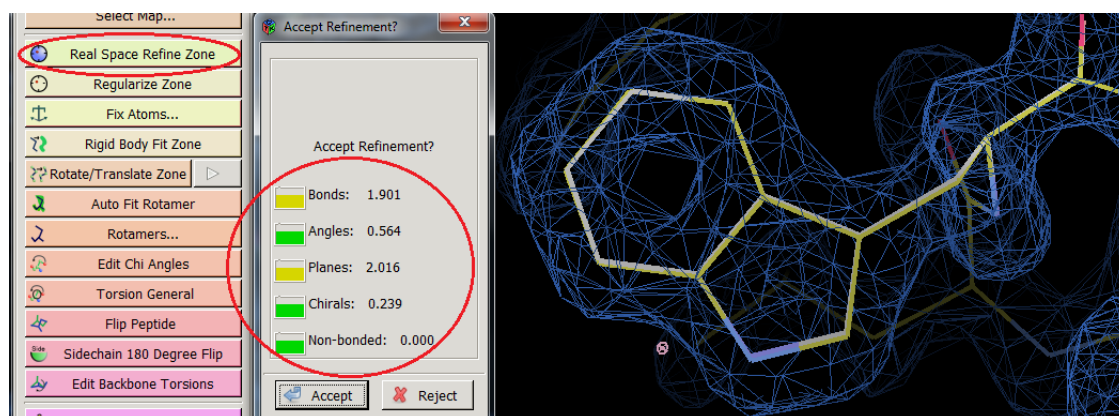
Struktura proteinu byla upravována v programu WinCoot. V tomto programu se nejdříve načítala mapa elektronové hustoty (mtz soubor), do které se následně vložil polypeptidový řetězec aminokyselin s molekulami vody (pdb soubor). Mapa elektronové hustoty zobrazuje třírozměrný prostor pro umístění struktury proteinu. Základní mapa označovaná jako FWT PHWT je mírou pravděpodobnosti výskytu elektronu v určitém místě. Tato mapa byla vygenerována v programu xdsapp GUI A v programu WinCoot bývá nejčastěji zobrazena modrou barvou. Diferenční mapa elektronové hustoty označovaná jako DELFWT PHDELWT zobrazuje rozdíly mezi původní mapou elektronové hustoty měřeného krystalu a současného modelu. Tato mapa je zobrazena nejčastěji červenou a zelenou barvou. Zelená barva poukazuje na pozitivní elektronovou hustotu, kde může chybět atom, postranní řetězec apod. Třetí poslední barvou elektronové sítě je červená, která označuje tzv. negativní elektronovou hustotu. Zelenou a červenou mapu elektronové hustoty vypočítává program CCP4. Uvedené typy map elektronové hustoty jsou znázorněny na obrázku č.11.



Obrázek č.11: Základní typy map elektronové hustoty.

Prvním krokem při modelování struktury byla analýza celého polypeptidového řetězce, kdy se musela individuálně zhodnotit a upravit každá aminokyselina. Pro každou aminokyselinu byla použita funkce *Real Space Refine Zone*, která upravuje každou aminokyselinu na základě pěti parametru: Bonds, Angles, Planes, Chirals, Non-

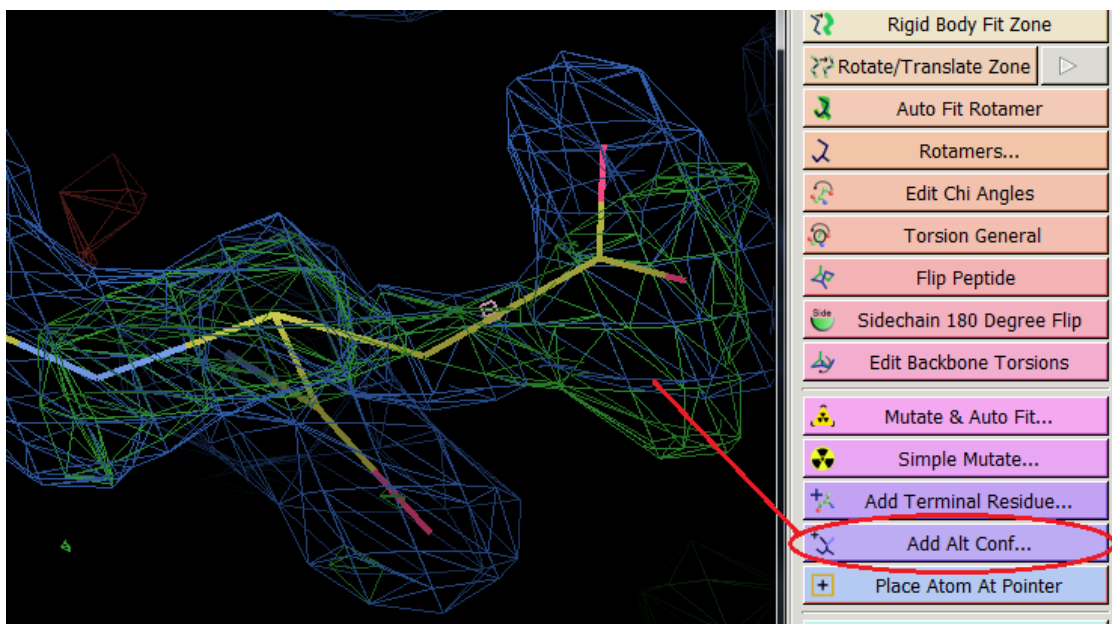
bonded (Obrázek č.12). Nicméně ne vždy umístí aminokyselinu správně, proto je nutné případné ruční doladění. Vzniklé rozdíly jsou především v důsledcích rozdílnosti modelů, prvním vytvořeným programem WinCoot a skutečnou strukturou. V případě přítomnosti diferenční elektronové mapy, která poukazuje na nedostačující elektronovou hustotu v polypeptidovém řetězci, je několik možností alternativního řešení: možnost alternativní konformace aminokyseliny, nedostačující obsazení, chyby některé aminokyseliny ve vytvořeném modelu podle sekvence aminokyseliny v proteinu.



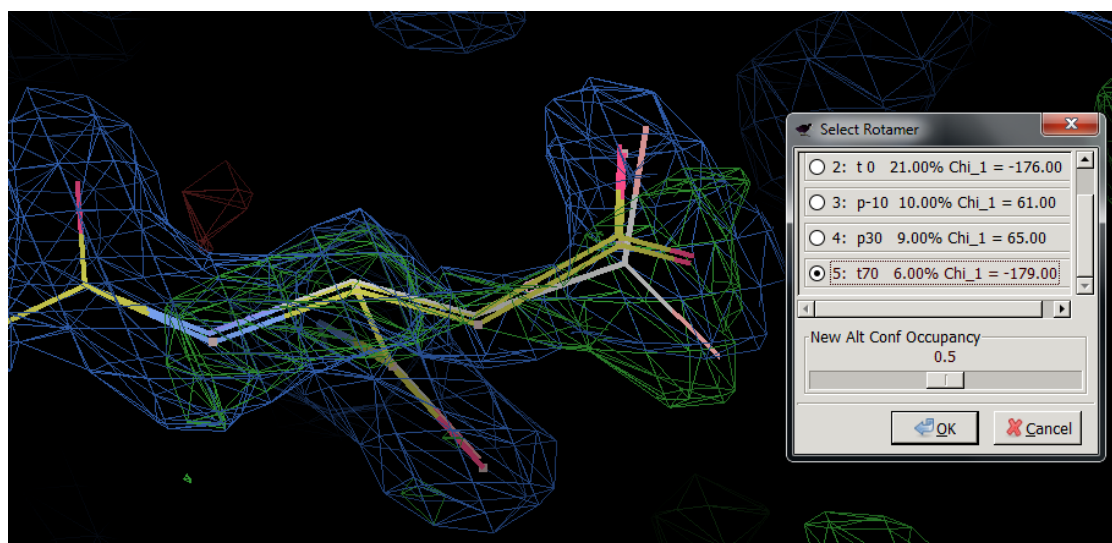
Obrázek č.12:Refinement řetězce aminokyseliny Trp 48 pomocí funkce *Real space refine zone*.

Značí-li diferenční mapa elektronové hustoty možnost alternativní konformace, je nutné jí dodělat. Tyto alternativní konformace se vytváří především na povrchu proteinu, kde nejsou aminokyseliny příliš fixované a mohou měnit své polohy. Typický příklad možnosti alternativní konformace je znázorněn u aminokyseliny asparagin Asp 76 na obrázcích č.13-15, kde se alternativní konformace vytvoří pomocí funkce *Add Alternative Conformation to a Residue*. Následně program nabídne několik možností konformací podle pravděpodobnosti umístění. Poté se většinou musí konformace ručně umístit do zelené mapy elektronové hustoty a výslednou konformaci je také nutné vycentrovat pomocí funkce *Real Space Refine Zone*. Následně je nutné zkontrolovat obsazení ve funkci *Residue info*, kde by měla být v případě jedné konformace obsazení pro oba řetězce 0,5 (0,5 pro základní řetězec aminokyseliny a 0,5 pro alternativní konformaci). Obsazení je zde chápáno jako pravděpodobnost, kdy v případě dvou alternativních konformací bude ve stejném čase buď první, nebo druhá možnost a to se stejnou pravděpodobností, jako například v případě Asp 76.

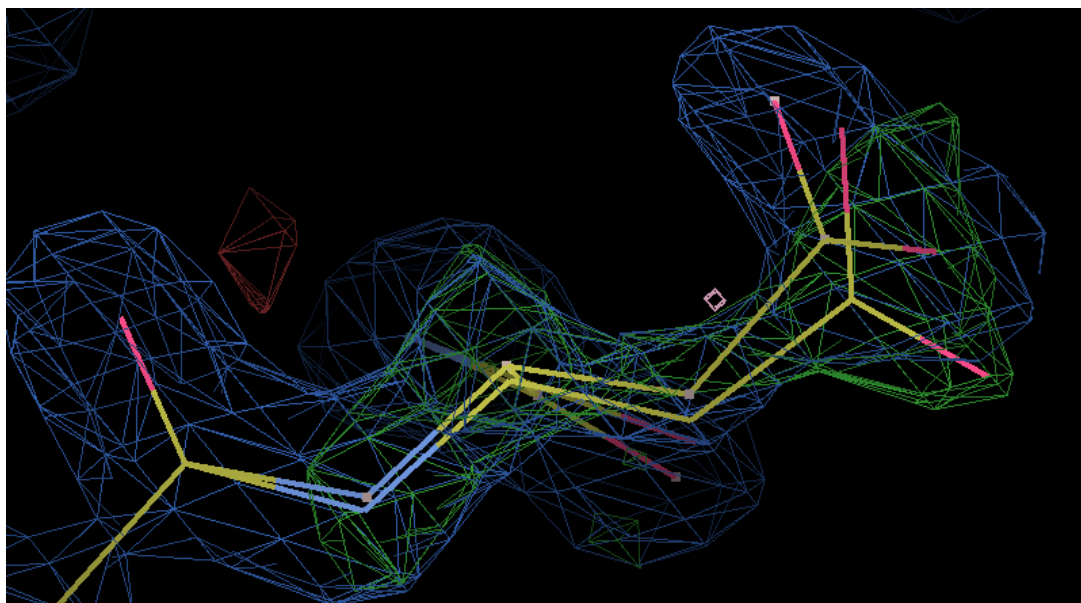
Druhou možností výskytu diferenční mapy elektronové hustoty v řetězci aminokyselin jsou nesprávná obsazení některé části řetězce konkrétní aminokyseliny (Obrázek č.16). Zde se pouze upraví obsazení pro celou aminokyselinu na 1.



Obrázek č.13: Diferenční mapa elektronové hustoty značící alternativní konformaci.



Obrázek č.14: Přidání alternativní možnosti a výběr z několika navrhovaných možností.



Obrázek č.15: Výsledná alternativní konformace.

Molecule: 0 C:/Users/Admin/Desktop/DhaA\106_refmac12a.pdb
ASPARTIC-ACID

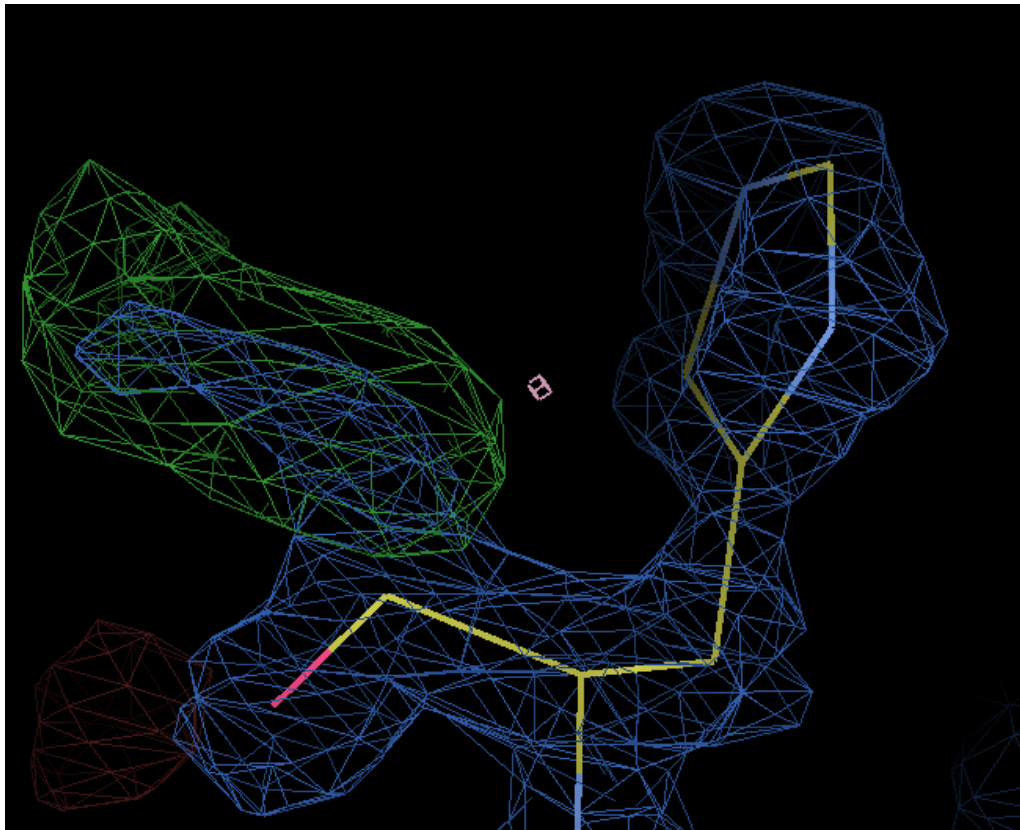
Master Atom
 Apply Occupancy to all atoms in residue?
 Apply Occupancy to atoms with alt. conf.:
 Apply Temperature Factor to all atoms in residue?

	Occupancy	Temperature Factor	
A/31 ASP/ N	1.00	9.01	Alt-conf:
A/31 ASP/ CA	1.00	11.31	Alt-conf:
A/31 ASP/ CB	1.00	11.02	Alt-conf:
A/31 ASP/ CG	0.50	8.60	Alt-conf:
A/31 ASP/ OD1	0.50	7.22	Alt-conf:
A/31 ASP/ OD2	0.50	8.24	Alt-conf:

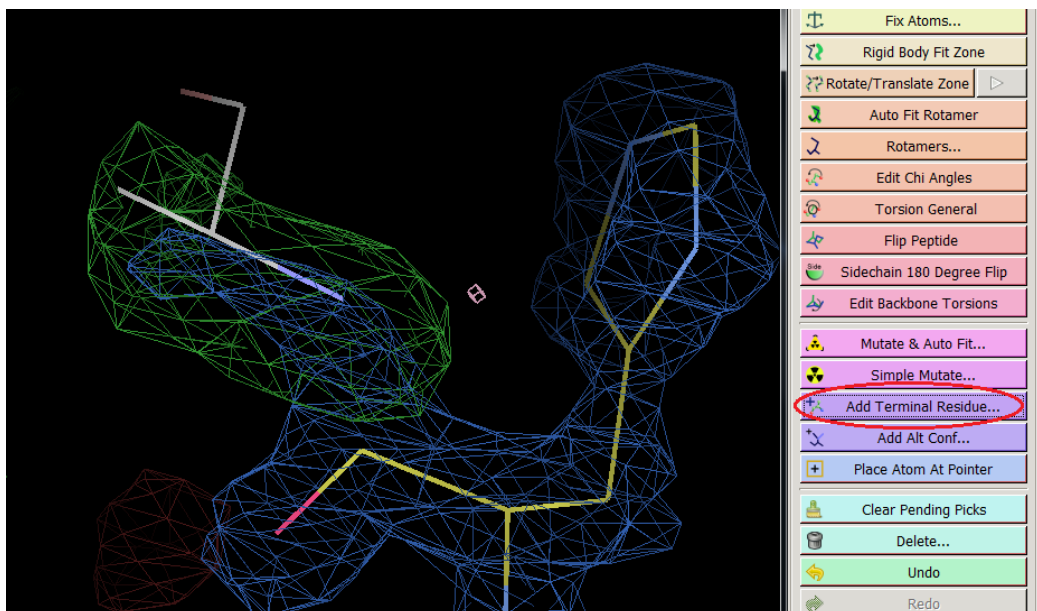
Chi Angles
 Chi 1: 65.97 degrees
 Chi 2: -32.28 degrees

Obrázek č.16: Chybné obsazení u aminokyseliny Asp 31.

