

# **STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST**

**Obor č. 3: Chemie**

## **Strukturní a biochemická analýza halogenalkandehalogenasy DmmA**

**Hana Bernhardová  
Zlínský kraj**

**Valašské Meziříčí 2020**

# STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 3: Chemie

## Strukturní a biochemická analýza halogenalkandehalogenasy DmmA

*Structural and biochemical analysis of haloalkane  
dehalogenase DmmA*

**Autoři:** Hana Bernhardová  
**Škola:** Gymnázium Františka Palackého Valašské Meziříčí,  
Husova 146, 757 37 Valašské Meziříčí  
**Kraj:** Zlínský  
**Konzultant:** Ing. RNDr. Martin Marek, Ph.D.

Valašské Meziříčí, 2020

Výzkumná činnost v rámci tohoto SOČ projektu byla provedena v Loschmidtových laboratořích Masarykovy univerzity v Brně. Difrakční analýza proteinových krystalů se uskutečnila na synchrotronovém zařízení Swiss Light Source (SLS), který je součástí Paul Scherrer Institutu ve Villigen (Švýcarsko). Tato studie byla provedena v rámci výzkumných projektů Marie Curie MSCA (792772) and GAMU (MUNI/H/1561/2018) Masarykovy univerzity v Brně.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracoval/a samostatně a použil/a jsem pouze prameny a literaturu uvedenou v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupňování této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

Ve Valašském Meziříčí dne 22. 2. 2020 .....

Hana Bernhardová

## **Poděkování**

Za skvělé vedení, seznámení s problematikou, cenné rady a neustálou podporu a ochotu mi pomoci a poradit, děkuji svému konzultantovi Ing. RNDr. Martinu Markovi, Ph.D.

Rovněž děkuji Mgr. Markétě Stuchlé za ochotné zaučení na začátku mé práce v laboratoři a velkou trpělivost při veškerých mých počátečních chybách.

Děkuji celému týmu Loschmidtových laboratoří za jejich pomoc a skvělou přátelskou atmosféru při práci.

Za jedinečnou možnost být součástí Loschmidtových laboratoří a možnost měřit difrakční data na synchrotronovém zařízení SLS ve švýcarském Villigenu bych ráda poděkovala prof. Mgr. Jiřímu Damborskému, Ph.D.

Děkuji také vedení školy Gymnázia Františka Palackého Valašské Meziříčí a třídnímu učiteli Ing. Pavlu Novosádovi za vstřícnost při omlouvání mé absence a možnost trávení týdnů v laboratoři místo výuky.

A v neposlední řadě také velmi děkuji své rodině a přátelům za neustálou pomoc a podporu.

## Anotace

Enzymy jsou proteinové biokatalyzátory, které zvyšují rychlost biochemických reakcí probíhajících v živých organismech a jejich role je pro správný chod organismu naprosto zásadní. Znalost struktury enzymů a vazby substrátů v enzym-substrátovém komplexu umožňuje bližší pochopení jejich funkce a následně také její racionální úpravy a vylepšení pomocí proteinového inženýrství.

Předmětem studia této práce byly enzymy z rodiny halogenalkandehalogenas, což jsou proteinové katalyzátory hydrolyticky štěpící vazbu halogen-uhlík na korespondující alkohol, halogenidový ion a proton v širokém spektru halogenovaných uhlovodíků. Pro tyto unikátní katalytické vlastnosti mají halogenalkandehalogenasy potenciální využití v biotechnologiích a bioremediaci. Nicméně, kromě několika výjimek, však doposud není známý jejich přesný evoluční původ a skutečná biokatalytická funkce v organismech.

Tato SOČ práce se zabývala studiem halogenalkandehalogenasy DmmA, která byla objevena v genomu mořské cyanobakterie *Lyngbya majuscula*. Hlavní cíle této práce byly: (i) konstrukce katalyticky neaktivní varianty enzymu DmmA, (ii) zavedení postupů pro rekombinantní produkci a purifikaci DmmA, (iii) najít a optimalizovat podmínky vhodné pro krystalizaci a ko-krystalizaci DmmA a (iv) nasbírat krystalografická data, vyřešit atomární strukturu DmmA v komplexu s méně tradičními halogenovanými substráty (např. halogenovaný derivát fluorescenční barvy BODIPY) či se strukturně vzdálenými domnělými substráty ze skupiny laktonů a koelenterazinů.

V rámci této práce se podařilo zavést a optimalizovat metodiku pro rekombinantní produkci, purifikaci a krystalizaci halogenalkandehalogenasy DmmA. Difrakční data s vysokým rozlišením byla úspěšně naměřena na takto získaných krystalech a atomární struktury DmmA v komplexu s molekulami ligandů byly vyřešeny. Výsledky této experimentální práce poskytují jako vůbec první na světě znalost molekulárního rozpoznání a vazby relativně velkých halogenovaných substrátových molekul v aktivním místě enzymu DmmA. Kromě toho se podařilo vyřešit i komplexní strukturu DmmA, kde je v jeho aktivním místě navázaná molekula N-heptyl-D/L-homoserin- $\gamma$ -laktonu, což je jeden z domnělých přirozených substrátů některých halogenalkandehalogenas. V neposlední řadě se také podařilo vyřešit krystalovou strukturu DmmA s navázaným neoxidovatelným analogem koelenterazinu, azakolenterazinem, v katalytické kavitě enzymu. Tato pozorování tak přinášejí nové strukturní informace o vazbě rozličných molekul do aktivního místa enzymu DmmA a budou tak sloužit k fundamentálnímu pochopení molekulárních mechanismů enzymové katalýzy. V neposlední řadě nové strukturní informace budou též využity i proteinovým inženýrstvím a výpočetním designem, které se snaží racionálně vylepšovat tyto enzymy pro různé technologické a průmyslové aplikace.

## **Klíčová slova**

Halogenalkandehalogenasy; DmmA, krystalizace, enzym-substrátový komplex; rentgenová krystalografie; proteinová struktura, fluorescenční substráty; laktony; biokatalýza

## Annotation

Enzymes are protein catalysts that accelerate the rate of chemical reactions occurring in all living organisms. The detailed molecular knowledge of their three-dimensional structure and their specific recognition of cognate substrate molecules in enzyme-substrate complexes enables us to better understand their catalytic function and to rationally modulate it by protein engineering methods.

In this thesis, the enzymes from haloalkane dehalogenase (HLD) family which catalyse hydrolytic cleavage of a hydrogen-carbon bond to corresponding alcohol, halide ion, and proton in a wide spectrum of halogenated hydrocarbons were studied. Due to these unique catalytic properties, the HLD enzymes are being used in biotechnological and bioremediation applications. Nevertheless, despite their vast importance we still know very little about their evolutionary origin and biological function in living organisms.

More precisely, a haloalkane dehalogenase DmmA, which was previously discovered in the marine cyanobacteria *Lyngbya majuscula* genome, was biochemically and structurally investigated. The specific aims of this thesis were to (i) construct a catalytically-inactive variant of DmmA, (ii) establish and optimise methods for recombinant production and purification of DmmA, (iii) search chemical space and optimise conditions for crystallization and co-crystallization of DmmA, (iv) collect crystallographic data and solve atomic structures of DmmA complexed with less traditional halogenated substrates such as a halogenated derivate of fluorescent dye BODIPY or with putative substrate molecules (lactone and coelenterazine derivatives).

The protocols for recombinant production, purification, and crystallization of DmmA enzyme, and its catalytically inactive variant DmmA-H315F were successfully optimised. The high-resolution diffraction data were collected, and the atomic structures of DmmA enzyme complexed with multiple ligand molecules were solved. The results show for the first time the molecular binding mode of bulky halogenated fluorescent substrate (BODIPY derivative) in the active site of DmmA enzyme. Additionally, crystallographic structures of DmmA complexed with putative substrate molecule N-heptanoyl-DL-homoserine lactone bound in the enzyme active site were solved. Specifically, the N-heptanoyl-DL-homoserine lactone bound DmmA structure reveals unprecedented molecular details of how a lactone moiety is coordinated between halide-stabilizing residues. Finally, the structure of DmmA complexed with azacoelenterazine, a non-oxidizable analogue of coelenterazine, show why HLD enzyme are not able to convert coelenterazine into coelenteramide, followed by the emission of light.

These observations provide new structural information on the nature of enzyme-substrate recognition in the active site of DmmA and will extend our current fundamental understanding of the molecular mechanism of HLD catalysis. Moreover, structural and biochemical results of this thesis will also be used in rational protein engineering in order to improve HLD enzymes for various technological and industrial applications.

## **Keywords**

Halogenalkandehalogenases; DmmA, crystallization, enzyme-substrate complex; X-ray crystallography; protein structure, fluorescent substrates; lactones; biocatalysis



# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>12</b>
1.1	Enzymy – vysoce specifické proteinové katalyzátory	12
1.1.1	Klasifikace enzymů	12
1.1.2	Struktura enzymů	13
1.1.3	Mechanismus enzymatické reakce	14
1.1.4	Enzymová kinetika	16
1.1.5	Využití enzymů v biotechnologiích a průmyslu	17
1.2	Halogenalkandehalogenasy	18
1.2.1	Struktura a reakční mechanismus	19
1.2.2	Využití v biotechnologiích	21
1.2.3	Halogenalkandehalogenasa DmmA	21
1.3	Strukturní analýza enzymů	22
1.3.1	Proteinová krystalografie	23
1.3.2	NMR spektroskopie	26
1.3.3	Elektronová mikroskopie	26
1.4	Strukturní analýza enzym-substrát komplexu	27
<b>2</b>	<b>Cíle práce</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>Metodika</b>	<b>30</b>
3.1	Seznam chemikálií	30
3.2	Seznam biologického materiálu	31
3.3	Seznam používaných roztoků a médií	31
3.4	Izolace, úpravy a klonování DNA	32
3.4.1	Izolace plazmidové DNA	32
3.4.2	Sekvenace DNA	33
3.4.3	Restrikční štěpení plazmidu	33
3.4.4	DNA elektroforéza	33
3.4.5	Izolace DNA z gelu	34
3.4.6	Transformace plazmidu do buněk	34
3.4.7	Mutageneze DNA pomocí polymerázové řetězové reakce	34
3.5	Rekombinantní produkce a purifikace enzymu DmmA	35
3.5.1	Rekombinantní nadprodukce enzymu DmmA	35
3.5.2	Manuální afinitní preparace proteinů	36

3.5.3	Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE) .....	36
3.5.4	Preparativní příprava proteinů afinitní FPLC chromatografií .....	37
3.5.5	Dialýza .....	37
3.5.6	Purifikace proteinu gelovou filtrační chromatografií .....	37
3.5.7	Koncentrování proteinu .....	37
3.5.8	Měření dehalogenasové aktivity pomocí Iwasaki metody .....	38
3.5.9	Měření aktivit fluorescenčních substrátů .....	38
3.6	Krystalizace DmmA enzymu a jeho komplexů .....	39
3.6.1	Krystalizace enzymu .....	39
3.6.2	Ko-krystalizační experimenty .....	39
3.6.3	Příprava krystalů pro proteinovou nanokrystalografii .....	40
3.6.4	Mražení krystalů .....	40
3.7	Difrakční analýza a determinace 3D struktur .....	40
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>41</b>
4.1	Nadprodukce enzymu DmmA v buňkách <i>E. coli</i> .....	41
4.1.1	Příprava a kontrolní ověření expresního vektoru .....	41
4.2	Příprava katalyticky neaktivní varianty DmmA-H315F .....	41
4.3	Optimalizace produkce a purifikace DmmA .....	44
4.4	Krystalizační experimenty .....	47
4.4.1	Krystalizace enzymu v nepřítomnosti substrátu (apo-DmmA) .....	47
4.4.2	Krystalizace enzym-substrátového komplexu .....	48
4.4.3	Příprava mikrokystalů pro časově rozlišenou krystalografii .....	52
4.5	Strukturní analýza enzymu DmmA .....	54
4.6	Strukturní analýza komplexu DmmA/BODIPY-Cl .....	57
4.7	Strukturní analýza komplexu DmmA s molekulami laktonů .....	59
4.7.1	DmmA/undekano-gamma-lakton komplex .....	59
4.7.2	DmmA/N-heptyl-DL-homoserin lakton komplex .....	61
4.7.3	Ostatní laktony .....	63
4.8	Strukturní analýza komplexu DmmA s azokoelenterazinem .....	63
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>Perspektivy do budoucna .....</b>	<b>72</b>
<b>8</b>	<b>Použitá literatura a zdroje .....</b>	<b>73</b>

8.1	Literatura .....	73
8.2	Zdroje obrázků .....	79

# 1 ÚVOD

## 1.1 Enzymy – vysoce specifické proteinové katalyzátory

### 1.1.1 Klasifikace enzymů

Enzymy jsou **proteinové katalyzátory**, které zvyšují rychlost chemických reakcí probíhajících v živých organismech (Kodíček et al., 2018). Jejich role je naprosto zásadní, téměř všechny metabolické procesy probíhající v buňce totiž potřebují enzymovou katalýzu, aby proběhly v dostatečné rychlosti pro udržení života (Agarwal, 2006). Molekuly, se kterými enzymy reagují, se nazývají **substráty**. Ty se enzymatickou katalýzou konvertují na **produkty** (Rodwell & Bender, 2015).

Enzymy kromě své vysoké účinnosti katalýzy navíc prokazují vysokou substrátovou i reakční specifitu a většinou katalyzují pouze jeden typ chemické reakce, tedy konverzi jedné konkrétní molekuly substrátu. Některé enzymy vykazují také ale tzv. **skupinovou specifitu**, kdy reagují se skupinou podobných substrátů, často obsahujících konkrétní funkční skupinu (Agarwal, 2006). Například alkalická fosfatasa odstraňuje fosfátovou skupinu z mnoha různých substrátů nebo karboxypeptidasa B, která hydrolyzuje různé peptidy z jejich terminálního C-konce. Tyto enzymy mohou mít ale odlišnou afinitu k různým typům substrátů (Rodwell & Bender, 2015).

Jakožto biokatalyzátory mají enzymy mnoho výhod oproti chemickým či syntetickým katalyzátorům. Kromě již zmíněné substrátové i reakční specifity enzymy také na rozdíl od chemických katalyzátorů neovlivňují složení rovnovážné směsi. Enzymy také vyžadují mírnější podmínky chemické reakce, což souvisí s jejich přirozeným výskytem v žijících organismech. Další výhodou je, že enzymatické reakce se dají snadno regulovat pomocí vazby jiných molekul než substrátu. Celkově enzymatické reakce vykazují o 6 až 12 řádů vyšší reakční rychlost než reakce nekatalyzovaná a o několik řádů vyšší než reakce se syntetickými katalyzátory (Robinson, 2015).

V historii název enzymu odpovídal jejich funkci či výskytu a zpravidla končil koncovkou -in (trypsin, pepsin atd.). Postupem času se začala používat jednotná koncovka -asa a názvy enzymů byly tvořeny buď z názvu substrátu se kterým reagovaly (např. proteáza), nebo z názvu typu chemické reakce, kterou katalyzovaly (např. oxidasa) (McDonald & Tipton, 2014).

Později, když začalo přibývat nově objevených enzymů, bylo potřeba vytvořit nějaký jednotný a komplexnější systém jejich pojmenování. Proto byla v roce 1961 Mezinárodní unií biochemie (IUB) zavedena jednotná nomenklatura, kdy název vyjadřuje jméno substrátu a produktu i typ chemické reakce a končí koncovkou -asa (např. L-alanin:2-oxoglutarát-aminotransferasa, substrát – L-alanin, produkt – 2-oxoglutarát, aminotrasferasova reakce) (McDonald & Tipton, 2014).

Enzymy se dle typu katalyzované reakce řadí do sedmi hlavních tříd (**Tabulka 1**), které se pak dělí na další třídy a podtřídy, dále charakterizující typ reakce. Každému enzymu je pak přiřazeno tzv. **EC číslo** (*Enzyme Commission number*) skládající se z čísla hlavní třídy, třídy, podtřídy a specifického pořadového čísla (Robinson, 2015).

**Tabulka 1.** Hlavní EC třídy a podtřídy klasifikace enzymů dle typu katalyzované reakce.

Klasifikace	Typ katalyzované reakce	Příklad podtříd
EC 1 – oxidoreduktasy	Oxidačně-redukční reakce	Oxidasy, dehydrogenasy, oxygenasy
EC 2 – transferasy	Přenos funkčních skupin	Aminotransferasy, hexokinasy, transmethylasy
EC 3 – hydrolasy	Hydrolytické štěpení	Proteasy, lipasy, esterasy, glykosidasy
EC 4 – lyasy	Eliminace skupin za vzniku dvojných vazeb	Dekarboxylasy, dehydratasy, aldolasy
EC 5 – izomerasy	Izomerace	Cis-trans isomerasy, epimerasy, racemasy
EC 6 – ligasy	Tvorba vazeb spojená s hydrolyzou ATP	Chelatasy, syntetasy
EC 7 – translokasy	Transport látek, nejčastěji přes biologické membrány	ATP-syntasa, buněčné transportéry

### 1.1.2 Struktura enzymů

Enzymy jsou ve většině případů globulární proteiny. Aminokyseliny enzymu mohou tvořit jeden nebo více polypeptidových řetězců, které jsou pak sbaleny v prostoru specifickým způsobem, aby vytvořily konkrétní enzym. Konkrétní sekvence jednotlivých aminokyselin tak determinuje strukturu enzymu, která pak určuje také jeho katalytickou aktivitu (Rodwell & Bender, 2015).

Substrát se při enzymatické reakci váže vždy do jednoho konkrétního tzv. **aktivního místa enzymu**, které je běžně tvořeno pouze velmi malým počtem aminokyselin (méně než deset). Konkrétní prostorové uspořádání a typ aminokyselin (nabité, hydrofobní atd.) zastoupených v aktivním místě umožňuje specifickou vazbu dané molekuly substrátu, a tedy i vysokou specifitu samotné katalytické aktivity. Role zbytku proteinu je pak ve stabilizaci aktivního místa a poskytnutí vhodného prostředí pro reakci se substrátem v aktivním místě. Je tak nemožné separovat pouze aktivní místo bez ztráty katalytické aktivity (Robinson, 2015).

Enzymy mohou být jak jednoduché (tvořené pouze polypeptidovým řetězcem), tak složené. Složené enzymy obsahují také nepeptidovou složku (molekulu nebo ion), kterou potřebují pro svou katalytickou aktivitu. Tato nepeptidová složka enzymu se nazývá **kofaktor**. Kofaktory enzymů pak můžeme rozdělit na dvě skupiny (Kodíček et al., 2018). První z nich, tzv. **prostetické skupiny**, se na enzym vážou velmi pevně kovalentní vazbou a během katalytické aktivity neopouštějí aktivní centrum. Mezi prostetické skupiny patří například flavinadeninindinukleotid (FAD, oxidačně redukční děje), pyridoxalfosfát (PLP, metabolismus aminokyselin), hem (přenos elektronů), biotin, kyselina lipoová (oxidační

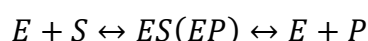
dekarboxylace) či například kobalamin (izomerace, methyltransferace). Druhou skupinou jsou pak tzv. **koenzymy**, které jsou na molekulu enzymu vázány pouze slabě a jsou schopné přecházet z jedné na druhou. Proteinová část enzymu se v tomto případě nazývá **apoenzym**, který společně s koenzymem tvoří kompletní enzym, tzv. **holoenzym**. Koenzymy většinou regenerují spřaženými reakcemi – koenzym po reakci přechází na jiný apoenzym, aby se regeneroval do původního stavu. Mezi koenzymy patří například nikotinamidadeninukleotid (NAD, katabolické dehydrogenace), nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP, anabolické redukce), koenzym A (CoA, HSCoA, aktivace karboxylových kyselin), thiamindifosfát (TPP, dekarboxylace 2-oxokyseliny) aj. (Kodíček et al., 2018; Richter, 2013).

Enzymy také často potřebují pro reakci některé iontové molekuly. Enzymy s pevně navázanými ionty kovů se nazývají **metaloenzymy**. Častými kovovými ionty v enzymech jsou  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  a  $Cu^{2+}$ , které jsou na enzym pevně vázány. Existují ale i kovové ionty, které se trvale na molekulu enzymu nevážou, přesto jsou však nezbytné pro správné proběhnutí reakce. Jedná se například o hořečnatý ion ( $Mg^{2+}$ ), který tvoří komplex s adenosintrifosfátem (ATP), jež pak působí v mnoha chemických reakcích využívající ATP jako zdroj energie (Rodwell & Bender, 2015).

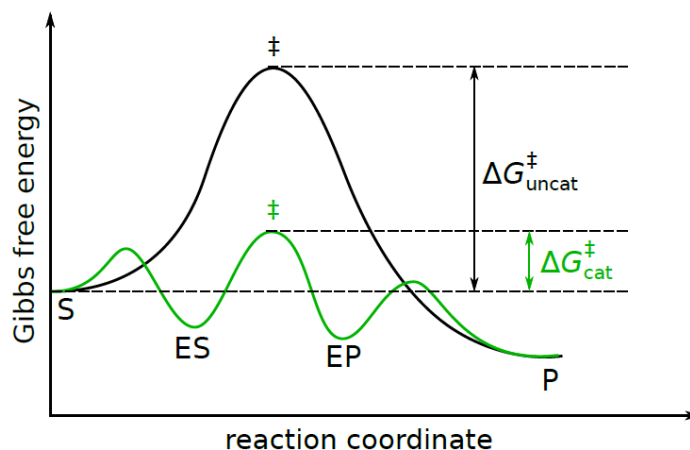
Některé reakce také vyžadují přítomnost jiných organických molekul, jejichž struktura se při reakci nemění. Jedná se například o askorbát (vitamin C), který je důležitý například při modifikaci prolinu na hydroxyprolin v prokolagenu (Smirnoff, 2018).

### 1.1.3 Mechanismus enzymatické reakce

Enzymy svou katalytickou aktivitou urychlují chod chemických reakcí nutných pro životní funkce. Průběh enzymatické katalýzy má několik kroků. Nejprve dochází k specifické vazbě substrátu do aktivního místa enzymu a vzniká tzv. **enzym-substrát komplex**. Následně proběhne chemická reakce a vytvoří se tak **komplex enzym-produkt**, který obvykle rychle disociuje na produkt a samotný enzym připravený k dalšímu cyklu katalyzované reakce (Rodwell & Bender, 2015).



Důvod, proč enzymy zrychlují průběh chemických reakcí se běžně vysvětluje teorií tzv. **tranzitního stavu**, kterou vypracoval v 50. letech 20. století americký kvantový chemik Linus Pauling (Ptáček et al., 2018). Tato teorie stanovuje, že chemické reakce probíhají skrz tzv. tranzitní stav, kdy zanikají staré a formují se nové chemické vazby. Průběh reakce se obvykle vyjadřuje tzv. **reakční koordinátou**, která reprezentuje změny Gibbsovy energie reaktantů v čase jejich přeměny na produkty. Tranzitní stav chemické reakce je stav s nejvyšší Gibbsovou energií, tedy nejméně stabilní. Enzymy pak urychlují průběh chemické reakce tak, že snižují aktivační energii pro tvorbu tranzitního stavu  $\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ , což zvyšuje pravděpodobnost překonání energetické bariéry mezi substrátem a produktem (**Obrázek 1**) (Ptáček et al., 2018).



**Obrázek 1.** Srovnání reakční koordináty nekatalyzované reakce (černá) a enzymatické reakce (zelená) (S – substrát, P – produkt, ES – enzym-substrát komplex, EP – enzym-produkt komplex, ‡ - tranzitní stav,  $\Delta G_{\text{uncat}}^{\ddagger}$  – změna Gibbsovy energie nekatalyzované reakce,  $\Delta G_{\text{cat}}^{\ddagger}$  – změna Gibbsovy energie katalyzované reakce). Převzato z Lienhard, 1973.

Jak již bylo zmíněno, jednou z nejdůležitějších vlastností enzymů je bezpochyby jejich substrátová specifita. Tato skutečnost byla známá již v 19. století, kdy německý chemik Emil Fisher přišel s **hypotézou zámku a klíče**, která vyjadřuje strukturní komplementaritu enzymu a substrátu (Agarwal, 2006). Dle této teorie pouze substrát musí mít přesně daný tvar, velikost a vazebné schopnosti (tvorba vodíkových můstky, elektrostatické interakce aj.) tak, aby přesně zapadl do aktivního místa enzymu jako klíč do zámku (**Obrázek 2**) (Kodíček et al., 2018). Poté následující analýzy struktury enzymů pomocí proteinové krystalografie prokázaly, že enzymy nejsou rigidní molekuly, ale naopak jsou na spoustě místech vysoce flexibilní. V roce 1958 proto Daniel Koshland přišel s modernější teorií tzv. **indukovaného přizpůsobení**, kdy enzymová molekula mění určitým způsobem svůj tvar, aby podpořila vazbu substrátu. Tato teorie se také někdy nazývá teorií ruky a rukavice, kdy ruka s rukavicí jsou strukturně komplementární, ale rukavice se při nasazování tvaru ruky částečně přizpůsobuje (**Obrázek 2**) (Kodíček et al., 2018).

a)



b)



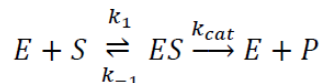
**Obrázek 2.** Teorie mechanismu enzymatické reakce: a) teorie zámku a klíče, b) teorie indukovaného přizpůsobení.

Enzymatická aktivita v organismech bývá velmi přísně regulována, a to několika způsoby. Prvním z nich je regulace genové exprese, tedy toho, jestli a kolik molekul enzymu bude v buňce dostupných. Druhým způsobem může být kovalentní modifikace např. fosforylace, kdy se přidáním (nebo také odebráním – defosforylace) fosfátové skupiny změní struktura enzymu, a tedy i jeho aktivita. Třetím způsobem je pak vazba regulační molekuly aktivátoru nebo inhibitoru – tzv. **alosterická modifikace** – do jiného místa, než je aktivní místo enzymu. Molekula touto vazbou opět způsobí změnu konformace enzymu, a opět i jeho aktivitu (Rodwell & Bender, 2015).

### 1.1.4 Enzymová kinetika

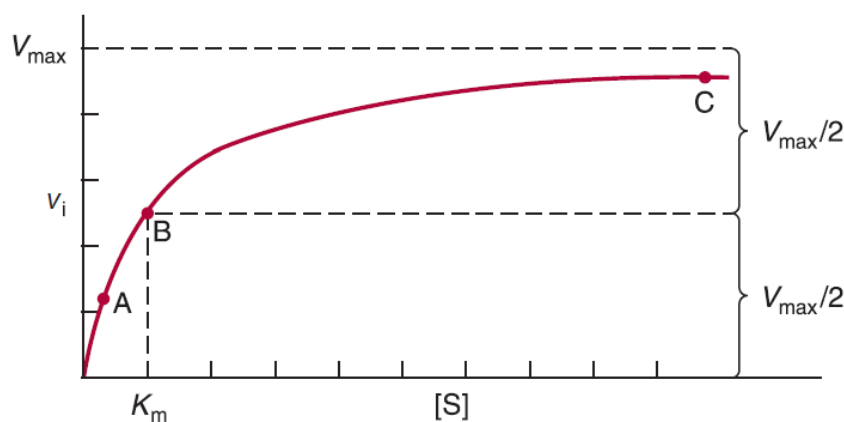
Cílem enzymové kinetiky je určit rychlost a rovnovážné konstanty pro všechny jednotlivé kroky katalytické reakce, aby byl získán celkový pohled na její reakční mechanismus. První důležitou analýzu enzymové kinetiky provedl již v roce 1903 Victor Henri, který jako první vytvořil spojitost mezi rychlostí reakce a koncentrací substrátu (Henri, 1903). Na jeho práci pak navázali vědci Michaelis a Mentenová, kteří popsali mechanismus tzv. **steady state kinetiky** (Kodíček et al., 2018).

V systému, který vytvořili se pracuje s tím, že substrát S se váže reverzibilně na enzym E a tím vzniká tzv. enzym-substrát komplex ES, zatímco po katalýze dochází k přeměně substrátu na produkt P a obnovení původního stavu enzymu. Enzym má tak jen dva možné stavy – E a ES a  $k_1$ ,  $k_{-1}$  a  $k_{cat}$  vyjadřují rychlostní konstanty dané reakce (Rodwell & Bender, 2015).



Michaelis a Mentenová se pak následně zabývali enzymovou katalýzou a měřili počáteční rychlost přeměny substrátu na produkt v závislosti na koncentraci substrátu (**Obrázek 3**). Tuto závislost popsali následující rovnicí:

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$



**Obrázek 3.** Efekt koncentrace substrátu na počáteční rychlost enzymaticky katalyzované reakce dle Michaelise a Mentenové. Převzato z Rodwell & Bender, 2015.

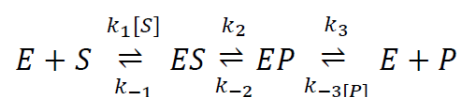


Maximální rychlost substrátové přeměny  $V_{max}$  odpovídá plnému nasycení všech molekul enzymu substrátem. Je tedy úměrná koncentraci molekul enzymu a rychlostní konstantě přeměny na produkt  $k_{cat}$  (Johnson, 2013).

$$V_{max} = [E] \times k_{cat}$$

Michaelisova konstanta  $K_m = (k_{-1} + k_{cat})/k_1$  odpovídá koncentraci substrátu, při které je rychlost reakce přesně poloviční oproti rychlosti maximální (**Obrázek 3**). Kinetické konstanty  $k_{cat}$  a  $K_m$  charakterizují **efektivnost enzymu** a je možné je zjistit počítačovými metodami schopnými numerické integrace kinetických dat (Zimmerle & Frieden, 1989).

