

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Strukturní studie halogenalkandehalogenasy
DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO₂

Diplomová práce

Bc. Ivana Berková

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

České Budějovice 2019

Berková, I., (2019): Strukturální studie halogenalkandehalogenasy DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2. [Structural studies halogenalkandehalogenas DgaA of *Glaciecola agarilytica* NO2. Mgr. Thesis, in Czech] - p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotation:

Haloalkane dehalogenases (HLDs) are microbial enzymes that have attracted significant interest because of their ability to catalyze the irreversible hydrolysis of a wide range of halogenated compounds. These enzymes can be used as potential applicants in industrial catalysis, in the bioremediation and the biosensing of environmental pollutants. Novel haloalkane dehalogenase DgaA (EC 3.8.1.5, HLDs) belonging to the superfamily of α/β hydrolases, was isolated from a psychrophilic and moderately halophilic organism, *Glaciecola agarilytica* NO2, that was found in marine sediment collected from the East Sea, Korea. Main target of this thesis was the processing of diffraction data from crystals of DgaA proteins and subsequent solving and refinement of structure of studied protein.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji magisterskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své magisterské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdání textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce.

Rovněž souhlasím s porovnáním textu této kvalifikační práce a databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 13. 11. 2019

Ivana Berková

Poděkování

Děkuji své školitelce Prof. Mgr. Ivaně Kuté Smatanové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a připomínky. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Mgr. Tatyňce Prudnikové, Ph.D. Poděkování patří také mé rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Obsah:

1. Úvod	1
2. Literární přehled.....	3
2.1. Rentgenová difrakce	3
2.1.1. <i>Historie rentgenové difrakce</i>	3
2.1.2. <i>Braggův zákon</i>	6
2.2. Vlastnosti proteinových krystalů	8
2.2.1. <i>Struktura a symetrie proteinových krystalů</i>	8
2.3. Řešení struktury proteinu.....	11
2.3.1. <i>Fázový problém</i>	11
2.3.2. <i>Mapa elektronové hustoty</i>	15
2.3.3. <i>Budování modelu a zpřesňování struktury</i>	15
2.3.4. <i>Validace struktury</i>	17
2.4. Programy na zpracování dat	19
2.4.1. <i>XDSAPP</i>	19
2.4.2. <i>MolRep</i>	20
2.4.3. <i>Refinement (zpřesnění, zdokonalení)</i>	21
2.4.4. <i>WinCoot</i>	22
2.4.5. <i>MolProbit</i>	23
2.5. Využití halogenalkandehalogenas	25
3. Materiál a metody	27
3.1. Sběr difrakčních dat.....	27
3.2. Zpracování difrakčních dat.....	29
3.3. Řešení fázového problému	30
3.3.1. <i>Srovnání sekvencí</i>	30
3.3.2. <i>Molekulární nahrazení</i>	30
3.4. Upřesnění struktury	32
3.5. Validace struktury.....	34
3.6. Zobrazení struktury.....	35
4. Experimentální výsledky	36
4.1. Výsledky rentgenové analýzy.....	36
4.2. Výsledky zpracování difrakčních dat	37
4.3. Výsledky řešení fázového problému	38

4.3.1.	<i>Výsledky srovnání sekvencí</i>	38
4.3.2.	<i>Výsledky molekulárního nahrazení</i>	38
4.4.	Výsledky upřesnění struktury	40
4.5.	Výsledky validace struktury	42
4.6.	Výsledky zobrazení struktury	44
5.	Diskuse	45
6.	Závěr	48
7.	Seznam literatury	49

1. Úvod

Krystalografie proteinů je jednou z klíčových technik strukturní biologie poskytující informace o struktuře proteinů. Jelikož proteiny jako strukturní a funkční jednotky hrají klíčovou roli v těle živých organismů, poskytla tato technika pochopení jejich funkcí a následné ovlivnění jejich činnosti. Z tohoto hlediska získala nezastupitelné místo v oblasti farmaceutického průmyslu, např. při hledání nových léčiv, jako v případě imunodeficientního viru (HIV) (Ulbrich a kol., 2012). V neposlední řadě přinesla nemalé informace z hlediska imunologie – T-lymfocyty, či umožnila pochopení struktury ribozomálního mechanismu (Ulbrich a kol., 2012).

Halogenalkandehalogenasy (HLDs) patřící mezi mikrobiální enzymy, byly poprvé identifikovány u gramnegativní bakterie *Xantobacter autotrophicus* (Janssen, 1985; Janssen a kol., 1988; Janssen a kol., 1989). Tato bakterie halogenované sloučeniny využívá jako jediný zdroj energie a uhlíku. Mechanismus získávání uhlíku probíhá prostřednictvím hydrolytického štěpení vazby halogen – uhlík, při němž vzniká alkylenový meziprodukt a posléze primární alkohol a vodík (Janssen, 2004). Pomocí tohoto mechanismu, který je charakteristický pro HLDs, se tato skupina stala vybranou oblastí intenzivního zkoumání v rámci životního prostředí pro odbourávání halogenových sloučenin (zejména s obsahem bromu a chloru), které jsou součástí antropogenních látek (Damborský a kol., 2001; Koudeláková a kol., 2011).

Halogenalkandehalogenasy se dělí podle typu bakterií, ze kterých byly získány, např. z bakterií *Xantobacter* a *Rhodococcus*. HLDs jsou rozděleny do tří podrodin (HLD –I, HLD –II a HLD –III) zejména z hlediska sekvenční podobnosti, složení katalytické pentády a strukturního složení víčkové domény. Za sesterské podskupiny považujeme HLD-I a HLD-III, neboť složení jejich katalytické triády je tvořené ze zbytku kyseliny asparágové a histidinu (Damborský a kol., 2010).

Struktura HLDs se skládá ze dvou domén, z hlavní a na ní dosedající víčkové domény. Hlavní doména je tvořena β -skládanými listy a α -šroubovicemi, kdežto víčková doména je tvořena především α -šroubovicemi. Mezi těmito domény se nachází aktivní místo, podle kterého je možné charakterizovat vlastnosti mikrobiálních enzymů HLDs a jejich zařazení do tří podrodin (Damborský a kol., 2010; Otyepka a kol., 2002).

Teoretická část práce zahrnuje charakteristiku rentgenové difrakce, vlastnosti a symetrii proteinových krystalů. Dále jsou zde uvedeny programy, které se zabývají zpracováním dat pro řešení struktury proteinů a následuje využití halogenalkandehalogenas.

Praktická část práce se zabývá řešením struktury proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 za využití různých programů - od zpracování difrakčních dat přes validaci až po grafické zobrazení konečné struktury.

Cíle práce:

1. Zpracování difrakčních dat získaných z krystalů proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2
2. Vyřešení a upřesnění struktury studovaného proteinu
3. Příprava struktury pro deponování do PDB
4. Porovnání struktury DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 s podobnými proteinovými strukturami

2. Literární přehled

2.1. Rentgenová difrakce

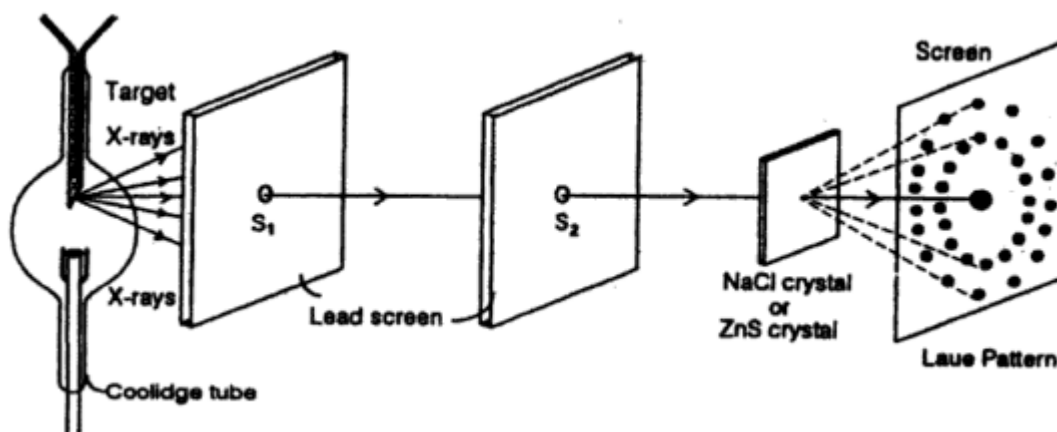
Rentgenová difrakce se v současné době řadí mezi nejhojněji využívané techniky pro stanovení struktury proteinů. Znalost strukturních informací umožňuje vysvětlení již dříve nezodpovězených otázek ve všech biologických odvětvích. (Smyth a kol., 2000).

2.1.1. Historie rentgenové difrakce

Dříve než byla známa rentgenová difrakce, bylo zjištění proteinové struktury poměrně náročný a zdoluhavý proces, často limitovaný na pečlivé měření úhlů mezi vzniklými krystalovými plochami a vykreslování vektorů do rovinných výkresů. Pomocí pečlivého měření a vykreslování došlo k vytvoření krystalové třídy nebo bodové skupiny krystalů. Pro zjištění vnitřní symetrie krystalů se krystalografové pokoušeli měřit fyzikální vlastnosti, jako byl piezoelektrický efekt nebo měření dvojitého lomu. Kromě těchto údajů, neměli žádné experimentální důkazy o umístění atomů v krystalové struktuře, kterými by zjistili strukturu krystalů. Tato teoretická krystalografie se záhy změnila s objevem Conrada Röntgena (Rupp, 2009).