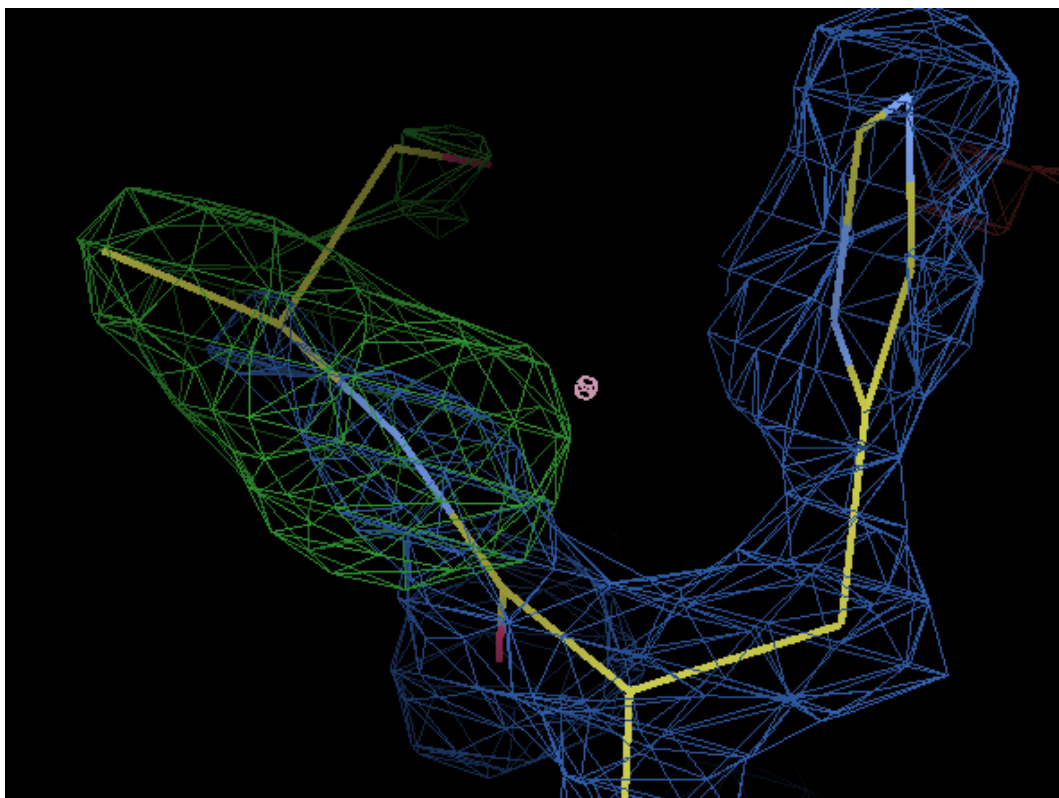
Třetí možností je, když diferenční mapa poukazuje na část chybějícího polypeptidového řetězce. U mutantního proteinu halohenalkandahalogenasy DhaA106 byl tento problém především v iniciační a terminační části řetězce aminokyselin. Řešením je přidání aminokyseliny na základě známe sekvence aminokyselin proteinu DhaA pomocí funkce *Add terminal residues*, kdy se přidá na C-konec polypeptidového řetězce aminokyselina Ala. Celý postup je znázorněn na obrázku č.17-19.



Obrázek č.17: Diferenční mapa elektronové hustoty naznačující místo pro umístění Ala na konec polypeptidového řetězce.

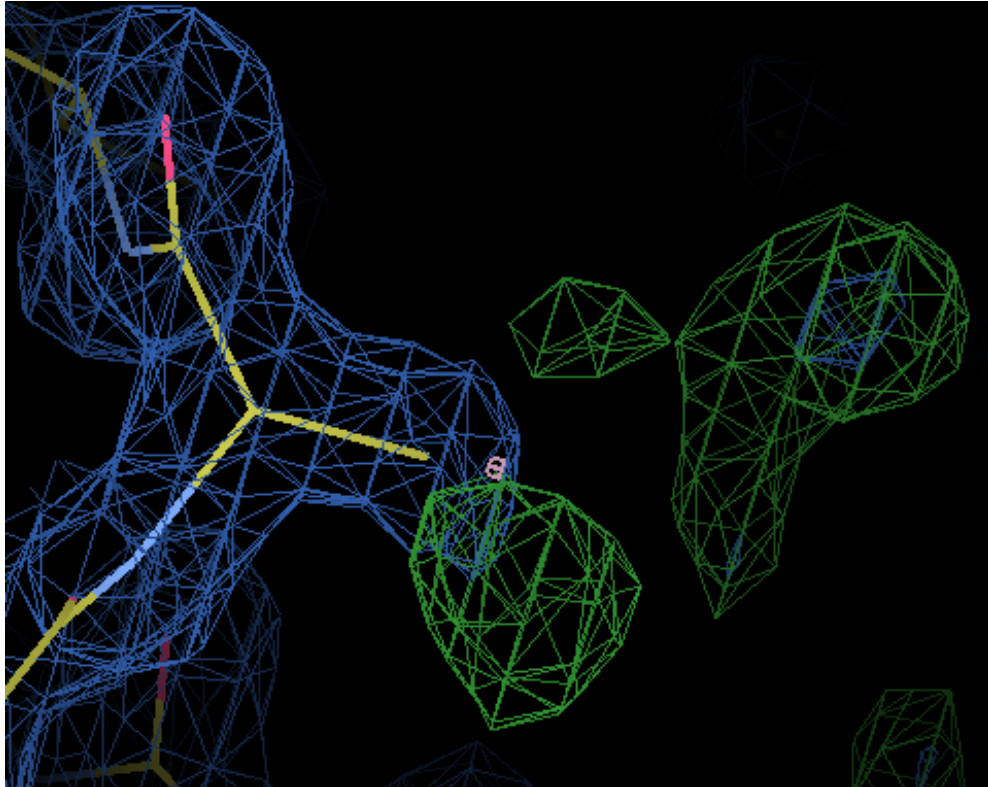


Obrázek č.18: Přidání Ala 296 k His 295.

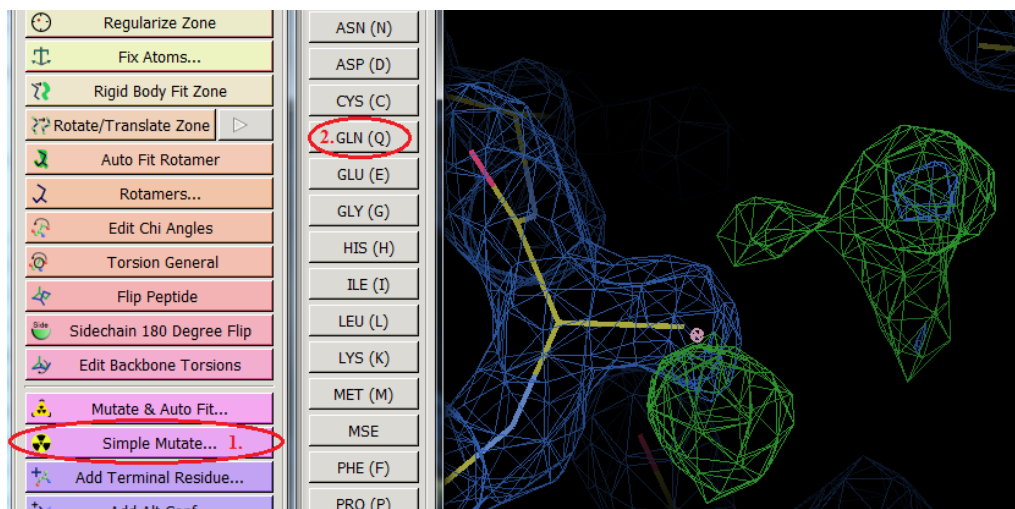


Obrázek č.19: Přidaný Ala 296.

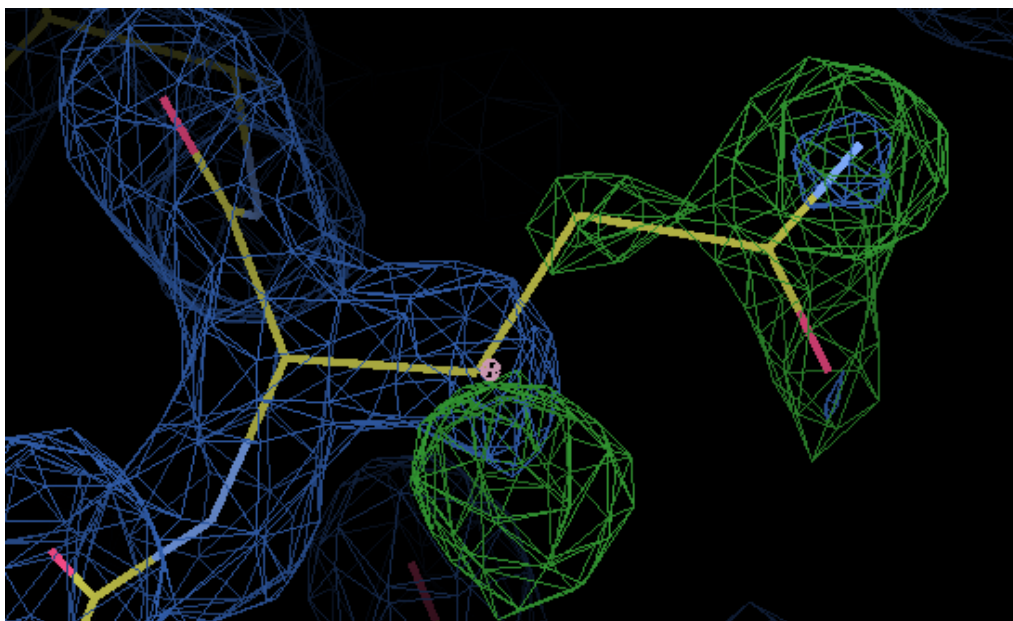
Další možnosti výskytu diferenční mapy byly pozorovány hlavně uvnitř polypeptidového řetězce, kdy postranní řetězec aminokyseliny procházel mimo mapu elektronové hustoty. Po ověření sekvence spolu s vyobrazeným řetězcem byla zjištěna buď chybná aminokyselina, která byla nahrazena správnou, dobře fitující mapu elektronové hustoty (Funkce *Simple mutate*) (Obrázek č.20-22), nebo byla aminokyselina pouze špatně naorientována mimo mapu elektronové hustoty (Obrázek č.23-24). V druhém případě se pouze správně naorientovala aminokyselina do mapy elektronové hustoty funkcí *Real space refinement zone*.



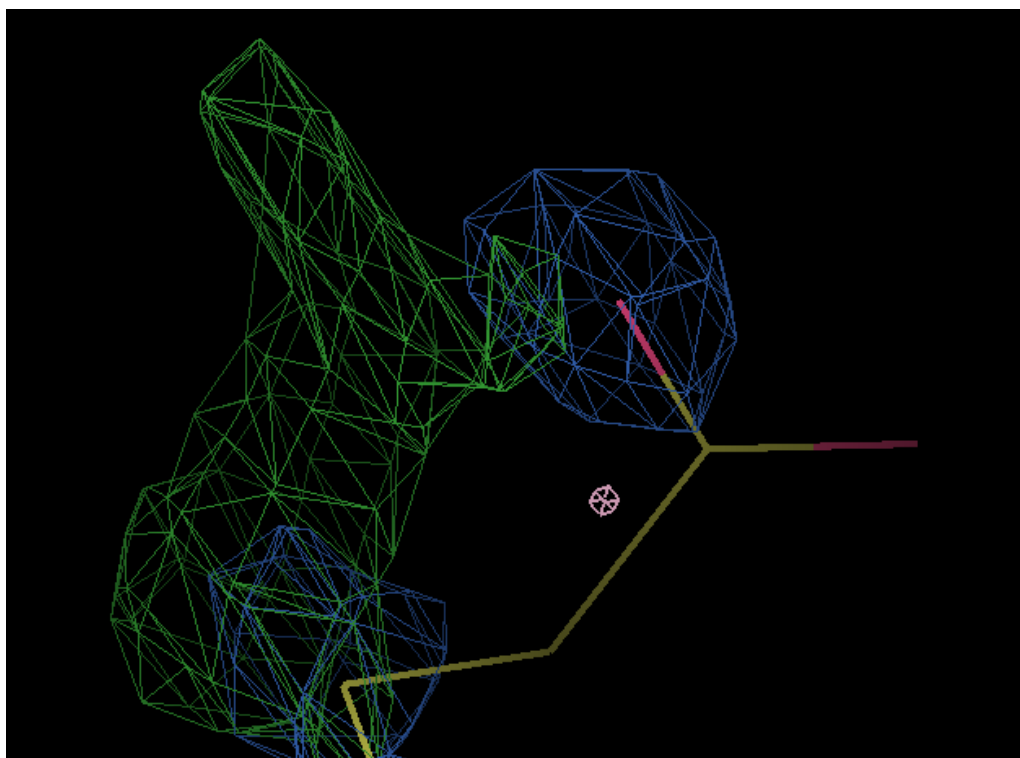
Obrázek č.20: Chybná aminokyselina (Ala 171) v polypeptidovém řetězci.



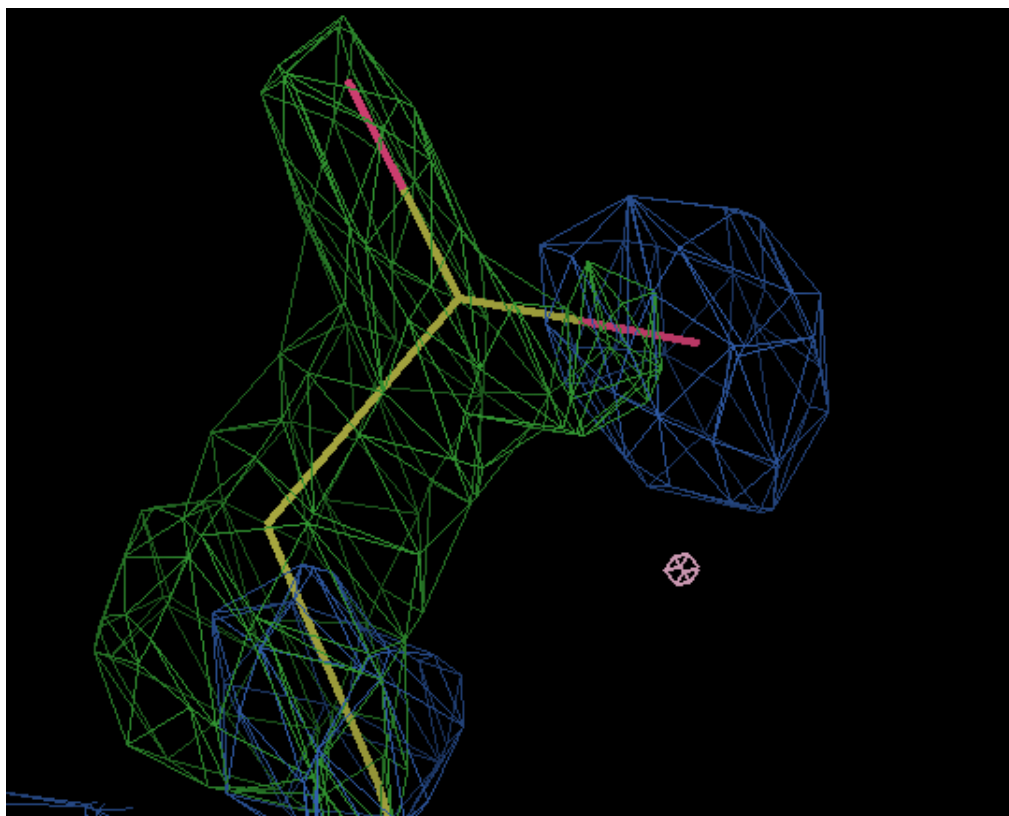
Obrázek č.21: Záměna Ala 171 za Gln 171.



Obrázek č.22: Namodelovaný Gln 171.

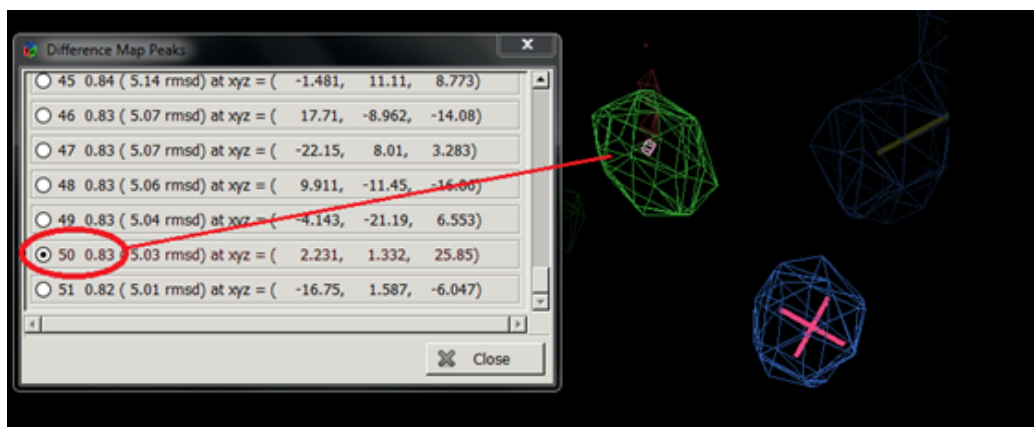


Obrázek č.23: Nesprávně orientovaná aminokyselina Glu 16.