Kinetický model popsáný ve výše uvedené rovnici ale neumožňuje analyzovat jednotlivé kroky v komplikovanějších katalytických reakcích. Proto se v dnešní době používá často tzv. analýza jednotlivých molekul (*single molekule analysis*), kdy se počítá s reverzibilními reakcemi u mnoha kroků a zároveň s konstantní koncentrací substrátu i produktů, což odpovídá podmínkám v živých organismech. Přes inovace, ale *single molekule* analýza pořád vychází z rovnice Michaelise a Mentenové, pouze reakční schéma je o něco komplikovanější (Gershenson, 2009).



### 1.1.5 Využití enzymů v biotechnologiích a průmyslu

Enzymy jsou díky svým katalytickým vlastnostem často využívány v průmyslu, kde oproti umělým katalyzátorům vykazují vysokou substrátovou i účinkovou specifitu (a tedy snížení podílu vedlejších produktů), a k jejich funkci jsou také potřeba daleko mírnější podmínky, což snižuje významně náklady na použití. Zároveň jsou také daleko šetrnější k životnímu prostředí, jelikož enzymy jsou většinou získávány z bakterií, které za svůj zdroj energie používají obnovitelné zdroje (Robinson, 2015).

Lidé enzymatických drah jiných organismů využívají už tisíciletí, a to například využitím kvasinek při pečení chleba nebo výrobě fermentovaných nápojů. První použití izolovaných exogenních enzymů se datuje do počátku 20. století, a to v kožedělném průmyslu, kdy byly využity proteolytické enzymy k odstranění srsti z kůží. V dnešní době se enzymy využívají v mnoha průmyslových odvětvích, největší význam ale má jejich využití v potravinářském, zemědělském, textilním, chemickém a farmaceutickém průmyslu a v medicíně (Kodíček et al., 2018).

V potravinářském průmyslu se využívají například amylasy hydrolyzující škrob při výrobě sladidel a zahušťovadel, chymosin pro štěpení vazby mléčné bílkoviny kaseinu při výrobě sýrů,  $\beta$ -galaktosidasa pro přípravu bezlaktózových mléčných výrobků pro lidi s intolerancí laktózy nebo papain pro změkčování masa. V zemědělství se enzymy často používají k zvýšení stravitelnosti krmiv (celulasy, hemicelulasy). V textilním průmyslu se zase využívá různých proteas a celulas k úpravě vlastností tkaniny (Fernandes, 2010) (Kodíček et al., 2018).

Velký význam mají enzymy i pro vědecký výzkum a medicínu. Využití enzymů pro manipulaci s nukleovými kyselinami (ligasy, restriční endonukleasy, polymerasy endonukleasy aj.) a proteiny (různé druhy proteas) umožnily naprostou revoluci a pokrok ve výzkumu v mnoha různých oblastech. V medicíně se enzymy často využívají jako analytické nástroje (stanovování glukózy v krvi pomocí glukosaoxidasy), ale také se využívají jako léčiva (podávání umělých enzymů lidem s nedostatečnou produkcí jejich vlastních (Rodwell & Bender, 2015).

Při komerčním použití enzymů se enzymy často zabudovávají do různých polymerů nebo se imobilizují vazbou na pevné povrchy, čímž se pak po proběhnutí reakci dají od reakční směsi jednoduše oddělit (Datta, Christena, & Rajaram, 2013).

V poslední době získalo velký význam ve výzkumu enzymů také **proteinové inženýrství**, kdy dochází k umělé úpravě a vylepšení vlastností enzymů pro lepší možnosti využití v praxi. Je tak uměle možné zvýšit jejich stabilitu i aktivitu, podle toho, co je v daném případě potřeba. V proteinovém inženýrství existují dva základní přístupy, a to **řízená evoluce** a **racionální design** (Goh et al., 2012). Řízená evoluce spočívá v proběhnutí mutagenese a vytvoření mnoha náhodných variant proteinu a následné selekci těch nejlepších mutantů, u kterých došlo ke zlepšení podmínek nebo jejich zachování v původním stavu. Následuje pokračování v mutagenesi a selekci tak dlouho, dokud enzym nedosáhne požadovaných vlastností. Nevýhodou je časová i materiální náročnost (Sinha & Shukla, 2019). Racionální design je metoda, kdy se vychází ze znalosti o struktuře a funkci proteinu a na základě strukturální a počítačové analýzy se vyberou potenciálně výhodné mutace, které se poté otestují. Nevýhodou je nutnost znalosti struktury proteinu a dalších jeho vlastností, které nebývají vždy dostupné (Goh et al., 2012). V praxi se oba dva tyto přístupy často kombinují pro dosažení těch nejlepších výsledků.

Proteinové inženýrství se dnes používá téměř ve všech odvětvích průmyslu, kde se využívají enzymy. Například byla připravena  $\alpha$ -amylasa s šestkrát větší termostabilitou (Declerck et al., 2000), nebo enzym glyfosát-N-acetyltransferasa, který degraduje herbicid glyfosát s 10 000x větší aktivitou (Mena-Benitez et al., 2008) a mnoho dalších. Tyto případy popisují situaci, kdy se proteinovým inženýrstvím vylepšily již stávající katalytické vlastnosti enzymů nebo jejich stabilita. Dnes už je ale možné vytvořit pomocí proteinového inženýrství i enzymy, který katalyzují reakce naprosto odlišné, třeba i takové které se vůbec nevyskytují v přírodě. Příkladem tohoto může být vytvoření enzymu katalyzujícího vznik vazby uhlík-křemík, což umožňuje daleko levnější a efektivnější výrobu některých léků, počítačů a jiných elektronických zařízení (Kan, Lewis, Chen, & Arnold, 2016).

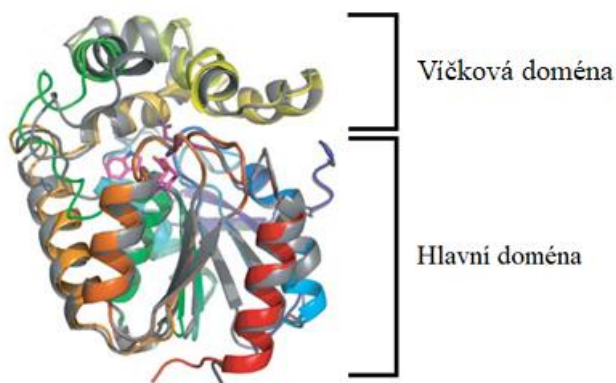
## 1.2 Halogenalkandehalogenasy

Halogenalkandehalogenasy (HLD, EC 3.8.1.5) patří do velké rodiny  $\alpha/\beta$ -hydrolas, které přeměňují halogenované uhlovodíky na příslušné alkoholy a halogenidový ion a proton (Swanson, 1999). Jediným kofaktorem, který tyto enzymy potřebují pro svou aktivitu, je voda. Jsou schopné reagovat s mnoha různými chlorovanými, bromovanými a jodovanými uhlovodíky. Doposud však není známá reakce s žádnými fluorovanými substráty (Janssen, 2004).

Halogenalkandehalogenasy jsou poměrně stabilní enzymy s unikátním katalytickým mechanismem a mají mnoho možných aplikací v enviromentálním a industriálním odvětví průmyslu (Koudelakova et al., 2013). Právě proto se staly předmětem enzymologického výzkumu a následně, kvůli velké dostupnosti informací, také jednou z rodin enzymů, která se využívá pro zjišťování základních principů enzymatických reakcí, jejich významu a funkcí (Klvana et al., 2009).

### 1.2.1 Struktura a reakční mechanismus

Jak již bylo zmíněno, halogenalkandehalogenasy patří do rodiny  $\alpha/\beta$  hydrolas, a sdílí proto evolučně poměrně značně konzervovanou strukturu s ostatními enzymy této rodiny, přestože zde existuje obrovská variabilita jak v sekvenci, tak v katalytických vlastnostech a funkci (Ollis et al., 1992). Protein se skládá ze dvou domén propojených dvěma smyčkami, a to z **hlavní domény** ( $\alpha\beta$ -sendvič architektura) a tzv. **víčkové domény** (Janssen, 2004) (**Obrázek 4**).



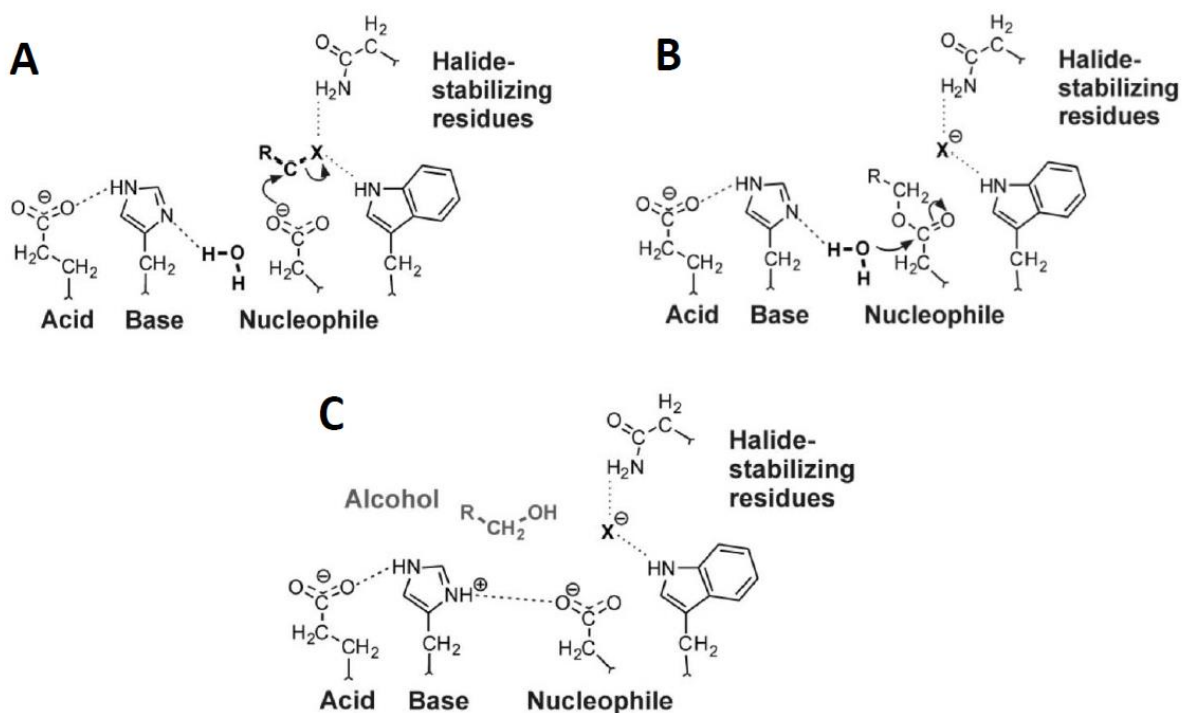
**Obrázek 4.** Halogenalkandehalogenasa DmmA (PDB 3UT1) s vyznačenou hlavní doménou a víčkovou doménou. Převzato a upraveno z Gehret *et al.*, 2012.

Aktivní místo halogenalkandehalogenas je vnořeno do hydrofobní kavity mezi oběma doménami, což zabraňuje proniknutí jiných organických molekul než substrátu k aktivnímu místu (Hasan, 2018). Víčková doména těchto enzymů se skládá převážně z helixů a je vysoce strukturně flexibilní, což jí umožňuje ovlivňovat skrz změny velikosti a tvaru tunelu interakci enzymu se substrátem (a tedy i substrátovou specifitu). Víčková doména ovlivňuje také ale i odchod halogenidového iontu z aktivního místa po proběhnutí reakce (Krooshof et al., 2008).

Halogenalkandehalogenasy mají specifický mechanismus reakce. Aktivní místo těchto enzymů obsahuje tzv. **katalytickou triádu**, tedy trojici aminokyselin, která se podílí na průběhu katalyzované reakce. Tyto tři aminokyseliny jsou v rodině  $\alpha/\beta$ -hydrolas vysoce evolučně konzervované a obsahují nukleofilní aspartát, histidin (báze) a kyselinu asparagovou nebo glutamovou (Janssen, 2004). Pro správné proběhnutí reakce jsou ale potřeba ještě dvě další aminokyseliny, které stabilizují halogenidový ion, a tvoří tak společně s třemi výše zmíněnými **katalytickou pentádu** (Klvana et al., 2009). Přesné aminokyselinové složení katalytické pentády se mezi jednotlivými halogenalkandehalogenasami liší a rozděluje je tak do tří hlavních skupin (HLD I-III). První skupina má katalytickou pentádu ve složení aspartát, histidin, kyselina asparagová plus dva tryptofany, druhá skupina má aspartát, histidin, kyselina

glutamová plus tryptofan a asparagin a třetí skupina má aspartát, histidin, kyselina asparagová plus tryptofan a asparagin (Hasan, 2018).

Přesný reakční mechanismus reakce halogenalkandehalogenas byl poprvé navržen na základě informací získaných proteinovou krystalografií pro dehalogenasu Dh1A a 1,2-dichlorethan (Koen et al., 1993) a následně potvrzen i pro mnoho jiných dehalogenas. Ukázalo se, že reakce má dva kroky a vzniká při ní **kovalentní esterový intermediát**. Prvním krokem reakce je  $S_N2$  útok aspartátu, kdy dojde k substituci halogenu za jeden z jeho kyslíkových atomů, a tím k přerušení vazby uhlík-halogen. Vzniklý halogenidový ion je pak stabilizován dvojicí tryptofan-tryptofan nebo tryptofan-asparagin (**Obrázek 5A**). Druhým krokem reakce je adice molekuly vody aktivované histidinem na v předchozí reakci vzniklý kovalentní esterový intermediát, čímž dochází k tvorbě příslušného alkoholu (**Obrázek 5B**). Po katalýze všechny produkty opustí aktivní místo (**Obrázek 5C**) (Janssen, 2004) (Hasan, 2018).



**Obrázek 5.** Reakční mechanismus halogenalkandehalogenas. (A)  $S_N2$  útok aspartátu a stabilizace halogenidového iontu dvojicí tryptofan-asparagin. (B) Vznik kovalentního ester intermediátu. (C) Hydrolyza kovalentního ester intermediátu. Převzato a upraveno z Koudelakova *et al.*, 2013.

V poslední době se velmi spekuluje o skutečné biologické funkci halogenalkandehalogenas, a zda-li je dehalogenasová reakce, kterou provádějí, opravdu ta evolučně původní. Ukázalo se totiž, že některé enzymy patřící do halogenalkandehalogenasové skupiny III (např. enzym OleB z *Xanthomonas campestris*) by mohly být ve skutečnosti beta-lakton dekarboxylasy (Christenson *et al.*, 2017). Beta-lakton dekarboxylázová aktivita ovšem prozatím nebyla prokázána u enzymů ze skupin HLD-I a HLD-III.

### 1.2.2 Využití v biotechnologiích

Halogenalkandehalogenasy mají velmi široké praktické využití napříč mnoha různými obory. Pro svou vysokou stereoselektivitu se využívají k přípravě opticky čistých alkoholů a esterů, hydroxyesterů, halogenovaných amidů a hydroxyamidů, čehož se využívá ve farmaceutickém průmyslu, kdy je často potřeba izolovat pouze jeden z enantiomerů (Koudelakova et al., 2013). Je možné tak například připravit (S)-2-pentanol, který je meziprodukt syntézy potenciálního léku proti Alzheimerově chorobě (Patel, 2006), nebo etyl-(S)-2-hydroxypropionát, který se používá pro přípravu lofexidinu, léku používaného na zmírnění symptomů při odvykání návykových látek (Szymański et al., 2011).

Největší využití mají ale halogenalkandehalogenasy v bioremediaci a degradaci toxických halogenovaných látek. Tyto látky, jako například 1,2-dichlorethan, 1-chlorbutan a hexachlorocyklohexan, se totiž vyskytují v prostředí díky používání organických rozpouštědel a pesticidů (Koudelakova et al., 2013). V praxi se využívá například dehalogenasa DhIA z *Xanthobacter autotrophicus* GJ10 pro čištění podzemní vody od 1,2-dichlorethanu v Lübecku v Německu (Stucki & Thüer, 1995).

Halogenalkandehalogenasy se také využívají pro odfiltrování toxických molekul ze vzduchu, které se tam dostaly kvůli užívání těkavých organických kapalin jako rozpouštědel při výrobě barev nebo léků. Například dehalogenasa DhaA byla použita pro detoxifikaci 1-chlorbutanu z odpadního plynu právě pomocí takového filtru (Erable et al., 2009).

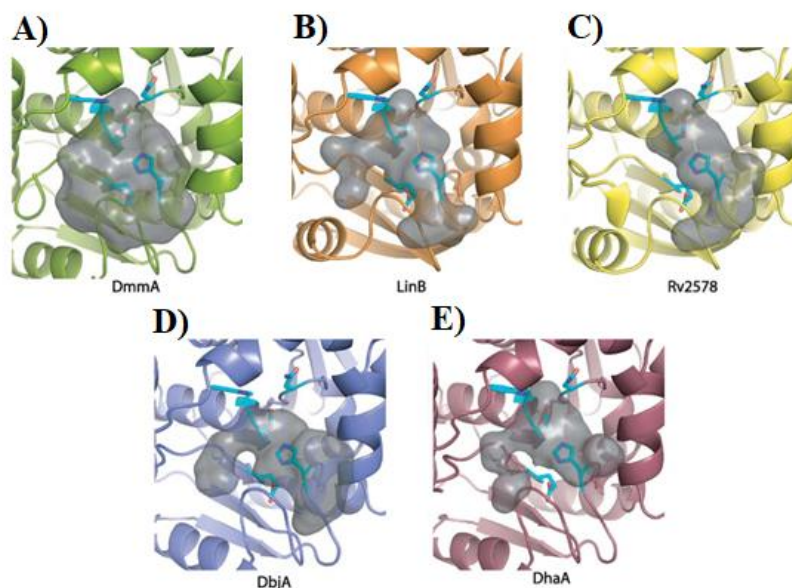
Kvůli dosavadnímu zákazu využití geneticky modifikovaných bakterií k potřebám detoxifikace v přírodě, byla v potaz vzata také fytoremediace, kdy do genomu tabáku byl vložen gen dehalogenasy DhIA a rostlina tak dokázala degradovat 1,2-dichlorethan (Mena-Benitez et al., 2008).

Halogenalkandehalogenasy se také používají k fluorescenčnímu značení proteinů, kdy se využívá upravená forma enzymu DhaA tzv. systém Halo-tag (England et al., 2015). Princip metody tkví v tom, že se používá katalyticky neaktivní varianta DhaA, kde je katalytický histidin vyměněn za fenylalanin, a dojde tedy po navázání halogenované sondy k zastavení reakce ve fázi kovalentního intermediátu v aktivním místě enzymu. Jako fluorescenční značka se zpravidla používá substrátová molekula kovalentně napojená na fluorescenční barvu (Ohana et al., 2009).

### 1.2.3 Halogenalkandehalogenasa DmmaA

Halogenalkandehalogenasa DmmaA byla původně objevena v mořském metagenomickém projektu a odtud pochází její název (Dehalogenase A from a Marine Microbiom) (Buryska et al., 2017). DmmaA patří do skupiny halogenalkandehalogenas HLD-II s katalytickým mechanismem srovnatelným s ostatními enzymy této skupiny.

Třírozměrná struktura tohoto enzymu již byla určena pomocí proteinové krystalografie (**Obrázek 4**) a ukázalo se, že v porovnání s ostatními enzymy má DmmaA kvůli odlišné konformaci smyčky spojující hlavní a víčkovou doménu široký vstupní tunel pro substrát a také velké aktivní místo, což umožňuje tomuto enzymu reagovat i s velkými aromatickými substráty, s kterými jiné enzymy této rodiny reagovat nemůžou (**Obrázek 6**) (Gehret et al., 2012).



**Obrázek 6.** Porovnání aktivních míst dehalogenas DmmA (A), LinB (B), Rv2578 (C), DbjA (D) a DhaA (E). Jak je patrné, aktivní místo DmmA je největší (A). Převzato z Gehret *et al.*, 2012.

DmmA je mezi dehalogenasami jedinečná vysokým počtem různých substrátů, které může přeměňovat, přičemž nejvyšší aktivitu vykazuje s bromovanými substráty (Buryska *et al.*, 2017). DmmA také odbourává toxické a těžko degradovatelné látky znečišťující prostředí jako například 1,2-dichlorethan, 1,2-dichlorpropan, 1,2,3-trichlorpropan a chlorocyklohexan, což ji činí jedinečnou v tomto ohledu, jelikož ostatní dehalogenasy stejné skupiny (např. DhaA nebo LinB) nevykazují aktivitu vůči všem těmto toxickým látkám najednou. DmmA tak má velké potenciální využití v biotechnologiích zaměřujících se na degradaci toxických látek v životním prostředí (Buryska *et al.*, 2017).

DmmA je aktivní v teplotním rozmezí 10 až 50 °C, s teplotním optimem 40 °C, což jsou podmínky podobné ostatním dehalogenasám. Co se pH optima týče, tak DmmA vykazuje alespoň 20% aktivitu v rozmezí pH 6,2 až 11,5 s optimem při pH 8,7 (Buryska *et al.*, 2017).

### 1.3 Strukturní analýza enzymů

Biologická funkce všech proteinů je dána jejich specifickou třídimenzionální strukturou. Dokonalá znalost struktury enzymů pak umožňuje plně pochopit jejich katalytickou a regulační funkci, molekulární mechanismus reakce nebo interakce enzymu s proteinovými partnery (Agarwal, 2006). Znalost struktury nese i mnoho praktických využití, například je naprosto zásadní pro racionální design v proteinovém inženýrství a cílenou mutagenezi (Sinha & Shukla, 2019), případně se může využít k syntéze specifických inhibitorů nebo aktivátorů (lze použít v medicíně při léčbě nádorových i jiných onemocněních) (Ramsay & Tipton, 2017).

V současné době je mnoho různých metod analýzy struktury enzymů, z nichž každá má mnoho výhod i nevýhod. Mezi ty nejběžněji používané metody patří proteinová krystalografie, NMR spektroskopie a elektronová mikroskopie.

### 1.3.1 Proteinová krystalografie

Proteinová rentgenová krystalografie je nejstarší a nejvíce používaná metoda určení proteinové struktury, a také jako jediná z metod používaných ve strukturní biologii běžně dosahuje atomárního rozlišení. První publikovanou strukturou určenou touto metodou byl myoglobin s rozlišením 6 Å (Å = Ångström,  $10^{-10}$  metru) v 50. letech 20. století (Kendrew *et al.*, 1958). Od té doby proteinová krystalografie zažila obrovský pokrok. Rychlost získání dat se snížila z měsíců na pár minut či sekund a také byly vynalezeny nové algoritmy a počítačové programy jak pro sbírání a zpracování difrakčních dat, tak pro řešení struktury, její zpřesňování a následnou interpretaci (Wlodawer *et al.*, 2008).

Díky těmto moderním postupům je tak tato metoda vysoce dostupná, což dokazuje i exponenciální růst počtu vyřešených struktur v proteinové **PDB (Protein Data Bank)** databázi, která ke konci roku 2019 zahrnuje více než 145 tisíc vyřešených proteinových struktur, z nichž většina byla získána právě proteinovou krystalografií (PDB, 2019).

Přes všechny výhody a současné usnadnění zůstává proteinová krystalografie velmi náročnou metodou. Pro získání detailní struktury je totiž třeba najít a optimalizovat mnoho jednotlivých kroků přesně tak, aby byly získány kvalitní, dobře difraktující proteinové krystaly, což většinou není triviální úkol.

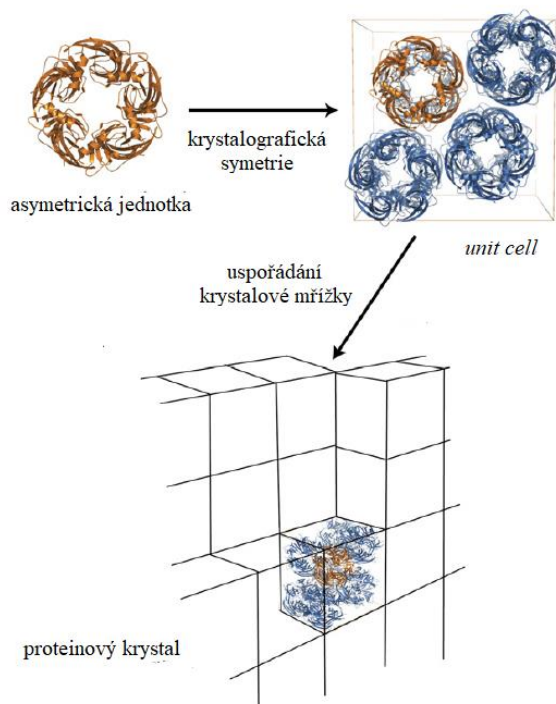
V prvé řadě je nutné získat relativně velké množství vysoce čistého proteinu o koncentraci 5-30 mg/ml. V dnešní době se pro jejich časovou nenáročnost používají pro produkci proteinů nejčastěji bakteriální produkční systémy (Georgiou & Segatori, 2005). Některé eukaryotické proteiny ale nemohou být produkovány v prokaryotických systémech, a tak se musí produkovat v kvasinkovém expresním systému (Jidenko *et al.*, 2005) nebo v hmyzích (Grujic *et al.*, 2008) či savčích buňkách (Bokhove *et al.*, 2016). Následně se protein musí opravdu důsledně purifikovat tak, aby byl chemicky i biologicky naprosto čistý, neobsahoval žádné jiné látky a také byl ve svém nativním stavu. Tento krok je často velmi náročný a je těžké získat velké množství takto čistého proteinu. Obzvláště u membránových proteinů, které jsou nerozpustné ve vodě, se to někdy zdá až zcela nemožné (Minor, 2007). Častokrát je nutné provést mutagenезi (i malá změna v sekvenci může udělat v efektivitě purifikace proteinu velkou změnu) a optimalizovat podmínky celého procesu purifikace, což zabere spoustu času. Protein se následně musí zakonzentrovat na vysokou koncentraci, kdy se u některých proteinů můžou vyskytnout problémy se srážením, které se následně musí řešit (Wlodawer *et al.*, 2008).

Ve chvíli, kdy je k dispozici velké množství chemicky i biologicky čistého proteinu o vysoké koncentraci je možné se pokusit o jeho krystalizaci. Konzentrováný roztok proteinu se smíchá s roztokem tzv. **precipitantu (srážedla)**, který podpoří vznik intermolekulárních interakcí důležitých pro vznik krystalů ovlivněním hydratace, rozpustnosti, elektrostatických a hydrofobních interakcí v proteinu (Rupp, 2010). Každý precipitant reaguje s proteinem naprosto odlišně a je potřeba najít ten konkrétní, který podpoří krystalizaci. Záleží totiž nejenom na chemické povaze precipitačního roztoku, ale i na pH, koncentrací solí, použitých detergentech, teplotě, přítomnosti nízkomolekulárních ligandů a mnoho dalších faktorech. Pro nalezení těch nejlepších podmínek se používají **krystalizační soupravy (screeny)**, které se většinou skládají ze směsi různých polyetylen glykolů, alkoholů a solí, které byly úspěšně použité ke krystalizaci proteinů v minulosti (Newman *et al.*, 2005). Díky moderním

krystalizačním robotům je dnes také možné zkoušet stovky různých podmínek najednou za minimální spotřeby materiálu.

Roztok proteinu se během krystalizace smíchá s roztokem precipitantu v daném poměru, a následně se hermeticky uzavře do jamky, ve které je přítomný taky rezervoár precipitačního roztoku o výrazně větším objemu. V probíhající době se pak z roztoku s proteinem odpařuje voda do rezervoáru a tím se protein koncentruje a v ideálním případě je tak iniciována jeho krystalizace. Pokud k ní dojde, je zpravidla ještě nutné dané podmínky optimalizovat tak, aby docházelo ke vzniku velkých jednoduchých krystalů, na kterých se dají naměřit kvalitní difrakční data (Rupp, 2010).

Proteinové krystaly jsou tvořeny mnoha kopiemi tzv. **základní buňky** (*unit cell*), ve které může být pouze jedna molekula proteinu, ale často je jich tam více. Podle charakteru jejich uspořádání v základní buňce se pak určuje tzv. **krystalografická symetrie**, kterých se rozlišuje 65 druhů. Dále se rozlišuje tzv. **asymetrická jednotka** (*asymmetric unit*), což je právě základní opakující se jednotka v rámci základní buňky (**Obrázek 7**). Je to právě struktura asymetrické jednotky, která se určuje během analýzy proteinovou krystalografií (Minor, 2007).

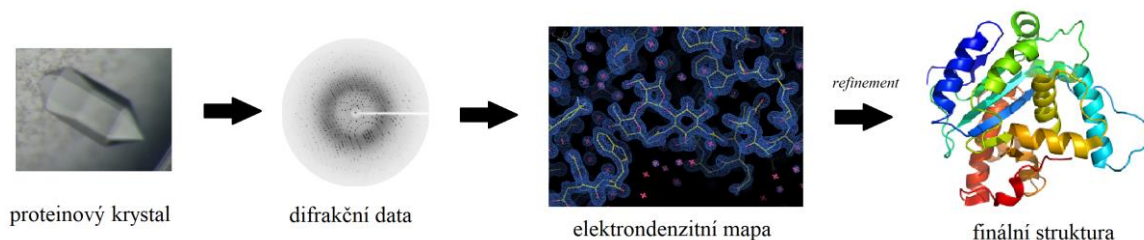


**Obrázek 7.** Uspořádání krystalové mřížky proteinové krystalu, asymetrická jednotka a *unit cell*. Převzato a upraveno z Minor, 2007

Data o struktuře proteinu v krystalu se získají měřením difrakce rentgenových paprsků. Na krystal zamražený v kapalném dusíku se pošle rentgenový paprsek o vlnové délce mezi 0.5-1.6 Å (délka kovalentní vazby mezi atomy je 1-2 Å) a dojde k rozptylu (difrakci) o jednotlivé atomy v molekule proteinu (Wlodawer et al., 2013). Díky symetrické a repetitivní struktuře krystalu pak dojde k pozitivní interferenci elektromagnetických vln, které jsou zaznamenány na detektoru v podobě jednotlivých difrakčních záznamů, které obsahují informace o rozložení tzv. **strukturních faktorů**. To, jestli bude krystal vůbec difraktovat a do jakého rozlišení, se nedá předem nijak předpokládat a často se zjistí, že získané proteinové krystaly se pro analýzu vůbec nedají použít.