Wilhelm Conrad Röntgen byl fyzik, který poprvé popsal nový typ neviditelného a pronikajícího záření z katodové trubice v roce 1895. Tento typ záření nazval rentgenovými paprsky (X-rays) (Dreth, 2007). V následujících letech Max von Laue během experimentování s rentgenovým zářením zjistil, že atomy v přírodním krystalu jsou pravidelně uspořádány ve stejných vzdálenostech a vzdálenosti mezi jednotlivými vrstvami odpovídají vlnové délce rentgenových paprsků. Z tohoto hlediska docházelo k interakci mezi rentgenovým zářením a přírodní trojrozměrnou difrakční mřížkou krystalu (Singh, 2009). To znamená, že pro vyřešení krystalové struktury dojde k určení a upřesnění souřadnic a parametrů teplotního pohybu všech atomů v elementární buňce (Kratohvíl a spol., 2008).

V roce 1913 Waltemen Friedrich, Paul Knipping a Max von Laue získali první rentgenové difrakční obrazce. Své první data (difraktogramy) získali z jednoduchých sloučenin, jako byl diamant, sulfid zinečnatý či chlorid sodný. (Dreth, 2007; Rupp, 2009). Schématické znázornění Laueova experimentálního uspořádání je znázorněno na Obr. 1. (Singh, 2009). Tímto objevem potvrdili základní atomovou konstituci hmoty a interakce (vazby) mezi atomy a poskytli tak, klíčové důkazy pro vývoj atomové teorie hmoty (Rupp, 2009). Výsledky, které publikovali v roce 1912, byly přímým důkazem existence vlnové povahy rentgenových paprsků (Dreth, 2007).

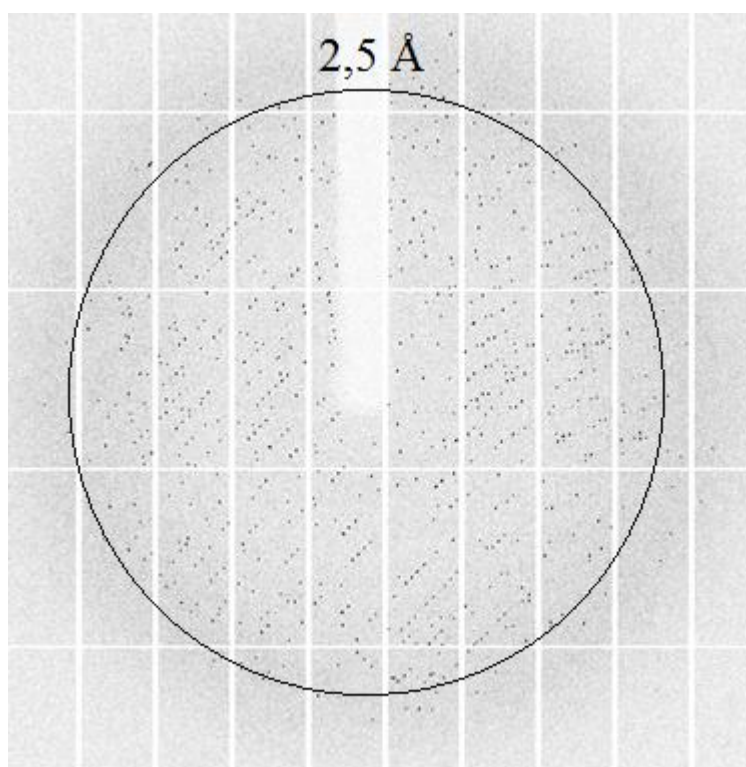


Obr. 1: Laueovo experimentální uspořádání (převzato z Singh, 2009).

Schématické znázornění Laueova experimentálního uspořádání. Rentgenový paprsek pocházející z trubice „Coolidge tube“ je směřován do jemné tužky průchodem dvěma olověnými síty. Olověná síta S_1 a S_2 absorbují všechny paprsky, s výjimkou těch, které procházejí správně orientovaným krystalem sulfidu zinečnatého nebo chloridu sodného, získá se symetrický difraktogram na fotografické desce. Tento vzor se skládá z centrální tmavé skvrny a dalších symetrických bodů odpovídající konstruktivní interferenci množiny krystalových rovin vyhovující Braggově rovnici.

Správnost rentgenového difraktogramu navrhl Dr. William Bragg, který tvrdil, že difrakční vzor je charakteristický pro daný krystal a jednotlivé skvrny (Laueovy skvrny) jsou způsobeny konstruktivní interferencí. Navíc tento experiment poukázal na dvě důležité skutečnosti – rentgenové záření jsou elektromagnetické vlny krátké vlnové délky – 10^{-11} m a atomy krystalu jsou uspořádány v pravidelné trojrozměrné mřížce. Zjištění těchto skutečností umožnilo krystalografům započít éru rentgenových difrakčních metod, které slouží ke zjištění struktury krystalů (Singh, 2009).

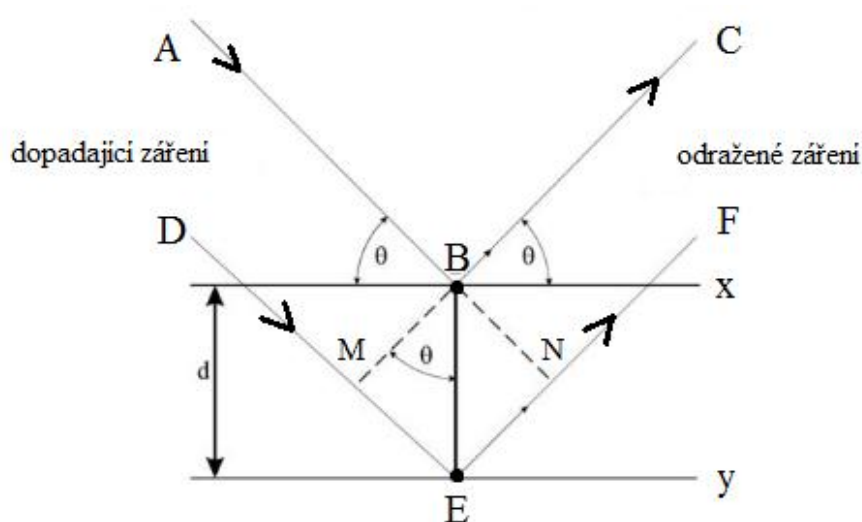
Elektromagnetické záření, které dopadá na vzorek krystalu, interaguje s elektrony třemi možnými způsoby. Prvním způsobem je pohlcení rentgenového záření elektrony atomu krystalů, dále elastický rozptyl (Rayleigh) a nepružný rozptyl (Comptonův). Nepružný rozptyl, nebo-li negativní (destruktivní) interference, přispívá k radiačnímu poškození, zvyšuje šumění a vytváří tak pozadí difraktogramu (difrakčního obrazce). To znamená, že paprsky rentgenového záření jsou v protifázi a dojde tak k jejich vyrušení. Nejdůležitější ze tří způsobů interakce s elektrony je pružný rozptyl (pozitivní interference). Při pozitivní interferenci nedochází ke ztrátě energie a frekvence elektronů je stejná, ale pouze se mění směr šíření a vzniká tak sekundární neboli difraktované záření. Během pozitivní interference, kdy jsou paprsky rentgenového záření ve stejné fázi, dojde k jejich interferenci (zesílení). Podmínku pro konstruktivní interferenci vysvětluje Braggův zákon. Sumace takovýchto rozptýlených vln vede, k tvorbě difrakčního obrazce, viz Obr. 2, který se používá k určení struktury proteinů (Rupp, 2009).



Obr. 2: Difrakční obrazec proteinu DgaA. Tmavé skvrny – pozitivní interference a světlá místa – negativní interference (šum pozadí) (Převzato z Berková, 2016).

2.1.2. Braggův zákon

Braggův zákon je podmínkou pro konstruktivní interferenci (tmavé tečky) v difraktogramu. W. L. Bragg vysvětluje pozitivní interferenci tak, že úzký paprsek monochromatických rentgenových paprsků s vlnovou délkou λ dopadá pod úhlem θ na množinu paralelních atomových rovin krystalu, jak je znázorněno na Obr. 3. Tyto paprsky jsou rozptýleny atomy (B a E) dvou sousedních rovin 'd', ve všech směrech. Konstruktivní interference bude probíhat pouze mezi těmito rozptylovými vlnami, které se odrážejí zrcadlově (u zrcadlového odrazu je úhel dopadu roven úhlu rozptylu $\theta = \theta'$, leží ve stejné rovině) z rovnoběžných rovin atomů, mají pouze rozdílnou dráhu $n\lambda$, kde λ je vlnová délka rentgenových paprsků a n je celé číslo (Singh, 2009).