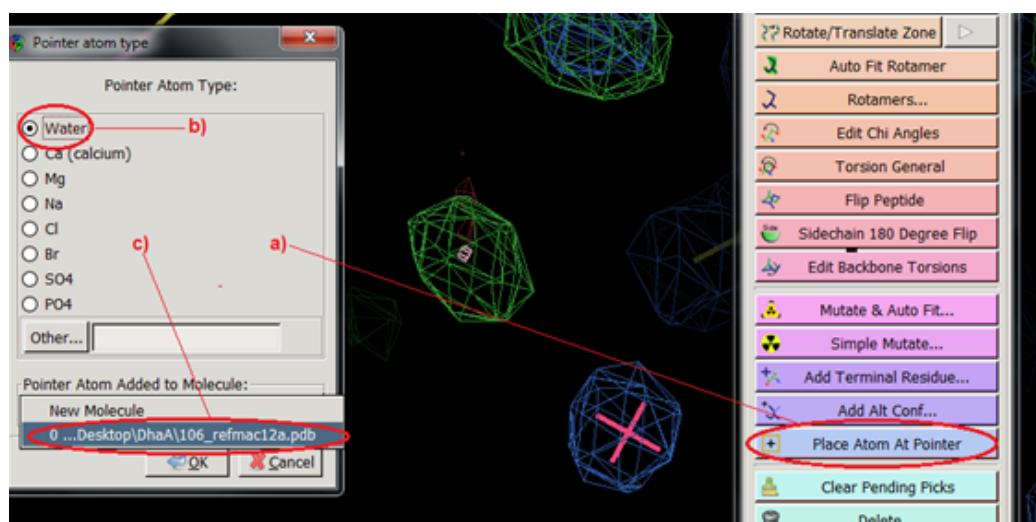


Obrázek č.24: Správně naorientovaná Glu 16.

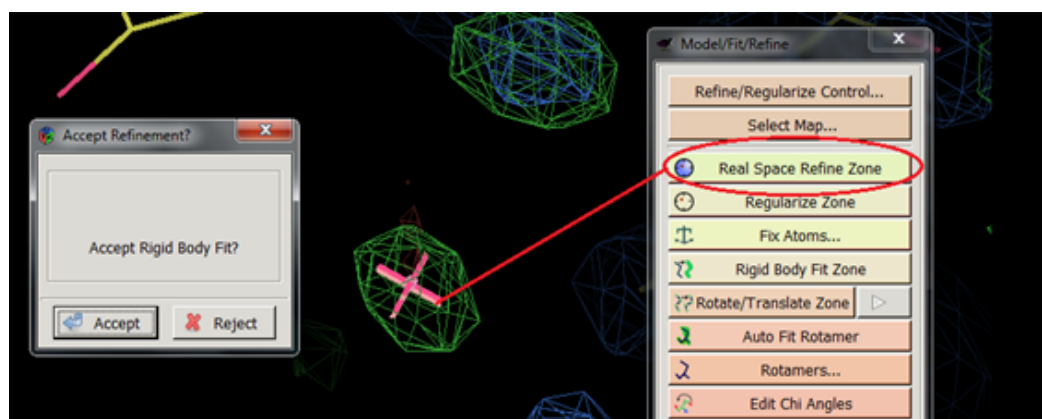
Po úpravě celého polypeptidového řetězce se pomocí funkce *Difference maps peaks* vyhledaly další místa s nedostačující mapou elektronové hustoty. Tato funkce hledá velké píky v diferenční mapě elektronové hustoty. Tyto mapy měly většinou tvar koule, které jsou charakteristické pro molekuly vody. Molekuly vody se přidávaly pomocí funkce *Place atom at pointer* a následnou volnou vody (water). Celý postup je znázorněn na obrázku č.25-27. U molekul vody se měřila vzdálenost pomocí funkce *Distances and Angles*, nebo *Environment distances*. Vodíková nekovalentní vazba má vzdálenost 2,5-3 Å, a v tomto rozmezí se také modelovaly molekuly vody (Obrázek č.28). Jestliže byly ve struktuře proteinu molekuly vody vzdálené pod 2 Å, byla jedna z nich odstraněna, nebo byla pro každou z vod přidána konformace a obsazení 0,5. Druhým kritériem pro přidání molekul vody byla síla signálu mapy elektronové hustoty ($1 < \text{sigma}$).



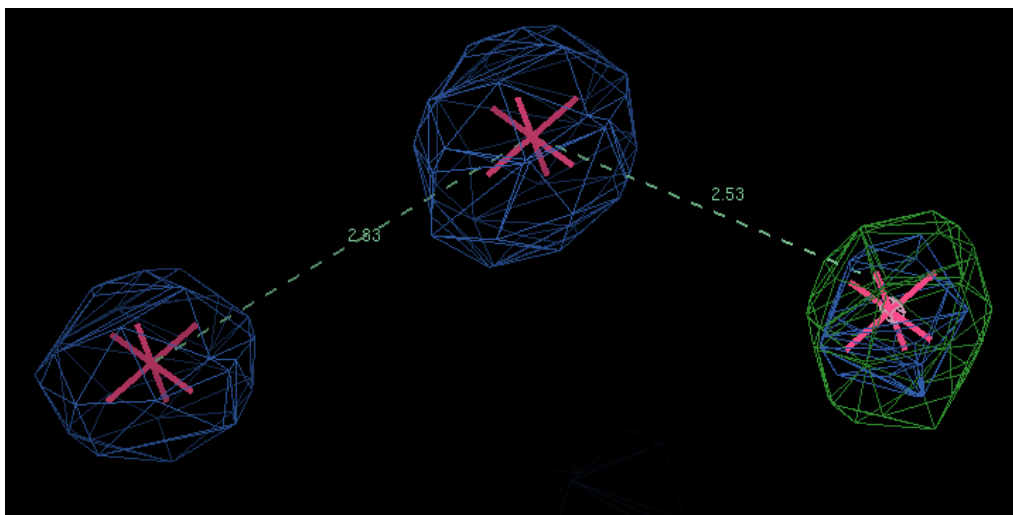
Obrázek č.25: Vyhledání chybějících částí řetězců/molekul pomocí funkce *difference map peaks*.



Obrázek č.26: a) Přidání molekuly vody (funkce *Place atom at pointer*). b) Volba atomu/molekuly. c) nový atom/molekula musí být součástí struktury celého proteinu (V případě volby *New Molecule* je nutné pozdější sjednocení pomocí funkce *Merge Molecule*).

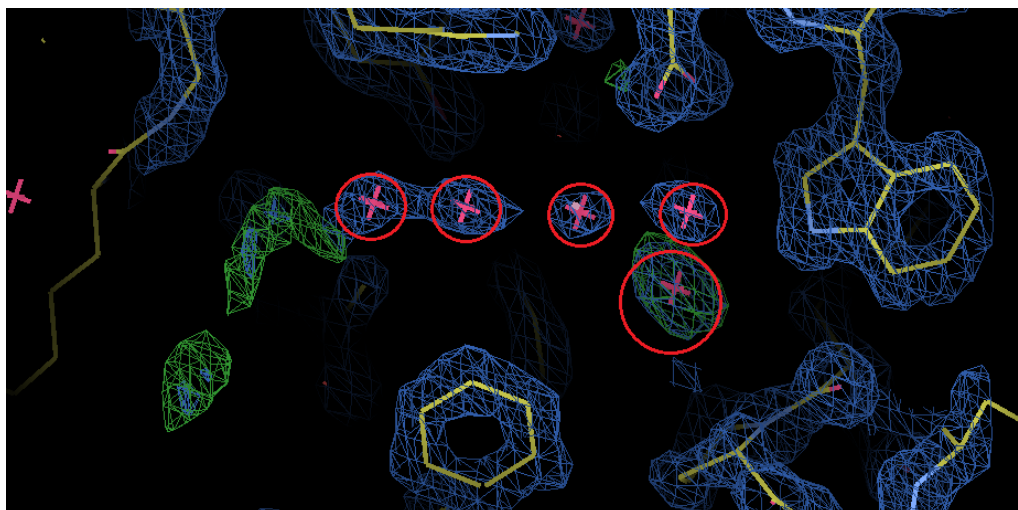


Obrázek č.27: Přidaná molekula vody a oprava polohy pomocí funkce *Real Space Refine Zone*.



Obrázek č.28: Správná vzdálenost mezi molekulami vody koordinovanými nekovalentní vodíkovou vazbou.

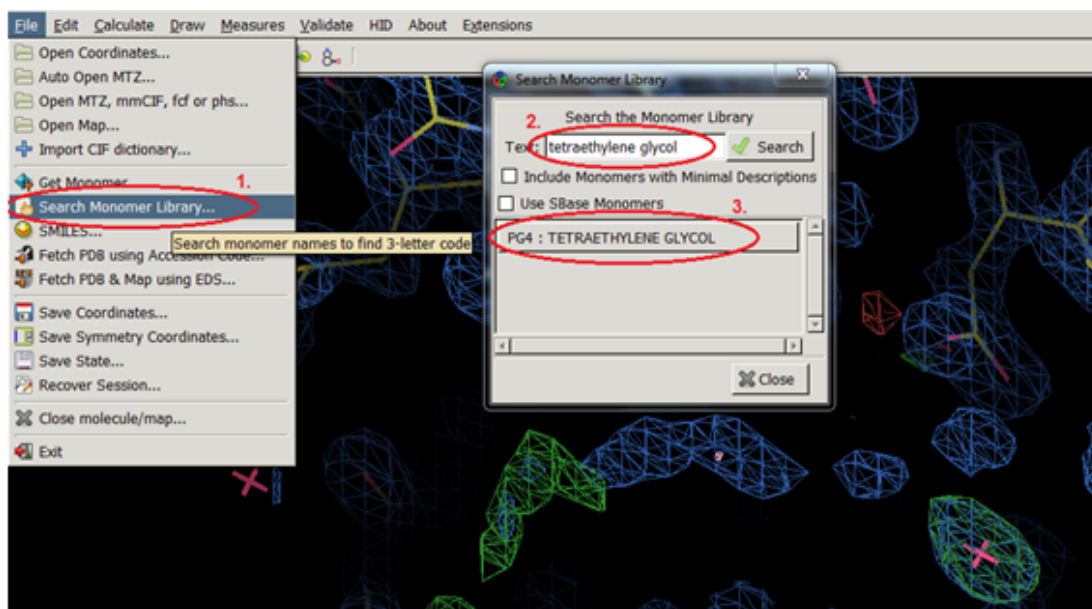
Další chyby byly zjištěny pomocí funkce *Difference maps peaks* uvnitř aktivního místa, kde byly chybně umístěny molekuly vody, z nichž jedna měla být halogenid navázaný nekovalentní vazbou mezi dvě aminokyseliny (Asn 41, Trp 107) stabilizující, namísto ostatních molekul by měla být namodelována molekula PEG. Na obrázku č.29 jsou znázorněny chybné molekuly vody.



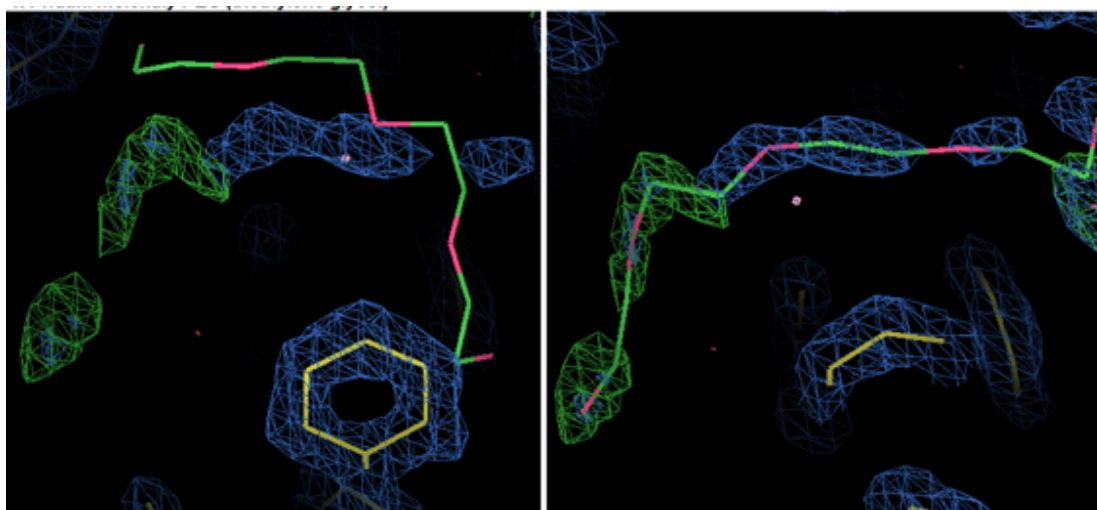
Obrázek č.29: Aktivní místo s chybnými molekulami vody.

Po odstranění molekul vody pomocí funkce *delete* a volby *water*, se namodelovala molekula PEG (polyethylenglykol). Přidání a vycentrování molekuly PEGu je znázorněno na obrázku č.30-31. Molekula PEGu byla vybrána s odpovídajícím množstvím ethylenu, tak aby dobře zapadla do mapy elektronové hustoty. V případě proteinu DhaA106 byl vybrán tetraethylenglykol.

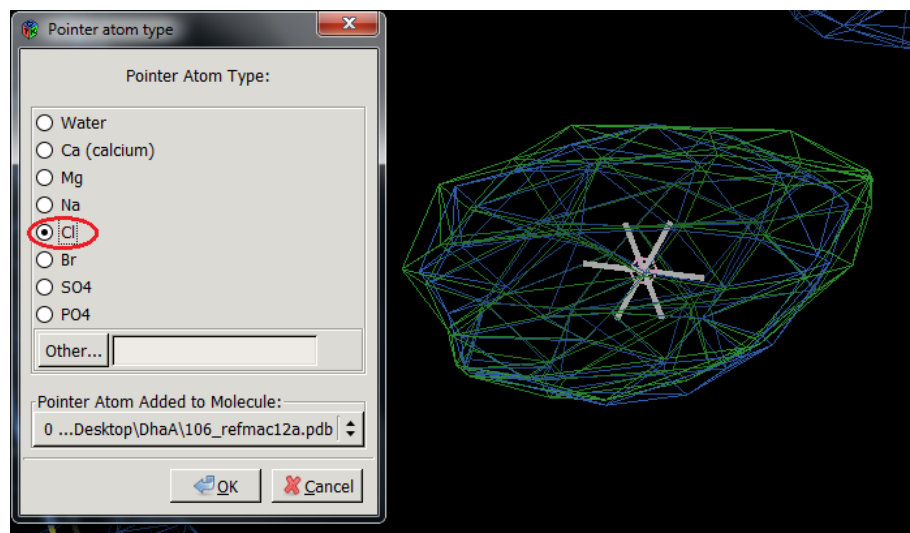
Aniont chloru se po smazání molekuly vody přidal pomocí funkce *Place atom at pointer* stejně jako molekula vody. Rozdílem je pouze volba chloru, který se přidá a následně vycentruje pomocí funkce *Real space refine zone* stejně, jako u výše popsaných příkladů (Obrázek č.32).



Obrázek č.30: Přidání molekuly tetraethylenglykolu pomocí funkce *Search Monomer Library*.

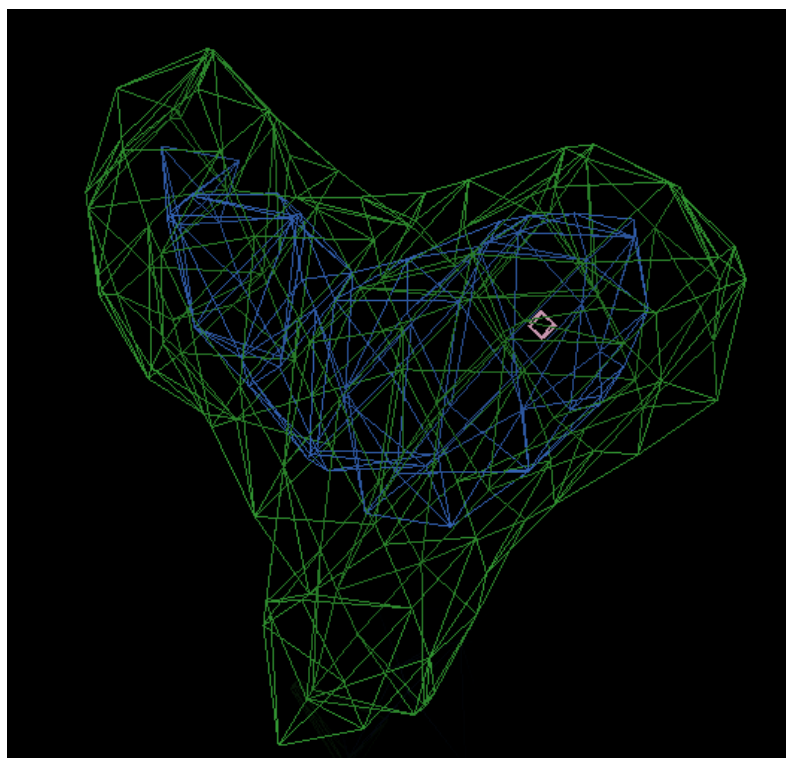


Obrázek č.31: Přidaná molekula PEGu a její následné vycentrování.