Difrakční záznamy se pak musí matematicky zpracovat tak, aby z nich byla získána informace o rozložení elektronových hustot dané struktury – tzv. **elektrondenzitní mapa hustoty elektronů (Obrázek 8)**. Je zde ale jeden experimentální problém. Elektromagnetické vlny jsou definované amplitudou a také fází. Měřená intenzita difrakce ale neposkytuje žádné informace o fázi vlny, proto musí být tato informace pro sestavení elektrondenzitní mapy získána odjinud (Wlodawer et al., 2008).



**Obrázek 8.** Průběh determinace krystalové struktury proteinů.

Je několik možností, jak tyto informace získat. Jednou z nich je modifikace aminokyselin v proteinu těžkými atomy, a zabudování například selenomethioninu, kolem nichž je elektronová hustota vysoká tak, že to umožňuje přesně určit jejich polohu a z ní pak odhadnout fáze vln, které se následně aplikují na celou strukturu (Taylor, 2010). Druhou variantou je metoda tzv. **molekulárního nahrazení**, která se používá, pokud je známa struktura blízce příbuzného proteinu nebo alespoň jeho menších podjednotek. Tato struktura se pak použije jako vyhledávací model pro výstavbu struktury nového proteinu (Scapin, 2013).

Po prvotním sestavení struktury ale analýza ještě zdaleka není u konce. Následuje ještě mnoho kol tzv. **rafinace (refinementu)**, neboli zpřesňování a vylepšování struktury. Ta probíhá jak softwarově, tak manuálně, a to do té doby, než je daná struktura skutečně nejlepším odrazem naměřených dat (Minor, 2007).

Proteinová krystalografie představuje v současné době nejpřesnější a nejvíce používanou metodu determinace proteinové struktury. Přes mnoho moderních postupů a usnadnění zůstává příprava kvalitních krystalů vysoce náročnou disciplínou. Obzvláště například u membránových proteinů, které nejsou rozpustné ve vodě, je to extrémně náročné (Parker & Newstead, 2016). Také struktury proteinů s vysokou flexibilitou se pomocí této metody určují jen velice těžko, protože flexibilní části proteinu neposkytují difrakční data. Pro tyto případy se musí použít jiné metody strukturní biologie (Wlodawer et al., 2013).

Některé z problémů proteinové krystalografie (nutnost velkých krystalů, radiační poškození) se podařilo vyřešit pomocí nové metody tzv. **časově-rozlišené krystalografie (time-resolved serial femtosecond crystallography)**. Tato metoda využívá pro získání rentgenových paprsků buď synchrotronové zařízení nebo nově vyvinuté lasery na bázi volných elektronů (*free-electron lasers*), které vysílají koherentní zacílené pulsy rentgenových paprsků v ultrakrátkých intervalech v řádech femtosekund, a strukturní data se získávají součtem jednotlivých difrakčních snímků z mnoha nanokrystalů v náhodné prostorové orientaci, čímž nedochází k ovlivnění výsledků radiačním poškozením (Martin-Garcia et al., 2016).

### 1.3.2 NMR spektroskopie

Další metodou analýzy struktury proteinů je NMR (nukleární magnetická rezonance) spektroskopie. Tato metoda se používá zejména k determinaci struktury menších molekul, se ale použít i pro determinaci struktury biomolekul jako jsou nukleové kyseliny nebo právě proteiny. Tato metoda dokáže určit strukturu látky v roztoku, oproti proteinové krystalizaci tak odpadá nutnost časově náročné přípravy proteinových krystalů (McMurry, 2011).

Podstatou této metody je, že spin atomů reaguje na magnetické pole. Po působení silného magnetického pole se jednotlivé spiny rozdělí na dvě energetické hladiny, nižší a vyšší s tím, že většina z nich bude samozřejmě v nižší hladině. Když ale tento spinový systém ozáříme radiofrekvenčním zářením, tak se některé spiny z nižší hladiny excitují do hladiny vyšší. Po odstranění záření dochází k deexcitaci, která se následně měří (Minor, 2007). Pouze některá jádra ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ) jsou NMR aktivní. Výsledkem měření jsou pak signály (*peaks*) na charakteristické pozici, které se říká chemický posun. Ten je závislý na frekvenci magnetu, který se používá, a na rezonanční frekvenci referenční sloučeniny. Pozici signálů ovlivňuje okolí atomu, přesněji vazebné elektrony. Ty se chovají jako magnety, a tak ovlivňují rezonanci jádra. Ve výsledném spektru signálů má proto každý typ jádra s různým okolím svůj vlastní signál a jeho intenzita odpovídá počtu jader ve stejném stavu (Marion, 2013). A právě na základě těchto informací se z NMR spekter dá vyčíst informace o struktuře molekuly.

Jelikož protony jsou NMR aktivní a jsou vysoce zastoupené v proteinech, NMR spektroskopie je poměrně snadná. Při použití pouze protonové NMR jde ale struktura sestavit pouze pro proteiny o hmotnosti menší než 10 kDa. U větších proteinů se musí provést experimenty s  $^{13}\text{C}$  a  $^{15}\text{N}$  jádry (Edwards & Reid, 2000). Jelikož v přírodě jsou tyto izotopy velmi málo zastoupené, musí se použít expresní systém, který tyto izotopy do proteinu uměle inkorporuje. Pro proteiny větší než 25 kDa je výhodné také vodíkové atomy vyměnit za deuterium, čímž se sníží hustota protonů, a je tak snazší informace zpracovat a nedochází k tak velkému šumu (Sattler & Fesik, 1996).

Přes všechny výhody ale NMR spektroskopie dodnes nedokáže charakterizovat proteiny větší než 40 kDa (Tugarinov et al., 2004). Kvůli závislosti na lokálním prostředí je ale skvělou metodou pro zjišťování interakcí mezi proteiny nebo proteiny a malými molekulami, či pro studium konformačních stavů proteinů (Minor, 2007).

### 1.3.3 Elektronová mikroskopie

Elektronová mikroskopie (EM) je další metodou determinace třírozměrné struktury proteinů. Touto metodou je možné analyzovat strukturu 2D krystalů, helikálních krystalů nebo tubulárních krystalů proteinu. Nicméně s rozvojem vysoce výkonných mikroskopů, nových typů detektorů a metod zpracování obrazu (sběr dat ve formě videa a ne jednotlivých obrázků) je v současné době stále více dostupné používat i tuto metodu pro studium prostorového uspořádání jednotlivých biologických makromolekul (tzv. *single-particle analysis*) bez nutnosti jejich předchozí krystalizace (Rivera-Calzada & Carroni, 2019). Tyto technologické pokroky v metodologii kryo-EM nastolily v posledních letech revoluci ve strukturní biologii (tzv. *resolution revolution*), kdy je možné studovat architekturu a strukturní detaily

jednotlivých biomakromolekul či jejich komplexů větších než 100 kDa bez nutnosti jejich krystalizace (Callaway, 2015).

Elektrony ale mají daleko větší energii než rentgenové paprsky používané v proteinové krystalografii, což způsobuje velký problém s radiačním poškozením zkoumaného vzorku. Zároveň jsou proteiny a jejich krystaly z velké části tvořeny vodou, která není vhodná pro měření v podmínkách vakua v elektronovém mikroskopu, a proteiny jsou také složeny převážně z lehkých atomů (H, C, N, O), které špatně rozptylují elektrony (Minor, 2007).

Tyto problémy se dnes řeší dvěma způsoby. Prvním z nich je technika tzv. **negativního barvení** (*negative stain technique*), kdy se voda v okolí proteinu vymění za vysušený roztok soli těžkého kovu. Tato metoda ale může vést k deformaci molekuly a maximální možné rozlišení je 20 Å (Jonic & Vénien-Bryan, 2009), což je samozřejmě nedostatečné rozlišení pro studium strukturních detailů.

Druhou, dnes vysoce zkoumanou variantou, je tzv. **kryo-elektronová mikroskopie**. Při této metodě je zkoumaný vzorek velmi rychle zmražen v dusíkem chlazeném ethanu a tímto je uchovávan ve stavu co nejpodobnějšimu nativnímu stavu. Teplota v mikroskopu je pak udržována chlazením tekutým dusíkem. Data se následně sbírají při nízkých teplotách a nízkých expozičních elektronech, aby nedošlo k poškození vzorku, což ale vede ke vzniku obrázků s velkým šumem a nízkým kontrastem. Pro získání dat s vysokým rozlišením je tedy nutné měřit několik kopií vzorku (Egelman, 2016) (Nwanochie & Uversky, 2019).

Kryo-elektronová mikroskopie jednotlivých částic poskytuje mnoho výhod při určení proteinové struktury, jelikož není nutné protein krystalizovat. V ideálním případě jsou molekuly proteinu při této metodě náhodně rozmístěné v tenké vrstvě vitrifikované vody (amorfního ledu) ve všech možných orientacích (Minor, 2007). Problémem bývá heterogenita konformací molekul, případně přítomnost flexibilních částí proteinu. V těchto případech je často nutné použít extrémně velký počet molekul a pak při analýze vybrat pouze ty, co jsou ve stejné konformaci, čímž se výrazně zlepší rozlišení metody (Egelman, 2016). Dnes je možné dosáhnout až rozlišení 1,5-4.5 Å (Bartesaghi et al., 2018)(Campbell et al., 2015) (Jiang et al., 2015), čímž se tato metoda stává klíčovým nástrojem v integrované strukturní biologii, jelikož dosahuje obdobných rozlišení jako rentgenová krystalografie, která ovšem vyžaduje nutnost časově náročné a nejisté krystalizace.

#### 1.4 Strukturní analýza enzym-substrát komplexu

Proteinová krystalografie nemusí být použita pouze na determinaci struktury samotného enzymu. Kvůli vysokému rozlišení metody je možné analyzovat strukturu komplexu enzymu s jeho substrátem, což může poskytnout vysoce cenné informace o mechanismu reakce a funkci enzymu (Rupp, 2010).

Nicméně pro zachycení enzym-substrátového komplexu je nutné zabránit přeměně substrátu na produkt. Toho se může docílit buď použitím modifikovaného substrátu, u kterého enzym není schopný provést přeměnu na produkt, nebo použitím enzymu s mutací v některé aminokyselině důležité pro přeměnu substrátu na produkt, čímž dojde k vazbě molekuly substrátu v aktivním místě enzymu, ale jeho následná přeměna je znemožněna (Hassell et al., 2006).

Existují dva základní přístupy, jak zachytit molekulární strukturu ligandu navázaného do aktivního místa enzymu. První z nich tzv. krystalový *soaking*, který spočívá v přenesení vyrostlých proteinových krystalů do kapky obsahující kromě krystalizačního roztoku i molekuly ligandu. Tato metoda je vhodná, když je například nutné testovat větší počet zkoumaných ligandů, jelikož je méně materiálově náročná. Ligand může být buď přidán přímo do roztoku, ve kterém byl protein krystalizován, nebo se krystaly přemístí do nového roztoku o stejném složení jako jejich precipitační roztok, avšak s přidavkem ligandu (Rupp, 2010). Délka expozice i přesná koncentrace ligandu je vysoce individuální a musí být zjištěna experimentálně. Riziko této metody je, že ligand či jeho rozpouštědlo, změna prostředí nebo neopatrné zacházení může poškodit krystaly (Müller, 2017).

Druhou používanou metodou je **ko-krystalizace**. Při této metodě se protein krystalizuje rovnou v přítomnosti ligandu. Purifikovaný protein je s ním smíchán, inkubován po určitou dobu, zpravidla 1 hodinu při 4 °C. Po odstranění nerozpustných agregátů se pak protein-ligand komplex krystalizuje obdobným způsobem. Přítomnost ligandu ale často ovlivňuje krystalizaci proteinu. Je nutné si uvědomit, že vazba ligandu na enzym může měnit jeho konformační stavy, výsledný komplex je zpravidla stabilnější než apo-forma enzymu, a proto může krystalizovat snadněji než bez jeho přítomnosti. Toho se často využívá u těžko krystalizovatelných proteinů (Hassell et al., 2006).

U obou metod ale nikdy není přesná záruka, že bude ligand přítomný v aktivním místě. Může být zabudovaný jinde do struktury krystalu nebo se do něj vůbec nedostat, to je však možné zjistit až po analýze difrakčních dat z měření.

Krystalografická analýza enzym-substrátových komplexů byla provedena i u některých halogenalkandehalogenas, aby se potvrdil mechanismus jejich reakce (Koen et al., 1993). Dopusud však byly publikovány pouze struktury halogenalkandehalogenas v komplexu s malými lineárními haloalkany jako například 1,2-dichloroetan nebo 1,2-dichloropropan (Oakley et al., 2002, Koen et al., 1993). Nebyly publikovány ani žádné struktury halogenalkandehalogenas v komplexu se složitějšími aromatickými nebo jinak netradičními ligandy.

## 2 CÍLE PRÁCE

Tato práce se zabývá vývojem a optimalizací experimentálních postupů pro rekombinantní produkci, krystalizaci a strukturní analýzu halogenalkandehalogenasy DmmA. Vyvinuté postupy byly následně použity pro krystalografické analýzy enzymu DmmA a jeho komplexů s netradičními halogenovanými substráty a s domnělými substráty ze skupin laktonů a koelenterazinů. Dílčí experimentální cíle této práce byly:

- Konstrukce katalyticky neaktivního mutantu DmmA pro účely zachycení enzym-substrátových komplexů.
- Optimalizace produkce a purifikace enzymu DmmA pro krystalizační experimenty.
- Nalezení a optimalizace vhodných krystalizačních podmínek pro strukturní analýzu halogenalkandehalogenasy DmmA a jejich komplexů. Studium vlivu použitého srážedla na velikost a kvalitu získaných DmmA krystalů.
- Krystalografická analýza komplexu DmmA s halogenovaným derivátem fluorescenčního substrátu BODIPY (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene): první strukturní analýza komplexu halogenalkandehalogenasy s velkým aromatickým substrátem.
- Strukturní analýza komplexů DmmA s domnělými substrátovými molekulami ze skupiny laktonů: odhalení vazebného mechanismu laktonových derivátů v aktivním místě halogenalkandehalogenas
- Strukturní analýza komplexu DmmA s neoxidovatelným derivátem koelenterazinu (tzv. azokoelenterazin): ověření vazebného mechanismu luminiscenčního substrátu do aktivního místa halogenalkandehalogenas

## 3 METODIKA

### 3.1 Seznam chemikálií

4-bromobutanenitril (Sigma-Aldrich)

6x Gel Loading Dye – blue (New England BioLabs)

Agar (Sigma-Aldrich)

Akrylamid/bis-akrylamid (Sigma-Aldrich)

Azakoelesterazin (syntetizováno na pracovišti Organické chemie Pasteurova institutu v Paříži, Francie)

Beta-butyro lakton (Sigma-Aldrich)

BODIPY-Cl (*8-chloromethyl-3,5-dimethyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*)  
(syntetizováno na pracovišti Organické fotochemie Masarykovy university)

Citronan sodný (Sigma-Aldrich)

Coomassie Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad)

Dimethylsulfoxid – DMSO (Sigma-Aldrich)

Dodecylsírán sodný – SDS (Sigma-Aldrich)

Ethanol 96% (Penta)

Ethylenediaminetetraacetic acid – EDTA (Sigma-Aldrich)

Formiát sodný (Sigma-Aldrich)

GelRed Nucleic Acid Stain, 10,000 x (Biotium)

Glycerol (Sigma-Aldrich)

Glycin (Fluka)

HEPES (*4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*)

Hydroxid sodný (Lach-ner)

Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich)

Chlorid sodný (Sigma-Aldrich)

Imidazol (Sigma-Aldrich)

InstantBlue Protein Stain (Expedeon)

*Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside* – IPTG (Duchefa Biochemie)

Izopropanol (Penta)

Kanamycin (Sigma-Aldrich)

Kyselina dusičná (UWR Chemicals)

Kyselina octová (Lach-ner)  
Luria-Bertani (LB) broth (Sigma-Aldrich)  
Malonát sodný (Sigma-Aldrich)  
*2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid* – MES (Sigma-Aldrich)  
*N, N, N', N'-tetramethylethane-1,2-diamine* – TEMED (Sigma-Aldrich)  
N-heptyl-DL-homoserin lakton (Sigma-Aldrich)  
Octan sodný (Sigma-Aldrich)  
Peroxodisíran amonný (Sigma-Aldrich)  
Polyethylenglykol 3,350 (Hampton Research)  
Quick-Load 1 kb DNA Ladder (New England BioLabs)  
Síran amonný (Penta)  
Síran lithný (Sigma-Aldrich)  
Sukcinát sodný (Sigma-Aldrich)  
Sulfát amonno-železitý (Lachner)  
Thiokyanatan rtuťnatý (Sigma-Aldrich)  
*Tris(hydroxymethyl)-aminomethane* – TRIS (Sigma-Aldrich)  
Undekano-delta-lakton (Aldrich chemistry)  
Undekano-gamma-lakton (Aldrich chemistry)  
*Unstained protein molecular weight marker* (Thermo Scientific)  
Vinan sodno-draselný (Sigma-Aldrich)  
Whiskey lakton (Aldrich chemistry)

### **3.2 Seznam biologického materiálu**

Plazmid pET24a:DmmA  
*Escherichia Coli* BL21DE3  
*Escherichia Coli* DH5 $\alpha$

### **3.3 Seznam používaných roztoků a médií**

**Glycinový pufr** – 100 mM glycinu rozpuštěno ve MQ vodě, pH 8,6

**50 mM fosfátový pufr** - 41 mM hydrogenfosforečnan draselný, 9 mM dihydrogenfosforečnan draselný, rozpuštěno v MQ vodě, pH 8

**1 M IPTG** – 1 M IPTG rozpuštěno ve sterilní MQ vodě

**Dialyzační pufr** – 50 mM formiát sodný, 10 mM TRIS, pH 7

**Iwasaki roztok 1** – 0,45 g thiokyanatanu rtuťnatého rozpuštěno v 150 ml ethanolu

**Iwasaki roztok 2** – 18,48 g síranu železitého rozpuštěno v 108 ml koncentrované kyseliny dusičné a 192 ml MQ vody

**LB agar (1,5%)** – 4g *LB Broth* a 3 g agaru rozpuštěno v 200 ml MQ vody

**LB médium** – 20 g *LB Broth* rozpuštěno v 1 l MQ vody

**Purifikační pufr A** – 50 mM formiátu sodného, 10 mM TRIS, 10 mM imidazolu rozpuštěno v MQ vodě, pH upraveno na hodnotu 7 kyselinou octovou

**Purifikační pufr B** – 50 mM formiátu sodného, 10 mM TRIS, 500 mM imidazolu rozpuštěno v MQ vodě, pH upraveno na hodnotu 7 kyselinou octovou

### 15% SDS gely

A) Separací gel – 4,5 ml 30% akrylamidu/bis-akrylamidu rozpuštěno v 2 ml destilované vody a v 2,3 ml pufru (1,5 M Tris, pH 8,8) a přidáno 90  $\mu$ l 10% SDS a 90  $\mu$ l 10% ASP a 4,5  $\mu$ l TEMED

B) Zaostrující gel – 540  $\mu$ l 30% akrylamidu/bis-akrylamidu rozpuštěno v 2 ml destilované vody a v 1 ml pufru (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) a přidáno 40  $\mu$ l 10% SDS a 60  $\mu$ l 10% ASP a 2  $\mu$ l TEMED

**1% agarózový gel** – 40 ml 1xTAE smícháno s 0,4 g agaru

**1xTAE pufr** – 40 mM TRIS, 20 mM kyseliny octové a 1 mM EDTA rozpuštěno MQ vodě, pH 8,2

**TRIS-glycinový pufr (1xSDS pufr)** – 50 mM TRIS, 384 mM glycinu, 0,1% SDS a 2 mM EDTA rozpuštěno v MQ vodě.

**TRIS-HCl pufr** – 50 mM TRIS rozpuštěno v 1 l MQ vody, pH upraveno na 7,5 kyselinou chlorovodíkovou

**SDS nanášející pufr** – 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pufru bylo smícháno s 7,5 ml glycerolu, 4 ml 10% (w/v) SDS, 1 ml 2-merkapt ethanolu, Coomassie Brilliant Blue R a 8 ml MQ vody

## 3.4 Izolace, úpravy a klonování DNA

### 3.4.1 Izolace plazmidové DNA

Jednotlivé kolonie bakterií *Escherichia coli* nesoucí plazmid pET24a:DmMA byly inokulovány do 10 ml 1xLB média obsahující příslušné selekční antibiotikum. Kultura byla inkubována v třepačce NB-205 (N-Biotek, Jižní Korea) při 37 °C a 200 otáčkách za minutu po dobu 16-18 hodin. Druhý den byla narostlá kultura sklizena centrifugací (11000 g/1 min), supernatant byl odstraněn. Plazmidová DNA byla izolována pomocí komerční soupravy NucleoSpin Plasmid (Macherey-Nagel, Německo). Bakteriální pelet se rozpustil v 250  $\mu$ l pufru A1, poté se přidalo 250  $\mu$ l modrého lyzačního pufru A2. Zkumavka se několikrát převrátila, aby došlo k dokonalému promíchání lyzačního pufru s bakteriálními buňkami, a následně proběhla



inkubace při pokojové teplotě po dobu 5 minut. Poté se k roztoku přidalo 300  $\mu$ l neutralizačního pufru A3 a směs byla promíchána až do úplné neutralizace, která byla indikována zbledáním směsi. Následně byla směs centrifugována (13000 g/10 min). Po centrifugaci bylo 750  $\mu$ l supernatantu obsahujícího plazmidovou DNA přeneseno pipetou na afinitní kolonku. Kolonka byla poté opět centrifugována (11000 g/ 1 min), aby došlo k vazbě DNA na afinitní membrány kolonky. Poté byla kolonka promyta 600  $\mu$ l pufru A4 během následné centrifugace (11000 g/ 1 min). Pro zvýšení čistoty izolovaného plazmidu byl tento krok opakován dvakrát. Následně proběhla centrifugace kolonky bez jakéhokoliv pufru (11000 g/ 1 min), tak aby došlo k odstranění zbytkových kapének promývacích roztoků. Pro eluci plazmidové DNA z afinitní kolonky byla použita sterilní demineralizovaná voda (demiH<sub>2</sub>O) přehřátá na 55 °C. Na membránu bylo nanášeno 30  $\mu$ l této vody a následovala finální centrifugace (11000 g/ 5 min). Eluční krok byl opakován dvakrát, takže na závěr bylo získáno 60  $\mu$ l plazmidové DNA. Koncentrace plazmidu a jeho čistota pak byla měřena na DS-11 Series Spektrofotomeru (DeNovix).

### **3.4.2 Sekvence DNA**

Pro zjištění přesné nukleotidové sekvence daného genu bylo smícháno 5  $\mu$ l plazmidu (~100 mg/ml) a 5  $\mu$ l sekvenačního oligonukleotidu (10  $\mu$ M). Sekvence byla následně provedena Sangerovou metodou firmou Europhins genomics v Lucembursku. Veškerá práce se sekvencemi pak probíhala v programu BioEdit 7.0.5.3. (Hall, USA).

### **3.4.3 Restrikční štěpení plazmidu**

Pro štěpení plazmidu byly vždy vybrány dvě restrikční endonukleasy, tak aby došlo k vyštěpení požadovaného genu. V případě plazmidu pET21b-DmmA se jednalo o enzymy NdeI a HindIII. Restrikční směsi obsahovaly 4  $\mu$ l plazmidové DNA (~100 ng/ $\mu$ l), 11  $\mu$ l sterilní demiH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l CutSmart pufru (New England BioLabs) a 1,5  $\mu$ l každé ze dvou endonukleas (New England BioLabs, 20 000 U/ml). Směs byla zamíchána a krátce stočena na centrifuze (11000 g/ 15 s) a inkubována ve 37 °C po dobu 1,5 hod.

### **3.4.4 DNA elektroforéza**

DNA elektroforéza probíhala v 1% agarózovém gelu připraveném smícháním agarosy s 1xTAE roztokem. Směs se následně zahřívala v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarosy a nechala se vychladnout na přibližně 50-60 °C. Poté se do směsi přidalo 1,5  $\mu$ l GelRed (Biotium, USA, ředěno 10 000x ve vodě) interkalační barvy a tekutý gel se nalil do formy na gely a nechal tuhnout 20-30 minut při laboratorní teplotě.

Vzorek DNA byl následně smíchán s 6x loading buffer (Thermo Fisher Scientific) a byl nanášen do jamek gelu spolu s 5  $\mu$ l markeru. Elektroforetická separace byla prováděna po dobu 35 minut při 120 V a 400 mA (PowePac Basic Power Supply, Bio-Rads). Separované DNA molekuly byly vizualizovány pomocí systému Bio-Doc-it 220 Imaging systém (UVP, Německo).

### 3.4.5 Izolace DNA z gelu

Pro zpětnou izolaci DNA z agarosového gelu se nejprve skalpelem pod modrým světlem (UltraBright LED Transilluminator, Maestrogen, vlnová délka světla 470 nm) vyřízla oblast gelu s požadovaným fragmentem DNA. Fragmenty DNA pak byly izolovány použitím komerční soupravy NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel). Nejprve bylo na každých 100 mg izolovaného gelu přidáno 400  $\mu$ l pufru NTI a směs byla inkubována na 10 minut při 50 °C. V průběhu inkubace byla směs průběžně vortexována. Následně bylo 700  $\mu$ l směsi nanášeno na afinitní kolonku s membránou vloženou do 2-ml mikrozkušavky a směs byla centrifugována (11000 g/30 s). Přefiltrovaná kapalina byla odstraněna a krok byl opakován, dokud nebyl na kolonku nanášen veškerý rozpuštěný roztok obsahující DNA. Poté byla kolonka promyta 700  $\mu$ l promývacího pufru NT3 a opět centrifugována (11000 g/30 s). Po promytí byla membrána kolonky vysušena centrifugací bez jakéhokoliv roztoku (11000 g/1 min). Na závěr byla kolonka přenesena do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky a bylo do ní přidáno 15-30  $\mu$ l elučního pufru NE. Následovala inkubace 1 min při laboratorní teplotě a poté následovala konečná centrifugace (11000 g/1 min). Koncentrace a čistota izolované DNA byla stanovena pomocí DS-11 Series Spektrofotometru (DeNovix).

### 3.4.6 Transformace plazmidu do buněk

Pro transformaci plazmidové DNA do buněk byly použity buňky *E. coli* BL21DE3 (pro rekombinantní produkci proteinů) nebo *E. coli* DH5 $\alpha$  (pro preparativní pomnožení plazmidu). K 50  $\mu$ l kompetentních *E. coli* DH5 $\alpha$ , respektive k 10  $\mu$ l *E. coli* BL21DE3 byl přidán 1  $\mu$ l plazmidu (~100 ng/ $\mu$ l) (nebo 10  $\mu$ l PCR směsi), a poté proběhla inkubace směsi na ledu po dobu 10 min. Následně byla provedena transformace metodou teplotního šoku (*heat shock method*) inkubací směsi ve 42 °C po dobu 1 min a vzorek byl opět inkubován na ledu po dobu 5 min. Po této inkubaci bylo přidáno 200  $\mu$ l 1xLB média bez antibiotika a buňky byly inkubovány ve 37 °C po dobu 60-90 min. Na závěr byly buňky vysety na Petriho misky s LB-agar médiem obsahujícím selekční antibiotikum kanamycin (50  $\mu$ g/ml) a misky byly inkubovány při 37 °C po dobu 16-18 h.

### 3.4.7 Mutagenese DNA pomocí polymerázové řetězové reakce

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction; PCR) byla použita pro cílenou mutagenese metodou megaprimerové mutagenese a skládala se ze 3 kroků:

- **Syntéza megaprimeru:** Nejprve se vytvořil primer s mutovaným kodonem, který byl sestaven podle původní sekvence tak, že se jeho sekvence skládala ze sedmi kodonů před mutovaným kodonem, z mutovaného kodonu a ze sedmi kodonů po mutovaném kodonu. Tento primer může být buď forward nebo revers podle toho na jakém místě v sekvenci je potřeba udělat mutaci. Následně byla na ledu namíchána PCR směs ve složení – 33,5  $\mu$ l sterilní vody, 10  $\mu$ l pufru pro Pfu polymerázu, 1  $\mu$ l dNTPs (10 mM od každého nukleotidu), 2  $\mu$ l forward primeru (10  $\mu$ M), 2  $\mu$ l revers primeru (10  $\mu$ M) (jeden z primerů byl mutovaný), 1  $\mu$ l teplátové DNA (~100 ng/ $\mu$ l) a 0,5  $\mu$ l Pfu polymerasy (2000 U/ml) PCR proběhla v XP Thermal Cycleru (Bioer, UK)

s následujícím nastavením cyklů: I. počáteční denaturace DNA při 98 °C, 30 s; II. denaturace DNA 98 °C, 10 s; III. nasednutí oligonukleotidů 55 °C, 20 s, IV. syntéza DNA 72 °C, 30 s; V. závěrečné dosyntetizování DNA řetězců 72 °C; 2 minuty; VI. zchlazení směsi na 4 °C. Kroky II. až IV. byly v rámci celého programu opakovány ve 30 cyklech, tak aby došlo k syntéze dostatečného množství požadovaných DNA řetězců. Megaprimerový DNA fragment byl následně separován pomocí gelové elektroforézy a izolován z gelu (postup viz. kapitola 3.2.5).