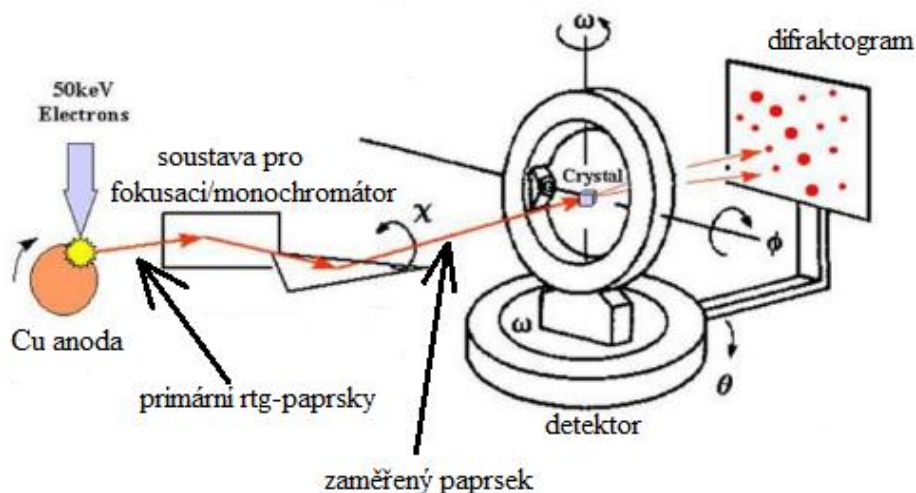


Obr. 3: Braggův zákon (Braggův rozptyl). Dvě dopadající vlny rentgenového záření (Podle Singh, (2009) vytvořila Ivana Berková).

Dvě vlny rentgenového záření A, D, rozptylující se na atomech B a E, jsou zrcadlově odráženy podél BC a EF z krystalových rovin x a y.

Braggův zákon lze vyjádřit matematicky jako: $n\lambda = 2d \sin\theta$, kde λ je vlnová délka dopadajících rentgenových paprsků, n je celé číslo ($n = 1,2,3\dots$), které odpovídá spektru první, druhé, třetí řady a tak dále, d je vzdálenost mezi rovinami, θ je úhel mezi přichozími (rozptýlenými) vlnami rentgenového záření a rovinami, $2d \sin\theta$ je rozdíl cesty mezi vlnami (Rupp, 2009; Singh, 2009).

Pro zjištění struktury proteinu je zapotřebí vzorek monokrystalického či polykrystalického materiálu. Pokud je použit monokrystal, mluvíme o monokrystalové RTG difrakční analýze a v případě polykrystalických vzorků, se jedná o práškovou RTG difrakční analýzu. Experimentální zařízení pro RTG strukturní analýzu se nazývá difraktometr, viz Obr. 4. (Kratochvíl a spol., 2008).



Obr. 4: Schéma difraktometru (převzato z Víték, 2017).

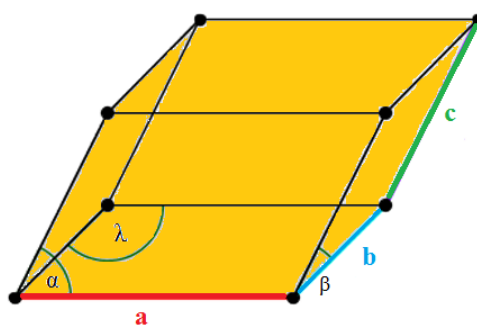
Základní složky proteinového rentgenového difraktometru jsou: zdroj monochromatického rentgenového záření uzavřený v trubici s Cu anodou, která musí být nepřetržitě chlazená (Brynda, 2002; Fernanda, 2018). Systém je následně vybaven optickou soustavou pro fokusaci difrakčního záření – jedná se o systém zrcadel a clon, které usměřují difrakční záření (Brynda, 2002; Pala a spol., 2012). Další nezbytnou součástí difraktometru je tzv. monochromátor, který slouží pro selekci jedné vlnové délky záření a kolimátor, který upravuje velikost procházejícího rentgenového paprsku, tzn., umožňuje průchod jen úzkému svazku záření a zbylé odstíní (Brynda, 2002). V neposlední řadě je důležitý detektor, který se pohybuje v kruhu kolem vzorku a pokrývá všechny úhly záření a zaznamenává jejich intenzitu (Fernanda, 2018). Výsledkem rentgenového difraktometru je difrakční obrazec s pozitivní a negativní interferencí.

2.2. Vlastnosti proteinových krystalů

Krystaly proteinů se vyznačují pravidelným uspořádáním do 3D struktury. Základní stavební jednotka tohoto uspořádání, tzv. elementární buňka, vytváří krystalovou mřížku. Uspořádání v krystalové mřížce je zprostředkováno slabými ne vazebnými interakcemi (např.: vodíkové můstky), které mají za následek nízkou mechanickou odolnost (proteiny jsou obvykle velmi křehké a lehce rozdrtitelné) a také jsou velmi citlivé k vnějším změnám (pH, teplota a jiné další). Pokud jsou krystaly proteinů vystaveny dehydrataci či radiaci dochází k rozsáhlému poškození nebo dokonce rozpadu krystalu. Veškeré tyto vlastnosti jsou zapříčiněné strukturou a symetrií proteinových krystalů (McPherson, 2004).

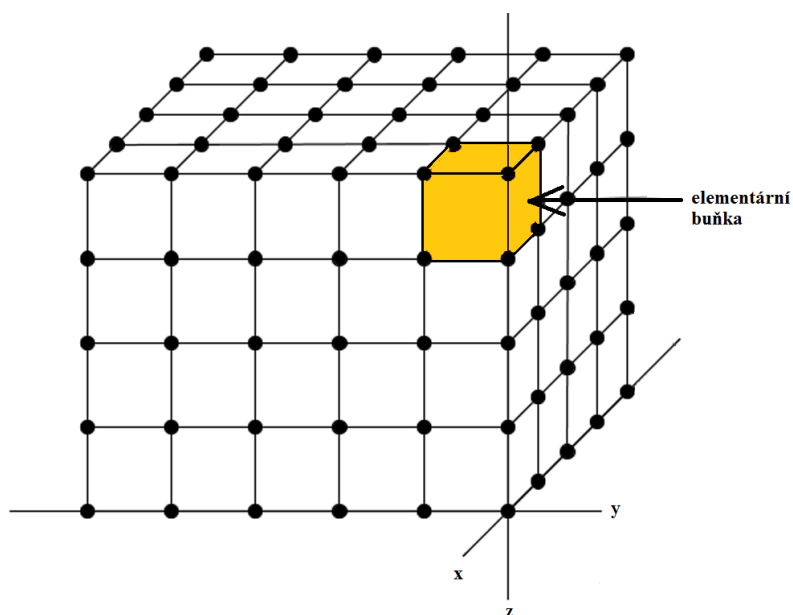
2.2.1. Struktura a symetrie proteinových krystalů

Krystal proteinu je pevná látka, která se vyznačuje pravidelným uspořádáním. Proteinový krystal je charakterizován krystalovou mřížkou, kterou tvoří opakující se základní stavební prvek – tzv. elementární buňka, viz Obr. 5 (Ilari a Savino, 2008; J. Drenth, 2007). Elementární buňka je definována třemi translačními vektory a , b , c a tyto vektory spolu svírají úhly α , β , a λ (Drenth, 2007).



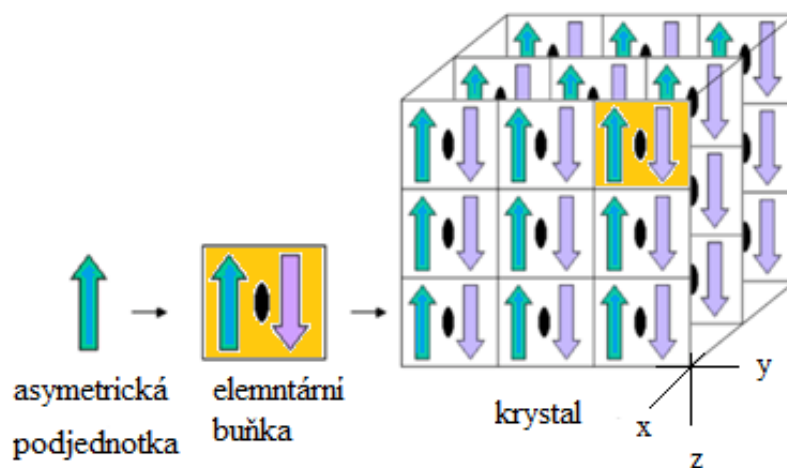
Obr. 5: Elementární buňka krystalové mřížky, která je definována translačními vektory a , b , c a spolu svírají úhly α , β , a λ (podle Drenth, 2007 vytvořila Ivana Berková, 2019).

Opakováním těchto jednotek dochází k vytvoření krystalové mřížky, viz Obr. 6.



Obr. 6: Tridimenzionální krystalová mřížka tvořena základní (elementární) stavební jednotkou (Podle Dreth, 2007 vytvořila Ivana Berková, 2019).

Krystalová mřížka je tedy tvořena ze základní stavební jednotky, nicméně tato jednotka je dále tvořena z tzv. asymetrické podjednotky, která je považována za nejmenší jednotku, na kterou lze vztahovat operaci symetrie. To znamená, že pokud aplikujeme operace krystalografické symetrie na asymetrickou jednotku, dojde k vytvoření jedné elementární buňky, která při překladu ve třech směrech vytvoří celý krystal proteinu, viz Obr. 7. (PDB-101, 2019).