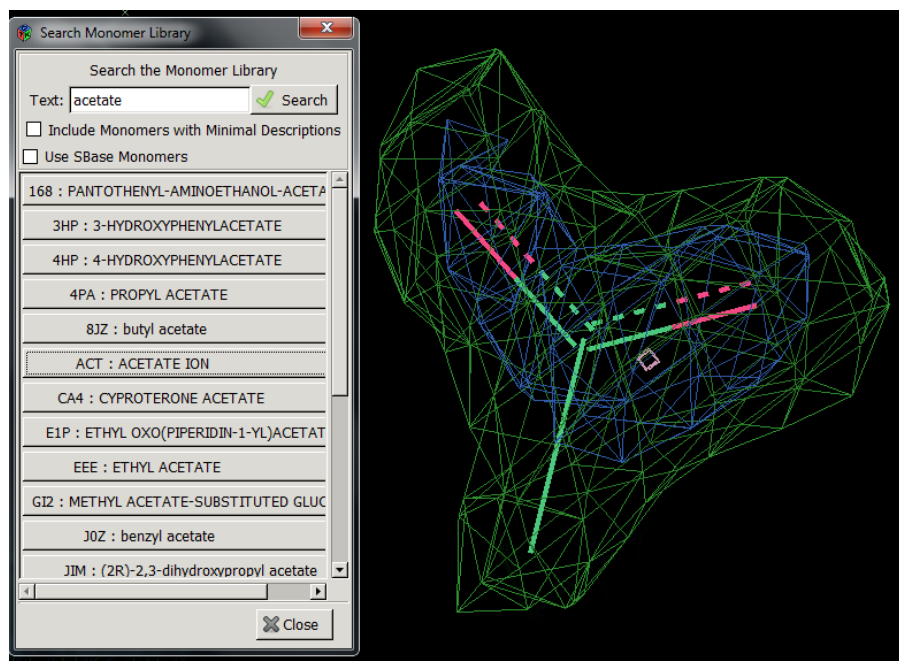


Obrázek č.32: Přidání aniontu chloru do aktivního místa pomocí funkce *Pointer Atom Type*.

Poslední úpravou byly zbytky kyseliny octové (acetáty), které byly součástí srážecího roztoku při krystalizaci. Po nalezení chybějících acetátů pomocí funkce *Difference map peaks*, se chybějící acetáty namodelovaly obdobně, jako molekula PEGu. V knihovně monomeru byl zadán *acetate* a následně se vybral iont kyseliny (*acetate ion*). Celý postup přidání acetátu je znázorněn na obrázku č.33-34.



Obrázek č.33: Síťový model mapy elektronové hustoty označující chybějící acetát.



Obrázek č.34: Dosazení molekuly acetátu do mapy elektronové hustoty.

3.4.3. Ověření upraveného enzymu DhaA106

Jednotlivé úpravy v programu WinCoot se pravidelně ověřovaly programem Refmac5 v CCP4, který vyhodnocuje modelovou strukturu s mapou elektronové hustoty. Do programu se tedy vkládají jak koordináty modelu (soubor pdb) tak i mapa elektronové hustoty (soubor mtz) pomocí funkce *refinementa* volbou typu rafinaci (*isotropní*), kde se do tabulky vyplní patřičná pole. Následně se spustí rafinace („refinement“). Po rafinaci se otevře soubor s výslednými hodnotami. Nejdůležitější jsou veličiny: R-factor, R-free, Rms bondlength, Rms bondangle, a mean B value.

R-factor, neboli zbytkový faktor nebo R-hodnota udává míru shody mezi krystalografickým modelem po rafinaci a opravách v programu WinCoot a difrakčními daty z rentgenové analýzy. Hodnota R-free je podobná jako R-factor s tím rozdílem, že před rafinací se odstraní přibližně 10 % z experimentálních dat a následně se provede rafinace se zbývajících 90 %. Hodnota R-free nezahrnuje 100% nasbíraných difrakčních dat a proto je o něco málo vyšší než R-factor.

Rms hodnoty představují kvadratický průměr, který je definován statisticky jako druhá odmocnina střední hodnoty druhých mocnin vzorku. Tato hodnota byla sledována u délky vazeb a úhlu vazeb.

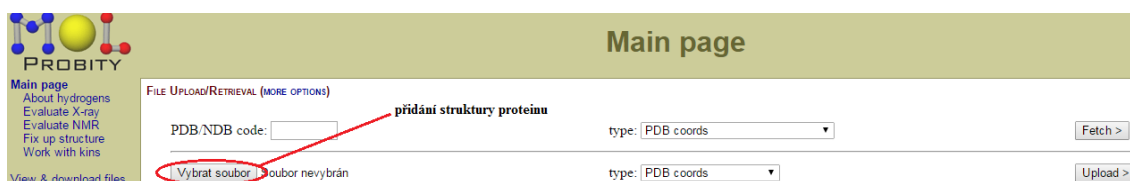
B value (také B faktor, hodnota B, neboli teplotní faktor) je hodnota, která určuje míru rozptylu pro každý atom nebo skupinu atomu. Teoreticky B-value určuje statickou

nebo dynamickou mobilitu atomu a také může určovat, kde jsou chyby v modelu struktury.

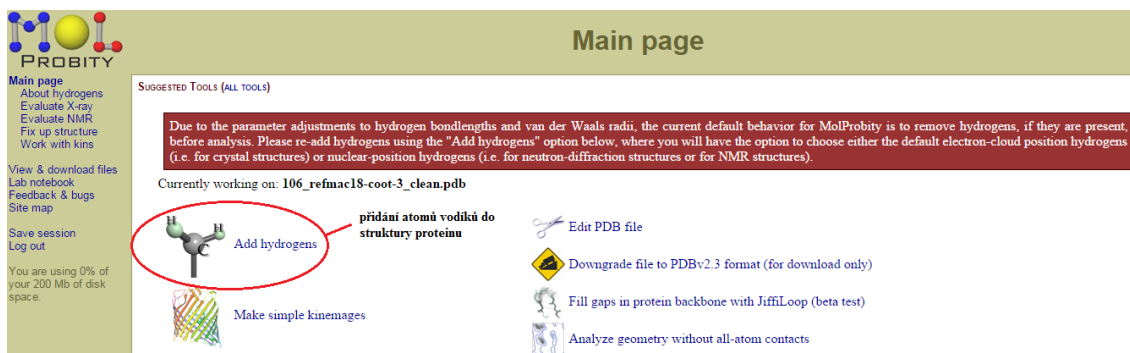
3.4.4. Validace struktury

Validace struktury byla provedena v softwaru COOT a online pomocí hodnotícího softwaru Molprobability na stránce *molprobability.biochem.duke.edu* (Chen a kol., 2010). Na rozdíl od softwaru CCP4 je zde hodnocen model struktury enzymu DhaA106 bez mapy elektronové hustoty. Hodnocení je prováděno vodíkům modelu s přidávanými atomy vodíků, a následně je prozkoumána geometrie každé aminokyseliny, případné křížení vazeb, úhly vazeb, torzí apod.

Prvním krokem validace bylo načtení strukturních dat finálního modelu dehalogenázy DhaA106 (po 18 kolech rafinace) ve formátu pdb (Obrázek č.35). Následně byly přidány atomy vodíku pomocí funkce *add hydrogens* (Obrázek č.36). Následně volbou *Analyze all-atom contacts and geometry* byly vypočteny jednotlivé parametry každého atomu všech aminokyselin v celém polypeptidovém řetězci (Obrázek č.37). Po vypočtení veškerých parametrů byla vytvořena souhrnná výsledná tabulka, která je uvedena v kapitole Výsledky.



Obrázek č.35: Načtení struktury proteinu do softwaru MolProbability.



Obrázek č.36: Přidání atomů vodíků do struktury proteinu DhaA106.

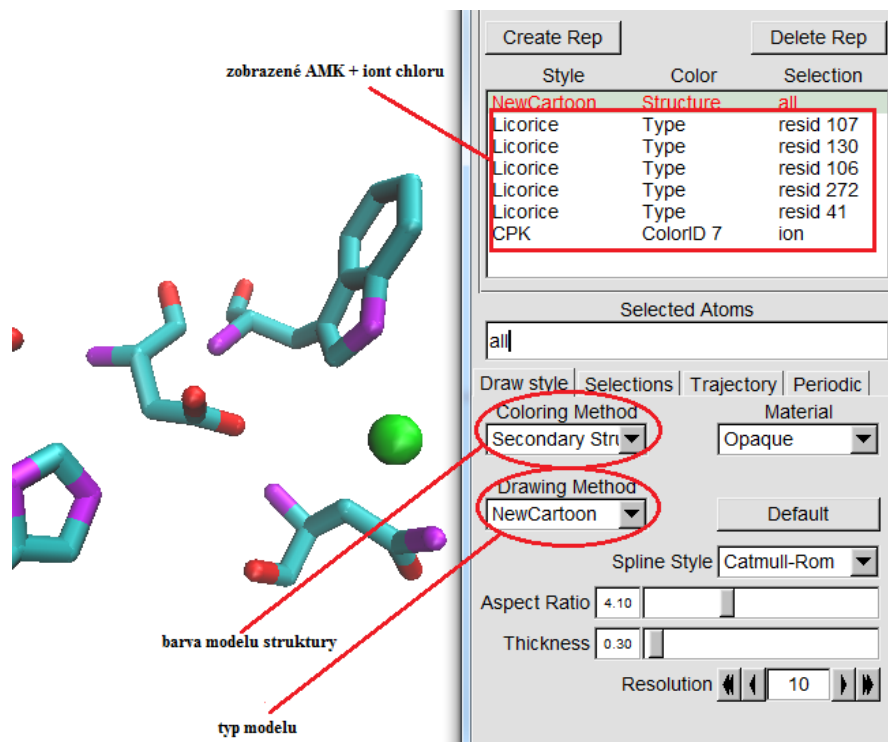


Obrázek č.37: Analýza meziatomových vzdáleností a geometrických parametrů v softwaru MolProbity.

3.4.5. Zobrazení molekulární struktury v programu VMD

Zobrazení opravené struktury DhaA bylo provedeno v programu VMD (Humphrey a kol., 1996), kterým lze zobrazit molekulární strukturu pomocí různých modelů. Tímto softwarovým nástrojem lze zobrazovat i konkrétní části molekuly, jako je například studovaná pentáda aktivního místa enzymu. Pentáda aktivního místa byla zobrazena pomocí funkce *Graphical representations*. Tato funkce umožňuje na definované oblasti molekuly zobrazit různé molekulární reprezentace, jako je např. tyčinkový, kuličkový stužkový či povrchový model (obrázek č.38). Následně byl společně s pentádou zobrazen chloridový anion, který se nekovalentně váže na aminokyseliny Trp 107 a Asn 41 nekovalentní vazbou.

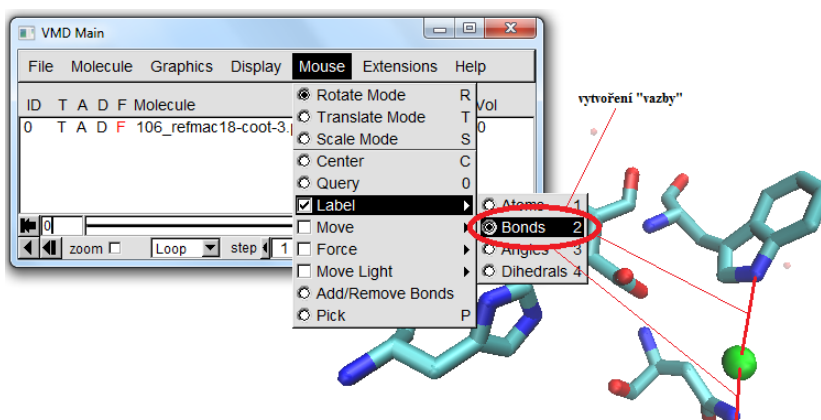
Model celého enzymu byl následně zobrazen stejným způsobem jako při zobrazení pentády.



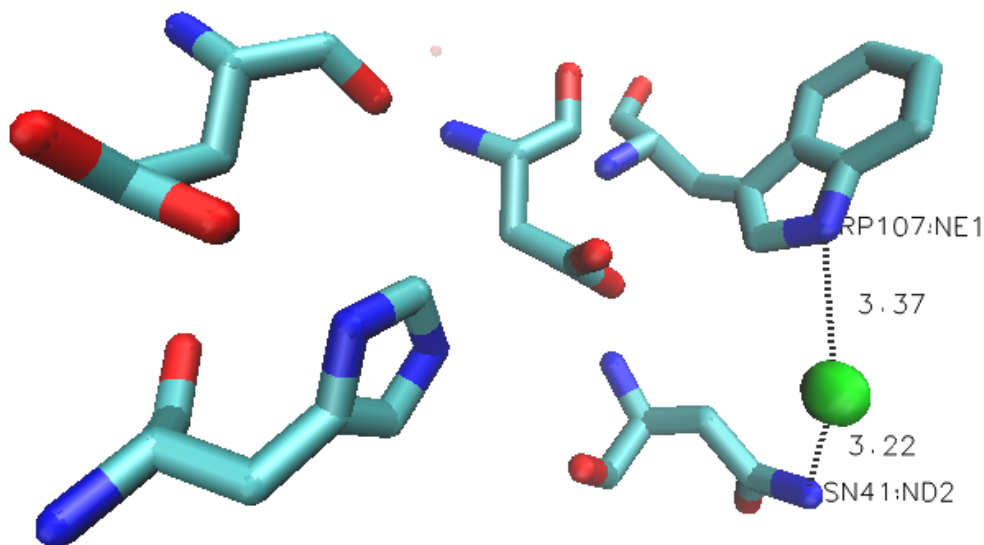
Obrázek č.38: Zobrazení aktivního místa (pentády AMK) dehalogenázy se zbytkem substrátu (chloridového aniontu).

3.5. Měření vzdáleností v aktivním místě v programu VMD

Měření meziatomových vzdáleností bylo provedeno stejně jako zobrazení proteinu v programu VMD. Na zobrazené pentádě aminokyselin a chloridového aniontu byla změřena vzdálenost chloridu k Trp 107 a Asn 41. Vzdálenost byla měřena v jednotce angstromech (Å). 1 Å odpovídá 0,1 nm. Postup měření je znázorněn na obrázku č.39 a 40.



Obrázek č.39: Zobrazení nekovalentních vazeb mezi chloridovým aniontem a Trp 107 a Asn 41.



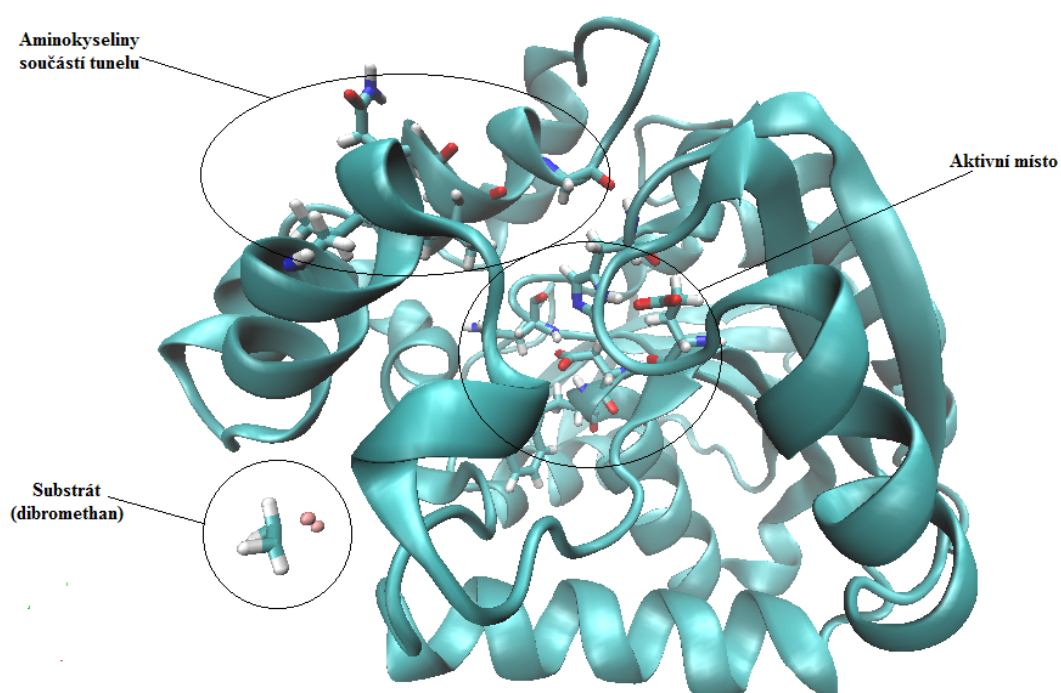
Obrázek č.40: Naměřené vzdálenosti nekovalentních vazeb fixujících chloridový aniont v aktivním místě dehalogenázy.

3.6. Simulace interakce proteinu DhaA106 se substrátem

Pro simulaci struktury proteinu byl použit software PELE (*Protein Energy Landscape Exploration*) (PELE, 2014), který se standardně používá k průzkumu energetických stavů proteinu a interakcí proteinu se substrátem.

Metoda softwaru PELE kombinuje statistický přístup Monte-carlo s algoritmy predikce proteinové struktury. Na rozdíl od metody molekulární dynamiky metoda PELE není časově náročná i v případě studia procesů, které se odehrávají i v delší časové škále.

Pro zobrazení výsledků simulace z PELE byl použit software VMD. Jako substrát byl zvolen 1,2-dibromethan. Celá simulace byla provedena ve 400 krocích se 148 akceptovanými molekulárními strukturami. Na obrázku č.41 je znázorněn snímek simulace interakce proteinu se substrátem.