- **PCR s použitím megaprimeru:** PCR směs byla namíchána na ledu v následujícím složení – 17,75 µl sterilní vody, 5 µl pufru pro Pfu polymerázu, 0,5 µl dNTPs (10 mM od každého nukleotidu), 1 µl megaprimeru, 0,5 µl teplátové DNA (plazmid ~100 ng/µl) a 0,25 µl Pfu polymerasy (2000 U/ml). Následně byla směs vložena do PCR cykléru s následujícím nastavením cyklů: I. 98 °C, 30 s; II. 98 °C, 10 s; III. 55 °C, 20 s, IV. 72 °C, 2,5 min; V) 72 °C; 8 min; VI. 4 °C, 1 h; kroky II. až IV. se opakovaly ve 30 cyklech.
- **Odstranění templátové DNA:** Odstranění původní templátové (nemutované) DNA proběhlo pomocí restriktivního enzymu DpnI, který rozeznává methylovanou DNA. K megaprimerové PCR směsi byly přidány 3 µl CutSmart pufru (New England BioLabs) a 2 µl DpnI (20 000 U/ml) a směs byla inkubována při 37 °C po dobu 2 h. Následně proběhla inaktivace DpnI enzymu zahřátím směsi na 80 °C po dobu 20 min. Výsledná plazmidová DNA nesoucí požadovanou mutaci v *Dmma* genu byla transformována a pomnožena v *E. coli* DH5α buňkách, poté izolována a správnost mutagenese byla ověřena pomocí DNA sekvenování.

### 3.5 Rekombinantní produkce a purifikace enzymu Dmma

#### 3.5.1 Rekombinantní nadprodukce enzymu Dmma

Plazmid pET24a-d-(+):Dmma nesoucí gen pro protein Dmma fúzovaný s histidinovou kotvou byl transformován do produkčních buněk *E. coli* BL21DE3 (New England Biolabs), které byly poté vysety na Petriho misku s LB-agar médiem obsahujícím selekční antibiotik kanamycin (50 µg/ml) a inkubovány ve 37 °C po dobu 16-18 h. Druhý den ráno byly ve sterilním boxu inokulovány 2 narostlé kolonie buněk do dvou Erlenmeyerových baněk s 10 ml 1xLB média a kanamycinem (50 µg/ml). Takto inokulované buňky byly poté inkubovány na třepače (200 rpm) při 37 °C po dobu 4-5 h. Následně byly obě kultury smíchány ve sterilním boxu a přeneseny do dvou 2-L sterilních Erlenmeyerových baněk s 1xLB médiem s kanamycinem (50 µg/ml). Tyto 2-L Erlenmeyerovy baňky pak byly inkubovány v inkubátoru Innova 44/44R orbital incubator (New Brunswick Scientific, USA) při 37 °C po dobu až optická denzita buněk (O.D.<sub>600</sub>) dosáhla hodnoty 0,2-0,3. Měření optické denzity bylo provedeno na spektrometru Biochrom WPA Lightwave (WPA Biochrom, UK). Jakmile O.D.<sub>600</sub> kultury dosáhlo hodnot v rozmezí 0,2-0,3 teplota v inkubátoru byla snížena na 20 °C. Po ochlazení kultury na 20 °C (po 30 min inkubaci) byla indukována exprese proteinu přidáním 0,5 ml 1 M roztoku IPTG do každé Erlenmeyerovy baňky. Buňky byly poté inkubovány při 20°C a 150 rpm po dobu 16 h. Na závěr byly buňky sklizeny centrifugací (4000 g/4 °C/15 min) v 1-L centrikonech. Supernatant byl odstraněn a buněčný pelet byl resuspendován v 30 ml příslušného

purifikačního pufru (viz kapitola 3.5.4). Buněčná suspenze pak byla pipetou přenesena do 50-ml zkumavek a doplněna purifikačním pufrem do 40 ml. Následně byly takto sklizené buňky zamrazeny a skladovány při teplotě  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.2 Manuální afinitní preparace proteinů

Za účelem optimalizace purifikačních pufků pro produkované proteiny byl proveden screening metodou afinitní mini-preparace. Buňky s nadprodukovaným proteinem byly pomalu rozmrazeny ve vodní lázni ( $15\text{-}20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a následně byly ultrazvukově dezintegrovány sonikací ve 4 cyklech po dobu 4 min (10 s ultrazvukový puls, 10 s pauza) na přístroji UP200S Ultrasonic Processor (Hielscher, Germany). Poté byly buňky rozděleny do dvou 30 ml centrikon a centrifugovány při 14000 g po dobu 1 h ( $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) tak, aby se oddělily zbytky buněčných stěn a membrán. Následně byl supernatant, tzv. bezbuněčný extrakt, přefiltrován do nové 50-ml zkumavky. K takto připravenému bezbuněčnému extraktu bylo přidáno 0,5 ml afinitní resinu (TALON Metal Affinity Resin, Clontech, USA). Směs byla inkubována na rolleru (Roller 6 Digital, IKA) 1 h při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , aby se DmMA protein prostřednictvím histidinové kotvy navázal na kobaltové kationty imobilizované na afinitní resinu. Poté následovala centrifugace ( $1000\text{ g}/4\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ min}$ ). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant a sedimentovaný resin s navázaným proteinem byl resuspendován v purifikačním pufru A s obsahem 10 mM imidazolu. Tento krok byl opakován ještě dvakrát tak, aby došlo k dokonalému vymytí nespecificky vázaných proteinů. Resin byl poté přenesen do purifikačních kolonek s fritou (Plastic XL Columns, Agarose Bead Technologies) tak, aby bylo možné provést eluci proteinu. Na této kolonce byl resin ještě promyt 70 ml purifikačního pufru A. Pro finální eluci proteinu byl použit purifikační pufr B (s obsahem 500 mM imidazolu). 2 ml pufru B byly nanесeny na resin a směs byla inkubována 5 min, aby došlo k vyvázání proteinu z resinu. Vyvázaný protein byl eluován do sterilních zkumavek, koncentrován v Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (MERCK) na požadovanou koncentraci a pro zjištění jeho čistoty byla provedena kontrolní elektroforetická analýza.

### 3.5.3 Proteinová elektroforéza (SDS-PAGE)

Proteiny byly separovány v polyakrylamidových gelech v přítomnosti dodecylsírany sodného (SDS) tzv. metodou SDS-PAGE (*SDS polyacrylamide gel electrophoresis*). Gely na SDS-PAGE byly složeny ze dvou částí: horní, menší část tvoří tzv. zaostrující (*stacking*) gel a spodní, větší část gelu tvoří tzv. separační (*resolving*) gel. Složení gelů upřesněno v seznamu gelů a médií (kapitola 3.3).

Vzorek na SDS-PAGE byl připraven smícháním roztoku izolovaného proteinu zředěného MQ vodou (23  $\mu\text{l}$ ) s 5  $\mu\text{l}$  nanášecího SDS-pufku. Množství proteinu použitého ve vzorku bylo stanoveno dle jeho koncentrace, při  $c \leq 0,5\text{ mg/ml}$  a při SDS elektroforéze bezbuněčného extraktu byly použity 3  $\mu\text{l}$  proteinu, při  $c 0,5\text{-}2\text{ mg/ml}$  byly použity 2  $\mu\text{l}$  proteinu, při koncentraci 2-6 mg/ml byl použit 1  $\mu\text{l}$  proteinu a při  $c \geq 6$  bylo použito 0,5  $\mu\text{l}$  proteinu.

Elektroforetická separace probíhala v 1x SDS-PAGE pufru při konstantním napětí 220 V a elektrickém proudu 400 mA po dobu 35 min. Následně byl gel vyňat z aparatury a přenesen do lázně barvy InstantBlue (Expedeon), kde byl inkubován 15 min. Po barvení proteinů bylo

pozadí gelu odbarveno ve třech cyklech inkubací v destilované vodě. Pro vizualizaci separovaných proteinů byl použit vizualizační systém GS-800 Calibrated Densitometer (BioRad, USA).

#### **3.5.4 Preparativní příprava proteinů afinitní FPLC chromatografií**

Suspenze buněk s naprodukovaným proteinem (40 ml) byla rozmražena, bylo k ní přidáno 100  $\mu$ l DNasy (finální koncentrace 55 U/ $\mu$ l) a buňky byly sonikovány ve čtyřech cyklech po dobu 4 min (10 s ultrazvukový puls, 10 s pauza). Poté byly dezintegrované buňky centrifugovány (14000 g/4°C/1 h), aby se oddělily zbytky buněčných stěn a membrán. Následně byl bezbuněčný supernatant přefiltrován (Syringe filters Rotilabo PES, 0,22  $\mu$ M, ROTH) do nové 50-ml zkumavky. Veškeré manipulační kroky probíhaly na ledu. Rekombinantní protein s histidinovou kotvou na jeho C-konci byl následně purifikován pomocí 5-ml kolony Ni-NTA Superflow Cartridge (Qiagen, Germany) připojené na chromatografický FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) systém BioLogic DuoFlow (Bio-Rad, USA). Purifikace probíhala v purifikačním pufru A za konstantního průtoku (1 ml/min). Eluce navázaného proteinu z afinitní kolony byla provedena diskontinuálním gradientem imidazolu. Eluce proteinu DmmA proběhla při 60% gradientu, tedy při koncentraci 300 mM imidazolu, frakce eluovaného proteinu byly sbírány do 15-zkumavek po objemech 3 ml.

#### **3.5.5 Dialýza**

Po afinitní purifikaci byl roztok DmmA proteinu přenesen do dialyzačního střívka (Membra-Cel(R) Dialysis Tubing, 16 mm, Biotech) a za stálého míchání pomocí magnetické míchačky při 4 °C dialyzován ve dvou litrech dialyzačního pufru po dobu až 16 h.

#### **3.5.6 Purifikace proteinu gelovou filtrační chromatografií**

Po dialýze byl protein zakoncentrován na objem 5 ml a dále purifikován gelovou filtrační chromatografií na preparativní koloně HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare, Švédsko) připojené na FPLC systém ÄKTA Purifier (Amersham, Švédsko). Purifikace probíhala v purifikačním pufru o stejném složení jako dialyzační pufr za konstantního průtoku (1 ml/min). 2-ml frakce purifikovaného proteinu byly sbírány do 96-jamkových bloků. Frakce obsahující DmmA protein byly na závěr smíchány a protein byl skladován ve 4°C.

#### **3.5.7 Koncentrování proteinu**

Pro koncentrování proteinu byly použity koncentrátoři Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck Millipore), které byly s proteinem centrifugovány při 4000 g (4 °C) až do požadované koncentrace. Průběžná koncentrace proteinu byla spektrofotometricky měřena pomocí DS-11 Series Spektrofotomeru (DeNovix).

### 3.5.8 Měření dehalogenasové aktivity pomocí Iwasaki metody

V digestoři se pomocí Hamiltonovy mikrostříkačky přeneslo 15  $\mu$ l halogenovaného substrátu (4-bromobutanenitril) do 25 ml uzavíratelné Erlenmeyerovy baňky s deseti mililitry glycinového pufru (100 mM glycine, pH 8,6). Následně byl substrát vortexován a inkubován v třepací vodní lázni při 37 °C 30 minut, aby došlo k jeho plnému rozpuštění.

Po inkubaci se odebral Hamiltonovou stříkačkou 1 ml směsi jako kontrolní vzorek (blank) do 1.5ml mikrozkušavky se 100  $\mu$ l 35% kyseliny dusičné a následně se enzymatická reakce zahájila přidáním 150  $\mu$ l enzymatického preparátu (Dmma) o koncentraci 5,88  $\mu$ M. V průběhu reakce se v daných intervalech (4, 8, 12, 16 a 20 min od počátku reakce) odebral vždy 1 ml reakční směsi do mikrozkušavky se 100  $\mu$ l 35% kyseliny dusičné, čímž okamžitě došlo k zastavení probíhané reakce.

Poté se připravil „blank pufr“ smícháním 100  $\mu$ l 35% kyseliny dusičné s 1 ml glycinového pufru a „blank enzym“ smícháním 100  $\mu$ l 35% kyseliny dusičné s 1 ml směsi pufru a enzymu ve stejné koncentraci jako při experimentu. Po přípravě blanků bylo v digestoři ke všem mikrozkušavkám přidáno 100  $\mu$ l Iwasaki roztoku I a 200  $\mu$ l Iwasaki roztoku II a mikrozkušavky byly vortexovány. Následně se 100  $\mu$ l od každé směsi napipetovalo do 96-jamkové destičky tak, že každý vzorek byl v 8 jamkách a byla měřena absorbance použitím Eon microplate reader (BioTek) při vlnové délce 460 nm. Výsledky byly analyzovány použitím Gen5 2.06 softwaru.

### 3.5.9 Měření aktivit fluorescenčních substrátů

Nejprve se připravil roztok fluorescenčního ligandu BODIPY-Cl (*8-chloromethyl-3,5-dimethyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*), který se rozpustil do koncentrace 1,86 mM v methanolu a poté byl naředěn těsně před měřením na koncentraci 50  $\mu$ M v DMSO (dimethylsulfoxid). Enzym Dmma dialyzovaný do 50 mM fosfátového pufru byl naředěn tak, aby po přidání 20  $\mu$ l roztoku substrátu byla jeho koncentrace 0,24  $\mu$ g/ml ve fosfátovém pufru a následně napipetován do 96-jamkové destičky v osmi opakováních po 180  $\mu$ l. Kromě enzymu se napipetovala i řada s 180  $\mu$ l 50 mM fosfátového pufru, která sloužila jako negativní kontrola. Měření probíhalo při 30 °C na Snergy H4 Hybrid Plate Reader (Biotek, USA). Reakce byla iniciovaná automatickým přidáním 20  $\mu$ l roztoku substrátu a v pravidelných intervalech byla měřena intenzita fluorescence pomocí excitačních a emisních monochromátorů nastavených na 500 nm a 530 nm s šířkou pásma 10 nm.

Zaznamenaná závislost intenzity fluorescence na čase byla konvertována na závislost koncentrace produktu na čase na základě kalibrační křivky, která byla získána změřením intenzity fluorescence koncentrační řady produktu – příslušného alkoholu po dehalogenasové reakci BODIPY-Cl s enzymem – BODIPY-OH (20  $\mu$ M – 156,28 nM). Data byla zpracovávána v programu Microsoft Excel.

## 3.6 Krystalizace DmmA enzymu a jeho komplexů

### 3.6.1 Krystalizace enzymu

Protein byl zakoncentrován na koncentraci mezi 10 až 13 mg/ml. Pro prvotní krystalizační screening byly použity 96-jamkové krystalizační destičky, do kterých byl protein i precipitační roztok z komerčně dodávaných krystalizačních souprav (Wizard I+II, PACT premium, JSGC-Plus, SG-1, MIDAS, Anions a Cations) napipetován pomocí krystalizačního robota Gryphon LCP crystallization robot (Art Robbins Instruments, USA), kdy došlo k smíchání 100 nl proteinu se 100 nl precipitačního roztoku v přítomnosti 40  $\mu$ l krystalizačního roztoku. Krystalizační experiment probíhal metodou difúze vodní páry (tzv. *vapour diffusion*), kdy je protein v určitém poměru (např. 1:1 či 2:1) smíchán s precipitačním roztokem a hermeticky uzavřen v komůrce se zásobním krystalizačním roztokem vysokého objemu a krystalizace je iniciována odpařováním vody z roztoku s proteinem do zásobního roztoku.

Na základě výsledků z prvotních krystalizačních screeningů byly vybrány nejlepší podmínky, ve kterých byl pozorován nárůst proteinových krystalů. Ty byly následně optimalizovány použitím ručně pipetovaných 15-jamkových krystalizačních destiček s EasyXtal 15-Well Tool objemem zásobního precipitačního roztoku 0,5 ml. Zjišťoval se tak nejvhodnější poměr proteinu a precipitačního roztoku (1:2, 1:1, 2:1; vše v mikrolitrech) a také byl testován mírný gradient koncentrace precipitačního činidla pro zjištění jeho optimální koncentrace. Tímto způsobem byl pak postupně vytvořen vysoce reprodukovatelný systém proteinové krystalizace pro následnou difrakční analýzu na synchrotronu. Krystalizační destičky byly v průběhu experimentů uchovávány v inkubátoru Bench Top Incubator (Molecular Dimensions Ltd, UK) při teplotě 20 °C. Pro vizualizaci stavu krystalizačních destiček byl využit mikroskop Olympus SZX16 model SZX2-ILLK (Olympus, Japonsko) vybavený Canon EOS 1100D kamerou (Canon, Taiwan). Fotografie z mikroskopu byly zpracovány v QuickPhoto Camera 3.2. softwaru (Promicra s.r.o., ČR).

### 3.6.2 Ko-krystalizační experimenty

V této práci byly používány obě základní metody krystalizace enzym-ligand komplexů, tedy tzv. namáčení (*soaking*) krystalů i ko-krystalizace.

Pro namáčení krystalů byl nejprve v 15-jamkové krystalizační destičce krystalizován nativní enzym v apo-formě v dříve již zjištěných a optimalizovaných krystalizačních podmínkách. Poté byly vytvořeny roztoky ligandů v krystalizačním roztoku v koncentraci 10 mM (ligand byl dle potřeby rozpuštěn buď přímo v krystalizačním roztoku nebo v DMSO nebo v isopropanolu). Následně byly krystaly přeneseny v nylonové smyčce do kapičky s roztokem ligandu a ponechány v něm po dobu 16 hodin. Po této inkubaci byly krystaly pozorovány pod mikroskopem.

Při ko-krystalizačních experimentech byl protein ještě před krystalizací smíchán s rozpuštěným ligandem v daném protein:ligand poměru (1:3, 1:5, 1:10), důkladně vortexován a následně inkubován 1 h při 4 °C. Poté byl roztok centrifugován (14000 g/10 min/4 °C), aby se oddělil přebytečný nerozpuštěný ligand či sražené proteiny. Supernatant obsahující solubilní enzym-ligand komplexy byl následně odebrán a krystalizován v 96-jamkových

krystalizačních destičkách pomocí krystalizačního robota i v 15-jamkových destičkách připravených manuálně.

### 3.6.3 Příprava krystalů pro proteinovou nanokrystalografii

Oproti klasické rentgenové krystalografii, vyžaduje proteinová nanokrystalografie velké množství proteinových mikro či nanokrystalů. Principem této metody je krystalizace proteinu o vysoké koncentraci (>30 mg/ml) ve velkém objemu (jednotky ml) krystalizačního roztoku za vzniku nanokrystalů, které jsou pak použitelné pro nanokrystalografické studie. V této práci byly nejprve vybrány podmínky z počátečních krystalizačních screeningů, kde byl pozorován nárůst velikostně definovaných mikrokystalů (jednotky či desítky  $\mu\text{m}$ ). Enzym byl pro tyto účely koncentrován na vysokou koncentraci až 45 mg/ml a následně smíchán v plastové mikrozkušavce s krystalizačním roztokem v poměru 1:1 a inkubován v termostatu při 20 °C. Druhou variantou bylo použití 3 ml skleněných uzavíratelných zkumavek s magnetickým míchátkem, kde byl protein s krystalizačním roztokem opět smíchán v poměru 1:1, a poté ponechán při pokojové teplotě za neustálého míchání (150 otáček/min). Kontrola průběhu krystalizace probíhala vždy každých 24 h odebráním 2  $\mu\text{l}$  roztoku a pozorováním pod mikroskopem.

### 3.6.4 Mražení krystalů

Proteinové krystaly byly těsně před mražením v tekutém dusíku nejprve na pár sekund ponořeny do krystalizačního roztoku obsahující 20% glycerol, který posloužil jako kryoprotektant. Následně byly krystaly vyloveny nylonovou smyčkou a bleskově zmrazeny v tekutém dusíku a uloženy ve speciálních Dewarových kontejnerech, ve kterých byly krystaly uchovávány a transportovány až na difrakční analýzu na synchrotronu.

## 3.7 Difrakční analýza a determinace 3D struktury

Difrakční experimenty byly provedeny na beamline PXIII (vlnová délka 0,71 - 2,25 Å), PILATUS 2M-F detektor, multo-axis PRIGo goniometr) v synchrotronovém urychlovači Swiss Light Source (SLS) ve Viligenu (Švýcarsko) při teplotě 100 K s použitím vlnové délky rentgenových paprsků 1 Å. Difrakční data byly následně zpracovány softwarem XDS (Kabsch, 2010) a Aimless (Evans a Murshudov, 2013). Počáteční fáze byly zjištěny metodou molekulárního nahrazení v programu Phaser (McCoy et al., 2007) z balíčku krystalografických softwarů Phenix (Adams et al., 2010), kdy byla jako model při nahrazení použita již publikovaná struktura DmmA s nižším rozlišením (PDB ID: 3UT1) (Gehret et al., 2012). Zpřesňování strukturního modelu bylo prováděno v několika cyklech automatického refinementu v softwaru phenix.refine (Adams et al., 2010) vždy následovaných manuální výstavbou a úpravou vytvořeného modelu v programu Coot 0.8.4. (Emsley a Cowtan, 2004). Vizualizace proteinových 3D struktur byla provedena pomocí programu PyMol 2.3.3. (Schrödinger, USA).

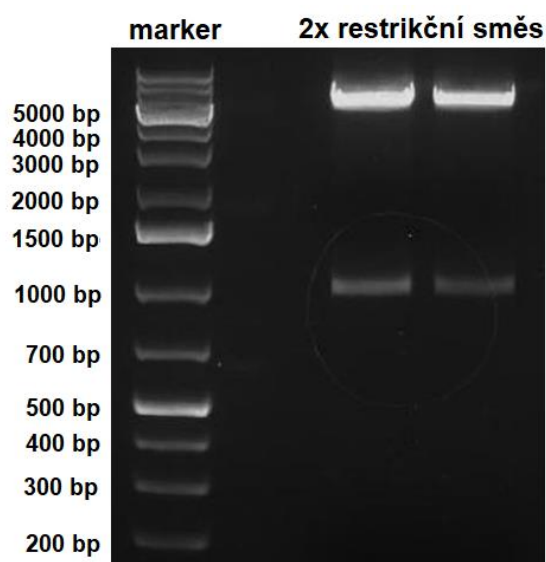


## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Nadprodukce enzymu DmmA v buňkách *E. coli*

#### 4.1.1 Příprava a kontrolní ověření expresního vektoru

Expresní plazmid pET24a:*DmmA* s kanamycinovou rezistencí a vloženým *DmmA* genem mezi restrikčními místy NdeI a HindIII byl pomnožen a izolován z glycerolového stoku *E. coli* DH5 $\alpha$  buněk. Pro ověření přítomnosti *DmmA* genu v plazmidu bylo provedeno jeho kontrolní štěpení restrikčními endonukleázami pro potvrzení přítomnosti *DmmA* genu. Fragmenty odpovídající *DmmA* genu (927bp) a linearizovaného plazmidového vektoru pET24a (5310 bp) byly potvrzeny pomocí separace v agarosovém gelu (**Obrázek 9**). Nukleotidová sekvence *DmmA* genu byla poté potvrzena metodou DNA sekvenování. Gen pro *DmmA* použitý v této práci byl zkrácený z N-konce a kódoval aminokyseliny 44-341. Dále byl také fúzovaný s histidinovou kotvou, která umožnila jeho purifikaci afinitní chromatografií.



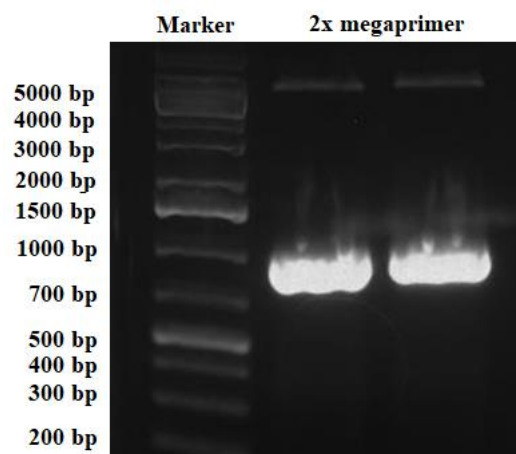
**Obrázek 9.** Kontrolní štěpení (NdeI a HindIII) plazmidu pETt24a:*DmmA* a jeho separace pomocí agarosové gelové elektroforézy. Lajny: M, molekulový marker; 1, štěpený plazmid pETt24a:*DmmA*.

#### 4.2 Příprava katalyticky neaktivní varianty DmmA-H315F

Pro analýzu enzym-substrátového komplexu je potřeba zastavit katalytickou funkci přeměny substrátu na katalytický produkt, aby v enzymu zůstal navázaný kovalentní intermediát reakce. V této práci tohoto bylo dosaženo cíleným nahrazením katalytického histidinu (H315) enzymu *DmmA* za aminokyselinu fenylalanin. Výsledný mutant nese označení *DmmA*-H315F.

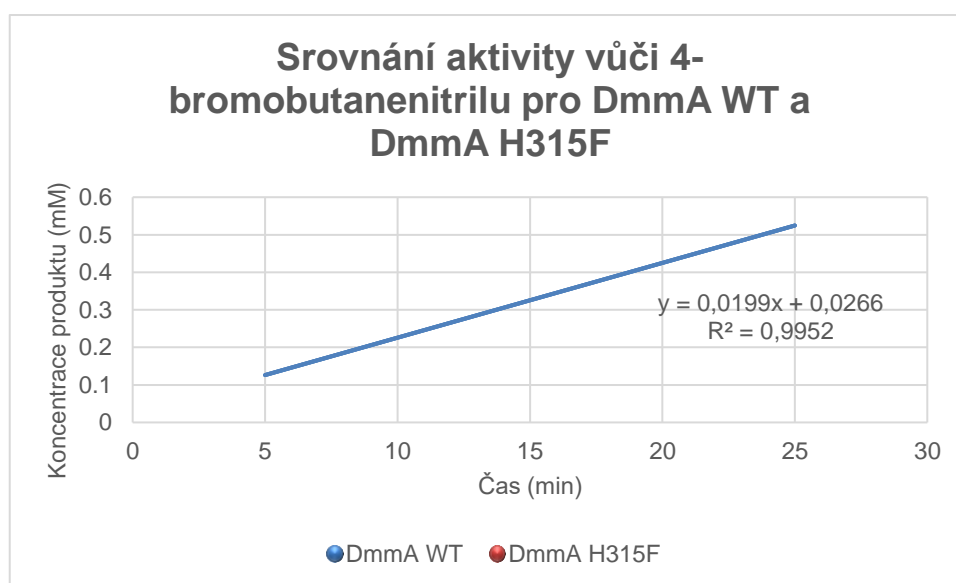
Mutagenese probíhala metodou PCR s použitím megaprimeru. Nejprve byl navržen a chemicky syntetizován primer pro PCR o délce 45 bp nesoucí danou mutaci, který byl použit v prvním kole PCR, kdy došlo k vytvoření megaprimeru. Ten byl následně separován použitím gelové elektroforézy (**Obrázek 10**). Poté byl tento megaprimer použit v druhém kole PCR za vzniku mutovaného plazmidu. Templátová DNA byla odstraněna štěpením enzymem DpnI a získaný mutovaný plazmid byl následně transformován do buněk *E. coli* DH5 $\alpha$ . Misky

s narostlými koloniemi byly poté podrobeny screeningu za účelem najít kolonii nesoucí plazmid s požadovanou mutací v *DmmA* genu, která byla ověřena DNA sekvenováním.



**Obrázek 10.** Separace nasyntetizovaného megaprimeru v agarózovém gelu, ze kterého byl mutační (H315F) megaprimer následně izolován pro mutagenizační reakci.

Pro ověření úspěšnosti mutagenese byla poté měřena dehalogenasová aktivita DmmA-H315F mutantu paralelně s enzymem divokého typu (DmmA) vůči substrátu 4-bromobutanenitrilu (Buryska et al., 2017) a vůči fluorescenčnímu substrátu BODIPY-Cl (*8-chloromethyl-3,5-dimethyl-4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene*). Katalytická aktivita DmmA a DmmA-H315F vůči 4-bromobutanenitrilu byla měřena v triplikátu pomocí Iwasaki metody (Iwasaki, 1952). Závislost naměřené koncentrace produktu reakce na čase ukazuje **Obrázek 11**. Enzym DmmA vykazoval specifickou aktivitu vůči 4-bromobutanenitrilu 116,2 nmol.s<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>, zatímco varianta DmmA-H315F ani při nejvyšší použité koncentraci enzymu (1 mg/ml) nevykazoval žádnou aktivitu (**Tabulka 2**).