Obr. 7: Asymetrická podjednotka, kterou představuje modrozelená šipka a tím, že se otočí o 180° kolem krystalografické osy symetrie, vzniká druhá kopie tohoto tvaru. Společně tyto dva tvary vytvářejí základní stavební jednotku, která při překladu ve třech směrech vytvoří krystalovou mřížku – krystal proteinu (podle PDB-101, 2019 vytvořila Ivana Berková, 2019).

Existuje několik způsobů, jak asymetrické podjednotky uspořádat do trojrozměrné krystalové mřížky proteinu. Výsledky těchto způsobů tvoří prostorové grupy (space group) a celkem je těchto prostorových grup na 230. Každá z těchto prostorových skupin je tvořena celočíselným indexem, parametry a symboly, které popisují vlastnosti krystalové mřížky (Aroyo, 2016).

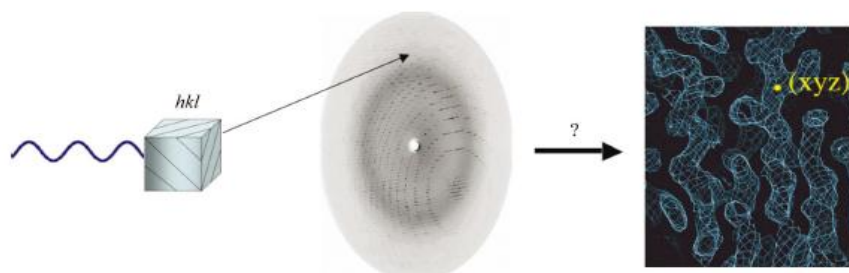
2.3. Řešení struktury proteinu

Ke stanovení struktury proteinu, se používá rentgenová difrakční analýza, která je založena na použití rentgenového záření, kde svazkem monochromatického rentgenového záření ozařujeme třídímní strukturu proteinu (krystalovou mřížku). Při jejím ozařování dochází k rozptylu rentgenového záření na elektronech a výsledkem je difrakční obrazec světlých a tmavých míst, odpovídající pozitivní či negativní interferenci (B. Rupp, 2009).

Každý odraz (strukturní faktor) rentgenového záření je charakterizován amplitudou a fází, který slouží pro rekonstrukci elektronové hustoty. Nicméně difrakční experiment (difrakční vzor) neposkytuje přímou informaci o reflexních fázích. Tyto informace jsou během rentgenového difrakčního experimentu ztraceny a tato neznalost fází se označuje jako fázový problém (G. Taylor, 2003; Wlodawer a kol., 2013).

2.3.1. Fázový problém

Každá skvrna (pozitivní a negativní interference) je popsána tzv. strukturním faktorem. Strukturní faktor představuje součet všech rozptylů (jsou tvořeny amplitudou a fází) ze všech atomů, které tvoří elementární buňku krystalu. Fourierovou transformací tohoto faktoru můžeme získat rozložení elektronové hustoty, viz Obr. 8. Amplitudu získáme z naměřené intenzity záření, jako druhou odmocninu. Kdežto z difrakčního experimentu nezískáme žádnou přímou informaci o fázi a tato skutečnost se označuje jako fázový problém (G. Taylor, 2003; Wlodawer a kol., 2013).



Obr. 8: Difrakční experiment.

RTG – záření dopadá na krystal proteinu (krystalovou mřížku) s určitou intenzitou (hkl). Amplitu vlny ($|F(hkl)|$) lze vypočítat z intenzity dopadajícího záření, jako druhá odmocnina. K výpočtu elektronové hustoty v poloze x, y a z (xyz představují souřadnice elementární buňky), vyžaduje se sčítání všech hkl . To znamená: hustota elektronů $\rho(xyz) =$ součet příspěvků do bodu (xyz) vln rozptýlených z roviny (hkl) , jehož amplituda závisí na počtu elektronů v rovině s přidáním správné relativní fáze. Matematické vyjádření:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum |F_{hkl}| \exp(i\pi h x + 2\pi k y + 2\pi l z),$$

Kde h, k a l jsou tzv. Millerovy indexy, V je objem elementární jednotky a ρ je elektronová hustota v bodě x, y a z . (podle G. Taylor, 2003; L. Židek, 2015).

Na základě této skutečnosti musí být fáze potvrzena nepřímou. V dnešní době existuje několik metod, jak vyřešit fázový problém: přímé metody, molekulární nahrazení, izomorfní nahrazení a anomální rozptyl (Woldawer a kol., 2003).

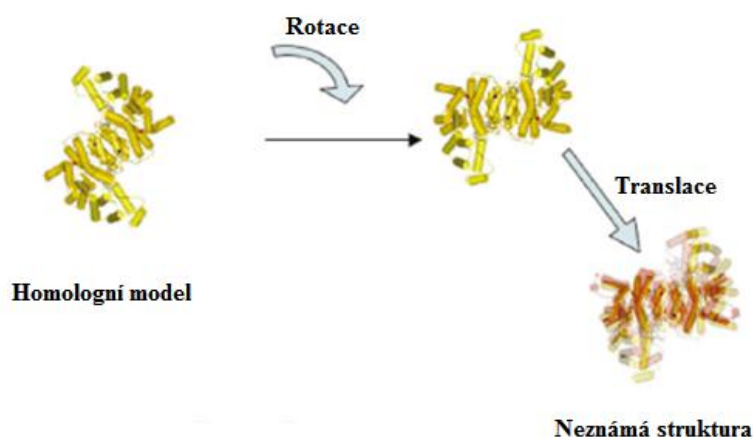
- **Přímé metody (direct methods)**

Jedná se o matematické techniky, které umožňují vyřešit fázový problém pomocí analytických metod bez znalosti strukturně-chemických informací (Allegra, 1980). Jinými slovy přímé metody využívají pravděpodobnostní vztahy mezi strukturálními faktory určitých skupin reflexí k odhadu jejich fází, obvykle rozšířením souboru fáze a vyžadují, aby údaje o difrakci probíhaly alespoň k atomovému rozlišení 1,2 Å (Woldawer a kol., 2003).

Přímé metody se používají převážně pro řešení malých molekul a nikoli při řešení velkých makromolekulárních struktur. Mohou být využity i při nalezení určitých „speciálních“ atomů, jako jsou těžké nebo anomální podstruktury v makromolekulárních krystalech (Woldawer a kol., 2003). Přímá metoda byla použita při řešení struktury inhibitoru trypsinu (R. Thaimattam, 2002).

- **Molekulární nahrazení (molecular replacement)**

Molekulární nahrazení je jednou z nejvíce využívaných metod v krystalografii pro řešení fázového problému. Tato metoda se používá, pokud máme strukturně podobný model proteinu k námi shodnému proteinu (sekvenční podobnost musí být > 25%) (G. Taylor, 2003; B. Rupp, 2009). To znamená, že tento model (strukturu) již někdo v minulosti vyřešil a jeho struktura je dostatečně podobná. Dochází k porovnávání obou struktur, neboť tato podobnost většinou odráží primární podobnost, takže srovnáním sekvencí získáme dobrý úsudek, zda molekulární nahrazení bude úspěšné (L. Židek, 2015). Molekula se známou strukturou (struktura modelu), která je z více než 25% podobná cílové struktuře, je umístěná v asymetrické jednotce tak, aby byla minimalizována odchylka kořenového středního čtverce mezi modelem a cílem (určují se tři rotační úhly a polohové parametry určující polohu). Fáze, která je vypočítána z modelové struktury, se pak kombinuje s amplitudou naměřenou z cílové struktury, za účelem vytvoření počáteční mapy elektronové hustoty. Tedy model nahrazuje cíl pro výpočet fází. Pokud je odchylka mezi modelem a cílovou strukturou malá, pak mapa elektronové hustoty bude ukazovat nové vlastnosti cílové struktury. Z toho hlediska považujeme fázový problém za vyřešený (A. J. McCoy, 2013).



Obr. 9: **Molekulární nahrazení.** Orientace neznámé struktury je zjištěna rotační funkční a její poloha v nové jednotkové buňce translační funkcí (podle z G.Taylor, 2003, vytvořila Ivana Berková, 2019).

Pro molekulární nahrazení se používají programy X-PLOR/CNS, AmoRe, MOLREP nebo Phaser, z nichž se v současné době nejhojněji využívají MOLREP a Phaser. Pomocí těchto metod bylo v současné době vyřešeno více než 90 % struktur (Scapin, 2013).

- **Izomorfní náhrada nahrazení (isomorphous replacement)**

Izomorfní nahrazení využívá rozdíly v intenzitě odrazu (porovnání difrakčních obrazců) nativního krystalu a jeho derivátu. Krystal derivátu je charakterizován tak, že ve struktuře má navázán jeden či více atomů s velkým počtem elektronů (těžké atomy). V praxi se tento derivát ponoří do roztoku obsahující sůl těžkých kovů – Au, Hg, Pb, Pt a jiné další. Tyto těžké kovy difundují kanálky, které jsou obsaženy v krystalu a váží se na specifická místa. V případě navázání těžkého kovu musí oba krystaly (krystal bez navázání těžkého kovu a nativní krystal) vykazovat stejnou velikost prostoru, rozměry jednotkových buněk a orientaci proteinu v buňce (stejně mřížkové parametry). (G. Taylor, 2003; Lattman a Loll, 2008; B. Rupp, 2009).