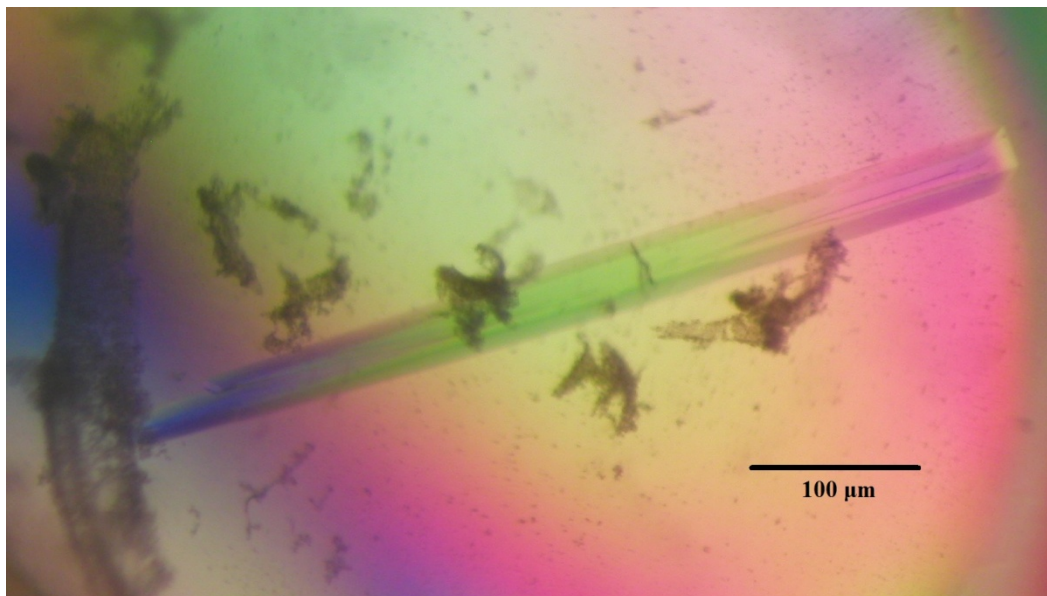


Obrázek č.41: Model dehalogenázy DhaA106 se substrátem 1,2-dibrómethanem.

4. Výsledky

4.1. Krystalizace proteinu DhaA106

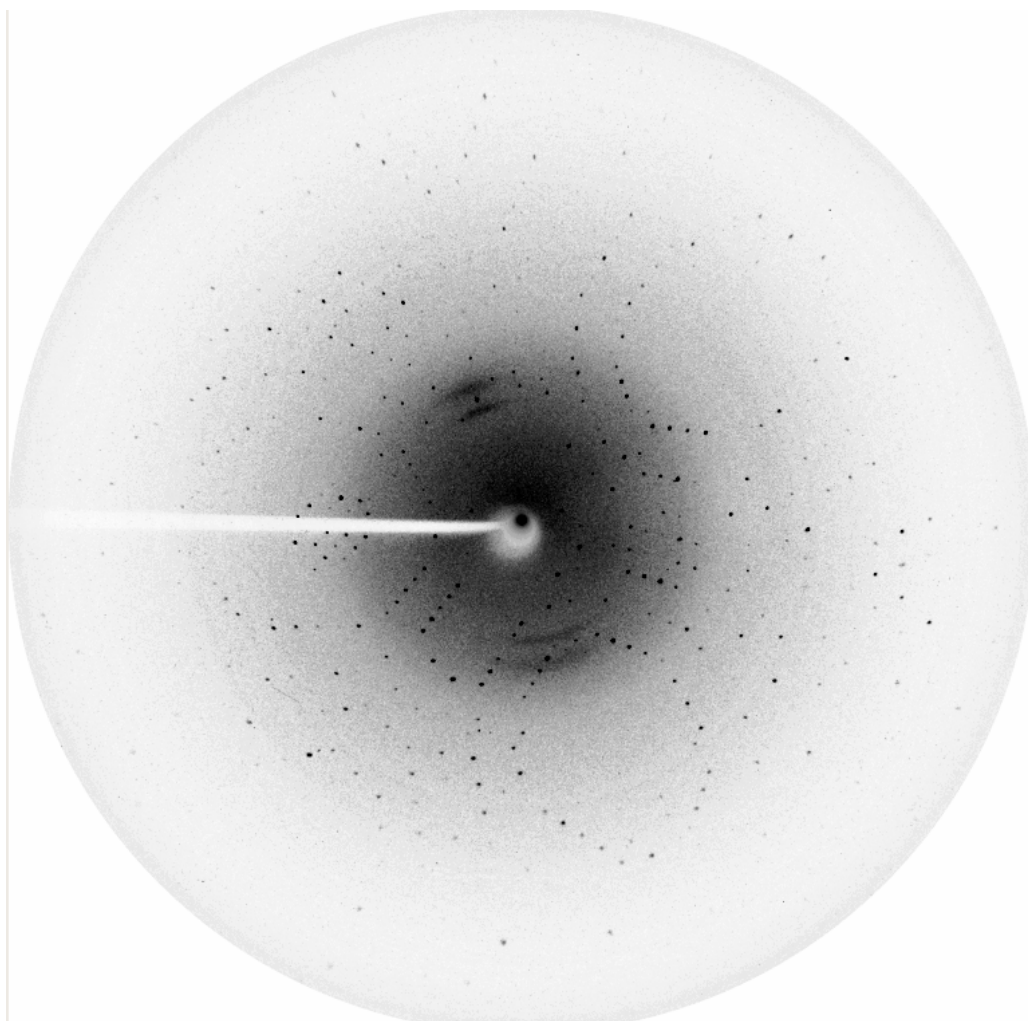
Krystaly DhaA106 vyrostly během jednoho týdne při pokojové teplotě ze srážecího roztoku a roztoku proteinu připraveného v poměru 1:1. Jednalo se především o tyčinkové krystaly (Obrázek č.42). Tyto krystaly, o velikosti 0,08 x 0,38 x 0,018 mm, byly použity pro difrakční analýzu.



Obrázek č.42 Tyčinkový krystal proteinu DhaA106.

4.2. Difrakční analýza

V průběhu difrakčního měření bylo získáno 500 záznamů s $0,5^\circ$ úhlem oscilace a vzdálenosti krystalu od detektoru 120 mm (Obrázek č.43). Všechny data z difrakční analýzy jsou uvedena v tabulce č.2.



Obrázek č.43: Jeden z pětiset záznamů z difrakční analýzy.

Tabulka č.2: Difrakční data.

Difrakční data	DhaA106
Difraktometr	homesource X-ray diffractometer
Detektor	MAR345 107,95 mm
Vzdálenost krystalu od detektoru	120 mm
Množství záznamů	500
Úhel oscilace	0,5 °
Vlnová délka	1,541790 Å
Rozlišení	39,42-1,69 (1,733-1,689) Å

4.3. Modelování proteinu DhaA106

Všechny úpravy v modelu molekulární struktury DhaA106 byly prováděny programem WinCoot. V polypeptidovém řetězci byly vytvořeny alternativní konformace, dále byly opraveny chybné aminokyseliny a chybná obsazení v řetězcích aminokyselin. K celé struktuře proteinu byly dále přidány molekuly vody, zbytek substrátu (aniont chloru), molekuly octanu a molekula polyethylenglykolu. Takto upravená struktura byla dále hodnocena (validována) softwarem WinCoot a MolProbability.

4.4. Rafinace molekulární struktury enzymu DhaA106

Celkem bylo provedeno 18 cyklů rafinace struktury enzymu DhaA106. V tabulce č.3 jsou uvedeny hodnoty poslední rafinace pro porovnání i hodnoty první rafinace. U všech veličin platí pravidlo, že čím jsou jejich hodnoty blíže k minimu, tím lépe model enzymu popisuje mapu elektronové hustoty. Pro R-factor a R-free je viditelné značné zlepšení a lze konstatovat, že získaný model téměř dokonale vyplňuje mapu elektronové hustoty.

Tabulka č.3: Porovnání hodnot 1. a poslední rafinace.

	1. Refinement	18. Refinement
R-factor	0,1627	0,1241
R-free	0,1918	0,1662
Rms-bondlength	0,0231	0,0186
Rms-bondangle	1,7242	1,8624
B-value	6,859	7,74

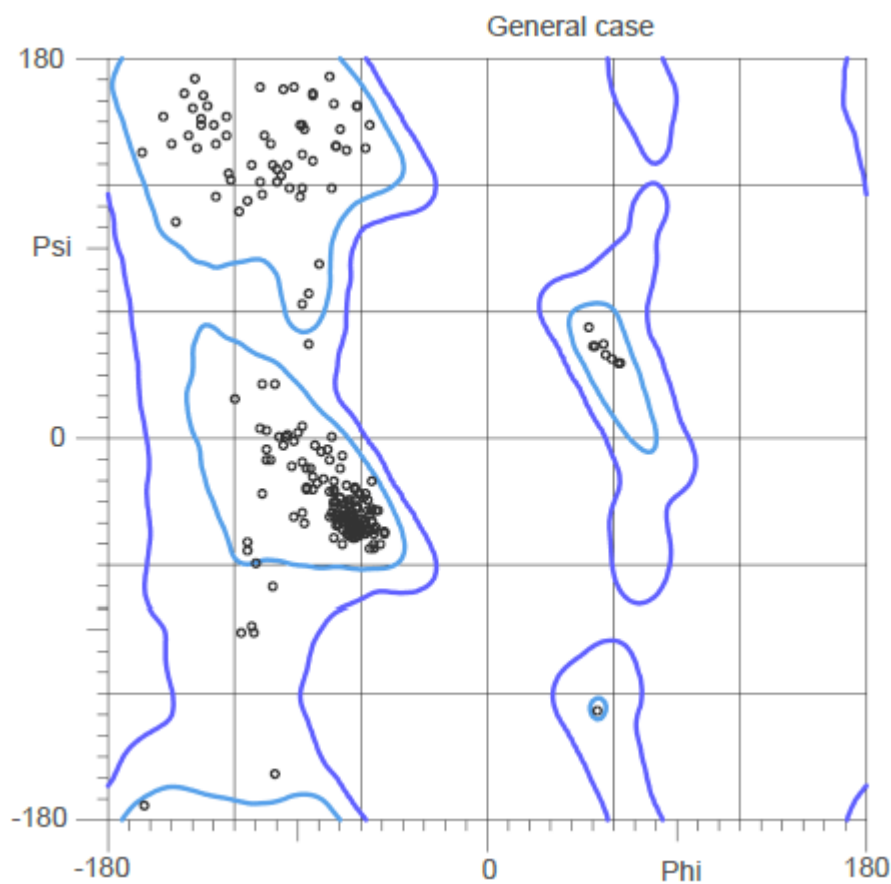
4.5. Validace enzymu DhaA106

Validace struktury DhaA106 byla provedena v softwaru MolProbability a WinCoot. Výsledné hodnoty jsou shrnuty v tabulce č.4. Na obrázku č.44 je zobrazen tzv. Ramachandranův diagram s uvedením torzních úhlů (úhel mezi dvěma rovinami) ϕ a ψ , které jsou v peptidovém řetězci studovaného modelu dehalogenázy.

Aminokyseliny v modelovaném řetězci neleží v zakázaných zónách s nevhodnými kombinacemi vazebných úhlů, čímž byla potvrzena věrohodnost získaného modelu.

Tabulka č.4: Výsledné hodnoty validace v softwaru MolProbity.

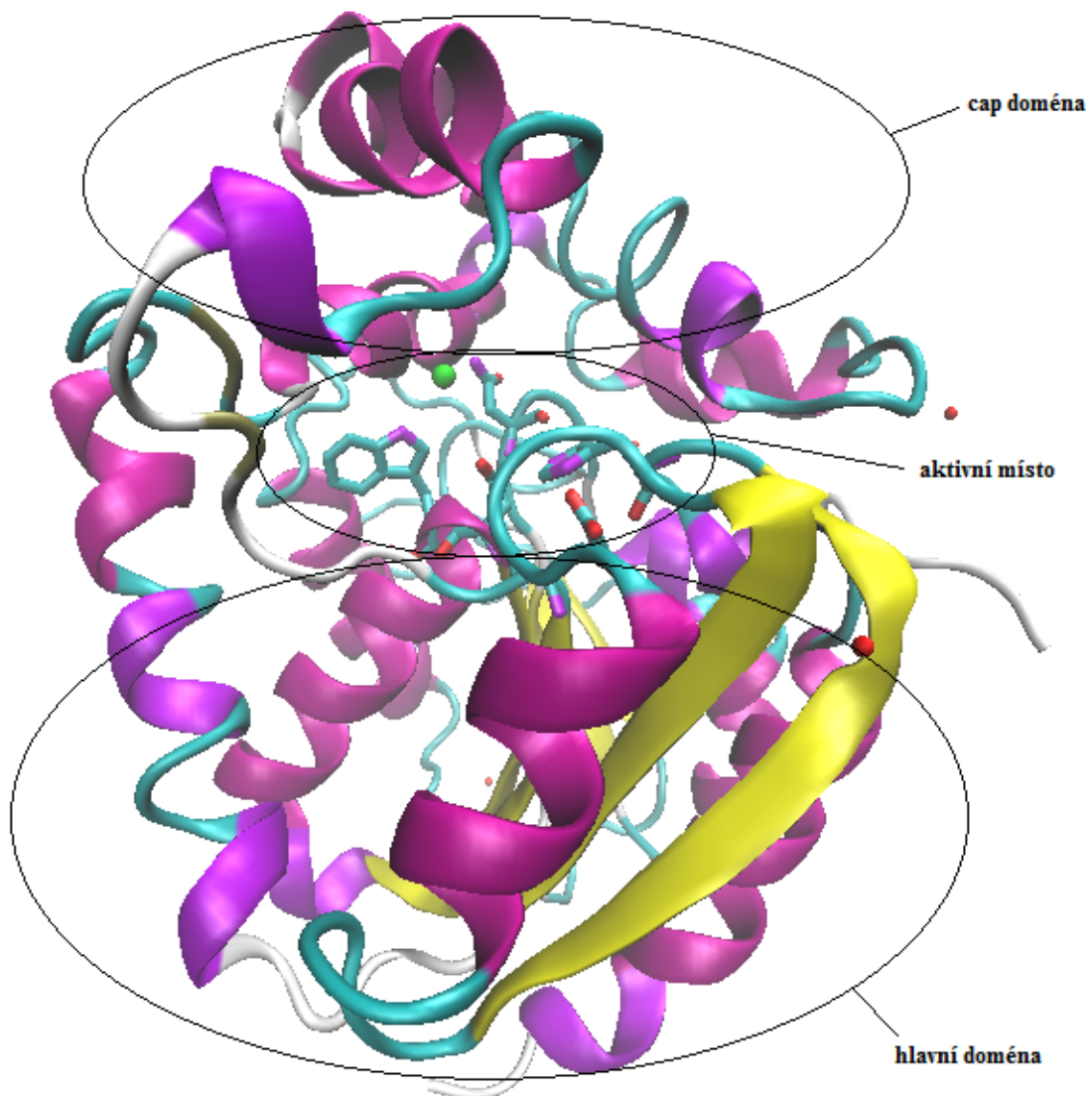
Clashscore, All atoms	4,28	
Poor rotamers	3	1,14%
Ramachandran outliers	0	0%
Ramachandran favored	299	97,08%
MolProbity Score	1,41	



Obrázek č.44: Ramachandranův diagram modelu proteinu DhaA106.

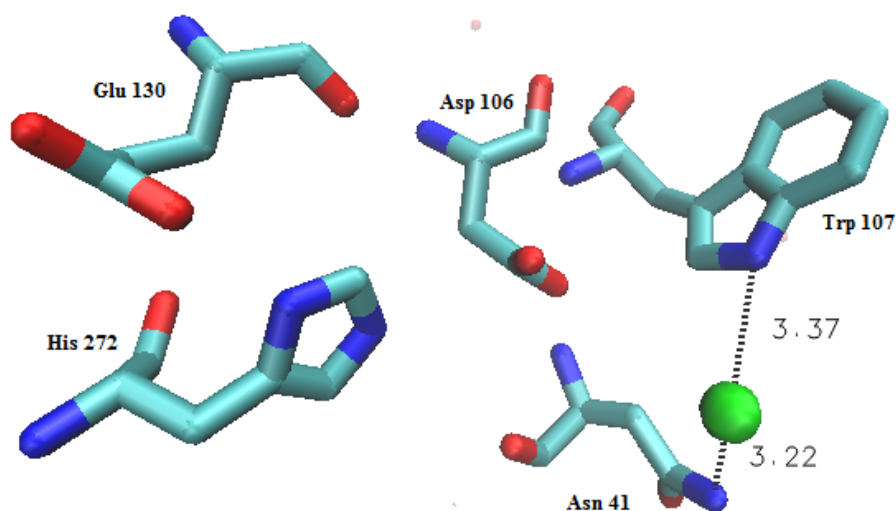
4.6. Zobrazení aktivního místa a celého enzymu DhaA106

Zobrazená struktura celého enzymu je na obrázku č.45. Enzym obsahuje pouze jedno aktivní místo, které je uloženo v hlavní doméně enzymu. Hlavní doména představuje největší část, kterou tvoří α -šroubovice (fialová barva) a β -skládané listy (žlutá barva). Za substrátovou specifitu odpovídá tzv. cap doména, která je složena pouze z α -šroubovic. Pentáda aminokyselin je znázorněna tyčinkovým modelem. Chloridový aniont jako zbytek odbourání substrátu je znázorněn zelenou kuličkou uvnitř aktivního místa.

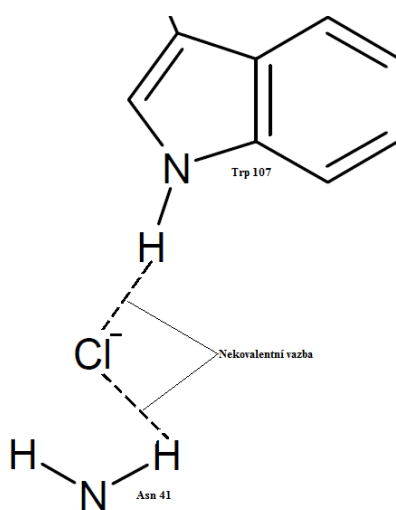


Obrázek č.45: Model enzymu DhaA106 se zvýrazněnými doménami a aktivním místem.