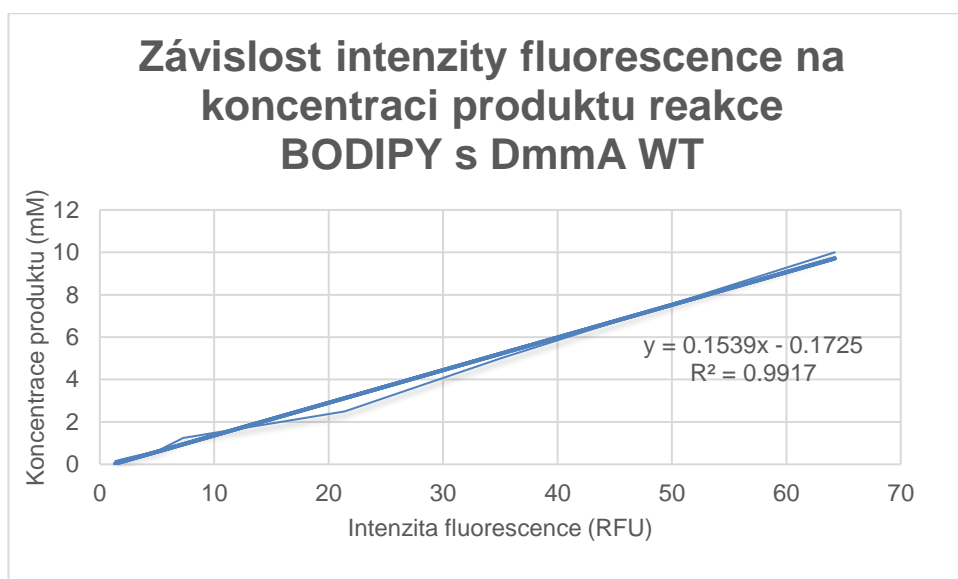


**Obrázek 11.** Srovnání aktivity DmmA WT a DmmA-H315F vůči 4-bromobutanenitrilu metodou Iwasaki. Z grafu vyplývá, že mutant DmmA-H315F nevykazuje vůči substrátu žádnou aktivitu.

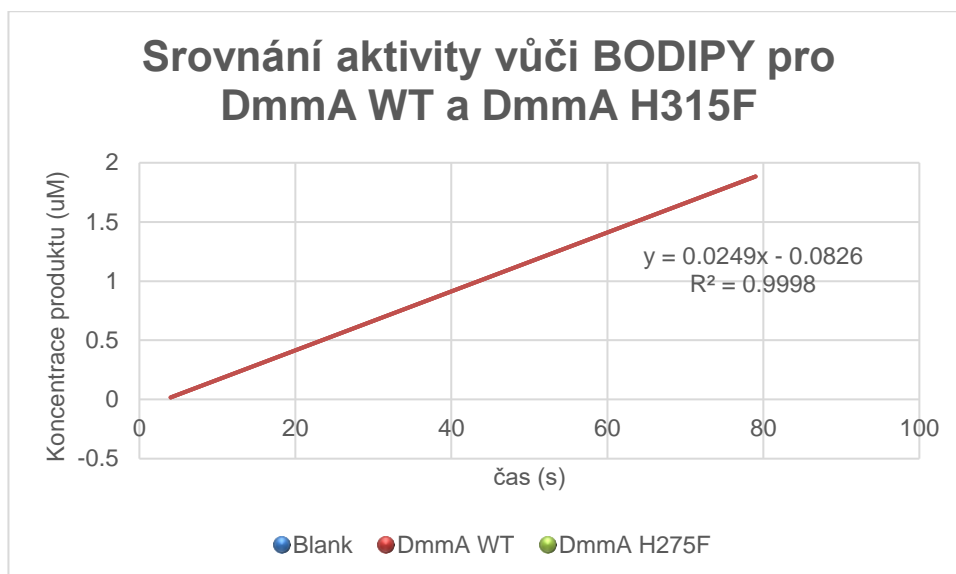
**Tabulka 2.** Výsledky měření specifické aktivity enzymu DmmA WT vůči 4-bromobutanenitrilu metodou Iwasaki.

DmmA WT	Koncentrace enzymu (mg/ml)	Počáteční rychlost ( $\mu\text{M}/\text{min}$ )	Specifická aktivita ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
Experiment 1	0,2	20,2	0,10245
Experiment 2	0,2	17,8	0,13489
Experiment 3	0,2	21,9	0,11120
Průměr		20,0	0,11618

Katalytická aktivita DmmA a DmmA-H315F vůči BODIPY-Cl byla měřena *steady-state* kinetickým experimentem. Kinetická data byly zaznamenávána v pravidelných intervalech po smíchání enzymu s 5 mM roztokem substrátu do výsledné koncentrace enzymu 0,24  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Naměřená intenzita fluorescence byla konvertována na koncentraci produktu pomocí kalibrační křivky, která byla získána změřením intenzity fluorescence koncentrační řady produktu reakce BODIPY-OH (**Obrázek 12**). Veškerá kinetická data byla proložena lineární funkcí a z naměřených dat byla dopočítána specifická aktivita enzymu. Enzym DmmA vůči BODIPY-Cl vykazoval specifickou aktivitu 103,8  $\text{nmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  (**Tabulka 3**). Obdobný experiment s DmmA-H315F potvrdil, že tento mutant nevykazuje žádnou aktivitu vůči fluorescenčnímu substrátu BODIPY-Cl (**Obrázek 13**).



**Obrázek 12.** Kalibrační křivka závislosti koncentrace produktu reakce BODIPY-Cl s enzymem DmmA na intenzitě fluorescence.



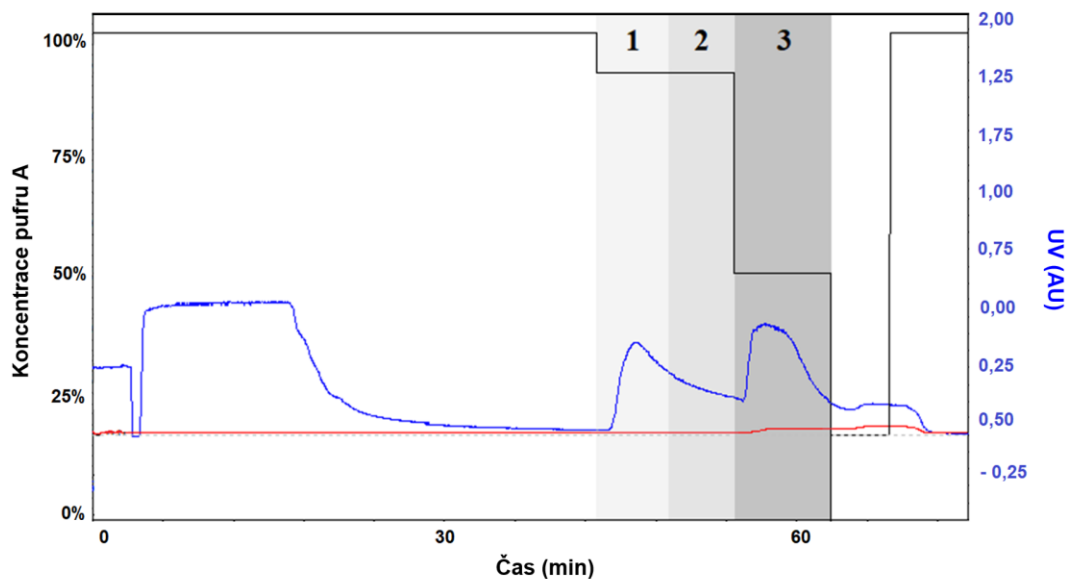
**Obrázek 13.** Srovnání aktivity DmmA a DmmA-H315F vůči BODIPY-Cl. Z grafu vyplývá, že mutant DmmA-H315F nevykazuje vůči BODIPY žádnou aktivitu.

**Tabulka 3.** Výsledná specifická aktivita a reakční rychlost DmmA vůči BODIPY-Cl.

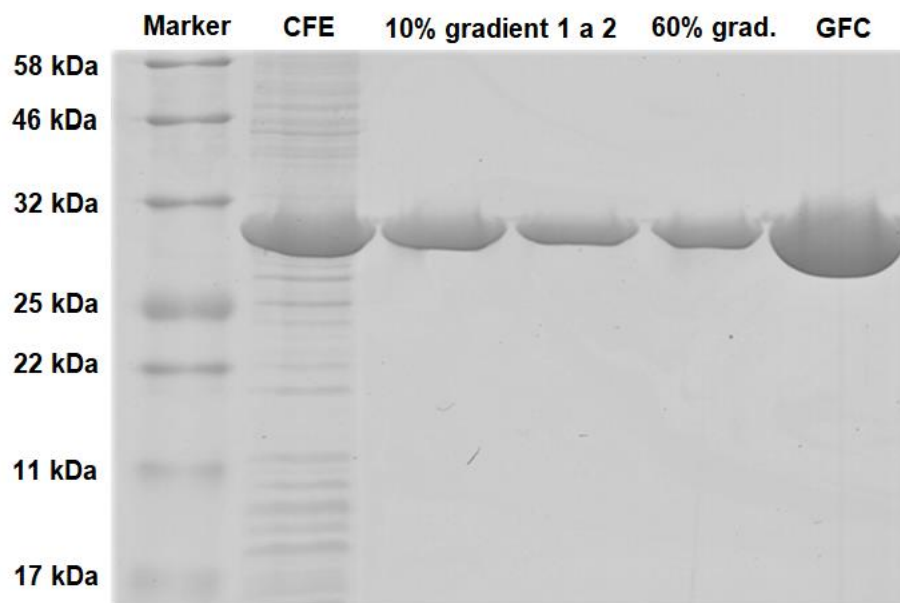
Enzym	Koncentrace enzymu (mg/ml)	Počáteční rychlost ( $\mu\text{M/s}$ )	Specifická aktivita ( $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ )
DmmA WT	0,24	0,0249	0,10375

### 4.3 Optimalizace produkce a purifikace DmmA

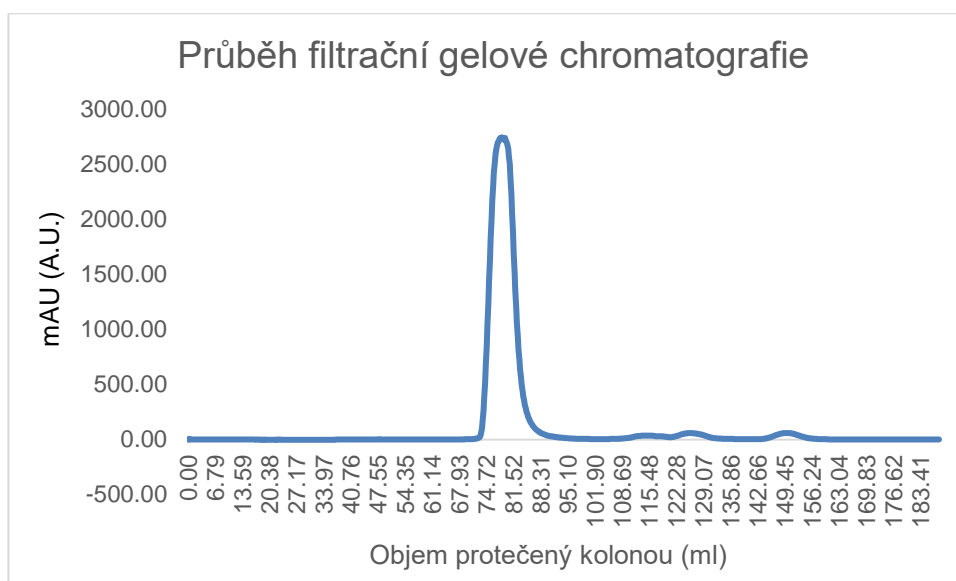
Izolovaný plazmid pET24a:*DmmA* byl následně úspěšně transformován do buněk *E. coli* BL21DE3 a byla indukována exprese *DmmA* genu. Po dezintegraci buněk sonikací byl bezbuněčný extrakt aplikován na afinitní Ni-NTA kolonu, kde byl DmmA purifikován afinitní chromatografií. Typický záznam z afinitní chromatografie proteinu DmmA je ukázán na **Obrázku 14**. Následně byl vzorek dočištěn použitím filtrační gelové chromatografie (**Obrázek 16**). Průběžná čistota proteinu při jednotlivých krocích purifikace byla analyzována použitím SDS-PAGE elektroforézy (**Obrázek 15**). Frakce DmmA proteinu s nejvyšší čistotou (vyšší než 95%) po gelové chromatografii byly následně použity pro krystalizační experimenty. Průměrný výtěžek vysoce čistého DmmA proteinu v krystalizační kvalitě získaný po dvou krocích chromatografické purifikace byl  $\sim 165$  mg proteinu na litr buněčné kultury.



**Obrázek 14.** Typický průběh afinitní chromatografie. (1) První část frakce odpovídající 10% gradientu imidazolu, (2) Druhá část frakce odpovídající 10% gradientu imidazolu, (3) 60% gradient imidazolu (dále použitý pro gelovou chromatografií).



**Obrázek 15.** Kontrola čistoty proteinu během purifikačního procesu SDS-PAGE elektroforézou: CFE – bezbuněčný extrakt (*cell free extract*), 10% gradient 1 – 10% gradient imidazolu 1 (odpovídá obrázku 9), 10% gradient 2 – 10% gradient imidazolu 2 (odpovídá obrázku 9), 60% grad. – 60% gradient imidazolu (odpovídá obrázku 9), GFC (gelová filtrační chromatografie)– protein po gelové chromatografii.

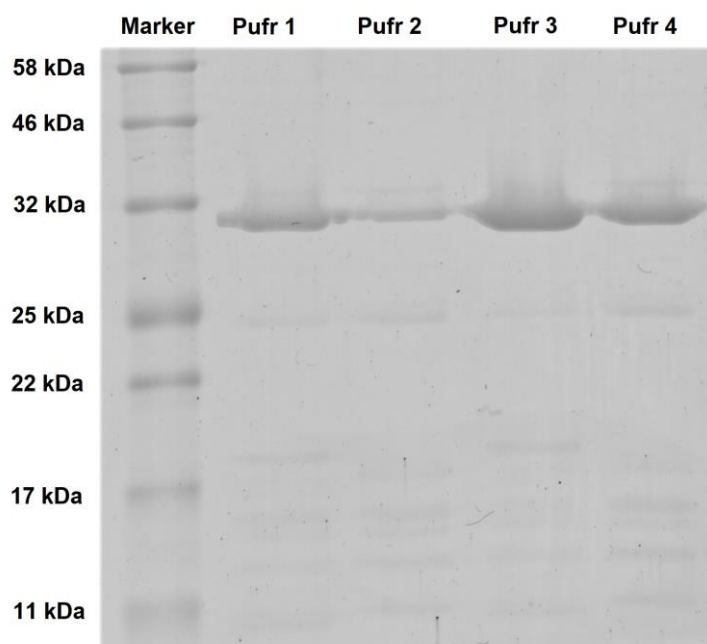


**Obrázek 16.** Typický průběh gelové filtrační chromatografie.

Z počátku byl protein purifikován v pufru obsahujícím 50 mM NaCl a 10 mM Tris (pH 8), ve kterém jsou přítomné chloridové anionty (Cl<sup>-</sup>). V publikaci Gehret et al. (2012) bylo ukázáno, že struktura enzymu Dmma má ve svém aktivním místě navázaný chloridový aniont, který pocházel z purifikačního či krystalizačního pufru. Bylo tudíž nasnadě upravit purifikační protokol tak, aby neobsahoval žádné halogenidové anionty, které by mohly interferovat s vazbou substrátových molekul v aktivním místě enzymu během ko-krystalizačních experimentů. Pro tyto účely byly provedeny purifikační experimenty, kde se testovala vhodnost použití 4 alternativních purifikačních pufrů: Pufr 1: 50 mM octan sodný, 10 mM Tris (pH 7); Pufr 2: 50 mM octan sodný, 10 mM Tris, (pH 8); Pufr 3: 50 mM formiát sodný, 10 mM Tris (pH 8) a Pufr 4: 50 mM formiát sodný, 10 mM Tris (pH 7). Po proběhlé purifikaci byly izolované proteiny inkubovány v lednici (6°C) po dobu 18 h, aby byla ověřena jeho stabilita. Druhý den byly enzymy koncentrovány na polovinu původního objemu a následně byla stanovena spektrofotometricky jejich koncentrace. Výsledná pozorování ukázala, že Dmma protein je stabilní ve všech testovaných pufrch, ale výtěžek solubilního proteinu se u jednotlivých pufrů liší (**Tabulka 4**). Následně byl proveden test čistoty purifikace použitím SDS elektroforézy (**Obrázek 17**). Jelikož všechny pufrы ukázaly shodnou čistotu, pro další experimenty byl vybrán pufr s nejvyšším výtěžkem, tedy Pufr 4.

**Tabulka 4.** Srovnání výtěžnosti proteinu v jednotlivých testovaných roztocích (Pufr 1-4).

Pufr	Koncentrace enzymu
Pufr 1	0,337 mg/ml
Pufr 2	0,135 mg/ml
Pufr 3	1,188 mg/ml
Pufr 4	0,384 mg/ml



**Obrázek 17.** Srovnání čistoty proteinu po purifikaci s resinem při použití testovaných pufrů.

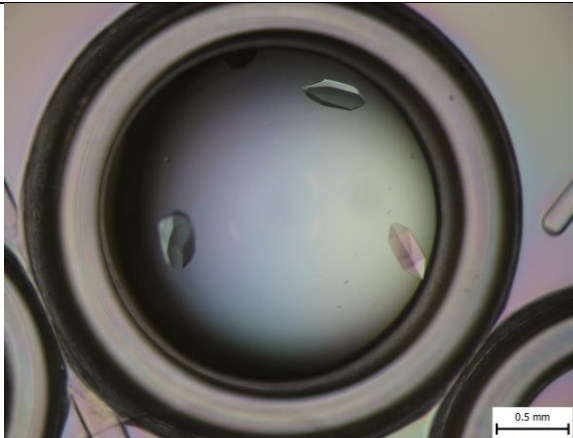
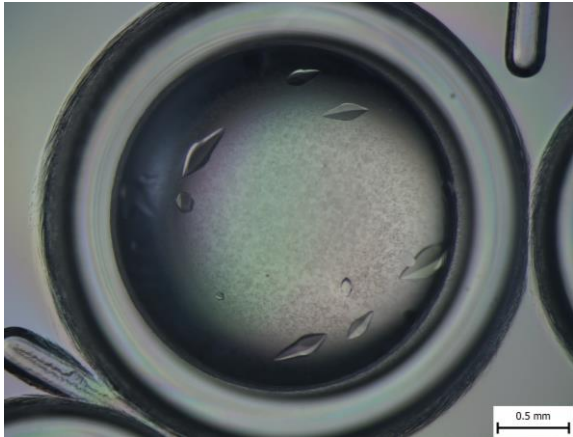

## 4.4 Krystalizační experimenty

### 4.4.1 Krystalizace enzymu v nepřítomnosti substrátu (apo-DmmA)

Čerstvě izolovaný protein DmmA byl použit pro počáteční screening krystalizačních podmínek. Krystaly narostly v celkem 13 různých podmínkách (**viz. Příloha 1**), z nichž bylo vybráno 7 podmínek s nejlepšími krystaly (AmSO<sub>4</sub> G1, Anions A1, Anions B3, Anions C1, Anions C6, Anions C7, PACT C10, ), které byly následně zopakovány ve větším objemu kapky (3  $\mu$ l).

Nakonec byly vybrány 3 nejlepší podmínky, které se následně optimalizovaly ve větším objemu kapky použitím gradientu koncentrace precipitantu (**Tabulka 5**). Jelikož protein krystalizoval reprodukovatelně ve velké krystaly ve všech podmínkách, destičky s takto nastaveným gradientem byly používány k získání krystalů pro strukturní analýzu. Co se poměru protein:precipitant týče, DmmA krystalizoval nejlépe při poměru 2:1 nebo 1:1 protein:precipitant. Krystaly s takto nastavenými podmínkami (Anions A1, C6 a C7) při difrakční analýze sdílely stejnou prostorovou grupu *P6* a difraktovaly do rozlišení 2,1-1,6 Å.

**Tabulka 5.** Nejlepší vybrané podmínky krystalizace DmmA a jejich gradienty použité při získání krystalů pro strukturní analýzu

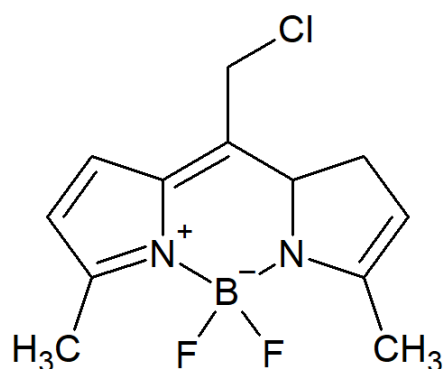
Podmínka	Složení	Fotografie
<b>Anions A1</b>	0,1 M octan sodný, pH 4,6 2,5 M octan sodný Gradient při optimalizaci: 2,4 M – 2,6 M octan sodný	
<b>Anions C6</b>	0,1 M octan sodný, pH 4,6 1,2 M malonát sodný Gradient při optimalizaci: 1,15 M – 1,3 M malonát sodný	
<b>Anions C7</b>	0,1 M MES, pH 6,5 3,5 M formiát sodný Gradient při optimalizaci: 3,4 M – 3,6 M formiát sodný	

#### 4.4.2 Krystalizace enzym-substrátového komplexu

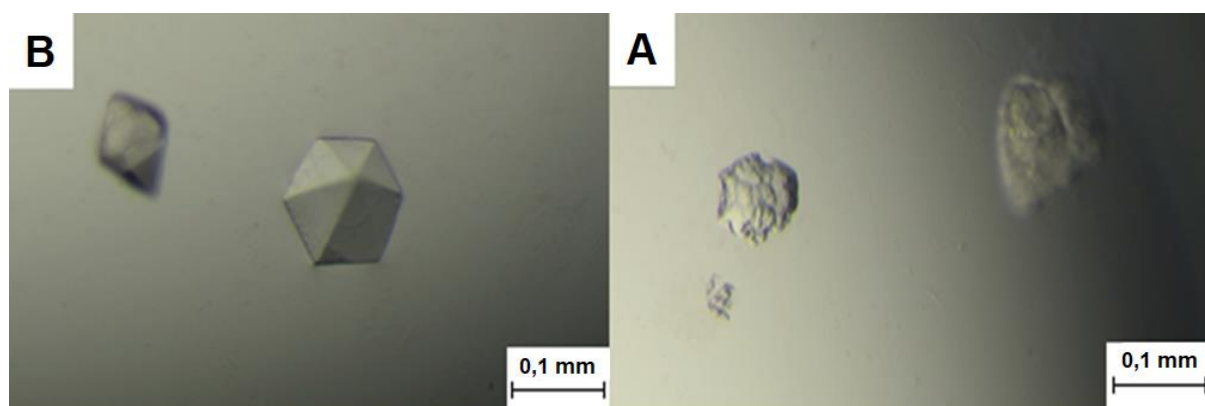
Pro krystalizaci enzym-substrátového komplexu DmmA/BODIPY-Cl (**Obrázek 18**) byla nejprve použita metoda namáčení krystalů v roztoku ligandu. Ligand (BODIPY-Cl) byl rozpuštěn ve 100% DMSO na koncentraci 100 mM a následně tento roztok přidán do krystalizačního roztoku použitého krystalu do výsledné koncentrace ligandu 10 mM. Po přidání roztoku ligandu byla ovšem pozorována jeho agregace, pravděpodobně díky jeho



hydrofobnímu charakteru. V následných optimalizacích byl proto ligand (100 mM BODIPY-Cl) rozpuštěn v krystalizačním roztoku, do kterého byl přidáno DMSO rozpouštědlo v poměru rozpouštědlo:voda 1:1. V této směsi se ligand rozpustil dobře, bez pozorovatelných náznaků agregace, nicméně při namáčení DmmA krystalů v tomto roztoku došlo během krátké doby (10 min) k jejich poškození (popraskání) a do 1 h byly biologické krystaly úplně rozpuštěny (**Obrázek 19**). Během dalších optimalizačních kroků se zjistilo, že DmmA krystaly rovněž postupně degradují i při použití krystalizačního roztoku bez DMSO. Na základě těchto zjištění bylo proto upuštěno od namáčení krystalů a následující experimenty byly soustředěny na optimalizaci ko-krystalizačních metod DmmA proteinu v přítomnosti substrátových molekul.



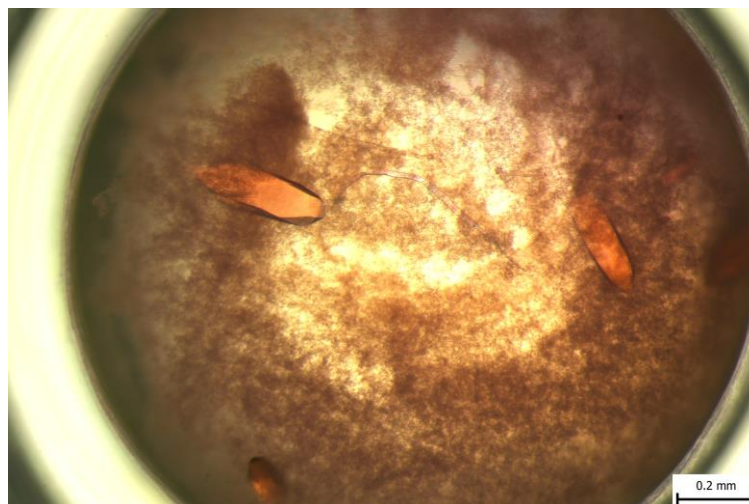
**Obrázek 18.** Struktura BODIPY.



**Obrázek 19.** Degradace DmmA krystalů v přítomnosti ligandu BODIPY-Cl. (A) Mikrofotografie DmmA krystalů inkubovaných v krystalizačním roztoku (0,1 M octan sodný pH 4,6, 1,2 M malonát sodný) v nepřítomnosti BODIPY-Cl. (B) Mikrofotografie degradovaných DmmA krystalů inkubovaných 10 min v krystalizačním roztoku obsahujícím ligand BODIPY-Cl a rozpouštědlo DMSO (0,1 M octan sodný pH 4,6, 1,2 M malonát sodný, 10 mM BODIPY-CL rozpuštěného v DMSO).

V rámci ko-krystalizačních experimentů se pracovalo jak s enzymem divokého typu DmmA, tak s jeho katalyticky neaktivní variantou DmmA-H315F. Enzym byl vždy smíchan s roztokem 100 mM BODIPY-Cl finálního enzym:ligand poměru 1:3 a komplex byl krystalizován v optimalizovaných krystalizačních roztocích odvozených od Anions A1, Anions C6 a Anions C7, kde se rovněž testoval vliv různých poměrů protein:precipitant (1:1, 2:1, 1:2). Z těchto experimentů se podařilo získat proteinové krystaly pouze při použití roztoků odvozených od Anions C6 a Anions C7. Narostlé proteinové krystaly měly načervenalou barvu

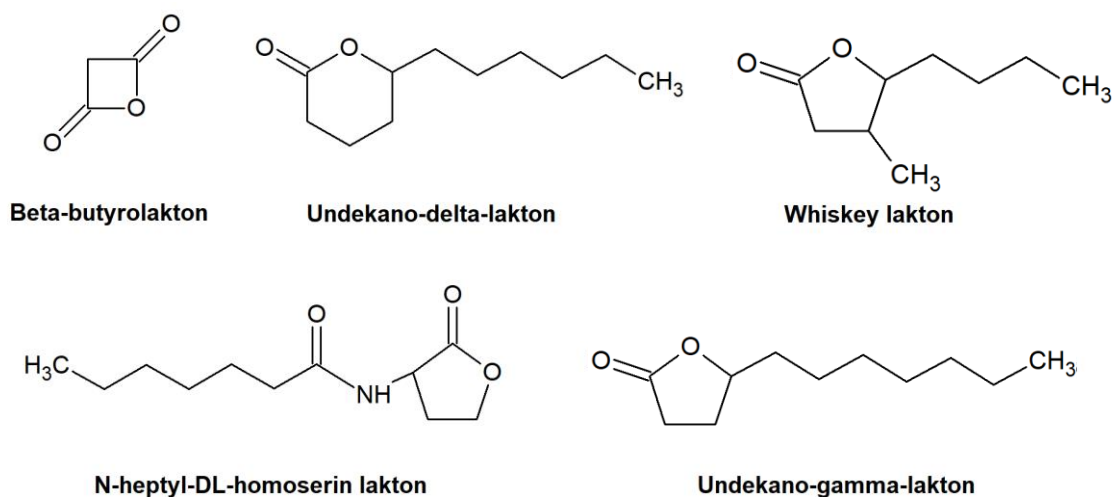
při pozorování v mikroskopu, což indikovalo že fluorescenční substrát BODIPY-Cl je přítomen v krystalu (**Obrázek 20**).



**Obrázek 20.** Krystaly DmmA-H275F získané v přítomnosti fluorescenční substrátové molekuly BODIPY-Cl.

Při ko-krystalizaci DmmA či DmmA-H315F s laktonovými molekulami byly nejprve připraveny krystalizační screeniny s třemi vybranými typy laktonů: i) whiskey laktonem, ii) undekano-gamma-laktonem a iii) beta-butyrolaktonem. Zásobní roztoky laktonů (chemická čistota >99,5 %) byly vždy stokrát naředěny ve vodě a poté smíchány s proteinovým vzorkem v enzym-ligand poměru 1:5 a krystalizovány s použitím komerčně dodávaných krystalizačních souprav Anions, SG1, Wizard, JCSG+ a PACT-premier. Výsledky ukázaly, že protein DmmA-H315F v přítomnosti laktonových molekul krystalizoval v mnoha různých podmínkách. V případě whiskey laktonu bylo identifikováno 69 krystalizačních podmínek, u undekano-gamma-laktonu 71 podmínek a u beta-butyrolaktonem celkem 43 různých krystalizačních podmínek (**viz Příloha 2**). Vybrané velké krystaly z těchto screeningů, které narostly v odlišných podmínkách než původně krystalizovaný apo-enzym, byly zamrazeny pro difrakční analýzu.