Přidání těžkých kovů do struktury krystalu významně přispívá k difrakci, a následně tím ovlivňuje intenzitu rozptýlených paprsků. Porovnáním difrakčních obrazců nativního proteinu a jeho derivátu, dochází k odvození pozice těžkých kovů a získání hodnoty počáteční fáze (G. Taylor, 2003).

- **Metody anomálního rozptylu (anomalous dispersion methods)**

Výše zmíněné metody jsou založené na tom, že rentgenové záření prochází krystalem netečně vůči elektronům, tedy nijak nedochází k výměně energie mezi krystalem a zářením (L. Žídek, 2015).

V případě anomálního rozptylu je to jinak. Tato metoda je charakteristická tím, že se frekvence rentgenového záření blíží frekvenci rezonančního přechodu mezi jednotlivými stavy elektronů (dochází k interakci mezi zářením a elektrony). Pohlcený foton umožní přechod elektronu do jiného stavu a vyzářený foton bude mít jinou amplitudu a fázi než na počátku. Tento rozdíl je označován za anomální rozptyl (Lattman a Loll, 2008; L. Žídek, 2015).

2.3.2. Mapa elektronové hustoty

Vyřešením fázového problému prostřednictvím vhodně zvolené metody, dojde k vytvoření mapy elektronové hustoty. Elektronová mapa je primárním výsledkem experimentu s rentgenovou difrakcí a reprezentuje distribuci atomů v prostoru (Smyth a Martin, 2000).

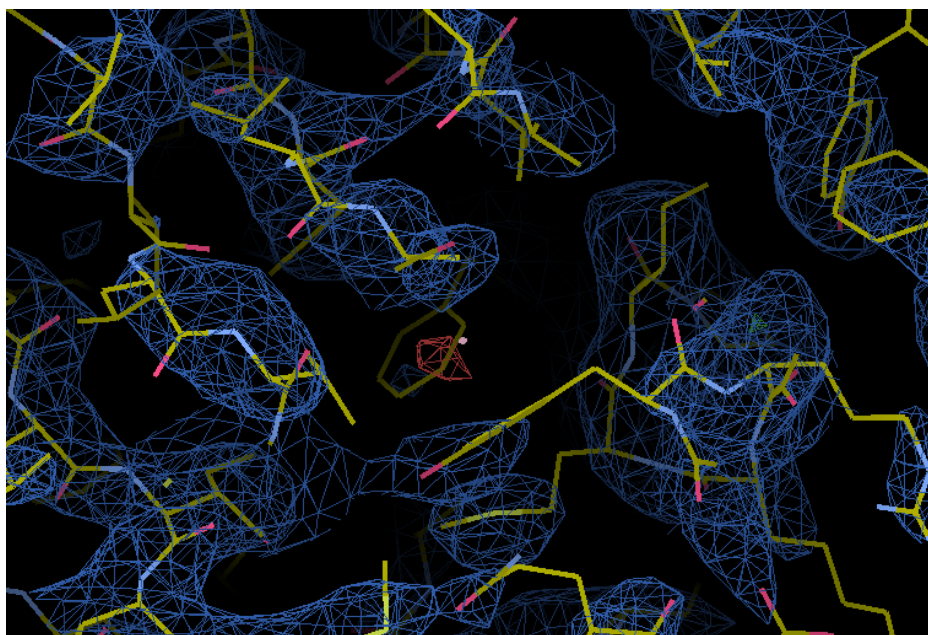
Po získání mapy elektronové hustoty, je zapotřebí získat kvantitativní reprezentaci atomové struktury molekuly. To znamená, že je potřeba vědět, kde jsou všechny atomy – vytvořit seznam souřadnic x , y , z každého atomu molekul. Získání těchto souřadnic odpovídá základní molekulární struktuře, kterou konstruujeme pomocí počítačového softwaru. Software nám umožňuje manipulovat s pozicemi atomů, dokud se neshodují s experimentálními obrazy (E. Lattman a P. Loll, 2008).

Interpretace map elektronové hustoty, a tím i přesnost atomových modelů je závislá na rozlišení (tj. na počtu odrazů obsažené v mapovém výpočtu) (Wlodawer a kol., 2003). Na základě kvality krystalu (kvalita difrakčních dat) může elektronová mapa obsahovat šum, a tím způsobit nezřetelný tvar molekuly. Čím lepší rozlišení získáme, tím bude snadnější stavba modelu. Rozlišení se udává v Å [$1 \text{ Å} = 0,1 \text{ nm}$] a za atomární rozlišení se považuje 1 Å . Při tomto rozlišení můžeme pozorovat pozice jednotlivých atomů. Tím, jak se rozlišení snižuje (Å nabývají na hodnotě) dochází ke zkreslení a není tedy možné určit pozici jednotlivých atomů. Za mezní hodnotu rozlišení se považuje 3 Å (Smyth a Martin, 2000).

2.3.3. Budování modelu a zpřesňování struktury

Po získání dostatečně kvalitní mapy elektronové hustoty je důležité, do jejich kontur vložit model proteinové struktury, viz obr. 10. Minimální shoda aminokyselinové sekvence se uvádí $> 25\%$. Po vložení modelového proteinu dochází k vytvoření prvotního modelu, který obsahuje mnoho chyb, které se opravují v procesu zpřesňování modelu (tzv. refinement) (Emsley a Cowtan, 2004; E. Lattman a P. Loll, 2008). To znamená, že se provádí opakovaná minimalizace, vypočítají se nové strukturní faktory a výsledkem je přesnější mapa elektronové hustoty (L. Židek, 2015).

Automatickou či manuální úpravou je snaha docílit, co možná nejlepší shody mezi pozorovanými a vypočítanými difrakčními daty. Pro úpravu těchto chyb se využívá celá řada počítačových softwarů, např. Coot (který je propojen s programem REFMAC poskytující další kroky k upřesnění struktury), XtalView nebo O (Emsley a Cowtan, 2004; E. Lattman a P. Loll, 2008). Měřítkem správnosti (kvality) získaného modelu je tzv. R faktor. R faktor udává míru shody mezi krystalografickým modelem a experimentálními RTG daty. To znamená, že pokud se snižuje hodnota R, dochází ke zdokonalování struktury (L. Žídek, 2015).



Obr. 10: **Mapa elektronové hustoty molekuly proteinu (modře) s vestavěným strukturálním modelem (vytvořila Ivana Berková, 2019).**

Výsledkem zpřesňování a modelování je model struktury, ve kterém známe souřadnice všech atomů (x , y , z). Nicméně tento výsledek není vždy úplný, neboť se v modelu vyskytují části molekul, které mohou zaujímat různou konformaci. Je tedy velmi běžné, že z difrakčních dat nelze určit polohu některých pohyblivých aminokyselin na koncích polypeptidových řetězců či polohu některých atomů v postranních řetězcích na povrchu biomakromolekul (L. Žídek, 2015).

2.3.4. Validace struktury

Během řešení struktury proteinu je molekulové modelování a zpřesňování čistě subjektivní. Z čehož vyplývá, že je zapotřebí programů ověřujících kvalitu dané struktury. Na validaci se používá celá řada programů, které sledují kvalitu a jsou schopny detekovat a odstranit chyby. Jedním z takových programů, který je schopen dané chyby detekovat, aby byl získán co možná nejlepší konečný výsledek, je MolProbity. MolProbity je schopen nabídnout validaci kvality pro nukleové kyseliny, řadu komplexů a v neposlední řadě struktury proteinů, více v kapitole 2.5 (Kleywegt, 2000).

Meřítko kvality získané struktury:

R – faktor

R-faktor nebo také faktor spolehlivosti je řazen mezi významné a nejhojněji používané měřítko kvality. Faktor, který vyjadřuje míru shody mezi krystalografickým modelem a experimentálně naměřenými rentgenovými difrakčními daty. Jinak řečeno, vyjadřuje shodu toho, jak upřesněná struktura odpovídá zjištěným datům (Kleywegt a Brünger, 1996; Kleywegt, 2000; Kasplus a Diederichts, 2012).

Hodnoty, které může R faktor nabývat, jsou 0 – 1. Hodnota 0 odpovídá dokonalé shodě mezi experimentálním pozorováním a strukturními faktory předpovězenými z modelu. To znamená, že během validace by se měl R-faktor snižovat. A tím by mělo docházet k zpřesňování struktury daného proteinu. Za znak správnosti u dat s vysokým rozlišením se považuje hodnota R-faktoru 0,25 a méně. Nicméně existují případy, kdy nízká hodnota R-faktoru nemusí nutně odpovídat dobrému modelu (Kleywegt a Brünger, 1996; Kleywegt, 2000). Podle Žídka (2015) je také možné získat nízkou hodnotu R faktoru uměle, například doplněním molekul vody.

- **R_{free} - faktor**

R_{free} je definován stejným vztahem jako v případě R-faktoru s rozdílem, že se počítá jen s malou podmnožinou odrazů (reflexí). Tento faktor měří míru, do jaké model odpovídá difrakčním datům testovací sady. Jinými slovy, faktor R_{free} by neměl přesáhnout hodnotu 0,40, bez ohledu na hodnotu R faktoru, která by byla pod 0,20. Protože pokud by byla hodnota nad 0,40, jednalo by se o modely obsahující vážné chyby (Kleywegt a Brünger, 1996; Karplus a Diederichts, 2012).