Detailní zobrazení pentády aminokyselin s chloridovým aniontem jako produktu dehalogenace je uvedeno na obrázku č.46. Chloridový aniont je fixován nekovalentní vazbou s dvěma dusíky aminokyselin Trp 107 a Asn 41, (Obrázek č.47). Délka vazby mezi chloridovým aniontem a Trp 107 je 3,37 Å. Délka vazby mezi chloridovým aniontem a Asn 41 je 3,22 Å.



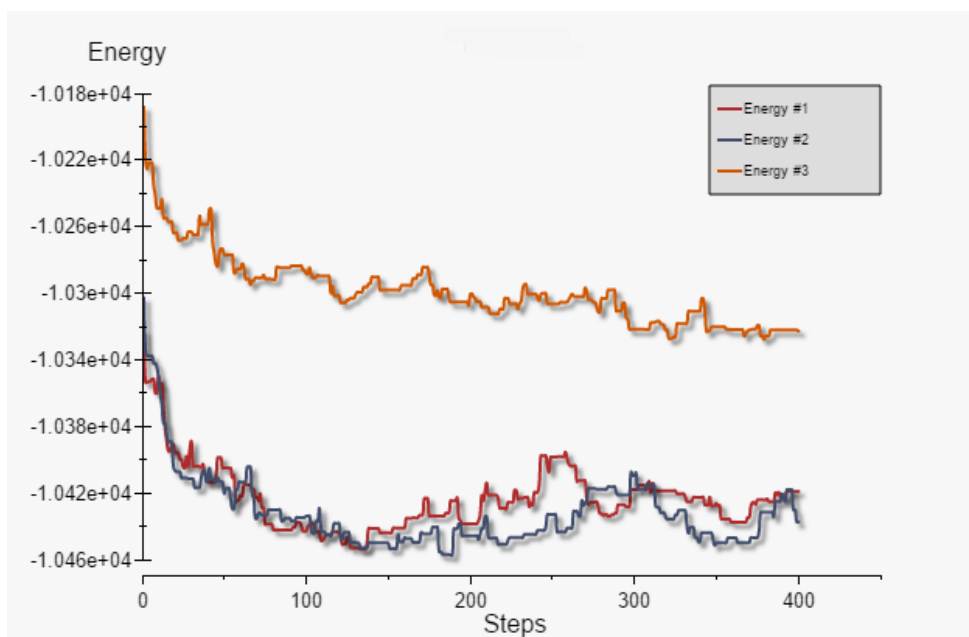
Obrázek č.46: Pentáda aminokyselin aktivního místa dehalogenázy s chloridovým aniontem zobrazena tyčinkovým modelem (vytvořeno softwarem VMD), chloridový aniont je znázorněn zelenou kuličkou.



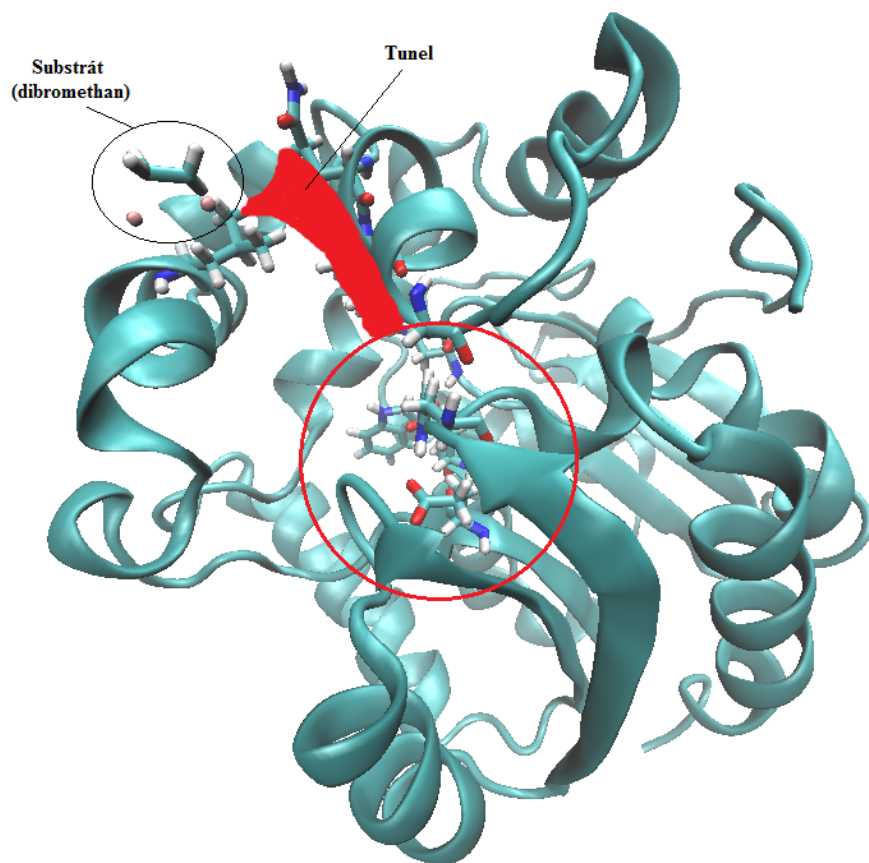
Obrázek č.47: Navázání zbytku substrátu mezi aminokyseliny Trp 107 a Asn 41 nekovalentní vazbou (vytvořeno softwarem ChemsKetch).

4.7. Simulace proteinu DhaA106 se substrátem

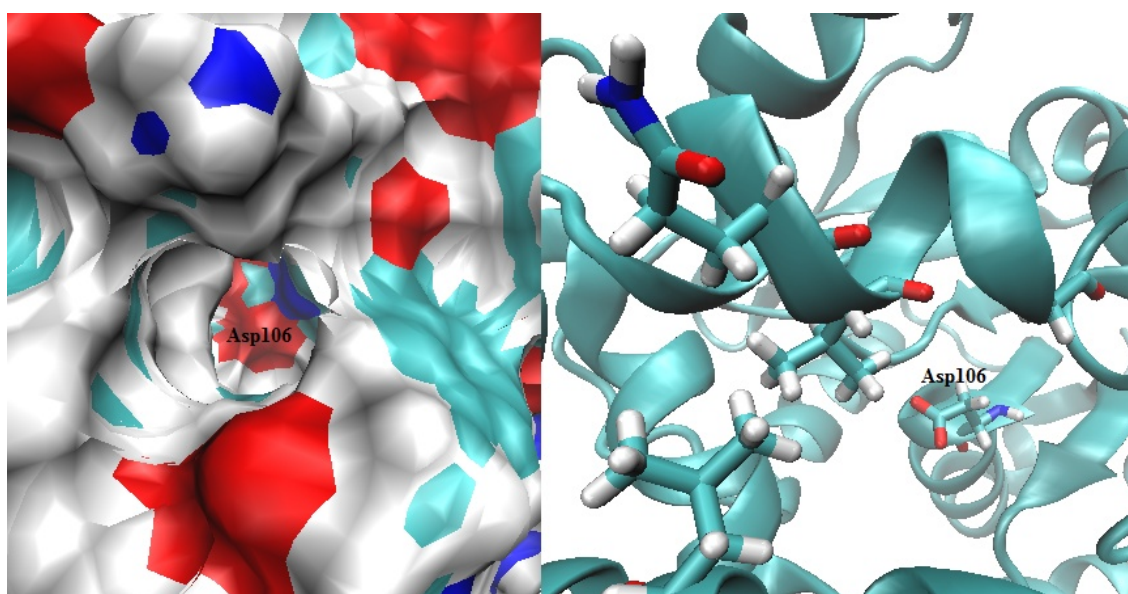
Průběh vývoje energie při simulaci proteinu se substrátem DBM (dibrómethanem) popisuje graf č.1, ve kterém jsou uvedeny 3 paralelně nezávislé simulace interakcí protein-substrát ve 400 krocích. Z grafu jsou patrné poklesy energie, které poukazují na blízkost tunelu. Do tunelu a následně do aktivního místa se však substrát nedostal. Na obrázku č.48 je substrát v těsné blízkosti vedoucího do aktivního místa. Během simulace protein měnil konformace, při některých krocích byl viditelný tunel, který spojuje aktivní místo s povrchem (Obrázek č.49).



Graf č.1: Průběh vývoje energie při simulaci proteinu se substrátem (dibrómethanem).



Obrázek č.48: Model enzymu DhaA106 se substrátem DBE v blízkosti tunelu.



Obrázek č.49: Pohled do tunelu, který spojuje aktivní místo s povrchem proteinu (32. krok simulace).

5. Diskuze

5.1. Krystalizace

Mutantní varianta DhaA106 byla vykrytalizována metodou sedící kapky. Stejnou metodu použili také Stsiapanava a kol. (2008) u mutantních variant DhaA04, DhaA14 a DhaA15. Pomocí uvedené metody byly také vykrytalizovány mutantní varianty DhaA31 (Lahoda a kol., 2011; 2014; Malcher, 2013). Metodu sedící kapky dále uvádí Stsiapanava a kol. (2011) u divoké varianty DhaA a u mutantní varianty DhaA13. Stejnou metodu pro krystalizaci DhaA12 uvádí i Emmer (2007). Pro krystalizaci proteinu DhaA lze použít i jiné krystalizační metody (základní i pokročilé), které jsou detailně popsány autory Kutá Smatanová (2008), Chayen (1997); Gilliland (1998) nebo v katalogu HamptonResearch (2001) (AlisoViejo, USA).

Předběžné krystalizační podmínky pro studovaný protein DhaA106 byly nalezeny za použití komerčních srážecích roztoků CrystalScreenkit HR2-110 (Hampton Research, AlisoViejo, USA). Srážecí roztok byl připraven z 0,1 M octanu sodného o pH 4,6; 0,2 M octanu amonného a 35 % PEG 4000. Stejný srážecí roztok použila i Tratsiak a kol. (2013) u halogenalkandehalogenasy DpcA. Pro krystalizaci mutantní varianty DhaA31 uvádí Lahoda a kol. (2014) srážecí roztok o složení 29 % PEG 4000 a 100 mM MES-NaOH pH 6,4. Stejný roztok aplikoval také Malcher (2013) pro krystalizaci DhaA31. U divokého typu DhaA byl použitý srážecí roztok složený z 39 % PEG 4000, 8 % TCP (trichlorpropanu) a 100 mM octanu sodného o pH 8,8; celkové pH roztoku bylo 7,8 (Lahoda a kol., 2014). U mutantní varianty DhaA12 byl aplikován jiný krystalizační roztok o složení: 20-25 % PEG 1500; 0,2 M octan sodný; 0,1 M MES pH 5,5 (Emmer, 2007). Stsiapanava a kol. (2008) uvádějí složení srážecích roztoků pro mutantní variantu DhaA04: 80 mM Bicine o pH 9; 8 % PEG 8000 a 80 mM MgCl₂ a pro varianty DhaA14 a DhaA15: 25 % PEG 4000, 8 % 2-propanol a 100 mM octan sodný. Pro divoký typ DhaA udává Stsiapanava a kol. (2011) složení krystalizačního roztoku: 25 % PEG 4000, 6% 2-propanol a 100 mM octan sodný a pro mutantní variantu DhaA13: 29 % PEG 8000; 200 mM octan sodný. V uvedených srážecích roztocích narostly monokrystaly vhodné pro difrakční analýzu, které byly měřeny na zdrojích synchrotronového záření. Citovaní autoři také uvádějí srážecí roztoky, při kterých vznikly pouze mikrokristaly. Složení těchto roztoků muselo být následně optimalizováno tak, aby jejich použití vedlo ke vzniku monokrystalů. Z uvedených

příkladů krystalizačních experimentů různých mutantních variant stejného proteinu DhaA je patrná velká variabilita srážecích roztoků a je zřejmé, že pro krystalizaci každé nové mutantní formy je nutné najít optimální specifické podmínky, tedy neexistuje jeden srážecí roztok, který by byl vhodný pro všechny mutantní varianty proteinu DhaA.

Důležitou podmínkou pro krystalizační experimenty je také čistota proteinu. Ta se posuzuje pomocí SDS-PAGE gelové elektroforézy (Malcher, 2013). Obecně platí: čím čistější protein tím větší šance na úspěšnou krystalizaci (KutáSmatanová, 2008). Další kritérium, na kterém závisí úspěšnost krystalizace, je složení proteinového roztoku, který není nikdy 100 %. V diplomové práci byl použit protein DhaA106 o koncentraci $11,6 \text{ mg.ml}^{-1}$ v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5. U divokého typu DhaAwt a mutantní varianty DhaA13 uvádějí Stsiapanava a kol. (2011) koncentraci proteinu 10 mg.ml^{-1} v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5. U krystalizace mutantních variant DhaA04, DhaA14 a DhaA15 měl protein v roztoku koncentraci $7-18 \text{ mg.ml}^{-1}$ a byl připraven v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5 (Stsiapanava a kol. 2008). Stejně koncentrace proteinových roztoků se používají i u jiných halogenalkandehalogenas, např. Tratsiak a kol. (2013) uvádí koncentraci proteinu DpcA10 mg.ml^{-1} v 50 mM Tris-HCl pufru o pH 7,5. Koncentrace proteinu a především jeho čistota jsou nutné požadavky při realizaci krystalizačních experimentů.

Nejlepší trojrozměrné krystaly DhaA106 měly velikost $0,08 \times 0,38 \times 0,018 \text{ mm}$ a tyčinkovitý tvar. Lahoda a kol. (2014) uvádí krystaly DhaA31 o velikosti $0,28 \times 0,19 \times 0,13 \text{ mm}$. Krystaly divokého typu DhaAwt o velikosti $0,19 \times 0,03 \times 0,03 \text{ mm}$ uvádí Stsiapanava a kol. (2011). U mutantní varianty DhaA13 měly největší krystaly rozměry $0,24 \times 0,12 \times 0,07 \text{ mm}$ (Stsiapanava a kol. 2011). Rozměry monokrystalů u mutantní varianty DhaA04 byly $0,20 \times 0,15 \times 0,06 \text{ mm}$. U varianty DhaA15 byly rozměry krystalů $0,17 \times 0,07 \times 0,02 \text{ mm}$ a $0,16 \times 0,06 \times 0,02 \text{ mm}$ u varianty DhaA14 (Stsiapanava a kol. 2008). Tyčinkovité krystaly uvádí i Malcher (2013) u varianty DhaA31 a Emmer (2007) u varianty DhaA12.

Krystaly DhaA106 rostly po dobu jednoho týdne, podobně jako krystaly ostatních mutantních variant a také krystaly divokého typu (Stsiapanava a kol. 2008; 2011). Hlavním parametrem je tedy správná volba srážecího roztoku a čistota a koncentrace proteinového roztoku. Kromě těchto faktorů může mít na růst krystalů vliv také světlo a okolní podmínky (KutáSmatanová, 2008), proto by měla být krystalizační destička pečlivě uzavřena proti přístupu světla a umístěna na stinném místě.

5.2. Difrakční analýza

Difrakčním měřením krystalů DhaA106 bylo zaznamenáno celkem 500 obrázků při nastavení oscilačního úhlu $0,5^\circ$ a vzdálenosti krystalu od detektoru 120 mm. Rentgenové záření mělo vlnovou délku 1,542 Å. Lahoda a kol. (2011; 2014) uvádí u sběru difrakčních dat z mutantní varianty DhaA31 vlnovou délku rentgenové záření 1,033 Å. Při tomto měření bylo získáno 120 difrakčních záznamů při nízkém rozlišení (50-2,89 Å) a úhlu oscilace 3° a vzdálenosti detektoru od krystalu 300 mm. Dále bylo získáno 400 difrakčních záznamů při vysokém rozlišení (50-1,26 Å), úhlu oscilace $0,5^\circ$ a vzdálenosti krystalu od detektoru 100 mm. Stejné nastavení vlnové délky rentgenové záření, jako bylo aplikované na krystaly DhaA106, uvádí i Stsiapanava a kol. (2011) a Emmer (2007) u krystalů DhaA divokého typu a mutantní varianty DhaA12, v obou případech se jednalo o stejný typ difraktometru a detektoru. U divokého typu DhaAwt bylo zaznamenáno 360 difrakčních záznamů s úhlem oscilace 1° a vzdálenosti krystal-detektor 60 mm (Lahoda a kol., 2014). U mutantní varianty DhaA04 probíhalo difrakční měření ve dvou krocích, kdy v prvním bylo zaznamenáno 152 difrakčních obrázků s úhlem oscilace 1° a vzdálenosti 200 mm od detektoru při nízkém rozlišení (30-2,30 Å). Ve druhém kroku bylo získáno 318 difrakčních obrázků při vysokém rozlišení 30-1,20 Å, s úhlem oscilace $0,5^\circ$ a vzdálenosti detektoru od krystalu 85 mm. Celkem bylo získáno 470 difrakčních záznamů. U mutantní varianty DhaA14 proběhla rentgenová analýza dokonce ve třech krocích, kdy v prvním bylo získáno 360 difrakčních obrázků při nízkém rozlišení 30-2,20 Å s úhlem oscilace 1° a vzdálenosti krystalu od detektoru 210 mm. Ve druhém kroku bylo celkem naměřeno 720 difrakčních obrázků při středním rozlišení 30-1,25 Å s úhlem oscilace 1° a vzdálenosti krystalu od detektoru 100 mm. Ve třetím kroku bylo zaznamenáno 720 obrázků při vysokém rozlišení 30-0,95 Å s úhlem oscilace $0,5^\circ$ a vzdálenosti krystalu od detektoru 50 mm. U mutantní varianty DhaA15 byly veškeré obrázky vytvořeny při stejném rozlišení 1,15 Å s úhlem oscilace $0,5^\circ$ a vzdálenosti krystalu od detektoru 171 mm (Stsiapanava a kol. 2008; 2010). U mutantní varianty DhaA13 bylo vytvořeno 400 difrakčních záznamů při nastavené vlnové délce 1,033 Å; zde se jednalo o krystaly proteinu i se substrátem (Stsiapanava a kol. 2011). Pro krystaly halogenalkandehalogenasy DpcA byla použita vlnová délka 0,978 Å a úhel oscilace 1° při vzdálenosti krystalu od detektoru 90 mm (Tratsiak a kol. 2013). Pro sběr difrakčních dat neexistuje pouze jeden typ difraktometru a detektoru. Pro každý typ detektoru a difraktometru je možné nastavení různé vlnové délky,

vzdálenosti krystalu od detektoru a úhlu oscilace, proto je nutné tyto proměnné brát v potaz pro úspěšné získání difrakčních dat.

