

Oponentský posudek disertační práce

„Crystallographic study of haloalkane dehalogenase DhaA mutant variant DhaA12 and DhaA31 and analysis of substrate biodegradation“

Maryna Lahoda

Autorka předložila práci ve formě komentovaných článků s obecným úvodem, který je na 42 stránkách. Očekával bych, že v této formě bude v úvodním komentáři shrnut ve stručnosti současný stav problematiky, z něho vyplývající jasně vytyčené cíle práce, stručně popsány konkrétní experimentální techniky a podmínky a charakterizovány získané nejdůležitější výsledky. Ne vše z toho jsem však v úvodu našel. I když je tato část napsána vcelku pěkně, tak je v některých částech spíše obecná. Práce je zaměřena na studium struktury proteinů halogenalkandehalogenasy DhaA a jejích mutantů DhaA31, DhaA12.

V samotném úvodu autorka vyzdvihuje význam studia těchto látek z hlediska životního prostředí, jejich aplikaci v biokatalýze a hned formuluje hlavní cíle práce – nalezení vhodných krystalizačních podmínek mutantu DhaA31 a jejich optimalizace, řešení struktury dvou variant DhaA31 - ve volné formě a v komplexu protein-substrát s 1,2,3 trichlorpropanem, detailní krystalografická analýza těchto dvou experimentálních struktur, srovnání různých fází reakční cesty enzymu DhaA31 s předchozími výsledky pro DhaA a vysvětlení mechanismu dehalogenace uvnitř aktivního místa. Dále pak i studium mutantu DhaA12.

Ve druhé části se autorka věnuje charakterizaci halogenalkandehalogenas, jejich klasifikaci a struktuře, aktivním místům, chemickým reakcím. Následuje důležitá část věnovaná aplikacím při biodegradaci aktivně, nových aplikacích v biokatalýze toxických látek, biomonitorování a rozbor známých výsledků, co se týče struktury DhaA a mutantů. Tato část se mně jeví vcelku pěkná a přehledná. Ukazuje zároveň, že téma práce je aktuální a význam studovaných látek podstatný i v praxi. Práce s literaturou se mně zdá adekvátní. Ve třetí části věnované experimentálním metodám je podán obecný přehled technik krystalizace makromolekul a přípravy krystalů pro difrakční měření. Zde bych uvítal na závěr stručný popis postupů použitých v dané práci. Je to sice uvedeno v člancích, ale dle mého názoru by to mělo být uvedeno i ve shrnující úvodní části. Předpokládám, že to studentka bude prezentovat při obhajobě. V podstatě stejnou připomínku mám i k následující části sběru difrakčních dat a řešení fázového problému, která je opět obecná. K této partii mám i několik drobných formálních připomínek. Ve vztahu (1) by mělo být *j* vysázeno všude jako index. Pojem *structural factor* se nepoužívá, správně *structure factor*. Odstavec textu pod tímto

vztahem není moc srozumitelný a přesný. Nepřesná je i první věta 3.2.1. Izomorfní nahrazení není nazýváno metodou těžkého atomu. Metoda je obecnější a nemusí být spojena s nahrazením (těžké atomy mohou být v látce přirozeně). Jinak je část stručná a přehledná. Opět bych uvítal krátce i zde, co konkrétně bylo využito při řešení studovaných struktur. Tím úvodní část končí.

Myslím, že v tomto formátu disertační práce nepostačuje jen čisté přiložení článků, ale po uvedených úvodních částech by měla následovat část shrnující nejdůležitější získané výsledky a případně závěry. Toto je částečně provedeno na třech stránkách v autoreferátu (Summary of Ph.D. thesis), ze kterého vyplývá, že vytčené cíle práce byly v podstatě splněny, určeny a analyzovány struktury studovaných látek. Z formálního hlediska bych opět doporučil text s důrazem na nejdůležitější výsledky, s odkazy na články, než na postupný popis obsahu jednotlivých článků, i když by se to v daném případě příliš nelišilo. Věřím, že tento postup zvolí studentka při vlastní obhajobě.