Podle Kleywegta a Brünera (1996) by měl být rozdíl mezi hodnotami R-faktoru a R_{free} - faktoru malý.

- **Kompletnost dat**

Kompletnost dat udává, jaká část reflexí byla v rozsahu Braggových vzdáleností skutečně naměřena ze všech pozorovatelných hodnot. Hodnota komplexnosti se udává v procentech a nejvyšší hodnota dosahuje 100. Pokud je hodnota méně než 100, znamená to, že nějaké reflexe chybí a dochází ke zhoršení modelových parametrů (Kleywegt, 2000; Weiss, 2001; Dauter, 2017).

- **Ramachandranův diagram**

Dalším spolehlivým měřítkem kvality, které posuzuje, zda je řešená struktura proteinu dostatečně kvalitní, je Ramachandranův diagram. Ramachandranův diagram je součástí validačních nástrojů, jako například: PROCHECK, MolProbity a jiné další. Princip Ramachandranova diagramu je založen na skutečnosti, že každá aminokyselina v polypeptidovém řetězci je charakterizována dvěma torzními úhly Φ a Ψ . To znamená, že každá aminokyselina je v polypeptidovém řetězci uspořádána tak, aby nedocházelo ke sterickým zábránám pomocí kombinací těchto dvou úhlů, které jsou dovolené. K tomu slouží tento diagram, který vynáší tyto kombinace obou úhlů – úhel Φ je osa x a úhel Ψ je osa y. Graf je rozdělen do několika oblastí. Oblast, která je přednostně zajímavá, oblast povolená, oblast výjimečná a oblast zakázaná. Udává se, že pokud je hodnota Ramachandranova diagramu nad 90%, tak se jedná o kvalitní strukturu studovaného proteinu (Laskowski a kol., 1993; Vondrášek a Vymětal, 2016).

2.4. Programy na zpracování dat

Získání struktury proteinů je zdlouhavý a náročný proces, který lze zrealizovat pomocí několika počítačových programů, např. XDSAPP, MolRep, WinCoot a jiné další.

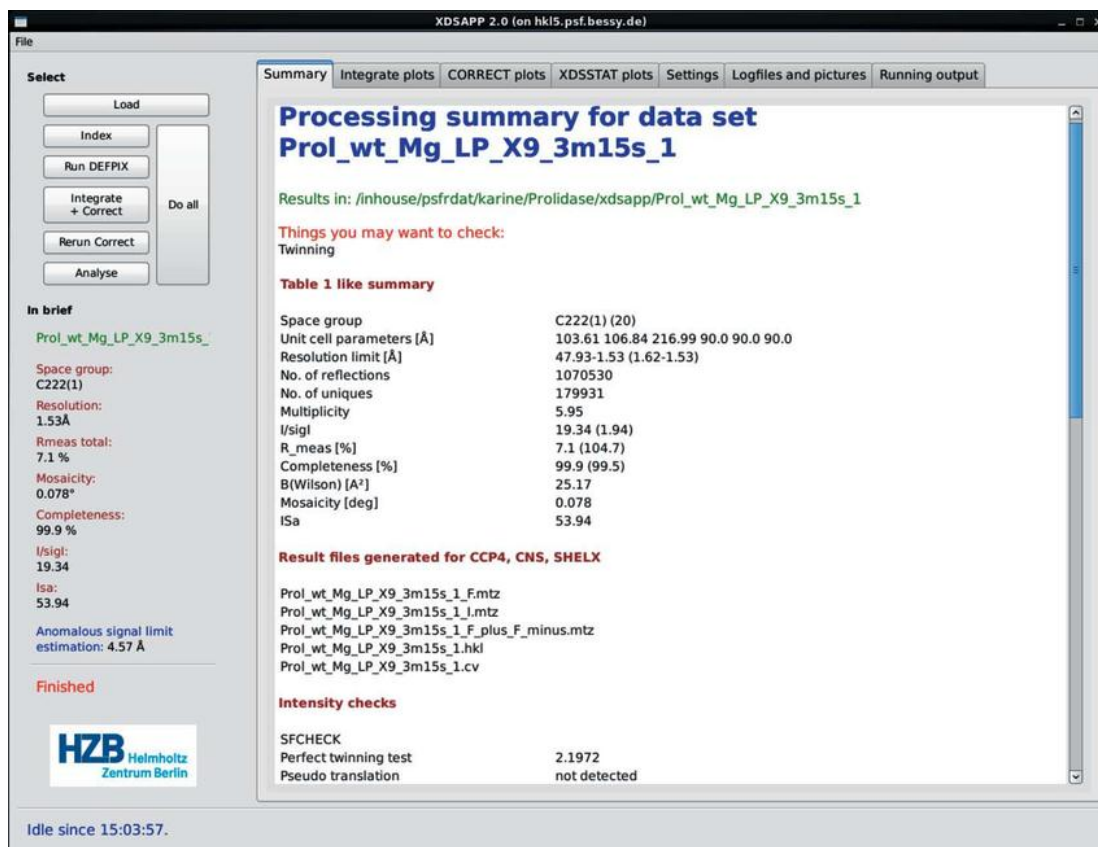
2.4.1. XDSAPP

Prvotním krokem pro získání struktury proteinu je zpracování difrakčních dat počítačovým programem XDSAPP (XDS Automation and Plotting Protocols) (Krug a kol., 2012).

Program XDSAPP umožňuje automatické zpracování difrakčních dat s minimálním vstupem uživatele a současně generuje vizuální zpětnou vazbu (např. grafy a jiné další) o průběhu zpracování a výslednou kvalitu dat (Krug a kol., 2012). Kromě programu XDSAPP je možné použití MOSFLM (Leslie, 2006) nebo HKL-2000 (Otwinovski a Minor, 1999) a podobné programy. Od programu XDSAPP se tyto programové softwary liší např. v rychlosti Fourierovy transformace (Krug a kol., 2012).

XDSAPP obsahuje potřebné kroky ke zpracování difrakčních dat – opravy, indexování, integrace, různé škálování a statistiky (měřítka faktorů, počet silných míst, divergence paprsků, apod.). Kromě těchto kroků je program schopen vyhodnocovat kvalitu difrakčních dat a provádět testy potencionálních problémů. Po zpracování difrakčních dat dochází k vytvoření mapy elektronové hustoty a je vygenerován mtz file (Krug a kol., 2012; Karine a kol., 2016).

Program XDS generuje osm různých tabulek, které představují různé úkoly a jsou reprezentovány jako grafy, tabulky a jiné další, viz Obr. 11. V těchto tabulkách jsou zaznamenány např. parametry základní stavební jednotky (unit cell), prostorová skupina (space group), R faktory a další parametry (Krug a kol., 2012; Karine a kol., 2016).



Obr. 11: Shrnutí výsledků při zpracování difrakčních dat (převzato z Krug a kol., 2012).

2.4.2. MolRep

Po zpracování difrakčních dat v programu XDSAPP, kde je vytvořena předběžná mapa elektronové hustoty, je potřeba vyřešit fázový problém. Vyřešení tohoto problému nabízí několik programů. Nicméně nejhojněji využívaným programem je MolRep (molecular replacement).

Jedná se o automatizovaný program pro molekulární nahrazení (molecular replacement), který vybírá všechny požadované parametry řešení a vytváří tak model, ve kterém jsou orientované a umístěné jednotkové buňky (unit cell). Tento model se vytváří pomocí struktury, která je > 25% aminokyselinové sekvence podobná té studované (Vagin a Teplyakov, 1997).

Program MolRep je softwarový balíček a je součástí programu CCP4 (Collaborative Computational Project, číslo 4), který sdružuje i jiné programy důležité pro řešení struktury

proteinů. Pomocí MolRepu je v současné době vyřešeno více než 95% proteinových struktur. MolRep, který se používá pro řešení fázového programu pomocí molekulárního nahrazení, obsahuje několik vestavěných funkcí pro přípravu modelu, např. umožňuje specifické přizpůsobení modifikace modelu – parametry pro efektivní vyhledávání, možnosti pro přípravu a korekci modelu. (Lebedev a kol., 2008).

Molekulární nahrazení může být také prováděno programem Phaser. Tento program využívá metody maximální pravděpodobnosti pro vyhledávání překladů a rotačních funkcí. Phaser byl velmi úspěšný při řešení mnoha dříve nevladatelných molekulárních nahrazení (McCoy, 2007).

2.4.3. Refinement (zpřesnění, zdokonalení)

Poté, co bylo provedeno molekulární nahrazení (porovnání aminokyselinové sekvence, řešení fázového problému), je model stále nepřesný. Je tedy zapotřebí, aby došlo ke zdokonalení fáze, a následně tak k vylepšení mapy elektronové hustoty. Pro zpřesnění (refinement) jsou zapotřebí dodatečné přestavby. Tyto dodatečné přestavby umocňují softwarové programy, jako např.: Refmac5 (The Link to X-Ray Protein Crystallography [online], Florian Fish, 2009).

Program Refmac5, který je součástí programového balíčku CCP4, používá techniku maximální pravděpodobnosti pro optimalizaci – tzn., přizpůsobuje atomové parametry modelu k rentgenovým krystalografickým datům (dochází ke statistickému přizpůsobení atomových souřadnic, aby lépe odpovídaly difrakčním datům). Toto přizpůsobení je charakterizováno prostřednictvím R faktoru (měří se, jak daleko se vypočítané amplitudy liší od pozorovaných amplitud) (Rinaldelli a kol., 2014). Během zpřesňování dochází k poklesu (minimalizaci) R faktoru a obecně se uvádí, že hodnoty ležící mezi 15% - 25% odpovídají kvalitnímu modelu (The Link to X-Ray Protein Crystallography [online], Florian Fish, 2009).