5.3. Rafinace, validace a úprava struktury DhaA106

Rafinace struktury DhaA106 byla provedena manuálně v softwaru WinCoot (Emsley a kol., 2010). Stejně postupovali i ostatní autoři při řešení struktury dalších mutantních variant DhaA (např. Lahoda a kol., 2014). Pravidelně byla kontrolována rafinace struktur v programu CCP4. Výsledky rafinace porovnané s jinými mutantními variantami proteinu DhaA jsou uvedeny v tabulce č.5.

Tabulka č.5: Výsledky rafinací u jednotlivých variant proteinu DhaA včetně divokého typu, od kterého jsou mutantní varianty odvozeny, DhaA04, DhaA14 a DhaA15 (Stsiapanava a kol., 2010), DhaA31 a DhaAwt (Lahoda a kol., 2014).

	DhaA106	DhaA04	DhaA14	DhaA15	DhaA31	DhaA
R-faktor (%)	12,41	13,7	11,5	13,2	12,8	21,6
R-free (%)	16,62	16,7	13,7	16,2	16	27,3
B-value	7,74	13,4	13,2	13,1	11,23	19,87

Z uvedené tabulky je patrné, že hodnoty rafinace jednotlivých struktur jsou i podobné, značné rozdíly jsou patrné pouze mezi mutantními variantami a divokým typem proteinu DhaAwt.

Validace struktury DhaA106 byla provedena pomocí softwaru MolProbity (Chen a kol., 2010). Celkem 97,3 % residuí bylo lokalizováno v nejuhodnější oblasti a 100% v povolené oblasti mapy elektronové hustoty. Podobné výsledky zaznamenala také Lahoda a kol. (2014) u divoké typu DhaAwt, kdy jediným rozdílem bylo o 0,6 % méně residuí ve zvýhodněné oblasti mapy elektronové hustoty. Téměř stejné výsledky uvádí i Stsiapanava a kol. (2010) u mutantních variant DhaA04, DhaA14 a DhaA15. U mutantní varianty DhaA31 bez substrátu bylo zaznamenáno 90 % residuí a u stejné varianty se substrátem 89,6 % uvnitř Ramachandranova diagramu (Lahoda a kol., 2014).

5.4. Charakteristika aktivního místa proteinu DhaA106

Aktivní místo je složeno z pentády aminokyselin, konkrétně z aminokyselin: asparagin 41, kyselina asparagová 106, tryptofan 107, glutamin 130 a histidin 272.

V aktivním místě je také zbytek substrátu (iont chloru), který je poután mezi tryptofan a asparaginem nekovalentní vazbou. Tyto dvě aminokyseliny stabilizují aniont chloru do příchodu dalšího substrátu, který aniont chloru vytěsni a nahradí jej dalším iontem. Při vstupu halogenovaného substrátu dochází k jeho navázání na kyselinu asparagovou 106, která naváže substrát esterovou vazbou. Současně dojde k uvolnění halogenu, který se naváže jako halogenid mezi dvě stabilizující aminokyseliny (Trp 107 a Asn 41). Následně histidin 272 odebere jeden vodík z molekuly vody, která takto účinně hydrolyzuje esterickou vazbu za vzniku alkoholu jako finálního produktu reakce (Lahoda a kol., 2014).

Ve struktuře DhaA106 byla nalezena katalytická pentáda včetně chloridového aniontu. Chyběla pouze molekula vody v dostatečné vzdálenosti (do 4Å) od histidinu 272. Vzdálenost chloridu od asparaginu 41 byla 3,22 Å a 3,37 Å od tryptofanu 107. U mutantní varianty DhaA31 byla vzdálenost iontu od asparaginu 41 3,34 Å a 3,27 Å od tryptofanu 107. Zde byla molekula vody vzdálená od histidinu 272 3,17 Å (Lahoda a kol., 2014). U mutantních variant DhaA04, DhaA14 a DhaA15 byla průměrná vzdálenost chloridového iontu od asparaginu 41 3,38 Å a 3,21 Å od tryptofanu 107 (Stsiapanava a kol. 2010). Někteří autoři uvádějí i vzdálenosti mezi ostatními aminokyselinami, jako například Lahoda a kol. (2014), která uvádí vzdálenost mezi kyselinou asparagovou 106 a histidinem 272.

5.5. Simulace interakce proteinu DhaA106 se substrátem

Simulace interakce proteinu se substrátem byla provedena pomocí softwaru PELE. Tento software byl úspěšně aplikován v mnoha studiích popisujících interakci proteinu se substrátem (Borrelli a kol., 2010), konformační změny na povrchu proteinu (Cossins a kol., 2012) apod. Uvedená metoda byla například aplikována ve studii proteinu arylalkohol oxidázy (Hernández-Ortega a kol., 2011), savčího proteinu rapamycinu (Espona-Fiedler a kol., 2012) a v neposlední řadě migračních procesů v hemoglobinu (Lucas a Guallar, 2012), nicméně je potřeba zmínit skutečnost, že doposud nebyla žádná dehalogenáza studována metodou PELE.

V průběhu simulace se substrát (1,2-dibrómethan) vyskytoval v především v okolí tunelu, který spojuje aktivní místo s povrchem, nicméně přímo do aktivního místa substrát neproniknul. Jednou z možných příčin částečně úspěšné simulace jsou rozměry

studovaného substrátu, brómovaný substrát je objemnější ve srovnání s chlorovaným analogem. Další možnou příčinou jsou konformační změny povrchu proteinu, při kterých dochází také k uzavírání a otevírání tunelu. V těsné blízkosti substrátu mohl být tunel uzavřený a substrát tak nemohl proniknout do aktivního místa. Další možnou příčinou mohla být absence vodného prostředí.

Pro komplexní pohled na proniknutí substrátu do aktivního místa enzymu je nezbytná i studie, ve které bude prozkoumáno více halogenovaných substrátů, s navýšením počtu simulačních kroků a se zahrnutím vhodného vodného prostředí solvatujícího komplex proteinu se substrátem.

6. Závěr

Cílem diplomové práce bylo vyřešení a prozkoumání molekulární struktury dehalogenasy DhaA106 a porovnat ji s ostatními mutantními variantami DhaA. K vyřešení molekulární struktury bylo nejprve nutné připravit vhodné krystaly. Tyčinkovité krystaly byly vypěstovány za použití srážecího roztoku s následujícím složením: 0,1 M octanu sodného o pH 4,6; 0,2 M octanu amonného a 35 % PEG 4000. Při difrakční analýze bylo získáno celkem 500 difrakčních záznamů, ze kterých byla vytvořena mapa elektronové hustoty a z ní prostorový model molekulární struktury dehalogenasy. Model byl následně postupně upravován v softwaru WinCoot, ve kterém proběhla rafinace každé aminokyseliny v polypeptidovém řetězci, dále byly opraveny pozice v řetězci aminokyselin, přidány alternativní konformace a chlorid do aktivního místa společně se zbytky srážedla a molekulami vody. Výsledný model byl rafinován v softwaru CCP4 a validován v softwaru MolProbity. Výsledné hodnoty rafinace a validace struktury byly porovnány nejen s ostatními mutantními variantami, ale také s divokým typem dehalogenasy DhaAwt. Molekulární struktura dehalogenasy DhaA106 byla následně znázorněna v softwaru VMD, kde bylo také detailně znázorněno aktivní místo, ve kterém byly změřeny vzdálenosti mezi chloridem a dvěma blízkými aminokyselinami, které jej vážou nekovalentně. Tyto vzdálenosti byly porovnány s mutantní variantou DhaA31. Poté byla provedena (pomocí softwaru PELE) simulace interakce proteinu s vybraným substrátem 1,2-dibromethanem. Během simulace se substrát dostal do blízkosti tunelu, který spojuje aktivní místo s povrchem enzymu.

7. Seznam použité literatury

Literární zdroje:

- Assis, H. M. S., Sallis, P. J., Bull A. T., Hardman, D. J. (1998). Biochemical characterization of a haloalcohol dehalogenase from *Arthrobacter erithrii* H10a. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**: 568–574.
- Banas, P., Otyepka, M., Jerabek, P., Petrek, M., Damborsky, J. (2006). Mechanism of enhanced conversion of 1,2,3- trichloropropane by mutant haloalkane dehalogenase revealed by molecular modeling. *Journal of Computer Aided Molecular Design*, **20**: 375–383.
- Benning, M.M., Wesenberg, G., Liu, R., Taylor, K.L., Dunaway-Mariano, D., Holden, H.M. (1998). The three-dimensional structure of 4-hydroxybenzoyl-CoA thioesterase from *Pseudomonas* sp. strain CBS-3. *Journal of Biological Chemistry*, **273**: 33572–33579.
- Bohac, M., Nagata, Y., Prokop, Z., Prokop, M., Monincova, M., Koca, J., Tsuda, M., Damborsky, J. (2002). Halide-stabilizing residues of haloalkane dehalogenases studied by quantum mechanic calculations and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, **41**: 14272–14280.
- Borrelli, K. W., Cossins, B., Guallar, V. (2010). Exploring hierarchical refinement techniques for induced fit docking with protein and ligand flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, **31**: (6), 1224-1235.
- Bosma, T., Kruizinga, E., de Bruin, E. J., Poelarends, G. J., Janssen, D. B. (1999). Utilization of Trihalogenated Propanes by *Agrobacterium radiobacter* AD1 through Heterologous Expression of the Haloalkane Dehalogenase from *Rhodococcus* sp. Strain m15-3. *Applied and Environmental Microbiology*. 65.
- Bosma, T., Damborsky, J., Stucki, G., Janssen, D.B. (2002). Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 3582–3587.
- Bosma, T., Pikkemaat, M.G., Kingma, J., Dijk, J., Janssen, D.B. (2003). Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of halopropane conversion by a *Rhodococcus* haloalkane dehalogenase. *Biochemistry*, **42**: 8047–8053.

- Campbell, D.W., Muller, C., Reardon, K.F. (2006). Development of a fiber optic enzymatic biosensor for 1,2- dichloroethane. *Biotechnology Letters*, **28**: 883–887.
- Castro, C.E., Bartnicki, E.W. (1968). Epoxidation of halohydrins, epoxide opening and transhalogenation by a *Flavobacterium* sp. *Biochemistry*, **7**: 3213–3218.
- Copley, S.D. (1998). Microbial dehalogenases: enzymes recruited to convert xenobiotic substrates. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**:613–617.
- Cossins, B.P., Hosseini, A., Guallar, V. (2012). Exploration of protein conformational change with PELE and meta-dynamics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, **8**: (3), 959-965.
- Damborsky, J., Rorije, E., Jesenska, A., Nagata, Y., Klopman, G. Peijnenburg, W.J.G.M. (2001). Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases. *Environmental Toxicology Chemistry* **20**: 2681–2689.
- Damborsky, J., Chaloupkova, R., Pavlova, M., Chovancova, E. Brezovsky, J. (2010). Structure–Function Relationships and Engineering of Haloalkane Dehalogenases. In *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*, Berlin, 1081-1098.
- Emmer, J. (2007). Structural Studies of the Haloalkane Dehalogenase Mutant (DhaA12) from *Rhodococcus rhodochrous*. Master's thesis, University of South Bohemia, 35.
- Espona-Fiedler, M., Soto-Cerrato, V., Hosseini, A., Lizcano, J.M., Guallar, V., Quesada, R., Gao, T., Pérez-Tomás, R. (2012). Identification of dual mTORC1 and mTORC2 inhibitors in melanoma cells: prodigiosin vs. obatoclax. *Biochemical pharmacology*, **83**: (4), 489-496.
- de Jong, R.M., Tiesinga, J.J., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Tang, L., Janssen, D.B., Dijkstra, B.W. (2003). Structure and mechanism of a bacterial haloalcohol dehalogenase: a new variation of the short-chain dehydrogenase/ reductase fold without an NAD (P) H binding site. *EMBO Journal*, **22**: 4933–4944.

- de Jong, R.M., Brugman, W., Poelarends, G.J., Whitman, C.P., Dijkstra, B.W. (2004). The X-ray structure of trans-3-chloroacrylic acid dehalogenase reveals a novel hydration mechanism in the tautomerase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, **279**: 11546–11552.
- Franken, S.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W.(1991), Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes. *EMBO Journal*, **10**: 1297–1302.
- Gilliland, G.L. (1998). A biological macromolecule crystallization database: A basis for a crystallization strategy. *Journal of Crystal Growth*, **90**: 50-51.
- Gray, K.A., Richardson, T.H., Kretz, K., Short, J.M., Bartnek, F., Knowles, R., Kan, L., Swanson, P.E., Robertson, D.E. (2001). Rapid evolution of reversible denaturation and elevated melting temperature in a microbial haloalkane dehalogenase. *Advanced Synthesis a Catalysis*, **343**: 607–616.
- Hisano, T., Hata, Y., Fujii, T., Liu, J.Q., Kurihara, T., Esaki, N., Soda, K. (1996). Crystal structure of L-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. YL. An alpha/beta hydrolase structure that is different from the alpha/beta hydrolase fold. *Journal of Biological Chemistry*, **271**: 20322–20330.
- Janssen, D.B. (2007). Biocatalysis by dehalogenating enzymes. *Advanced in Applied Microbiological*, **61**: 233–252.
- Janssen, D. B., Scheper, A, Dijkhuizen, L., Witholt, B. (1985). Degradation of halogenated aliphatic compounds by *Xanthobacter autotrophicus* GJ 10. *Applied and Environmental Microbiology*, **49**: 673-677.
- Janssen, D.B., Oppentocht, J.E., Poelarends, G.J. (2001). Microbial dehalogenation. *Current Opinion in Biotechnology*, **12**: (3), 254-258.
- Janssen, D.B., Dinkla, I.J.T., Poelarends, G.J., Terpstra, P. (2005). Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. *Environmental Microbiology*, **7** (12), 1868–1882.

- Janssen, D.B., Majeric-Elenkov, M., Hasnaoui, G., Hauer, B., Lutje Spelberg, J.H. (2006). Enantioselective formation and ring-opening of epoxides catalysed by halohydrin dehalogenases. *Biochemical society*, **34**: 291-295.
- Hernández-Ortega, A., Lucas, F., Ferreira, P., Medina, M., Guallar, V., Martínez, A.T. (2011). Modulating O₂ Reactivity in a Fungal Flavoenzyme INVOLVEMENT OF ARYL-ALCOHOL OXIDASE PHE-501 CONTIGUOUS TO CATALYTIC HISTIDINE. *Journal of Biological Chemistry*, **286**: (47), 41105-41114.
- Chaloupkova, R., Sykorova, J., Prokop, Z., Jesenska, A., Monincova, M., Pavlova, M., Tsuda, M., Nagata, Y., Damborsky, J. (2003). Modification of activity and specificity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by engineering of its entrance tunnel. *Journal of Biological Chemistry*: **278**: 52622–52628.
- Chayen, N.E. (1997). A novel technique to control the rate of vapour diffusion, giving larger crystals. *Journal of Applied Crystallography*, **30**: 198-202.
- Chovancova E., Kosinski J., Bujnicki J. M., Damborsky J. (2007). Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. *Proteins: Structure, Function, Bioinformatics*, **67**: 305–316.
- Kasai, N., Suzuki, T., Furukawa, Y. (1998). Chiral C₃ epoxides and halohydrins: their preparation and synthetic application. *Journal of Molecular Catalysis*.**4**: 237–252.
- Keuning, S., Janssen, D.B., Witholt, B. (1985). Purification and characterization of hydrolytic haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Journal of Bacteriology*, **163**: 635–639.
- Kiefer, P.M., Copley, S.D. (2002). Characterization of the initial steps in the reductive dehalogenation catalyzed by tetrachlorohydroquinone dehalogenase. *Biochemistry*, **41**: 1315–1322.
- Klvana, M., Pavlova, M., Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Prokop, Z., Dvorak ,P., Stsiapanava, A., Kutý, M., Kuta- Smatanova, I., Dohnalek, J., Kulhanek, P., Wade, R.C., Damborsky, J. (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. *Journal of Molecular Biology*, **392**: 1339-1356.