Z přiložených článků vyšel jeden v Acta Crystallographica F (I) a další byl, dle čerstvých informací, přijat v Acta Crystallographica D (II) s vysokým impakt faktorem. Časopis je zároveň podle posledních hodnocení na prvním místě mezi časopisy v oboru krystalografie. Jaká je situace se třetím zařazeným článkem (opět do Acta Cryst F)? A také se čtvrtým zmíněným článkem pro Nature Chemistry? Ten v PDF disertace fakticky není přiložen, takže jej nelze ani hodnotit, což považuji za vcelku závažný nedostatek. Jedná se o technickou chybu?

Nicméně lze konstatovat, že i první dva již vyšlé články dokládají, že autorka získala zajímavé výsledky, které se jí podařilo publikovat v kvalitních časopisech. U tří článků je první autorkou. Ve své práci dostatečně projevila schopnost řešit výzkumný projekt tvůrčím způsobem. Práce je psána anglicky. Jazyk je vcelku akceptovatelný, i když na několika místech jsou nepříliš anglické formulace.

Přes výtky zejména k formě disertační práce doporučuji tuto práci jako podklad k udělení titulu Ph.D.

V Praze 17. 9. 2013



Doc. RNDr. Radomír Kužel, CSc

Institute of Molecular Genetics of the ASCR

Assoc. Prof. RNDr. Jiří Brynda PhD.
Institute of Molecular Genetics of the ASCR, v. v. i.
Laboratory of Structural Biology
Flemingovo nám. 2
166 37 Praha 6

+420 220183 210
brynda@img.cas.cz

Opponent report of PhD. thesis of Maryna Lahoda:

“Crystallographic study of haloalkane dehalogenase DhaA mutant variant DhaA12 and DhaA31 and analysis of substrate biodegradation by DhaA31“

The submitted PhD thesis is focused on the structural analysis of haloalkane dehalogenase DhaA "wild-type" and two mutant of this enzyme. Haloalkane dehalogenases hydrolyze carbon–halogen bonds in a wide range of halogenated aliphatic molecules, known as highly resistant industrial pollutants. The potential use of haloalkane dehalogenases in bioremediation applications triggered intensive investigation of these enzymes and their engineering.

Submitted thesis consist of 39 pages of introduction, literary review and methods, the second half contains three attached publications. Although there is a title of fourth publication on the last page, the manuscript of this work is not attached. The description of experimental methods is very brief, page range 25-38 is used for explanation of crystal growth techniques, data collection, solving of phase problem and structure refinement (structure refinement is described on one page, which I find very surprising).

There are some mistakes and type errors, *eg.*:

- page 33, equation [1] j is an index and should be written as a subscript, moreover the atomic displacement parameter or parameters are omitted from the equation.
- page 34, equation [2] is absolutely incorrect, there is missing the phase information.
- same page, line 7. The statement is not understandable, what author means by: "The phase is unknown and it is only additional information the crystallographer needs on order to compute $\rho(x,y,z)$ "

However, I have to say that the attached publications are of high quality and their findings are very valuable for the scientific community, which was proved by their acceptations in respectable International Journals. After reading of the mentioned publication one can conclude that the core of thesis lays in the structural studies of haloalkan dehalogenase DhaA and its mutant DhaA31. The key publication: " Crystallographic analysis

of 1,2,3-trichloropropane biodegradation by haloalokane dehalogenase DhaA31." (Lahoda , *et. al.* 2013, Acta Cryst D), reports structure studies of DhaA variant or mutant with increased catalytic activity to widespread anthropogenic pollutant 1,2,3 trichloropropane, is very interesting. So my questions are aimed at rational design of highly active mutants and structural analysis:

1st question: In the figure 15 you have documented the sequential alteration of the active site of DhaA enzyme to become DbjA like enzyme. This modulation of the sequence is documented for variants DhaA07-12. Could you similarly show the mutational trajectory toward mutant DhaA31 and comment on the rational background?

2nd question: In the above mentioned paper you have used the SHELXL program and anisotropic ADP's for refinement of two highly resolved structures (DhaA31 and its complex with 1,2,3 trichloropropane). For stable and trustworthy refinement you need high a parameter/ observation ratio, could you please show this values for all three refinements and comment on them? (And subquestion or comment: Are you sure, that R.M.S.D. values of bond angle in table 1, page 56, are correct?)

3rd question: From the table 1, page 56, (Data-collection and refinement statistics), it is clear that you used reduced dataset for refinement wt DhaA enzyme. Could you please explained why?