Tento program, který slouží k zpřesňování struktury makromolekulárních komponentů v celém rozsahu, využívá různé funkce v závislosti na difrakci (např. amplituda, intenzita a jiné další) a pomocí různých vylepšujících nástrojů (Murshudov a kol., 2011).

Při zdokonalení modelu jsou využívány dvě metody: maximální pravděpodobnost, která je popsána výše a simulované žíhání. Obě metody používají omezení, jak má vypadat atomový model (různé vzdálenosti, úhly vazeb a teplotní faktory – faktor B) (The Link to X-Ray Protein Crystallography [online], Florian Fish, 2009).

Program umožňuje vylepšení konečné fáze modelu a následně zlepšení mapy elektronové hustoty, se kterou následně pracují další programy, např. Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit). Kromě programu Refmac5 se využívají i další, jako např.: CNS (Crystallography and NMR System), MOPRO (Molecular Properties) (Murshudov a kol., 2011).

2.4.4. WinCoot

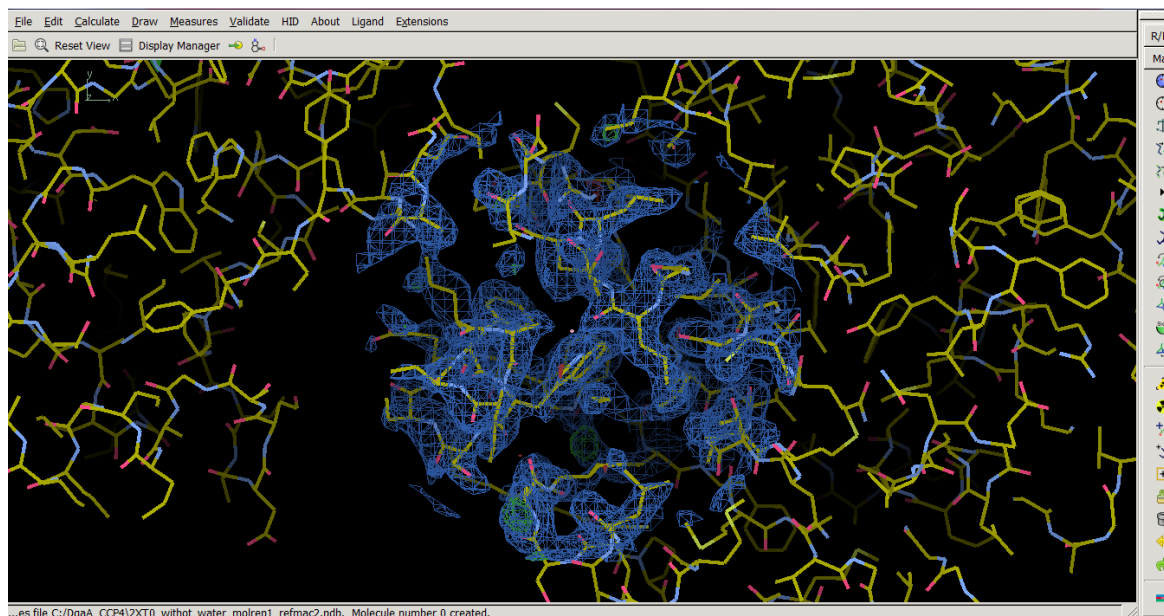
Coot (Crystallographic Object-Oriented Toolkit) je určen pro makromolekulární modelování, kompletaci a validaci modelu. Tento program zobrazuje mapy elektronové hustoty, modely a umožňuje modelovou manipulaci (idealizace, zdokonalení reálného prostoru, manuální rotaci/přemístování, mutaci a další manipulace). Cílem Cootu je poskytnout přístup k potřebným nástrojům pro intenzivní zpřesňování a validaci makromolekulární struktury (Emsley a Cowtan, 2004; Emsley a kol., 2010).

Hlavním úkolem softwaru je vizualizace makromolekulární struktury a dat, budování modelu do mapy elektronové hustoty a následná validace (Emsley a kol., 2010).

Coot poskytuje nástroje pro zobrazení trojrozměrných dat spadajících do tří tříd: atomové modely (obecně zobrazené jako vektory spojující atomy), mapy elektronové hustoty a obecné grafické objekty (Emsley a kol., 2010).

Program Coot obsahuje: 1. Hlavní okno, viz Obr. 12, které se skládá z následujících prvků. Ve středu hlavního okna je trojrozměrné plátno, které obsahuje atomové modely, mapy elektronové hustoty a jiné. 2. V horní části je panel nabídek, který zahrnuje různé soubory (File, Edit a jiné další), která poskytuje přístup k těmto souborům a nástrojům pro manipulaci s modely. 3. Mezi lištou nabídky a hlavním oknem je panel nástrojů, obsahující často používané ovládací prvky (např. Reset view – přepíná mezi pohledy molekul). 4. Na pravé straně okna je panel nástrojů umožňující modifikaci atomových modelů (např.

mutace, rotace a další) 5. Pod oknem je řádek, ve kterém je krátký text zobrazující zprávy o stavu prováděných operacích (Emsley a kol., 2010).



Obr. 12: Program Coot, poskytující makromolekulární modelování (vytvořeno: Ivana Berková, 2019).

2.4.5. MolProbity

Jedná se o webovou službu poskytující ověření struktury, která je založená na širokospektrální úrovni hodnocení kvality modelu na globální a lokální úrovni. Poskytuje informace o kvalitě struktury nejen proteinů, ale také nukleových kyselin. Informace jsou poskytovány v grafických formátech – tabulky a grafy (Vincent a kol., 2009; Davis a kol., 2007; Davis a kol., 2004).

Ověření struktury dané makromolekuly začíná nahráním vlastního koordinačního souboru nebo PDB souboru (např. PDB soubor z programu WinCoot). Posléze se vybere jedna z možných funkcí, které webový portál nabízí pro další validaci (např. přidání vodíků, analýza všech atomů a jejich geometrie), veškeré tyto kroky slouží k validaci a posléze k zpřesnění dané struktury makromolekuly (Vincent a kol., 2009).

Kromě těchto funkcí je také MolProbity schopen kontrolovat konformační odchylky, analyzovat rotamery a Ramachandranův diagram. Přidáním atomů vodíků upozorňuje na

sterické problémy uvnitř molekuly, dokáže vypočítat vodíkové můstky a van der Waalsovy interakce, pomocí programem REDUCE (Davids a kol., 2007).

Kromě této webové služby pro ověření struktury je možné použít program PROCHECK, který poskytuje celkové statistické údaje, hodnocení a informace o lokálních problémových oblastech (Davis a kol., 2004; Davis a kol., 2007).

2.5. Využití halogenalkandehalogenas

Halogenované sloučeniny jsou látky, které znečišťují životní prostředí v důsledku jejich využití – herbicidy, insekticidy, fungicidy, rozpouštědla, hydraulické a teplotnosné kapaliny, plastifikátory a v neposlední řadě jako meziproducty při chemické syntéze. Kromě toho je také známo, že jsou halogenované uhlovodíky produkovány například dřevokaznými houbami, více než 130 sloučenin obsahujících chlór bylo izolováno z rostlin a kapradin (Fetzner a Linges, 1994; Fetzner, 1998). Bylo zjištěno, že některé organismy tyto látky syntetizují k chemické obraně, například jako dráždivé látky nebo pesticidy, či jako antibakteriální, antimykotické, insekticidní a herbicidní látky (Fetzner, 1998). Navíc jsou halogenované sloučeniny produkovány v abiogenních procesech, například při erupci sopky, lesními požáry a v dalších geotermických procesech (Kurihara a Esaki, 2008).

Velký počet halogenových sloučenin byl uznán za potenciálně mutagenní, karcinogenní a toxické látky pro některé orgány (játra, ledviny nebo nervový systém). Velké nebezpečí těchto sloučenin tkví v jejich nízké biologické rozložitelnosti, která představuje velkou hrozbu pro životní prostředí a volně žijící zvířata. Za nejvíce nebezpečné lze považovat halogenové alifatické sloučeniny bromové a chlorované alkany a alkeny (Stucki a Thuer, 1995).

Halogenalkandehalogenasy (HLDs) jsou převážně známy svou schopností transformovat halogenové sloučeniny a na základě této schopnosti, známé jako bioremediace, se hojně využívají pro odstranění těchto látek ze znečištěné půdy, povrchové vody, podzemních vod a z atmosféry. Bioremediace lze dosáhnout použitím mikroorganismů, které vytvářejí HLDs. Příkladem takové aplikace je například odstranění 1,2-dichlorethanu z podzemních vod za pomoci kmene *X.autrotrophicus* GJ10. Obecně známé jako mikrobiální dehalogenace (Stucki a Thuer, 1995).