- Kmunicek, J., Luengo, S., Gago, F., Ortiz, A.R., Wade, R.C., Damborsky, J. (2001). Comparative binding energy analysis of the substrate specificity of haloalkane dehalogenase from *Xanthobacter autotrophicus* GJ10. *Biochemistry*, **40**: 8905–8917.
- 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*, **17**: 125-132.
- Koudelakova, T., Chaloupkova, R., Brezovsky, J., Prokop, Z., Sebestova, E., Hesseler, M., Damborsky, J. (2013). Engineering enzyme stability and resistance to an organic cosolvent by modification of residues in the access tunnel. *Angewandte Chemie International Edition*, **52**: (7), 1959-1963.
- Kulakova, A.N., Stafford, T.M., Larkin, M.J., Kulakov, L.A. (1995). Plasmid pRTL1 controlling 1-chloroalkane degradation by *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB13064. *Plasmid*, **33**: 208-17.
- Kulakova, A.N., Larkin, M.J., Kulakov, L.A. (1997). The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiology*, **143**: 109–115.
- Kurihara, T., Esaki, N., Soda, K. (2000). Bacterial 2-haloacid dehalogenases: structures and reaction mechanisms. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **4**: 57-65.
- Kutá Smatanová, I. (2008). Crystallization techniques in protein crystallography, Habilitation thesis, Palacky university Olomouc.
- Lahoda, M., Chaloupkova, R., Stsiapanava, A., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2011). Crystallization and crystallographic analysis of the *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 DhaA mutant DhaA31 and its complex with 1, 2, 3-trichloropropane. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **67**: (3), 397-400.
- Lahoda, M., Mesters, J.R., Stsiapanava, A., Chaloupková, R., Kutý, M., Damborský, J. Kutá Smatanová, I. (2014). Crystallographic analysis of 1,2,3-trichloropropane biodegradation by the haloalkane dehalogenase DhaA31. *Acta Crystallographica*, **70**: 209-217.

- Leisinger, T., Bader, R., Hermann, R., Schmid-Appert, M., and Vuilleumier, S. (1994). Microbes, enzymes and genes involved in dichloromethane utilization. *Biodegradation* **5**: 237–248.
- Liu, X., Hanson, B.L., Langan, P., Viola, R.E. (2007). The effect of deuteration on protein structure: a high-resolution comparison of hydrogenous and perdeuterated haloalkane dehalogenase. *Acta Crystallographica*, **63**: 1000–1008.
- Lucas, M.F., Guallar, V. (2012). An atomistic view on human hemoglobin carbon monoxide migration processes. *Biophysical journal*, **102**: (4), 887-896.
- Malcher, P. (2013). Biodegradace environmentálních polutantů – charakterizace mutantní halogenalkandehalogenasy DhaA31 z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. Bakalářská práce, Jihočeská univerzita, 60.
- Marek, J., Vevodova, J., Kuta-Smatanova, I., Nagata, Y., Svensson, L.A., Newman, J., Takagi, M., Damborsky, J. (2000). Crystal structure of the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *Biochemistry*, **39**: 14082–14086.
- Mazumdar, P.A., Hulecki, J.C., Cherney, M.M., Garen, C.R., James, M.N. (2008). X-ray crystal structure of *Mycobacterium tuberculosis* haloalkane dehalogenase Rv2579. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1784**: 351–362.
- Newman, J., Peat, T.S., Richard, R., Kan, L., Swanson, P.E., Affholter, J.A., Holmes, I.H., Schindler, J.F., Unkefer, C.J., Terwiliger, T.C. (1999). Haloalkane dehalogenases: Structure of a *Rhodococcus* enzyme. *Biochemistry*, **38**: 16105-16114.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J., Sussman, J.L., Verschueren, K.H.G., Goldman, A. (1992). The a/b hydrolase fold. *Protein Engineering*, **5**: 197–211.
- Petrek, M., Otyepka, M., Banas, P., Kosinova, P., Koca, J., Damborsky, J. (2006). CAVER: A new tool to explore routes from protein clefts, pockets and cavities. *BMC Bioinformatics*, **7**: 316.

- Pavlova, M., Klvana, M., Prokop, Z., Chaloupkova, R., Banas, P., Otyepka, M., Wade, R.C., Tsuda, M., Nagata, Y., Damborsky, J. (2009). Engineering access tunnels of dehalogenase by computational design and directed evolution to boost its activity towards an anthropogenic toxic substrate. *Nature Chemical Biology*, (submitted).
- Pries, F., VandenWijngaard, A.J., Bos, R., Pentenga, M., Janssen, D.B. (1994). The role of spontaneous cap domain mutations in haloalkane dehalogenase specificity and evolution. *Journal of Biological Chemistry*, **269**: 17490–17494.
- Pries, F., Kingma, J., Janssen, D.B. (1995). Activation of an Asp-124- > Asn mutant of haloalkane dehalogenase by hydrolytic deamidation of asparagine. *FEBS Letters*, **358**: 171–174.
- Prokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Florian, J., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Natsume, R., Janssen, D.B., Nagata, Y., Senda, T., Damborsky, J. (2008). Two structurally uncoupled bases of enzyme enantioselectivity within a single active site.
- Prokop, Z., Sato, Y., Brezovsky, J., Mozga, T., Chaloupkova, R., Koudelakova, T., Jerabek, P., Natsume, R., Janssen, D.B., Florian, J., Nagata, Y., Senda, T., Damborsky, J. (2009). Two structural bases of enzyme enantioselectivity within a single active site. *Nature* (in preparation).
- Seffernick, J.L., de Souza, M.L., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P. (2001). Melamine deaminase and atrazine chlorohydrolase: 98 percent identical but functionally different. *Journal of Bacteriology*, **183**: 2405–2410.
- Schindler, J.F., Naranjo, P.A., Honaberger, D.A., Chang, C.H., Brainard, J.R., Vanderberg, L.A., Unkefer, C.J. (1999). Haloalkane dehalogenases: steady-state kinetics and halide inhibition. *Biochemistry*, **38**: 5772-5778.
- Stsiapanava, A., Koudelakova, T., Lapkouski, M., Pavlova, M., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2008). Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultrahigh resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **64**: (2), 137-140.

- Stsiapanava, A., Dohnalek, J., Gavira, J. A., Kutý, M., Koudelakova, T., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2010). Atomic resolution studies of haloalkane dehalogenases DhaA04, DhaA14 and DhaA15 with engineered access tunnels. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **66**: (9), 962-969.
- Stsiapanava, A., Chaloupkova, R., Fortova, A., Brynda, J., Weiss, M. S., Damborsky, J., Kuta Smatanova, I. (2011). Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the wild-type haloalkane dehalogenase DhaA and its variant DhaA13 complexed with different ligands. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **67**: (2), 253-257.
- Stucki, G., Thuer, M. (1995). Experiences of a large-scale application of 1,2-dichloroethane degrading microorganisms for groundwater treatment. *Environmental Science a Technology*, **29**: 2339–2345.
- Swanson, P.E. (1999). Dehalogenases applied to industrialscale biocatalysis. *Current Opininn Biotechnoly*, **10**: 365–369.
- Tang, L., Lutje Spelberg, J.H., Fraaije, M.W., Janssen, D.B. (2003). Kinetic mechanism and enantioselectivity of halohydrin dehalogenase from *Agrobacterium radiobacter*. *Biochemistry*, **42**: 5378–5386.
- Tratsiak, K., Degtjarik, O., Drienovska, I., Chrast, L., Rezacova, P., Kutý, M., Kuta Smatanova, I. (2013). Crystallographic analysis of new psychrophilic haloalkane dehalogenases: DpcA from *Psychrobacter cryohalolentis* K5 and DmxA from *Marinobacter* sp. ELB17. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, **69**: (6), 683-688.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Poelarends, G.J., Mars, A.E., Janssen, D.B. (2000). Detoxification of reactive intermediates during microbial metabolism of halogenated compounds. *Curr Opin Microbiol*, **3**: 257–262.
- van Hylckama Vlieg, J.E.T., Tang, L., Lutje Spelberg, J.H., Smilda, T., Poelarends, G.J., Bosma, T., van Merode, A.E.J., Fraaije, M.W., Janssen, D.B. (2001). Halohydrin Dehalogenases Are Structurally and Mechanistically Related to Short-Chain Dehydrogenases/Reductases. *Journal of bacteriology*, **17**: 5058-5066.

- Verschueren, K.H.G., Franken, S.M., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. (1993a). Refined X-ray structures of haloalkane dehalogenase at pH 6.2 and pH 8.2 and implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology*, **232**: 856–872.
- Verschueren, K.H.G., Seljee, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. (1993b). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*, **363**: 693–698.
- Verschueren, K.H.G., Seljee, F., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W. (1993c). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature* **363**: 693–698.
- Yujing, M., Mellouki, A. (2001). Rate constants for the reactions of OH with chlorinated propanes. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **3**: 2614–2617.

Použitý software:

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

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

Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics, *Journal of Molecular Graphics*, **14**: 33-38.

Chen, V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L.W., Richardson, J.S. Richardson, D. C. (2010). Graphical tools for macromolecular crystallography in PHENIX. *Acta Crystallographica D*, **66**: 12-21.

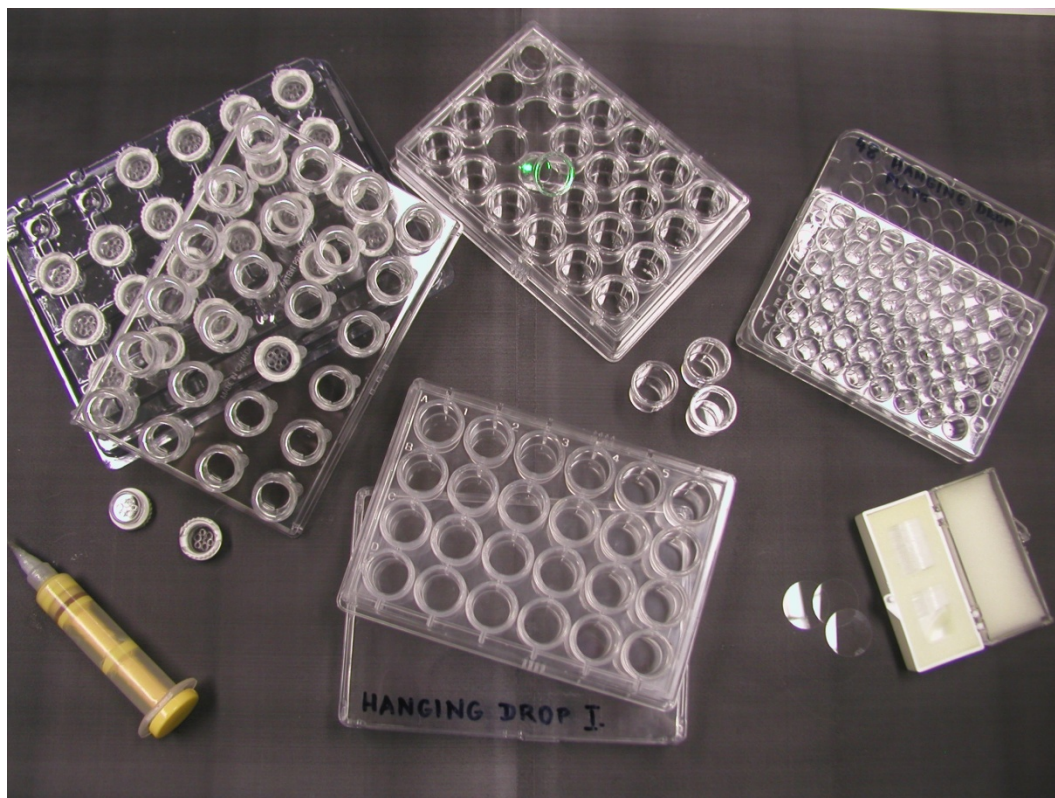
Krug, M., Weiss, M. S., Heinemann, U., Mueller, U. (2012). XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS. *Journal of Applied Crystallography*, **45**:(3), 568-572.

Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R., Winn, M.D., Long, F., Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, **67**: (4), 355-367.

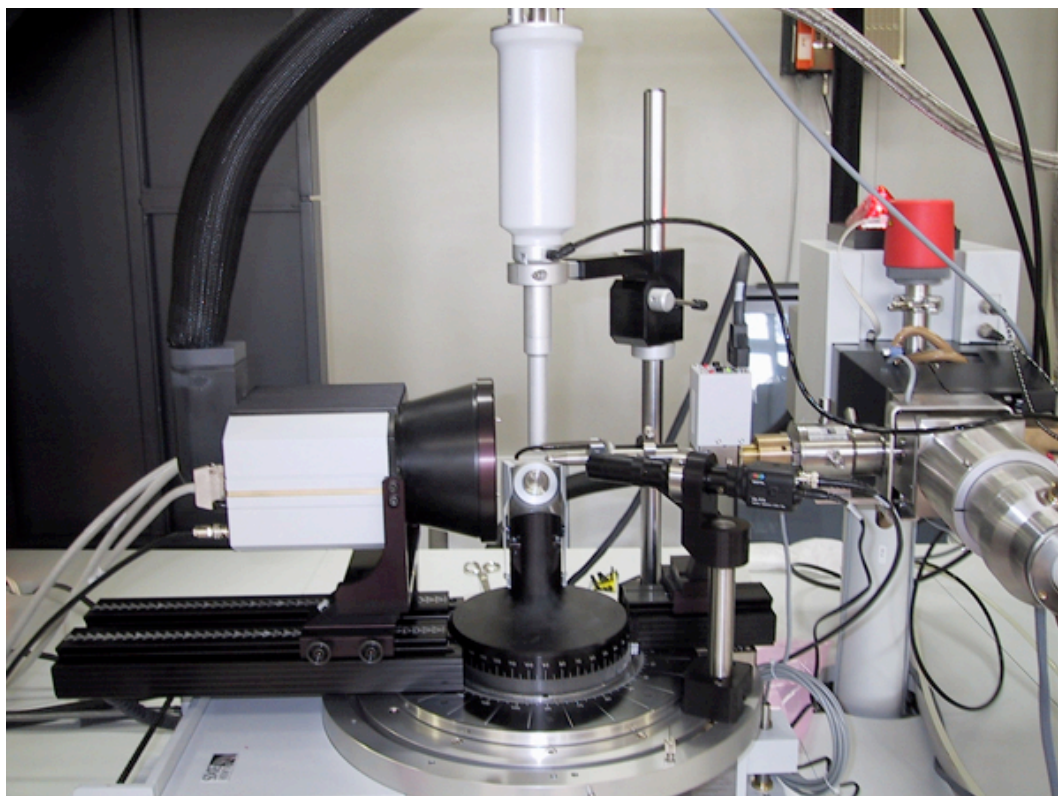
PELE: Protein energy landscape exploration (2005). A novel Monte-carlo based technique. *Journal of chemical theory and Computation*, **1**: 1304-1311.

Vagin, A., Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement. *Journal of applied crystallography*, **30**: 1022-1025.

8. Přílohy



Obrázek č.50: Krystalizační destičky.



Obrázek č.51: Difraktometr Nonius FR591 (Bruker-Nonius).

9. Abstrakt (česky)

Cílem diplomové práce bylo porovnání halogenalkandehalogenasy DhaA106 s jinými studovanými mutantními variantami téhož proteinu. Pro difrakční analýzu bylo nejprve nutno vypěstovat vhodné krystaly uvedeného proteinu. Pro krystalizaci byla použita základní metoda sedící kapky. Vypěstované tyčinkovité krystaly byly použity pro difrakční analýzu. Při difrakční analýze bylo získáno celkem 500 difrakčních záznamů, ze kterých byla vytvořena mapa elektronové hustoty a z ní prostorový model molekulární struktury dehalogenasy. V modelu struktury byly následně přidány alternativní konformace aminokyselin, molekuly vody, zbytky srážecího roztoku a chlorid do aktivního místa. Po uvedené softwarové úpravě modelu byla provedena rafinace validace finální struktury molekuly. Následně byla analyzována pentáda aminokyselin aktivního místa a celý protein. Hodnoty validace, rafinace a meziatomových vzdáleností v aktivním místě byly porovnány s několika mutantními variantami dehalogenasy, dále byly porovnány srážecí roztoky pro krystalizaci a sběr difrakčních dat. V posledním kroku práce byla studována interakce zvoleného substrátu na povrchu proteinu v blízkosti tunelu spojující aktivní místo s povrchem. Uvedená studie interakcí byla provedena na principu kombinace Monte-carlo metody s algoritmy predikce proteinové struktury.

Klíčová slova: krystalizace, DhaAwt, DhaA106, halogenalkandehalogenasa, struktura, modelovací studie

10. Abstrakt (anglicky)

The aim of the thesis was to compare the haloalkane dehalogenase DhaA106 with other studied protein mutant variants. For diffraction analysis, it was necessary to grow appropriate crystals of DhaA106 protein. Crystallization experiments were performed by standard sitting drop method. Obtained rod crystals were used for diffraction analysis. During diffraction measurement complete set of 500 diffraction images were obtained, from which the electron density map was formed and the spatial model of the molecular structure of DhaA106 dehalogenase was created. Alternative conformation of amino acids, water molecules, parts of precipitating solution and chloride ion in the active site were subsequently added into the model structure. The final structure of the molecule was refined and validated. Subsequently, the amino acids present in the active site and whole protein structure were analyzed. Values of validation and refining and interatomic distances in the active site were compared with several variants mutant dehalogenase DhaA, as well as the precipitating solutions used for crystallization and diffraction data collection. In the last step of the work interactions of the selected substrate with the protein surface in the vicinity of the tunnel connecting the active site of the surface were studied. Mentioned interaction study was based on the principle of combination of the Monte-Carlo methods with protein structure prediction algorithms.

Key words: crystallization, DhaAwt, DhaA106, haloalkane dehalogenase, structure, modeling study