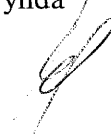
I proclaim, that my comments and questions do not aspire to dispute a good level of the documented scientific work in the manuscripts, which corresponds to high scientific quality of the laboratories cooperating on this important project. I have some objections to the length and range of introduction. Moreover, I think that the candidate could have documented a number of results which were out of the scope of the attached publications and discuss them to communicate particular knowledge in the field of structural biology of dehalogenase enzymes. My essential objections are:

- 1) missing objectives of work as a separate chapter
- 2) missing discussion of the success in solving of particular aims
- 3) and missing final summary of the thesis.

In summary of my report I want to state clearly, that I am not able to judge if the formal requirement for PhD thesis were fulfilled, and this have to be decided by the University authorities. However, I would like to point out that, the scientific work presented in the attached papers with candidate as first author, prove her scientific and communication skills, and this PhD thesis should be admitted for defense.

In Prague September 17th 2013

Jiří Brynda



**Oponentský posudek disertační práce Mgr. Maryny Lahody
„Crystallographic study of haloalkane dehalogenase DhaA
mutant variants DhaA12 and DhaA31
and analysis of substrate biodegradation by DhaA31“**

Projekt se zabýval problémem, jak struktura mutantů haloalkane dehalogenázy ovlivňuje funkci tohoto proteinu a přinesl nové informace o tom, jakou roli mohou mutanti tohoto enzymu hrát při udržitelnosti životního prostředí. Toto téma zapadá do náplně vědecké laboratoře, kterou vede školitelka doktoranda.

V práci byly vyřešeny následující struktury proteinů:

- Struktura komplexu mutantní halogenalkendehalogenázy DHA-A31 s 1,2,3-trichloropropanem (4FWB), substrát 3KP, 4Cl, 353 HOH.
- Struktura komplexu mutantní halogenalkendehalogenázy DHA-A31 bez substrátu (3SK0) 1xCl, 270 HOH.
- Struktura komplexu mutantní halogenalkendehalogenázy DHA-A12 (3RK4), Cl, 385 HOH.

Práce obsahuje na stranách 1-15 úvod do problematiky halogenalkendehalogenáz. Na stranách 16-20 je popis řešení struktury DhaA31 s ligandem a bez ligandu. Na stranách 21-24 je popis řešení struktury DhaA12. Na stranách 25-38 je úvod do krystalizace proteinů. Na stranách 43-70 jsou kopie publikací.

Po formální stránce není práce členěna standardně a závěr v „Autoreferátu“ je formulován jako tři nezávislé abstrakty tří publikací.

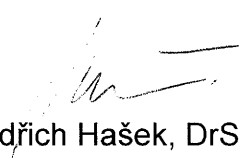
Je však zřejmé, že autorka zvládla techniky přípravy krystalických proteinů a metodiku proteinové krystalografie. Připravila kvalitní monokrystaly a vyřešila tři různé struktury halogenalkendehalogenázy. Získané výsledky byly zpracovány a deponovány v Proteinové strukturní databázi PDB. První práce byla opublikována v časopise Acta Crystallographica F. Dvě struktury A31 mutantu Dha (bez ligandu a se substrátem) byly přijaty k publikaci do časopisu Acta Crystallographica D (s vynikajícím impact faktorem 14,1).

Mám dotaz na doktorandku, kde leží pozice maxim na diferenční mapě anomálního rozptylu (na ní jsou při rozlišení lepším než 1,3 Å zřetelné všechny atomy chloru) a zda-li není možné rafinovat v aktivním místě též intermediát zablokovaný nízkým pH v konfiguraci zobrazené na obrázku 12(b) a nebo kombinaci konfigurací 12(b) a 12(d)?

Byl splněn úkol zadání disertační práce, tj. vyřešit prostorovou strukturu proteinů neligandované halogenalkendehalogenázy, mutantu A31, komplexu A31 mutantu halogenalkendehalogenázy s trichloropropanem a A12 mutantu neligandované halogenalkendehalogenázy. Všechny tři struktury, které autorka vyřešila byly deponovány v Proteinové Strukturní Databance PDB pod kody 4FWB, 3SK0, 3RK4.

Lze proto konstatovat, že předložená disertační práce **Maryny Lahody** splňuje předpoklady kladené zákonem a proto ji doporučuji jako podklad k udělení titulu PhD.

V Praze 31. 8. 2013


RNDr. Jindřich Hašek, DrSc