Paralelně s krystalizačními screeniny v 96-jamkových destičkách byla provedena i ko-krystalizace v 15-jamkových krystalizačních destičkách v optimalizovaných podmínkách, které již byly dříve stanoveny pro apo-enzym (**Tabulka 5**), tedy Anions A1, Anions C6 a Anions C7. V případě ko-krystalizace v 15-jamkových destičkách byly kromě undekano-gamma-laktonu, beta-butyro laktonu a whiskey laktonu použity ještě N-heptyl-DL-homoserin lakton a undekano-delta-lakton (**Obrázek 21**). Výsledky těchto experimentů souhrnně zachycuje **Tabulka 6**. Narostlé krystaly ze všech testovaných podmínek byly zamrazeny pro difrakční analýzu.

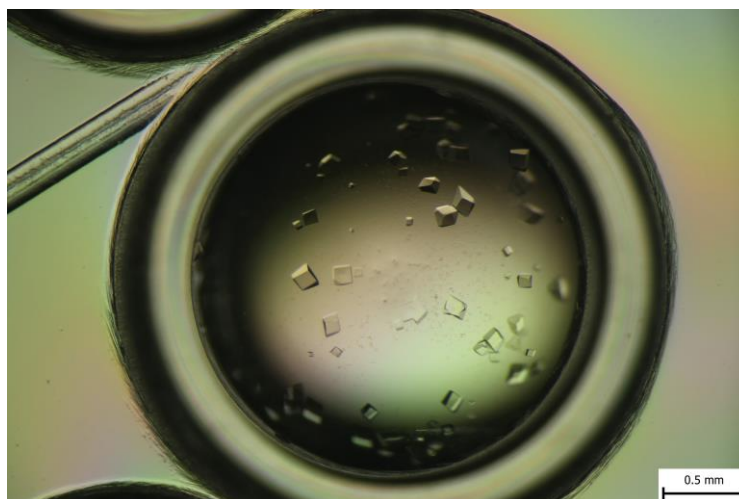


**Obrázek 21.** Struktury v této práci používaných laktonů.

**Tabulka 6.** Krystalizační hity pro DmmA a DmmA-H315F s laktonovými molekulami.

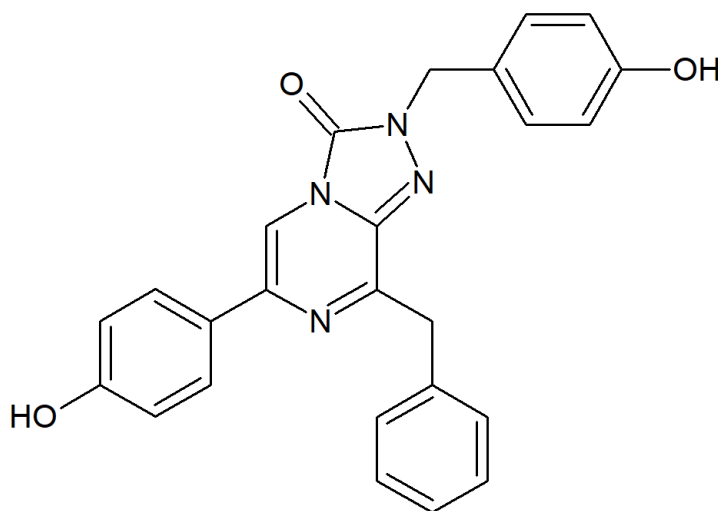
	DmmA	DmmA-H315F
<b>Undekano-gamma-lakton</b>	Anions C6 a Anions C7	Anions C6
<b>Undecano-delta-lakton</b>	Anions C6 a Anions C7	Anions C6
<b>Whiskey lakton</b>	Anions C6 a Anions C7	Anions C6
<b>Beta-butyrolakton</b>	Anions A1	Komplex nekrystalizoval
<b>N-heptyl-DL-homoserin lakton</b>	Komplex nekrystalizoval	Anions C6

Při měření difrakčních dat na synchrotronu z krystalů izolovaných v jiných podmínkách než standardní Anions A1, C6 a C7 byly nalezeny nové krystalizační podmínky (1 M sukcinát sodný, 0,1 M HEPES pH 7), kdy protein krystalizoval v jiné prostorové grupě *P321* než ostatní krystaly. Krystaly patřící do prostorové grupy *P321* také difraktovaly do podstatně vyššího rozlišení 1,2 Å. Po zjištění těchto výsledků byla provedena krystalizace DmmA WT a DmmA-H315F bez ligandu v těchto podmínkách s poměrem protein:precipitační roztok 1:1 na 15-jamkové destičce v kontrole s Anions C6 a C7. Kontroly vykrytalizovaly v obou případech jako obvykle, v nových sukcinátových podmínkách však vykrytalizoval pouze mutantní enzym DmmA-H315F (**Obrázek 22**).



**Obrázek 22.** Morfologie krystalů DmMA-H315F v podmínkách 1M sukcinát sodný, 0,1 M HEPES pH 7.

Enzym DmMA byl také ko-krystalizován z azokoelenterazinem IPPZ145 (**Obrázek 23**). Komplex byl krystalizován ve standardních podmínkách pro DmMA enzym (Anions A1, C6, a C7) v poměru protein:precipitační roztok 1:1 a v molárním poměru enzym:ligand 1:3. Enzym s tímto ligandem vykristalizoval v podmínkách Anions C6 a následně byl zamražen pro difrakční analýzu.

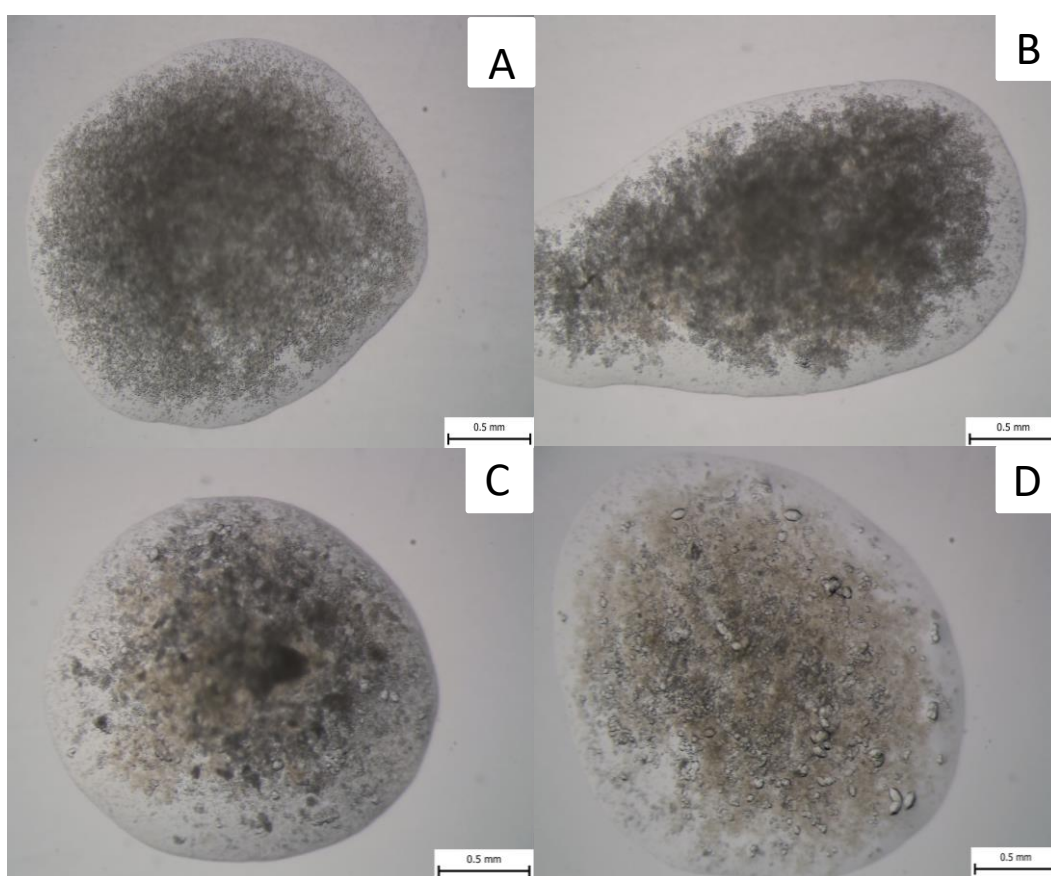


**Obrázek 23.** Struktura azokoelenterazinu IPPZ145.

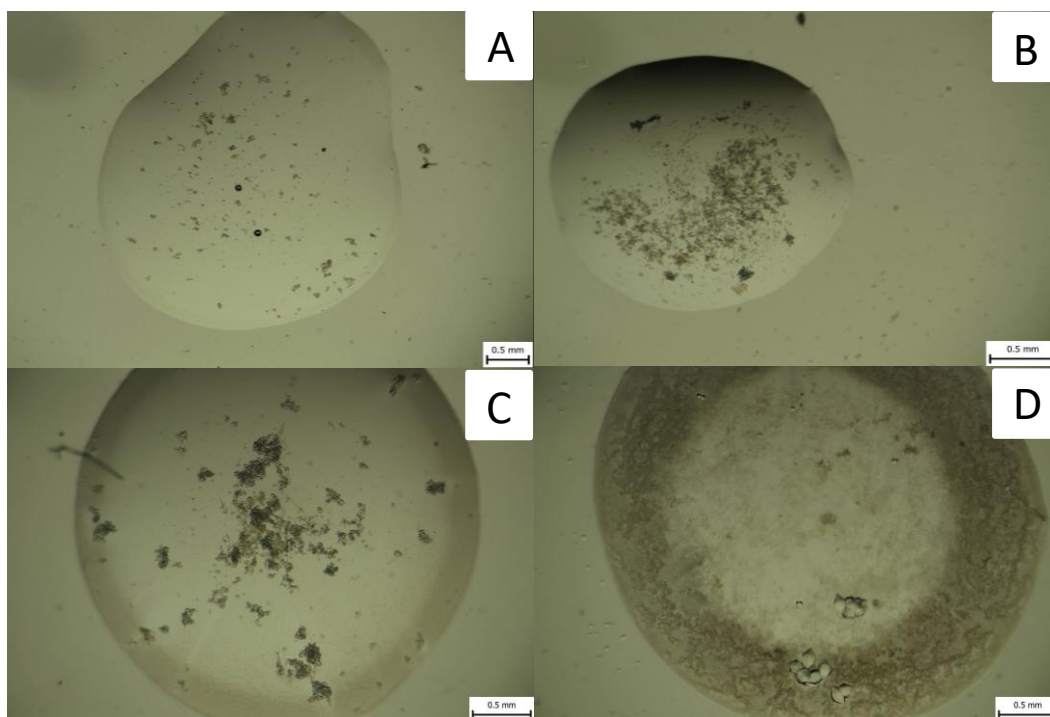
#### 4.4.3 Příprava mikrokrytalů pro časově rozlišenou krystalografii

Z počátečních screeningů krystalizace DmMA byly vybrány podmínky Anions C1 (3,5 M formiát sodný a 0,1 M octan sodný pH 4,6). Na základě tohoto roztoku byl navržen gradient koncentrací srážecí soli (formiát sodný): 3,4 M, 3,45 M, 3,5 M a 3,55 M. Protein byl zakoncentrován na koncentraci kolem 45 mg/ml a následně smíchán s precipitačním roztokem v poměru 1:1 (30  $\mu$ l + 30  $\mu$ l) v 1,5-ml mikrozkuhavce a ponechán v inkubátoru při 20 °C. Viditelné mikrokrytalové se začaly objevovat už po 48 h inkubace ve všech testovaných podmínkách. Nicméně bylo zaznamenáno, že se zvyšující koncentrací srážecí soli roste také velikost krystalů.

Paralelně byla provedena i krystalizace DmmA proteinu ve skleněných vialkách s magnetickým míchátkem, rovněž v poměru enzym:krystalizační roztok 1:1 (200  $\mu$ l + 200  $\mu$ l). Vialky byly inkubovány na magnetické míchače při otáčkách 130 rpm při laboratorní teplotě. Ve skleněných vialkách ani po dvou týdnech přítomnost proteinových krystalů nebyla pozorována a protein byl pouze vysrážený. Tento experiment se proto dále optimalizoval použitím koncentrací formiátu sodného: 3,45 M, 3,4 M, 3,35 M a 3,3 M a protein byl krystalizován jak v polypropylenových mikrozkuřavkách v enzym:krystalizační roztoku v poměru 1:1 (30  $\mu$ l + 30  $\mu$ l), které byly ponechány v inkubátoru při 20 °C, tak i v skleněných vialkách bez míchání v poměru 1:1 (200  $\mu$ l + 200  $\mu$ l), které byly ponechány při pokojové teplotě. Po 48 h byla pozorována geneze mikro-krystalů ve všech podmínkách jak v mikrozkuřavkách, tak i ve skleněných vialkách. Jako nejlepší koncentrace se ukázal 3,4 M formiát sodný. Průběh experimentů je zachycen na **Obrázcích 24 a 25**.



**Obrázek 24.** Průběh krystalizačního experimentu v menším objemu v propylenových mikrozkuřavkách v inkubátoru při 20 °C. A) Koncentrace precipitantu 3,45 M; B) Koncentrace precipitantu 3,4 M; C) Koncentrace precipitantu 3,35 M; D) Koncentrace precipitantu 3,3 M.



**Obrázek 25.** Průběh krystalizačního experimentu ve větším objemu v skleněných vialkách na magnetické míchačce při pokojové teplotě. A) Koncentrace precipitantu 3,45 M; B) Koncentrace precipitantu 3,4 M; C) Koncentrace precipitantu 3,35 M; D) Koncentrace precipitantu 3,3 M.

## 4.5 Strukturní analýza enzymu DmmA

Struktura DmmA bez ligandu byla vyřešena s rozlišením 1,85 Å ve skupinové grupě P62 molekulárním nahrazením dvěma kopiemi enzymatické asymetrické jednotky. Difrakční data a statistiky strukturního modelu jsou shrnuty v **Tabulce 7**.

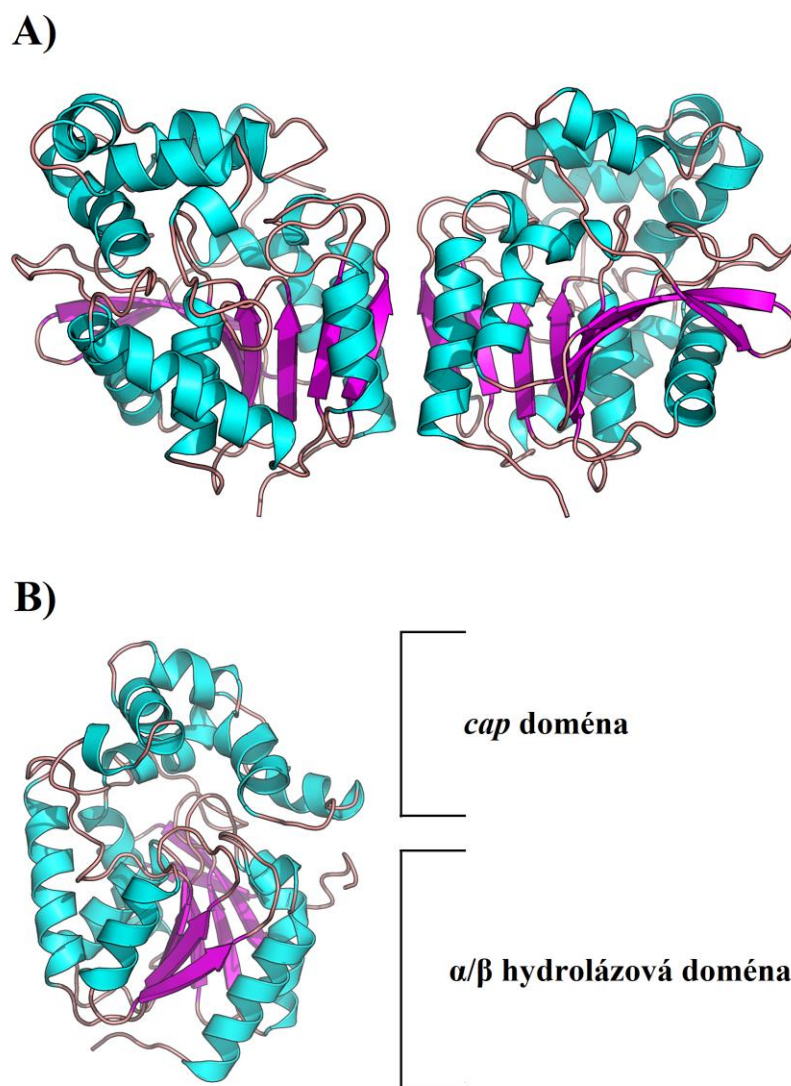
**Tabulka 7.** Difrakční data a statistiky strukturního modelu DmmA.

Sběr dat	DmmA
Vlnová délka (Å)	1
Prostorová grupa	P62
Rozměry základní buňky	
a, b, c (Å)	101,85; 101,85; 121,32
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (Å)	41,45 – 1,853 (1,919 – 1,853)
Počet naměřených reflexí	1 226 420 (119 911)
Počet unikátních reflexí	60 283 (5 918)
$R_{\text{merge}}$	0,078 (2,997)
$I / \sigma I$	22,66 (1,42)
Kompletnost (%)	99,16 (96,87)
Multiplicita	20,3 (20,3)
CC(1/2)	1 (0,833)
Wilsonův B-faktor	37,98
<b>Rafinace</b>	
Rozlišení (Å)	41,45 – 1,853 (1,919 – 1,853)

Počet reflexí	59 973 (5 847)
Rwork / Rfree	0.195 / 0.231
Počet atomů	
Protein	4 647
Ligand	2
Voda	204
B-faktor	
Protein	48,91
Ligand	51,41
Voda	52,87
R.m.s odchylka od ideálnosti	
Délka vazby (Å)	0,007
Vazebné úhly (°)	0,86
Ramachandran preferované (%)	96,8
Ramachandran povolené (%)	3,20
Ramachandran odlehle (%)	0

Jako model pro determinaci struktury byla použita již publikovaná struktura DmmA s nižším rozlišením (PDB 3UT1) (Gehret et al., 2012). Protein se v krystalu vyskytoval jako dimer, což souhlasí i s elučními objemy při gelové chromatografii. Jednotlivé monomery spojují převážně nekovalentní polární a hydrofobní vazby s převahou těch polárních. Finální model obsahuje aminokyseliny 43-341 v monomeru A i v monomeru B.

Monomer DmmA se skládal z  $\alpha/\beta$  hydrolázové domény a víčkové domény. Hlavní  $\alpha/\beta$ -hydrolázová doména se skládala z osmi  $\beta$ -skládaných listů, z nichž  $\beta 2$  je v antiparalelní pozici vůči ostatním, a z šesti  $\alpha$ -helixů. Víčková doména byla tvořena 5  $\alpha$ -helixy spojenými šesti smyčkami (**Obrázek 26**).

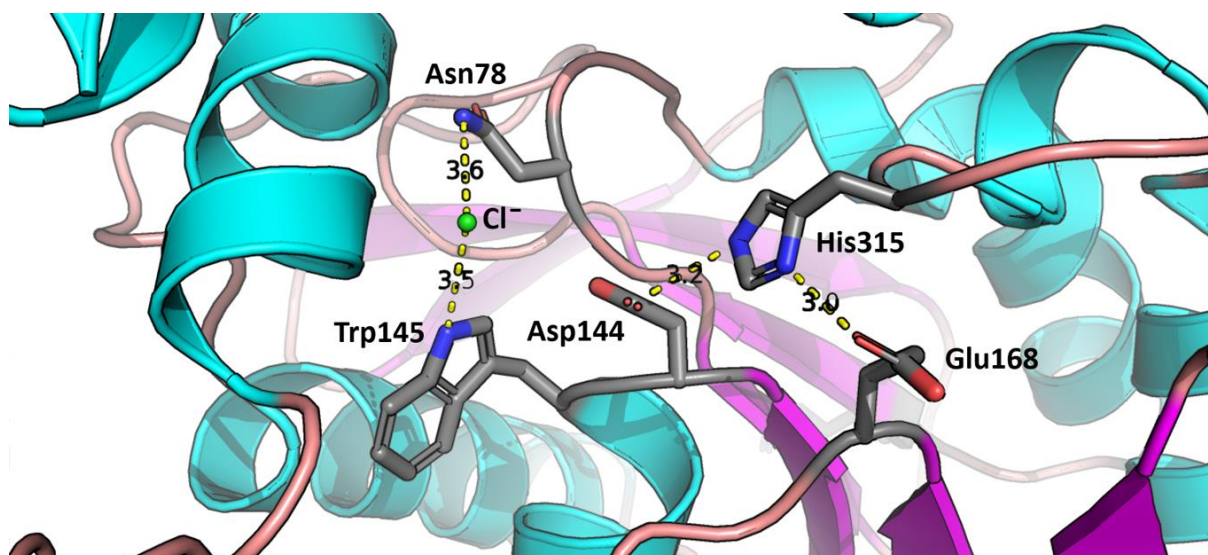


**Obrázek 26.** Krystalová struktura apo-formy DmmA. (A) DmmA dimer. (B) DmmA monomer s vyznačenými doménami.

Aktivní místo enzymu se nachází mezi oběma doménami v hydrofobní kavitě, která je přístupná skrze intramolekulární tunely. DmmA má podobně jako ostatní halogenalkandehalogenasy v aktivním místě 5 katalytických aminokyselin tvořících tzv. katalytickou pentádu. Jedná se o nukleofilní aspartát (Asp144), bázi (His315), katalytickou kyselinu (Glu168) a dvě halogenid-stabilizující aminokyseliny (Asn78 a Trp145).

V aktivním místě byl nalezen chloridový ion (z pufru obsahující 50 mM chlorid sodný), který byl na místě stabilizovaný halogenid-stabilizujícími aminokyselinami (**Obrázek 27**). Při mutaci histidinu H315 za fenylalanin u DmmA-H315F nebyly kromě změny katalytické aminokyseliny zaznamenány žádné změny ve struktuře enzymu.





**Obrázek 27.** Aktivní místo enzymu DmmA s vyznačenou katalytickou pentádou a chloridovým aniontem.

#### 4.6 Strukturní analýza komplexu DmmA/BODIPY-Cl

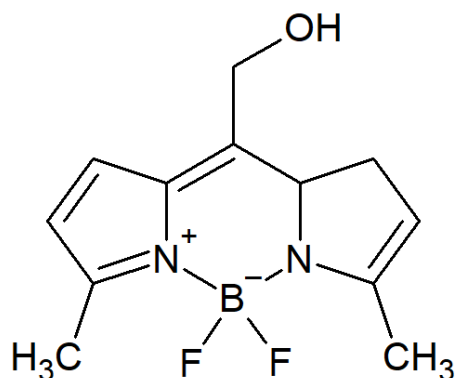
Struktura komplexu DmmA s BODIPY-Cl byla řešena jak s enzymem DmmA, tak s katalyticky neaktivním mutantem DmmA-H315F, protože obě varianty enzymy s BODIPY-Cl vykristalizovaly v jasně červené krystaly (**Obrázek 20**). Struktura s enzymem DmmA byla vyřešena s rozlišením 1,7 Å v prostorové grupě P62 molekulárním nahrazením modelem DmmA bez ligandu analyzovaným dříve. Finální model obsahuje aminokyseliny 43-341 v monomeru A i v monomeru B. Difrakční data a statistiky rafinace jsou shrnuty v **Tabulce 8**.

**Tabulka 8.** Difrakční data a statistiky rafinace při determinaci struktury enzymu DmmA s produktem dehalogenační reakce BODIPY-OH.

Sběr dat	DmmA BODIPY-OH
Vlnová délka (Å)	1
Prostorová grupa	P62
Rozměry základní buňky	
a, b, c (Å)	101,89; 101,89; 121,03
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (Å)	39,97 – 1,727 (1,798 – 1,727)
Počet naměřených reflexí	1 522 946 (149 065)
Počet unikátních reflexí	74 432 (7 394)
$R_{\text{merge}}$	0,064 (1,816)
$I / \sigma$	30,76 (2,00)
Kompletnost (%)	99,86 (99,61)
Multiplicita	20,5 (20,2)
CC(1/2)	1 (0,757)
Wilsonův B-faktor	28,67
<b>Rafinace</b>	
Rozlišení (Å)	39,97 – 1,727 (1,798 – 1,727)
Počet reflexí	74 412 (7 389)

Rwork / Rfree	0.192 / 0.22
Počet atomů	
Protein	4 690
Ligand	66
Voda	373
B-faktor	
Protein	34,24
Ligand	42,20
Voda	38,18
R.m.s odchylka od ideálnosti	
Délka vazby (Å)	0,007
Vazebné úhly (°)	0,95
Ramachandran preferované (%)	96,63
Ramachandran povolené (%)	3,37
Ramachandran odlehle (%)	0

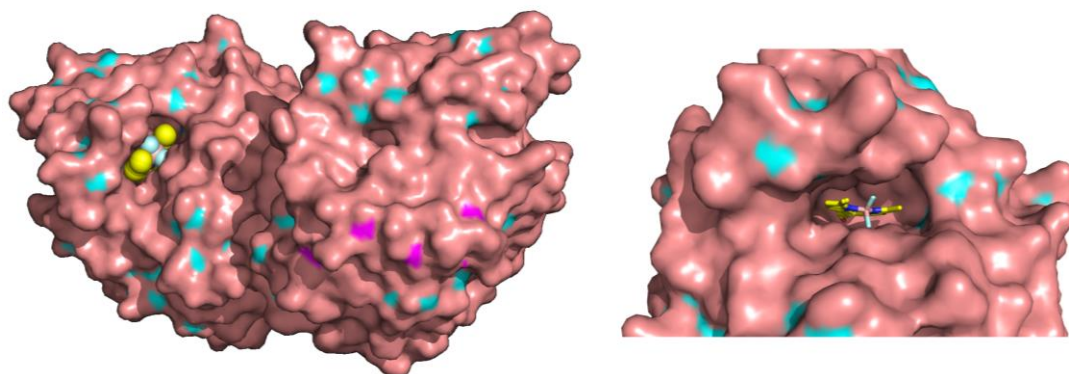
Červená barva krystalů naznačovala přítomnost BODIPY-Cl ve struktuře. Difrakční analýza pak potvrdila vazbu ligandu v aktivním místě monomeru A enzymu (**Obrázek 29**), kdy BODIPY-Cl přesně vyplňoval prohlubeň v enzymu. Jelikož byl enzym aktivní, jednalo se již o produkt dehalogenasové reakce BODIPY-OH (**Obrázek 28**). V aktivním místě byl BODIPY-OH navázán v místě typickém pro produkt reakce dehalogenas a je stabilizován vodíkovým můstkem s Asp144. BODIPY-Cl se v aktivním místě vyskytoval pravděpodobně ve dvou konformacích, jak je vidět na **Obrázku 30**.



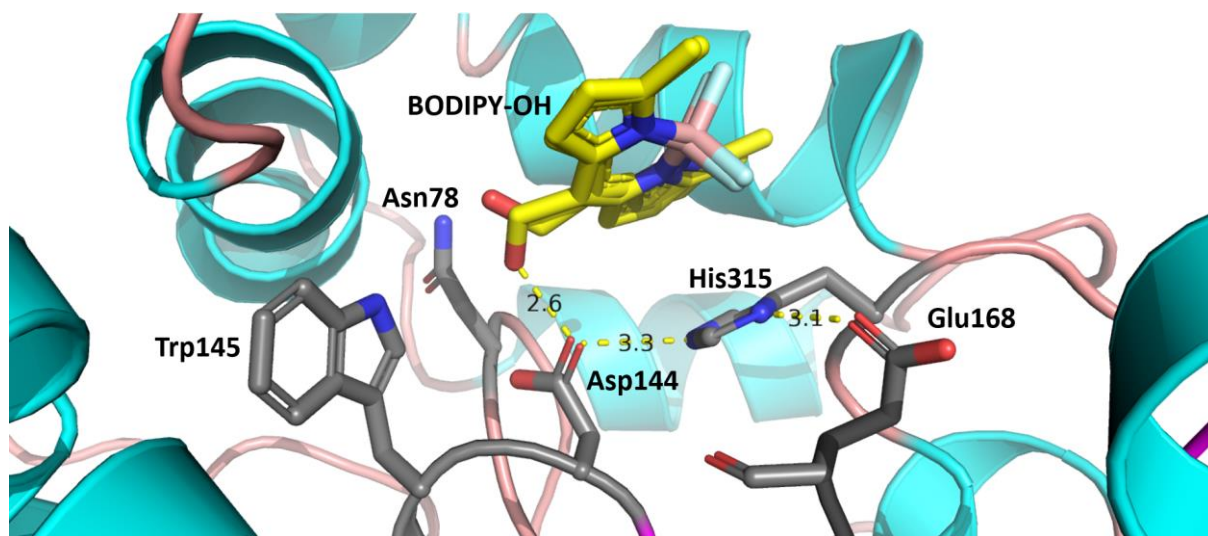
**Obrázek 28.** Struktura produktu dehalogenasové reakce DmmA s BODIPY-Cl: BODIPY-OH.

V druhém aktivním místě v monomeru B byla elektronová denzita nejasná, a tak nebyla dále interpretována.

I krystaly DmmA-315F byly difrakčně analyzovány a difraktovaly s rozlišením 1,8 Å. I zde ovšem ani v jednom aktivním místě nebyla denzita jednoznačná, a tak výsledky nebyly dále interpretovány.



**Obrázek 29.** Vazba molekuly BODIPY-OH do aktivního místa monomeru A enzymu DmmA.



**Obrázek 30.** Aktivní místo DmmA s navázaným produktem dehalogenační reakce BODIPY-OH.

## 4.7 Strukturní analýza komplexu DmmA s molekulami laktonů

### 4.7.1 DmmA/undekano-gamma-lakton komplex

Struktura komplexu DmmA s undekano-gamma-laktonem byla řešena pro varianty DmmA WT i DmmA-H315F, jelikož obě tyto varianty vykristalizovaly v krystaly vhodné pro difrakční analýzu. Struktura DmmA-H315F kokrystalizovaná s undekano-gamma-laktonem ve screenu nových podmínek (precipitant – sukcinát sodný) byla vyřešena s rozlišením 1,2 Å metodou molekulárního nahrazení (model – monomer DmmA bez ligandu) v jiné prostorové grupě (P3221) než ostatní krystaly. Finální model obsahuje aminokyseliny 43-341. Difrakční data a statistiky rafinace jsou shrnuty v **Tabulce 9**.

**Tabulka 9.** Difrakční data a statistiky rafinace při determinaci struktury enzymu DmmA-H315F s produktem dekarboxylační reakce undekano-gamma-laktonu 2-oktenem.

Sběr dat	DmmA-H315F 2-okten
Vlnová délka (Å)	1
Prostorová grupa	P3221
Rozměry základní buňky	
a, b, c (Å)	75,46; 75,46; 120,57
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (Å)	36,01 – 1,227 (1,323 – 1,227)
Počet naměřených reflexí	1 981 517 (176 792)
Počet unikátních reflex	103 409 (10 231)
$R_{\text{merge}}$	0,060 (1,358)
$I / \sigma$	28,74 (1,89)
Kompletnost (%)	99,88 (99,58)
Multiplicita	19,2 (17,3)
CC(1/2)	1 (0,85)
Wilsonův B-faktor	14,67
<b>Rafinace</b>	
Rozlišení (Å)	36,01 – 1,227 (1,323 – 1,227)
Počet reflexí	103 333 (10 221)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.170 / 0.183
Počet atomů	
Protein	2 322
Ligand	10
Voda	338
B-faktor	
Protein	17,59
Ligand	28,90
Voda	28,17
R.m.s odchylka od ideálnosti	
Délka vazby (Å)	0,005
Vazebné úhly (°)	0,86
Ramachandran preferované (%)	96,97
Ramachandran povolené (%)	3,03
Ramachandran odlehlé (%)	0

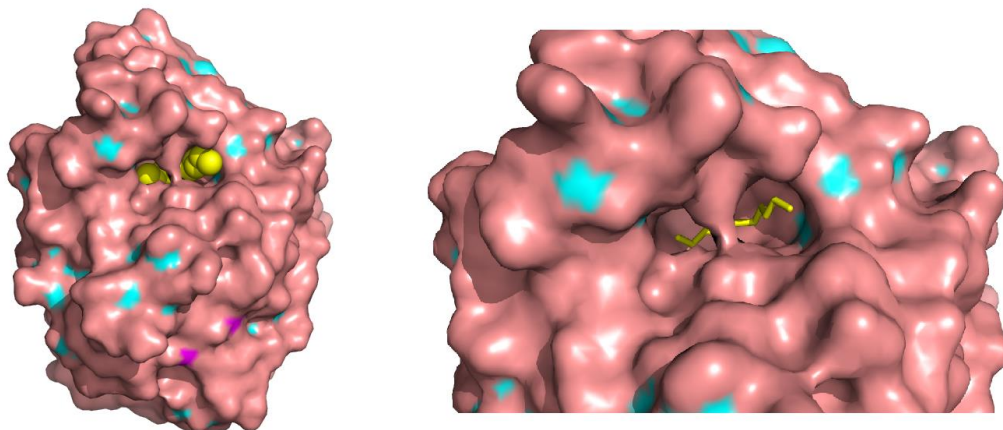
Na rozdíl od krystalů DmmA v prostorové grupě P62, kde byl asymetrickou jednotkou dimer, u krystalů skupiny P3221 se jako asymetrická jednotka ukázal monomer enzymu. Po bližším prozkoumání ale bylo zjištěno, že enzym se nevyskytuje v krystalu jako monomer, ale jako dokonale prostorově souměrný dimer, čímž je možné jako asymetrickou jednotku použít monomer. Krystaly analyzované v sukcinátových podmínkách, a tedy v prostorové grupě P3221, mimo jiné díky této přídavné symetrii, také dosahovaly daleko vyššího rozlišení (kolem 1,2 Å) než krystaly prostorové grupy P62.

Difrakční analýza krystalů DmmA-H315F ukázala v aktivním místě enzymu elektronovou denzitu. Ta ovšem neodpovídala samotnému undekano-gamma-laktonu, ale produktu

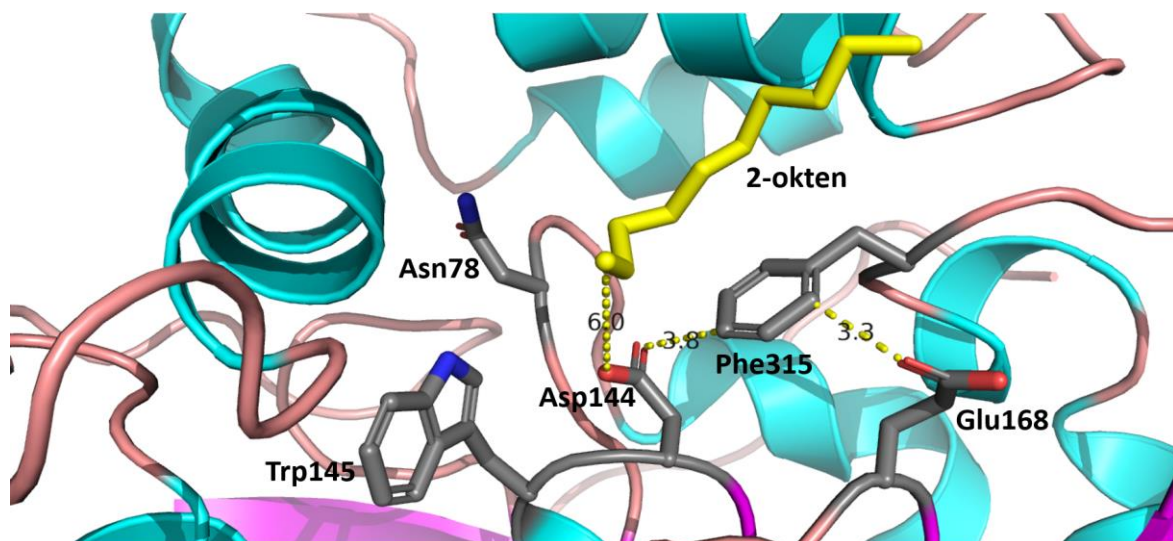
po dekarboxylaci laktonu 2-oktenu. 2-okten podobně jako BODIPY-OH vyplnil prohlubeň aktivního místa enzymu a pevně se do něj navázal (**Obrázek 31**).

V aktivním místě se 2-okten nacházel poněkud dále od katalytické pentády (6 Å od nejbližší aminokyseliny Asp144), a proto s ní nevytvářel žádné nekovalentní vazby (**Obrázek 32**).

Struktura byla analyzována i pro krystaly Dmma WT kokrystalizované s undekano-gamma-laktonem, které difraktovaly s rozlišením 1,9 Å. Po vyřešení struktury byla ale v aktivním místě nalezena daleko méně jasná elektronová denzita, a proto výsledky nebyly dále interpretovány.



**Obrázek 31.** Vazba molekuly 2-okten do aktivního místa enzymu DmmaA-H315F.



**Obrázek 32.** Aktivní místo DmmaA-H315F s navázaným produktem po dekarboxylaci undekano-gamma-laktonu 2-oktenem.

#### 4.7.2 DmmaA/N-heptyl-DL-homoserin lakton komplex

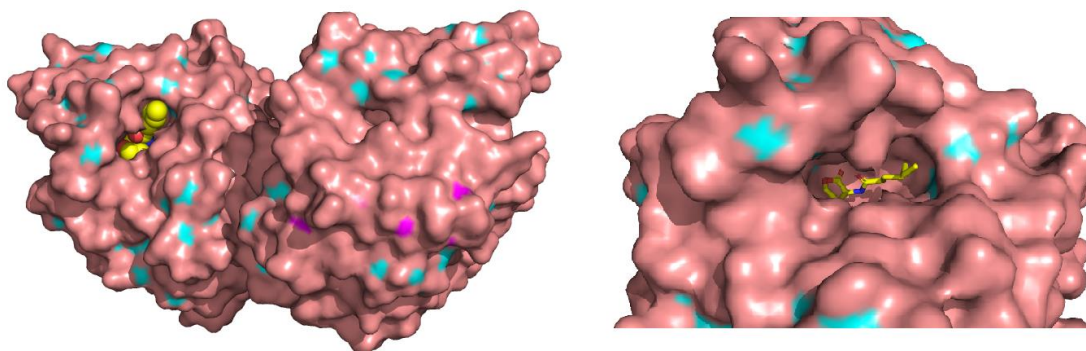
Struktura komplexu DmmaA s N-heptyl-DL-homoserin laktonem byla řešena pouze pro variantu DmmaA-H315F, protože komplex DmmaA WT a N-heptyl-DL-homoserin laktonu nevykrytalizoval v žádných použitých podmínkách. Struktura byla vyřešena s rozlišením 1,5 Å v prostorové grupě P62 metodou molekulárního nahrazení (model – DmmaA bez ligandu).

Finální model obsahuje aminokyseliny 43-341 v monomeru A i v monomeru B. Difrakční data a statistiky rafinace jsou shrnuty v **Tabulce 10**.

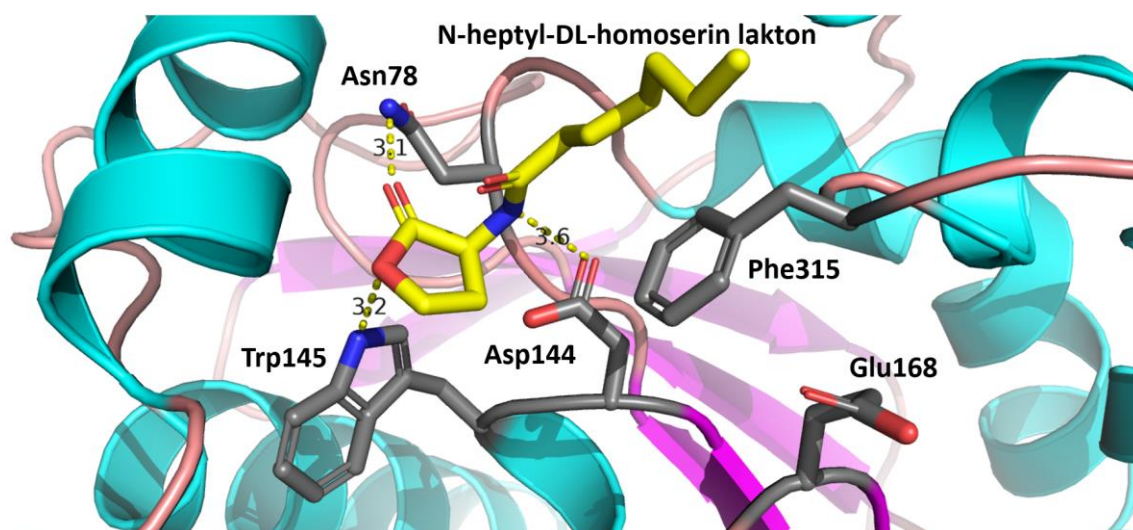
**Tabulka 10.** Difrakční data a statistiky rafinace při determinaci struktury enzymu DmmA-H315F s N-heptyl-DL-homoserin laktonem.

Sběr dat	DmmA-H315F N-heptyl-DL-homoserin lakton
Vlnová délka (Å)	1
Prostorová grupa	P62
Rozměry základní buňky	
a, b, c (Å)	101,58; 101,58; 121,55
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (Å)	48,86 – 1,54 (1,595 – 1,54)
Počet naměřených reflexí	2 068 269 (136 195)
Počet unikátních reflexí	101 272 (10 231)
$R_{\text{merge}}$	0,048 (1,814)
$I / \sigma$	30,95 (1,59)
Kompletnost (%)	96,50 (78,52)
Multiplicita	20,4 (16,6)
CC(1/2)	1 (0,77)
Wilsonův B-faktor	28,59
<b>Rafinace</b>	
Rozlišení (Å)	48,86 – 1,54 (1,595 – 1,54)
Počet reflexí	101 130 (8 185)
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.177 / 0.197
Počet atomů	
Protein	4658
Ligand	44
Voda	410
B-faktor	
Protein	35,61
Ligand	37,38
Voda	42,12
R.m.s odchylka od ideálnosti	
Délka vazby (Å)	0,006
Vazebné úhly (°)	0,87
Ramachandran preferované (%)	96,28
Ramachandran povolené (%)	3,72
Ramachandran odlehlé (%)	0

Difrakční analýza krystalů DmmA-H315F ukázala v aktivním místě monomeru A i B enzymu elektronovou denzitu odpovídající navázanému N-heptyl-DL-homoserin laktonu. Ten opět vyplnil prohlubeň a pevně se tak navázal do aktivního místa enzymu, jak ukazuje **Obrázek 33**. V aktivním místě enzymu se N-heptyl-DL-homoserin nacházel poměrně blízko katalytické pentády a byl na místě stabilizován třemi vodíkovými můstky, s Asp144 a s halid-stabilizujícími aminokyselinami Asn78 a Trp145 (**Obrázek 34**).



**Obrázek 33.** Vazba molekuly N-heptyl-DL-homoserin laktonu do aktivního místa monomeru A enzymu DmmA-H315F.



**Obrázek 34.** Aktivní místo enzymu DmmA-H315F s navázaným N-heptyl-DL-homoserin laktonem.

### 4.7.3 Ostatní laktony

Krystaly vhodné pro difrakční analýzu byly získány také z kokrystalizace DmmA WT a DmmA-H315F s whiskey laktonem, undekano-delta laktonem a beta-butyrolaktonem. Všechny z těchto krystalů difraktovaly v rozlišení mezi 1,7 a 2 Å, ale v žádné z těchto struktur nebyl lakton či produkt po jeho dekarboxylaci jednoznačně navázán. V aktivních místech se zpravidla objevila elektronová denzita, značící přítomnost navázaného ligandu, ale nebylo možné přesně stanovit, o jaký ligand se jednalo. Proto tyto struktury nebyly dále analyzovány.

## 4.8 Strukturální analýza komplexu DmmA s azokoelenterazinem

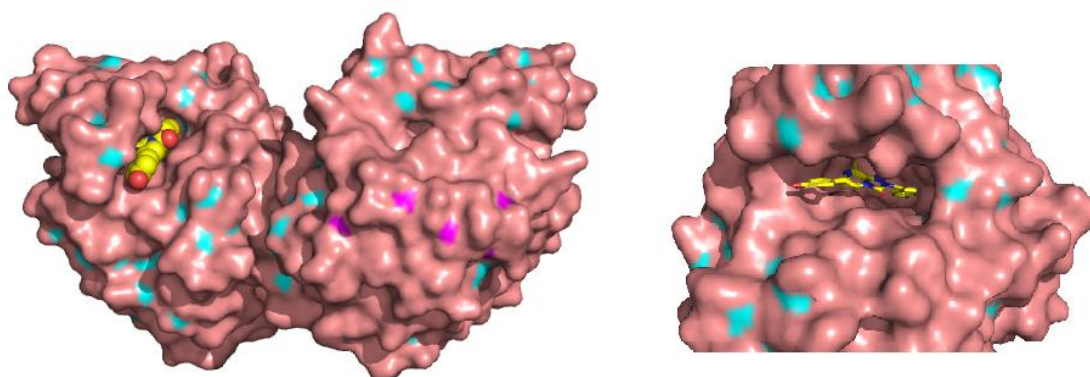
Struktura komplexu DmmA s azokoelenterazinem byla řešena pro variantu DmmA WT a byla vyřešena s rozlišením 1,65 Å v prostorové grupě P62 metodou molekulárního nahrazení (model – DmmA bez ligandu). Finální model obsahuje aminokyseliny 43-341 v monomeru A i v monomeru B. Difrakční data a statistiky rafinace jsou shrnuty v **Tabulce 11**.

**Tabulka 11.** Difrakční data a statistiky rafinace při determinaci struktury enzymu DmmA s azakoelenterazinem.

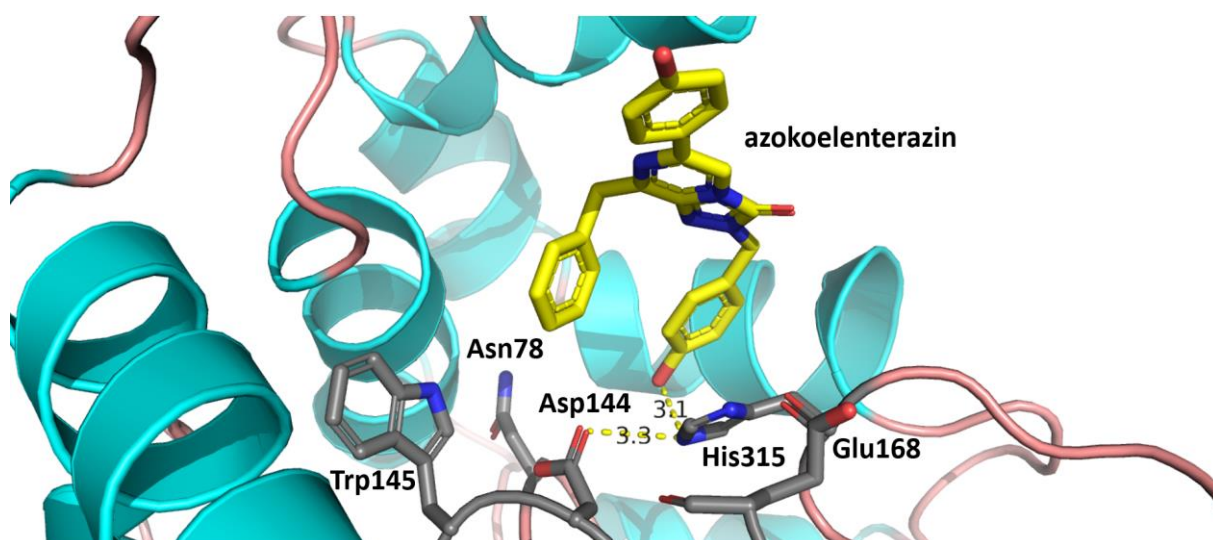
Sběr dat	DmmA azakoelenterazin
Vlnová délka (Å)	1
Prostorová grupa	P62
Rozměry základní buňky	
a, b, c (Å)	100,2; 100,2; 121,83
$\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)	90, 90, 120
Rozlišení (Å)	38,7 – 1,65 (1,71 – 1,65)
Počet naměřených reflexí	1 696 129 (168 656)
Počet unikátních reflex	82 791 (8 212)
$R_{\text{merge}}$	0,064 (2,062)
$I / \sigma I$	30,60 (1,85)
Kompletnost (%)	99,82 (99,06)
Multiplicita	20,5 (20,05)
CC(1/2)	1 (0,83)
Wilsonův B-faktor	26,34
<b>Rafinace</b>	
Rozlišení (Å)	38,7 – 1,65 (1,71 – 1,65)
Počet reflexí	82 791 (8 201)
Rwork / Rfree	0.189 / 0.213
Počet atomů	
Protein	4663
Ligand	46
Voda	328
B-faktor	
Protein	35,56
Ligand	38,65
Voda	37,08
R.m.s odchylka od ideálnosti	
Délka vazby (Å)	0,007
Vazebné úhly (°)	0,88
Ramachandran preferované (%)	96,79
Ramachandran povolené (%)	3,21
Ramachandran odlehlé (%)	0

Difrakční data krystalu DmmA-H315F ukázala v aktivním místě monomeru A enzymu elektronovou denzitu odpovídající navázanému azakoelenterazinu. Způsob jeho navázání do prohlubně a aktivního místa ukazuje **Obrázek 35**. V aktivním místě enzymu se azakoelenterazin nacházel v blízkosti katalytických aminokyselin Asp144 a His315 a byl stabilizován vodíkovou vazbou s His315, jak ukazuje **Obrázek 36**. V monomeru B enzymu byla nalezena elektronová denzita, která se sice podobala denzitě v monomeru A, ale nebyla tak jasně determinovatelná, proto výsledky nebyly dále analyzovány.





**Obrázek 35.** Vazba molekuly azokoelenterazinu laktonu do aktivního místa monomeru A enzymu DmmA.



**Obrázek 36.** Aktivní místo DmmA s navázanou molekulou azokoelenterazinu.

## 5 DISKUZE

Cílem této práce bylo vytvořit robustní a vysoce reprodukovatelný systém pro rekombinantní produkci a krystalizaci halogenalkandehalogenasy DmmA za účelem její strukturní analýzy včetně studia vazby netradičních či domnělých substrátových molekul v aktivním místě enzymu.

V rámci této práce se podařilo zavést expresní a purifikační protokol enzymu DmmA, který dosahoval vysokých výtěžků. Enzym byl ze začátku purifikován v pufru s obsahem 50 mM NaCl. Nicméně, po první difrakční analýze enzymu ko-krystalizovaného se substrátem 4-bromobutanenitrilu bylo zjištěno, že aktivní místo enzymu je okupováno chloridovým aniontem, který pravděpodobně interferuje s vazbou substrátové molekuly. Proto byl navržen a optimalizován nový systém purifikace v podmínkách bez přítomnosti halogenidových aniontů, při kterém se tento problém již neprojevoval. Při testování různých druhů pufrů bylo zjištěno, že DmmA se účinněji uvolňuje z afinitní kolony při pH 7 než při pH 8, což je v souladu s hypotézou, že pH elučního pufru ovlivňuje stabilitu proteinu a výtěžek jeho purifikace (Bornhorst & Falke, 2000). Metodou cílené mutagenese se úspěšně podařilo připravit i katalyticky neaktivního mutanta, který měl vyměněný histidin katalytické triády za fenylyalanin (H315F), což způsobilo zamezení průběhu dehalogenasové reakce a její zastavení v kroku navázaného kovalentního intermediátu (Hynková et al., 1999). Pro potvrzení katalytické nefunkčnosti byla porovnána aktivita DmmA a DmmA-H315F vůči 4-bromobutanenitrilu (Buryska et al., 2017) a rovněž i fluorescenčnímu substrátu BODIPY-Cl. Enzymová aktivita u varianty DmmA-H315F nebyla pozorována ani při použití vysoké koncentrace enzymu (**Obrázky 11 a 13**).

V rámci této práce byl také úspěšně vytvořen vysoce reprodukovatelný protokol krystalizace enzymu DmmA. Enzym byl po purifikaci koncentrován a krystalizován metodou difúze páry v různých podmínkách komerčně dodávaných krystalizačních souprav. Podařilo se vykristalizovat DmmA enzym v celkem 13 různých chemických podmínkách, ze kterých byly vybrány 3 podmínky, ve kterých krystaly vypadaly nejlépe z hlediska velikosti a morfologie. Jednalo se o krystalizační roztoky ze soupravy Anions (A1, C6 a C7). Tyto podmínky byly nadále systematicky optimalizovány až do vytvoření vysoce stabilního a reprodukovatelného krystalizačního systému, při kterém vznikaly velké monokrystaly vhodné pro difrakční analýzu. Enzym krystalizoval nejlépe v podmínkách nízkého až neutrálního pH (4,6-6,5) a vysoké koncentraci soli malých organických kyselin jako srážedla (např. formiát sodný, octan sodný či malonát sodný). Krystaly DmmA získané z těchto podmínek difraktovaly až do rozlišení 1,6-2,2 Å v prostorové grupě P62, což souhlasí s dříve publikovanou strukturou toho enzymu dle Gehret et al., 2012, která byla determinována v rozlišení 2,2 Å.

V rámci vývoje krystalizačního systému bylo také cílem vytvoření systému pro produkci velkého množství mikro či nanokrystalů pro časově rozlišené strukturní studie. Po vyzkoušení několika podmínek, které v počátečních screeningách daly vzniknout mikro a nanokrystalům byly vybrány nejlepší podmínky (Anions C1). V tomto krystalizačním roztoku, kdy byl protein inkubován s roztokem srážedla v polypropylénových mikrozkušnicích, reprodukovatelně docházelo k produkci velkého množství požadovaných mikro-krystalů (složení roztoku: 3,45 M formiát sodný, 0,1 M octan sodný pH 4,6). Tento experiment byl současně prováděn i ve skleněných vialkách v objemu (200 µl enzymu + 200 µl precipitačního roztoku), kde se ale

nikdy nepodařilo vyprodukovat větší množství požadovaných mikro-krystalů. Proto bude v budoucnu potřeba tuto krystalizaci dále optimalizovat, aby bylo možné mikro-krystaly získat ve velkém množství.

V rámci ko-krystalizačních experimentů byly objeveny také nové chemické podmínky (1 M sukcinát sodný, 100 mM HEPES pH 7), při kterých DmmA protein krystalizoval v prostorové grupě *P3121* a difrakční data dosahovala výrazně vyššího rozlišení (až 1,2 Å). Toto zlepšení bylo pravděpodobně způsobeno těsnější výstavbou proteinových krystalů, jejich vyšší symetrií, a také podstatně nižšími B-faktory. Tyto podmínky pak byly opakovány i v nepřítomnosti ligandu v 15-jamkové krystalizační destičce, jak s DmmA, tak i s mutantem DmmA-H315F. Vykrytalizoval ale pouze mutant, což souhlasí s tím, že v prvotních screenech s *wild* typem enzymu nebyly tyto podmínky zaznamenány. Tato skutečnost ukazuje, že i bodová mutace proteinu může ovlivnit jeho krystalizaci, jak bylo dokázáno už dříve (Guo et al., 2006).

Zajímavá je otázka oligomerie DmmA. Dle struktury Gehret et al., 2012 je totiž DmmA monomer, kdežto v této práci enzym eluoval při gelové chromatografii a následně i krystalizoval pouze jako dimer. V krystalech prostorové grupy *P3121* byla sice asymetrická jednotka pouze monomer, po bližším prozkoumání ale bylo zjištěno, že se jedná o dokonale symetrický dimer. Enzym v struktuře dle Gehret et al., 2012 byl ale purifikován v pufru o desetkrát větším obsahu soli než v této práci, a právě zvýšená polarita prostředí mohla způsobit rozpad dimeru na monomery. Závislost oligomerie na koncentraci soli byla prokázána již u mnoha enzymů (Shima et al., 1998, Ibrahim et al., 2018). DmmA tak může existovat v podobě monomer/dimer v závislosti na koncentraci soli. Přesná oligomerie DmmA ale stále zůstává nedořešenou a bude potřeba dalších experimentů pro její vyjasnění.

Následně byl enzym DmmA WT a DmmA-H315F analyzován v komplexu s ligandy. Nejprve byla použita metoda namáčení krystalů DmmA WT v roztoku ligandu (BODIPY-Cl), ale ukázalo se, že jak rozpouštědlo ligandu DMSO, tak samotné BODIPY-Cl během půl hodiny rozpustí krystaly, a proto byla pro následující experimenty použita metoda kokrystalizace a výsledné krystaly byly měřeny na synchrotronu *Swiss Light Source* ve Švýcarském Villigenu a dále analyzovány.

DmmA WT i DmmA-H315F byly kokrystalizovány s fluorescenčním substrátem BODIPY-Cl v podmínkách vytvořeného krystalizačního systému, který byl pro BODIPY-Cl dále optimalizován. Získané krystaly měly jasně červenou barvu, což značilo přítomnost BODIPY-Cl v krystalu. Po difrakční analýze enzymu DmmA WT bylo potvrzeno, že byl produkt reakce BODIPY-Cl s dehalogenasou (BODIPY-OH) navázán v aktivním místě monomeru A enzymu v pozici běžné pro produkty po dehalogenasové reakci. V monomeru B byla elektronová denzita nejasná, což může být způsobeno nižším rozlišením monomeru B nebo faktem, že BODIPY-OH druhé aktivní místo obsazuje pouze někdy.

Reakce enzymů s fluorescenčními substráty jsou velmi cenné pro kinetické analýzy a fakt, že DmmA s těmito substráty reaguje může velmi usnadnit práci s celou skupinou těchto enzymů v budoucnu. Tato struktura je zároveň první struktura halogenalkandehalogenasy DmmA s velkou aromatickou molekulou. Skutečnost, že enzym DmmA je schopný reagovat i s takovými molekulami, má vysoké potenciální využití v biotechnologiích. Halogenalkandehalogenasy DmmA se používají k detoxifikaci toxických halogenovaných molekul, doposud byly ale vhodné pouze pro použití s malými lineárními molekulami

(Koudelakova et al., 2013). Enzym DmmA tak kvůli svému velkému aktivnímu místu schopnému navázat i substráty velikosti BODIPY ukazuje potenciální využití při detoxifikaci velkých aromatických halogenovaných toxických molekul.

S BODIPY byl kokrystalizován také mutant enzymu DmmA-H315F. V aktivním místě byla určitá elektronová denzita. Nebylo ale možné přesně určit, o co konkrétně se jedná, a tak tato struktura nebyla interpretována. U mutantního enzymu je předpokládán kovalentně navázaný intermediát. Jeho nepřítomnost může být vysvětlena nižším rozlišením struktury, zvýšenou flexibilitou nebo nízkou okupací aktivního místa.

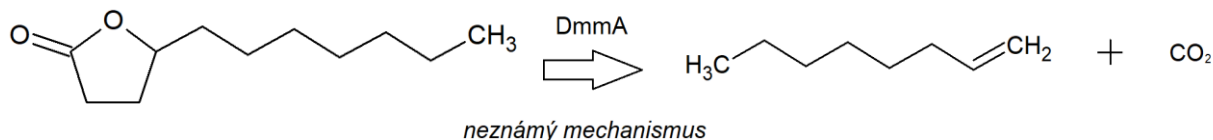
Dále byly enzymy DmmA WT i DmmA-H315F kokrystalizovány s molekulami laktonů. Na začátku byly provedeny screeny DmmA-H315F s laktony (undekano-gamma-lakton, whiskey lakton, betabutyro lakton) na nové krystalizační podmínky. Ukázalo se, že mutantní enzym s ligandem krystalizuje mnohem více (až 70 podmínkách), což opět ukazuje na to, jak pouhá bodová mutace může změnit proteinovou krystalizaci (Guo et al., 2006). Díky těmto screenům byly objeveny podmínky se sukcinátem jako precipitantem, které vedly ke krystalizaci v jiné prostorové grupě s daleko vyšším rozlišením (viz výše).

Obě varianty enzymu DmmA WT a DmmA-H315F pak byly kokrystalizovány ve větším objemu ve standardně používaných podmínkách s molekulami vybraných laktonů (betabutyrolakton, undekano-gamma-lakton, undekano-delta-lakton, whiskey lakton a N-heptanyl-DL-homoserin lakton). Krystaly použitelné pro difrakční analýzu byly zamrazeny a dále analyzovány.

Analýzou kokrystalizace DmmA-H315F v sukcinátových podmínkách s undekano-gamma laktonem byla získána struktura velmi vysokého rozlišení (1,2 Å). V aktivním místě byla nalezena denzita odpovídající laktonu po jeho dekarboxylaci (2-oktenu). Ve struktuře DmmA WT kokrystalizovaného s tímto laktonem se objevila určitá elektronová denzita, nebyla ale jasně determinovatelná, což mohlo být způsobeno výrazně nižším rozlišením této struktury nebo nižší okupací aktivního místa.

Dále byl analyzován enzym DmmA-H315F s N-heptyl-DL-homoserin laktonem. Po difrakční analýze byla získána struktura, ve které byl celý lakton navázaný pevně v aktivním místě enzymu v obou monomerech. Enzym DmmA WT s tímto laktonem nevykrystalizoval, a tak nebylo možné provést analýzu této struktury.

Tyto nálezy podporují hypotézu, že enzym DmmA je schopný dekarboxylace laktonů. V práci Christenson et al., 2017 bylo naznačeno, že halogenalkandehalogenasy skupiny III, které obecně vykazují velmi nízkou dehalogenasovou aktivitu, jsou schopné dekarboxylovat beta-laktony a pravděpodobně můžou hrát roli v syntéze olefinů nebo v mechanismu bakteriálního *quorum sensing*. Ve struktuře DmmA-H315F kokrystalizovaný s undekano-gamma-laktonem je navázaný již produkt po dekarboxylaci laktonu, je tedy možné, že i DmmA má určitou dekarboxylační aktivitu (obrázek 39), jejíž mechanismus je pravděpodobně odlišný od dehalogenasové aktivity (ve struktuře je s produktem po dekarboxylaci enzym s mutovaným katalytickým histidinem). V této fázi ale není možné vyloučit, že došlo k spontánní dekarboxylaci laktonu už před krystalizací enzymu a do aktivního místa se navázal už rovnou produkt, a budou potřeba další experimenty pro potvrzení.



**Obrázek 37.** Hypotéza dekarboxylační aktivity enzymu DmmA s undekano-gamma-laktonem na oxid uhličitý a 2-okten, který byl navázaný v aktivním místě enzymu po kokrytalizaci s laktonem.

Ve struktuře DmmA-H315F s N-heptyl-DL-homoserin laktonem došlo k navázání celého laktonu bez dekarboxylace. Navázání do aktivního místa je ale velice pevné a došlo k němu v obou monomerech enzymu. To, že nedošlo k dekarboxylaci, může značit, že enzym je buď specifický jen pro některé laktony, nebo že v případě undekano-gamma-laktonu skutečně došlo k dekarboxylaci spontánně. Ale již fakt, že došlo k takto pevné vazbě laktonu do aktivního místa naznačuje, že skupina enzymů halogenalkandehalogenas může obsahovat i enzymy, které jsou primárně lakton-dekarboxylasy, a jejich dehalogenasová aktivita je až sekundární. Je také možné, že jednotlivé skupiny halogenalkandehalogenas mají různý poměr aktivity a afinity vůči halogenovaným substrátům a laktonům. Právě serinové laktony jako je N-heptyl-DL-homoserin jsou v přírodě využívány bakteriemi v *quorum sensing* (Schuster et al., 2013). To, že halogenalkandehalogenasy by mohly svou dekarboxylační aktivitou regulovat tento extrémně důležitý mechanismus, by vysvětlovalo jejich vysoké zastoupení napříč různými druhy bakterií, které se vůbec nevyskytují v prostředí s toxickými halogenovanými látkami. N-heptyl-DL homoserin by díky své pevné vazbě mohl také potenciálně sloužit jako kompetitivní inhibitor halogenalkandehalogenasy DmmA, a tím získat komerční využití v regulaci dehalogenasové reakce enzymu. Celkově bude ale pro potvrzení této hypotézy třeba ještě mnoho dalších experimentů.

Krystaly DmmA WT a DmmA-H315F byly získány i kokrytalizací s whiskey laktonem, undekano-gamma-laktonem, undekano-delta laktonem a beta-butyrolaktonem. Všechny tyto krystaly difraktovaly v rozlišení mezi 1,7 a 2 Å, ale při analýze struktur nebylo možné říci, zda byl v aktivním místě enzymu lakton nebo produkt po dekarboxylaci navázan. Ve všech případech byla experimentálně objevena elektronová denzita v aktivním místě, která naznačovala přítomnost ligandu, ale nebylo možné přesně stanovit, o jaký ligand se jedná. Tyto problémy mohly být způsobeny nižším rozlišením než u struktury DmmA/undekano-gamma-lakton komplexu, kde byla struktura interpretována, vyšší flexibilitou laktonu v aktivním místě, malou velikostí laktonu (v případě beta-butyrolaktonu) nebo tím, že enzym by mohl být selektivní a váže pouze některé typy molekul laktonů.

Posledním zkoumaným substrátem byl azakoelenterazin, modifikovaný substrát enzymu luciferasy, která je halogenalkandehalogenasám velmi podobná (Woo et al., 2008) a existuje hypotéza, že by tyto skupiny enzymů mohly mít stejnou evoluční historii. Azakoelenterazin byl kokrytalizován s enzymem DmmA a po difrakční analýze byla získána struktura obsahující tento ligand v obou monomerech enzymu. Tato skutečnost podporuje příbuznost obou enzymů. Z charakteru vazby azakoelenterazinu je patrné, že substrát se do aktivního místa enzymu navázal v neproduktivní konformaci a slaběji než do aktivního místa luciferasy, a proto nemohlo dojít k dekarboxylázové oxygenaci a emisi světla jak v luciferáze. Znalost vazby azakoelenterazinu v aktivním místě DmmA by mohla být potenciálně využita v metodě racionálního designu. Mohla by se tak vytvořit haloalkandehalogenasa, která bude vykazovat

luciferázovou i dehalogenasovou aktivitou, a byla by využitelná v biosenzorických aplikacích monitoringu výskytu toxických látek (Satpathy et al., 2015)

## 6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvořit stabilní expresní, purifikační a krystalizační systém halogenalkandehalogenasy DmmA, a následně analyzovat její strukturu v komplexu s netradičními substráty: fluorescenčním aromatickým substrátem BODIPY, s molekulami laktonů a azakoelenterazinem. Výsledky práce ukázaly strukturu DmmA s produktem BODIPY-OH navázaným v aktivním místě enzymu, což naznačuje, že tato halogenalkandehalogenasa může být díky fluorescenci substrátu využita v kinetických analýzách enzymů a také díky svému velkému aktivnímu místu pro degradaci velkých aromatických halogenovaných toxických substrátů v prostředí. Dále byly analyzovány struktury katalyticky neaktivního mutanta DmmA-H315F s molekulami undekano-gamma-lakton a N-heptyl-DL-homoserin lakton. Ve struktuře s undekano-gamma-laktonem se v aktivním místě nacházel produkt po dekarboxylaci laktonu a ve struktuře s N-heptyl-DL-homoserinem byl v aktivním místě navázaný celý lakton. Kvůli těmto skutečnostem vyvstává hypotéza, že halogenalkandehalogenasy nebo některá jejich skupina jsou ve skutečnosti lakton-dekarboxylasy využívané bakteriemi pro regulaci syntézy olefinů nebo *quorum sensing*, která ale bude potřebovat ještě dalšího prověřování. Poslední analyzovanou strukturou byl komplex DmmA s azakoelenterazinem, substrátem enzymu luciferasy. Azakoelenterazin se do aktivního místa navázal, čímž podporuje hypotézu příbuznosti těchto enzymů. Jeho vazba je ale katalyticky neproduktivní, ale její strukturní detaily mohou být využitelné pro racionální design enzymu, který bude vykazovat dehalogenasovou i luciferasovou aktivitu.

## 7 PERSPEKTIVY DO BUDOUCNA

Z výsledků této práce vyplynulo mnoho nových hypotéz, které vyžadují provedení dalších experimentů pro jejich ověření. Zde jsou přiloženy plány budoucích experimentů, které by mohly potvrdit nebo vyvrátit hypotézy stanovené v této práci.

- Pokusit se optimalizovat sukcinátové podmínky krystalizace tak, aby se podařilo vykrytalizovat DmmA enzym divokého typu pro rentgenovou strukturní analýzu s vysokým rozlišením nebo pro časově rozlišenou strukturní analýzu.
- Udělat nativní elektroforézu proteinu DmmA dialyzovaného do gradientu koncentrací NaCl a ověřit hypotézu, že oligomerizace tohoto enzymu závisí právě na koncentraci solí. Případně tyto hypotézu otestovat použitím metody maloúhlového rozptylu světla.
- Optimalizovat podmínky krystalizace DmmA pro aplikace v oblasti časově-rozlišené krystalografie, a následně pomocí této metody strukturně analyzovat katalytickou reakci enzymu DmmA.
- Analyzovat strukturu DmmA-H315F s BODIPY-Cl v sukcinátových podmínkách tak, aby bylo dosaženo vyššího rozlišení, kde by bylo možné vidět navázanou strukturu kovalentního intermediátu reakce.
- Analyzovat strukturu DmmA i DmmA-H315F s více molekulami laktonů, které jsou využívány v bakteriálních chemické komunikaci tzv. *quorum sensing*.
- Udělat biochemickou analýzu všech tří podskupin halogenalkandehalogenas a zjistit, zda opravdu vykazují lakton-dekarboxylační aktivitu a odvodit tak skutečnou biologickou funkci této třídy enzymů v organismech. Experimenty s DmmA už byly zahájeny (únor 2020), a to metodou NMR, kde se porovnává abiotická a biotická reakce, aby se zjistilo, jestli laktony samovolně dekarboxylují nebo je zde opravdu nějaká enzymatická aktivita. V případě nefunkčnosti metody se uvažuje ještě o použití vysokoúčinné kapalinné chromatografie.
- Zjistit, zda by N-heptyl-DL-homoserin lakton díky své pevné vazbě mohl působit jako kompetitivní inhibitor halogenalkandehalogenasové aktivity.
- Využít znalosti ze struktury DmmA s azokoelenterazinem pro racionální design haloalkandehalogenas, které budou provádět dehalogenasovou i luciferázovou aktivitu.

Vybrané výsledky prezentované v této práci budou v následujících měsících publikovány v odborném časopise.



## 8 POUŽITÁ LITERATURA A ZDROJE

### 8.1 Literatura

- Agarwal, P. K. (2006). Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories*, 5, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-2>
- Bartesaghi, A., Aguerrebere, C., Falconieri, V. et al., (2018). Atomic Resolution Cryo-EM Structure of  $\beta$ -Galactosidase. *Structure*, 26(6), 848-856.e3. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.04.004>
- Bokhove, M., Sadat Al Hosseini, H., Saito, T., Dioguardi, E., Gegenschatz-Schmid, K., Nishimura, K., ... Jovine, L. (2016). Easy mammalian expression and crystallography of maltose-binding protein-fused human proteins. *Journal of Structural Biology*, 194(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2016.01.016>
- Bornhorst, J. A., & Falke, J. J. (2000). Purification of proteins using polyhistidine affinity tags. *Methods in Enzymology*, Vol. 326, pp. 245–254. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(00\)26058-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(00)26058-8)
- Buryska, T., Babkova, P., Vavra, O., Damborsky, J., & Prokop, Z. (2017). Downloaded from <http://aem.asm.org/> on November 5, 2017 by GAZI UNIVERSITESI Downloaded from <http://aem.asm.org/> on November 5, 2017 by GAZI UNIVERSITESI. (November). <https://doi.org/10.1128/AEM.01684-17>
- Callaway, E. (2015). The revolution will not be crystallized: A new method sweeps through structural biology. *Nature*, 525(7568), 172–174. <https://doi.org/10.1038/525172a>
- Campbell, M. G., Veessler, D., Cheng, A., Potter, C. S., & Carragher, B. (2015). 2.8 Å resolution reconstruction of the thermoplasma acidophilum 20 s proteasome using cryo-electron microscopy. *ELife*, 2015(4), 1–22. <https://doi.org/10.7554/eLife.06380>
- Christenson, J. K., Robinson, S. L., Engel, T. A., Richman, J. E., Kim, A. N., & Wackett, L. P. (2017). OleB from Bacterial Hydrocarbon Biosynthesis Is a  $\beta$ -Lactone Decarboxylase That Shares Key Features with Haloalkane Dehalogenases. *Biochemistry*, 56(40), 5278–5287. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00667>
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>
- Declerck, N., Machius, M., Wiegand, G., Huber, R., & Gaillardin, C. (2000). Probing structural determinants specifying high thermostability in *Bacillus licheniformis*  $\alpha$ -amylase. *Journal of Molecular Biology*, 301(4), 1041–1057. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4025>
- Edwards, A. J., & Reid, D. (2000). Introduction to NMR of Proteins. In *Current Protocols in Protein Science* (pp. 17.5.1-17.5.39). <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1705s19>
- Egelman, E. H. (2016). The Current Revolution in Cryo-EM. *Biophysj*, 110, 1008–1012. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.02.001>

- England, C. G., Luo, H., & Cai, W. (2015). HaloTag Technology: A Versatile Platform for Biomedical Applications. *Bioconjugate Chemistry*, 26(6), 975–986. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00191>
- Erable, B., Goubet, I., Seltana, A., & Maugard, T. (2009). Non-conventional gas phase remediation of volatile halogenated compounds by dehydrated bacteria. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2841–2844. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2009.01.010>
- Fernandes, P. (2010). Enzymes in food processing: A condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Research*, Vol. 2010. <https://doi.org/10.4061/2010/862537>
- Gehret, J. J., Gu, L., Geders, T. W., Brown, W. C., Gerwick, L., Gerwick, W. H., ... Smith, J. L. (2012). Structure and activity of DmmA, a marine haloalkane dehalogenase. 21, 239–248. <https://doi.org/10.1002/pro.2009>
- Georgiou, G., & Segatori, L. (2005, October). Preparative expression of secreted proteins in bacteria: Status report and future prospects. *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 16, pp. 538–545. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.07.008>
- Gershenson, A. (2009). Single molecule enzymology: Watching the reaction. *Current Opinion in Chemical Biology*, Vol. 13, pp. 436–442. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.06.011>
- Goh, K. M., Hong, G. P., Chyi, N. H., Ng, P., Piaw, C. K., & Rahman, R. N. Z. R. A. (2012). Trends and tips in protein engineering, a review. *Jurnal Teknologi (Sciences and Engineering)*, 59(SUPPL.1), 21–31. <https://doi.org/10.11113/jt.v59.1574>
- Grujic, O., Grigg, M. E., & Boulanger, M. J. (2008). Insect-cell expression, crystallization and X-ray data collection of the bradyzoite-specific antigen BSR4 from *Toxoplasma gondii*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 64(5), 425–427. <https://doi.org/10.1107/S1744309108010920>
- Guo, Y., Li, Z., Van Vranken, S. J., & Li, H. (2006). A single point mutation changes the crystallization behavior of Mycoplasma arthritidis-derived mitogen. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 62(3), 238–241. <https://doi.org/10.1107/S1744309106003691>
- Hasan, K. (2018). A mini review of haloalkane dehalogenase: From molecular characterization to applications. *Communications in Science and Technology*, 3(1), 15–18. <https://doi.org/10.21924/cst.3.1.2018.70>
- Hassell, A. M., An, G., Bledsoe, R. K., Bynum, J. M., Carter, H. L., Deng, S. J. J., ... Shewchuk, L. M. (2006). Crystallization of protein-ligand complexes. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 63(1), 72–79. <https://doi.org/10.1107/S0907444906047020>
- Henri, V. (1903). Lois générales de l'Action des Diastases. *Nature*, 68(1758), 221–221. <https://doi.org/10.1038/068221d0>
- Hynková, K., Nagata, Y., Takagi, M., & Damborský, J. (1999). Identification of the catalytic triad in the haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. *FEBS Letters*, 446(1), 177–181. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(99\)00199-4](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(99)00199-4)

- Ibrahim, I. M., Wang, L., Puthiyaveetil, S., Krauß, N., Nield, J., & Allen, J. F. (2018). Oligomeric states in sodium ion-dependent regulation of cyanobacterial histidine kinase-2. *Protoplasma*, 255(3), 937–952. <https://doi.org/10.1007/s00709-017-1196-7>
- Iwasaki, I. et al. (1952). *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 25, 226
- Janssen, D. B. (2004). Evolving haloalkane dehalogenases. *Current Opinion in Chemical Biology*, 8(2), 150–159. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2004.02.012>
- Jiang, J., Pentelute, B. L., Collier, R. J., & Hong Zhou, Z. (2015). Atomic structure of anthrax protective antigen pore elucidates toxin translocation. *Nature*, 521(7553), 545–549. <https://doi.org/10.1038/nature14247>
- Jidenko, M., Nielsen, R. C., Sørensen, T. L. M., Møller, J. V., Le Maire, M., Nissen, P., & Jaxel, C. (2005). Crystallization of a mammalian membrane protein overexpressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11687–11691. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503986102>
- Johnson, K. A. (2013, September 2). A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. *FEBS Letters*, Vol. 587, pp. 2753–2766. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.07.012>
- Jonic, S., & Vénien-Bryan, C. (2009). Protein structure determination by electron cryo-microscopy. *Current Opinion in Pharmacology*, 9(5), 636–642. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2009.04.006>
- Kan, S. B. J., Lewis, R. D., Chen, K., & Arnold, F. H. (2016). Directed evolution of cytochrome c for carbon-silicon bond formation: Bringing silicon to life. *Science*, 354(6315), 1048–1051. <https://doi.org/10.1126/science.aah6219>
- Kendrew, J. C., Bodo, G., Dintzis, H. M., Parrish, R. G., Wyckoff, H., & Phillips, D. C. (1958). A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature*, 181(4610), 662–666. <https://doi.org/10.1038/181662a0>
- Klvana, M., Pavlova, M., Koudelakova, T., et al., (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(5), 1339–1356. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.076>
- Kodíček, M., Valentová, O., & Hynek, R. (2018). *Biochemie, chemický pohled na biologický svět*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická.
- Koen, H. G., Henriëtte, J., Kor, H., Bauke, W., Verschueren, K. H. G., Seljée, F., ... Kalk, K. H. (1993). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*, 363, 693-698. <https://doi.org/10.1038/363693a0>
- Koudelakova, T., Bidmanova, S., Dvorak, P., Pavelka, A., Chaloupkova, R., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2013). Haloalkane dehalogenases: Biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, 8(1), 32–45. <https://doi.org/10.1002/biot.201100486>

- Krooshof, G. H., Floris, R., Tepper, A. W. J. W., & Janssen, D. B. (2008). Thermodynamic analysis of halide binding to haloalkane dehalogenase suggests the occurrence of large conformational changes. *Protein Science*, 8(2), 355–360. <https://doi.org/10.1110/ps.8.2.355>
- Marion, D. (2013, November). An introduction to biological NMR spectroscopy. *Molecular and Cellular Proteomics*, Vol. 12, pp. 3006–3025. <https://doi.org/10.1074/mcp.O113.030239>
- Martin-Garcia, J. M., Conrad, C. E., Coe, J., Roy-Chowdhury, S., & Fromme, P. (2016). Serial femtosecond crystallography: A revolution in structural biology. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 602, 32–47. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2016.03.036>
- McDonald, A. G., & Tipton, K. F. (2014). Fifty-five years of enzyme classification: Advances and difficulties. *FEBS Journal*, 281(2), 583–592. <https://doi.org/10.1111/febs.12530>
- McMurry, J. (2011). *Fundamentals of organic chemistry*. Brooks/Cole.
- Mena-Benitez, G. L., Gandia-Herrero, F., Graham, S., Larson, T. R., McQueen-Mason, S. J., French, C. E., ... Bruce, N. C. (2008). Engineering a catabolic pathway in plants for the degradation of 1,2-dichloroethane. *Plant Physiology*, 147(3), 1192–1198. <https://doi.org/10.1104/pp.108.119008>
- Minor, D. L. (2007). The Neurobiologist's Guide to Structural Biology: A Primer on Why Macromolecular Structure Matters and How to Evaluate Structural Data. *Neuron*, 54(4), 511–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.026>
- Müller, I. (2017, February 1). Guidelines for the successful generation of protein-ligand complex crystals. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, Vol. 73, pp. 79–92. <https://doi.org/10.1107/S2059798316020271>
- Newman, J., Egan, D., Walter, T. S., Meged, R., Berry, I., Jelloul, M. Ben, ... Perrakis, A. (2005). Towards rationalization of crystallization screening for small- To medium-sized academic laboratories: The PACT/JCSG+ strategy. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 61(10), 1426–1431. <https://doi.org/10.1107/S0907444905024984>
- Nwanochie, E., & Uversky, V. N. (2019). *Molecular Sciences Structure Determination by Single-Particle Cryo-Electron Microscopy: Only the Sky (and Intrinsic Disorder) is the Limit*. <https://doi.org/10.3390/ijms20174186>
- Oakley, A. J., Prokop, Z., Boháč, M., Kmuníček, J., Jedlička, T., Monincová, M., ... Wilce, M. C. J. (2002). Exploring the structure and activity of haloalkane dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26: Evidence for product- and water-mediated inhibition. *Biochemistry*, 41(15), 4847–4855. <https://doi.org/10.1021/bi015734i>
- Ohana, R. F., Encell, L. P., Zhao, K., Simpson, D., Slater, M. R., Urh, M., & Wood, K. V. (2009). HaloTag7: A genetically engineered tag that enhances bacterial expression of soluble proteins and improves protein purification. *Protein Expression and Purification*, 68(1), 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2009.05.010>

- Ollis, D. L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S. M., ... Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Engineering*, 5(3), 197–211. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1409539>
- Parker, J. L., & Newstead, S. (2016). Membrane protein crystallisation: Current trends and future perspectives. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 922, pp. 61–72). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-35072-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-35072-1_5)
- Patel, R. (2006). Biocatalysis: Synthesis of Chiral Intermediates for Pharmaceuticals. *Current Organic Chemistry*, 10(11), 1289–1321. <https://doi.org/10.2174/138527206777698011>
- Ptáček, P., Šoukal, F., & Opravil, T. (2018). Introduction to the Transition State Theory. In *Introducing the Effective Mass of Activated Complex and the Discussion on the Wave Function of this Instanton*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.78705>
- Ramsay, R. R., & Tipton, K. F. (2017, July 15). Assessment of Enzyme Inhibition: A Review with Examples from the Development of Monoamine Oxidase and Cholinesterase Inhibitory Drugs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, Vol. 22. <https://doi.org/10.3390/molecules22071192>
- Rivera-Calzada, A., & Carroni, M. (2019). Editorial: Technical Advances in Cryo-Electron Microscopy. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 72. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2019.00072>
- Robinson, P. K. (2015). Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry*, 59, 1–41. <https://doi.org/10.1042/BSE0590001>
- Rodwell, V. W., & Bender, D. A. (2015). *e t i n d Illustrated Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03449>
- Rupp, B. (2010). *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science.
- Satpathy, R., Konkimalla, V. B., & Ratha, J. (2015). Computer aided design of a luciferase like haloalkane dehalogenase enzyme by homology based rational protein design (HRPD) method. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 2(4), 315–323. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/299597259\\_Computer\\_Aided\\_Design\\_of\\_a\\_Luciferase\\_Like\\_Haloalkane\\_Dehalogenase\\_Enzyme\\_by\\_Homology\\_Based\\_Rational\\_Protein\\_Design\\_HRPD\\_Method](https://www.researchgate.net/publication/299597259_Computer_Aided_Design_of_a_Luciferase_Like_Haloalkane_Dehalogenase_Enzyme_by_Homology_Based_Rational_Protein_Design_HRPD_Method)
- Sattler, M., & Fesik, S. W. (1996). Use of deuterium labeling in NMR: Overcoming a sizeable problem. *Structure*, 4(11), 1245–1249. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(96\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(96)00133-5)
- Scapin, G. (2013). Molecular replacement then and now. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 69(11), 2266–2275. <https://doi.org/10.1107/S0907444913011426>
- Schuster, M., Joseph Sexton, D., Diggle, S. P., & Peter Greenberg, E. (2013). Acyl-Homoserine Lactone Quorum Sensing: From Evolution to Application. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 43–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155635>

- Shima, S., Tziatzios, C., Schubert, D., Fukada, H., Takahashi, K., Ermler, U., & Thauer, R. K. (1998). Lyotropic-salt-induced changes in monomer/dimer/tetramer association equilibrium of formyltransferase from the hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* in relation to the activity and thermostability of the enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 258(1), 85–92. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580085.x>
- Sinha, R., & Shukla, P. (2019). Current Trends in Protein Engineering: Updates and Progress. *Current Protein & Peptide Science*, 20(5), 398–407. <https://doi.org/10.2174/1389203720666181119120120>
- Smirnoff, N. (2018, July 1). Ascorbic acid metabolism and functions: A comparison of plants and mammals. *Free Radical Biology and Medicine*, Vol. 122, pp. 116–129. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.033>
- Stucki, G., & Thüer, M. (1995). Experiences of a Large-Scale Application of 1, 2-Dichloroethane Degrading Microorganisms for Groundwater Treatment. *Environmental Science and Technology*, 29(9), 2339–2345. <https://doi.org/10.1021/es00009a028>
- Swanson, P. E. (1999). Dehalogenases applied to industrial-scale biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 10(4), 365–369. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(99\)80066-4](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(99)80066-4)
- Szymański, W., Westerbeek, A., Janssen, D. B., & Feringa, B. L. (2011). A simple enantioconvergent and chemoenzymatic synthesis of optically active  $\alpha$ -substituted amides. *Angewandte Chemie - International Edition*, 50(45), 10712–10715. <https://doi.org/10.1002/anie.201105164>
- Taylor, G. L. (2010). Introduction to phasing. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 66(4), 325–338. <https://doi.org/10.1107/S0907444910006694>
- Tugarinov, V., Hwang, P. M., & Kay, L. E. (2004). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy of High-Molecular-Weight Proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 73(1), 107–146. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.074004>
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2008). *Protein crystallography for non-crystallographers, or how to get the best ( but not more ) from published macromolecular structures. 2007*, 1–21. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06178.x>
- Wlodawer, A., Minor, W., Dauter, Z., & Jaskolski, M. (2013). Protein crystallography for aspiring crystallographers. *Febs J.*, 280(22), 5705–5736. <https://doi.org/10.1111/febs.12495>
- Woo, J., Howell, M. H., & von Arnim, A. G. (2008). Structure-function studies on the active site of the coelenterazine-dependent luciferase from *Renilla*. *Protein Science*, 17(4), 725–735. <https://doi.org/10.1110/ps.073355508>
- Zimmerle, C. T., & Frieden, C. (1989). Analysis of progress curves by simulations generated by numerical integration. *Biochemical Journal*, 258(2), 381–387. <https://doi.org/10.1042/bj2580381>

## 8.2 Zdroje obrázků

**Obrázek 1** – Lienhard, G. E. (1963). Enzymatic Catalysis and Transition-State Theory. *Science*, 180(4082), 149-154. <https://doi.org/10.1126/science.180.4082.149>

**Obrázek 3** – Rodwell, V. W., & Bender, D. A. (2015). *Harper's Illustrated Biochemistry 30th edition*. <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03449>

**Obrázek 4** – Gehret, J. J., Gu, L., Geders, T. et al., (2012). Structure and activity of DmmA , a marine haloalkane dehalogenase. *Protein Science*, 21, 239–248. <https://doi.org/10.1002/pro.2009>

**Obrázek 5** – Koudelakova, T., Bidmanova, S., Dvorak, P., Pavelka, A., Chaloupkova, R., Prokop, Z., & Damborsky, J. (2013). Haloalkane dehalogenases: Biotechnological applications. *Biotechnology Journal*, 8(1), 32–45. <https://doi.org/10.1002/biot.201100486>

**Obrázek 6** – Gehret, J. J., Gu, L., Geders, T. et al., (2012). Structure and activity of DmmA , a marine haloalkane dehalogenase. *Protein Science* 21, 239–248. <https://doi.org/10.1002/pro.2009>

**Obrázek 7** – Minor, D. L. (2007). The Neurobiologist's Guide to Structural Biology: A Primer on Why Macromolecular Structure Matters and How to Evaluate Structural Data. *Neuron*, 54(4), 511–533. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.04.026>

Všechny ostatní otázky v této práci jsou vlastní tvorbou autorky.