Navíc tyto degradační aspekty mohou být využity pro průmyslové biokatalyzátory při výrobě cenných meziproductů v chemických syntézách. Kromě toho se biokatalyzátory vyznačují různou regiospecifitou a chiralitou, která vede k vytvoření nových produktů v průmyslovém odvětví (Fetzner a Linges, 1994). Například opticky čisté alkoholy a estery jsou důležité stavební bloky při syntéze léčiv (Pieters a kol., 2001; Kourist a spol., 2008; Westerbeek a kol., 2011). Vysoce enantioselektivní HLD DbjA je schopen produkovat (S)-

pentan-2-ol, který je používán jako meziproduct při výrobě léčiv pro léčení Alzheimerových chorob (Patel, 2006).

Zajímavé použití HLDs je například u bakterií, které jsou geneticky modifikované pro expresi rekombinantního fluoroacetátu dehalogenasy. Uvádí se, že byly použity k ochraně ovčí před toxicitou fluoroacetátu, které byly syntetizovány některými rostlinami (Kurihara a Esaki, 2008).

HLDs jako DhaA, DmbA a LinB se používají při dekontaminaci půdy od válečných činidel, jako je například yperit (Prokop a kol., 2006). Další aplikací těchto enzymů je stanovení úrovně toxicity halogenových uhlovodíků v životním prostředí pomocí biosenzorů (Peter a kol., 1996).

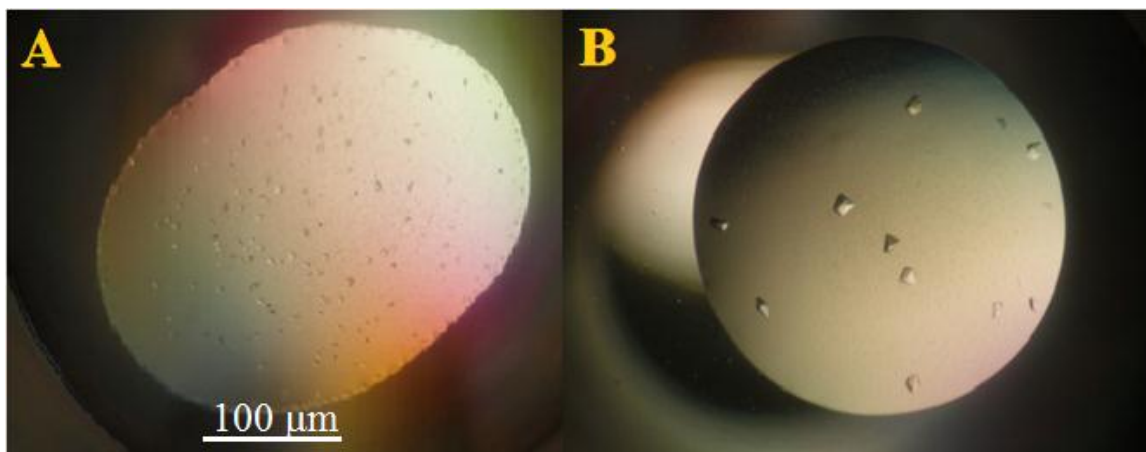
3. Materiál a metody

3.1. Sběr difrakčních dat

Pro získání difrakčních obrazců byly vybrány krystaly proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2, které byly vypěstovány metodou sedící kapky o koncentraci proteinu 5 mg/ml. Nejlepší krystaly byly získány za použití krystalizačních činidel ze sady Index HR2-144 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA, USA) a za podmínek označené 49 a 74, viz Tab. I a na Obr. 13. Rentgenová difrakce byla provedena ve vědeckém pracovišti Helmholtz Zentrum Berlin (HBZ) v německém Berlíně se zdrojem synchrotronového zařízení BESY – II. Před zahájením sběru difrakčních obrazců byly nejprve krystaly proteinu DgaA zmrazeny pomocí tekutého dusíku, z důvodu zamezení teplotně-vibračních pohybů. RTG – záření o vlnové délce 0,918 Å procházelo krystalem s oscilačním úhlem 0,1°, kdy při každém pootočení krystalu byl získán difrakční snímek. Měření krystalu bylo ukončeno po otočení o 180°.

Tab. I: Podmínky, při níž vznikaly krystaly proteinu DgaA, vhodné pro rentgenovou difrakční analýzu.

C _{DgaA} [mg/ml]	Krystalizační činidlo				poměr v kapce
	Č.	sůl	pufr	srážedlo	
5	49	0,2 M CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1 M BIS-TRIS pH 6,5	45 % 2-methyl-2,4-pentadiol	1:1
5	74	0,2 M Li ₂ SO ₄ · H ₂ O	0,1 M BIS-TRIS pH 5,5	25 % Polyethylen glykol 3350	1:1



Obr. 13: Krystaly A – krystalizace s krystalizačním činidlem č. 49 a krystaly B – krystalizace s krystalizačním činidlem č. 74.

3.2. Zpracování difrakčních dat

Získaná difrakční data byla dále zpracována pomocí programu XDSAPP během tří kroků – indexace, integrace a analýza. Během zpracování difrakčních dat bylo získáno předběžné grafické vyhodnocení informací (např. parametry unit cell, R-faktor a další) a získán výstupní soubor ve formátu mtz obsahující informace pro další zpracování. Posléze byl tento soubor zpracován pomocí programu Matthews_coef a mosfilm, který umožňuje vyhodnotit počet molekul v asymetrické jednotce a jedná se tak o první krok pro stanovení struktury.

3.3. Řešení fázového problému

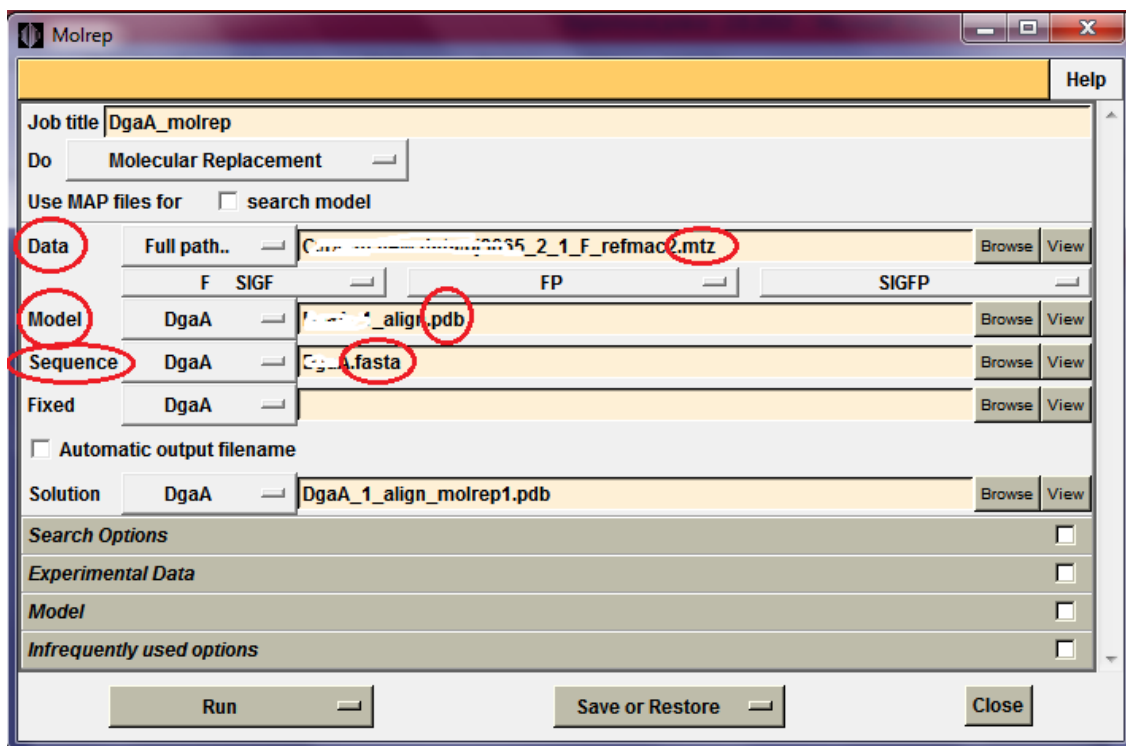
3.3.1. Srovnání sekvencí

Během řešení struktury proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 je zapotřebí vyřešit fázový problém. Pro vyřešení fázového problému byla zvolena metoda molekulárního nahrazení, která požaduje známý model podobného proteinu. Na základě aminokyselinové sekvence proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 byla v RCSB PDB nalezena podobná aminokyselinová sekvence vhodného homologu.

3.3.2. Molekulární nahrazení

Sekvence podobného homologu byla převedena do souboru pdb a následně byl tento soubor použit v programu MOLREP (molecular replacement), který je součástí CCP4, pro vytvoření počátečního modelu. Tento program na základě informací z homologního proteinu - parametry elementární buňky, symetrie krystalu a další, je schopen vytvořit počáteční model studovaného proteinu. (Lebedev a kol., 2008).

Jako vstupní data pro program MOLREP byl použit pdb soubor (obsahující sekvenci homologu), mtz soubor (výchozí složka obsahující informace o proteinu DgaA z XDSAPP) a fasta (sekvence studovaného proteinu DgaA) – tento formát byl vytvořen v textovém editoru. Jednotlivé kroky jsou označeny na Obr. 14. Kromě vytvoření počátečního modelu, je tento program schopen vypočítat space group daného proteinu.



Obr. 14: Vložení vstupních dat do programu MOLREP.

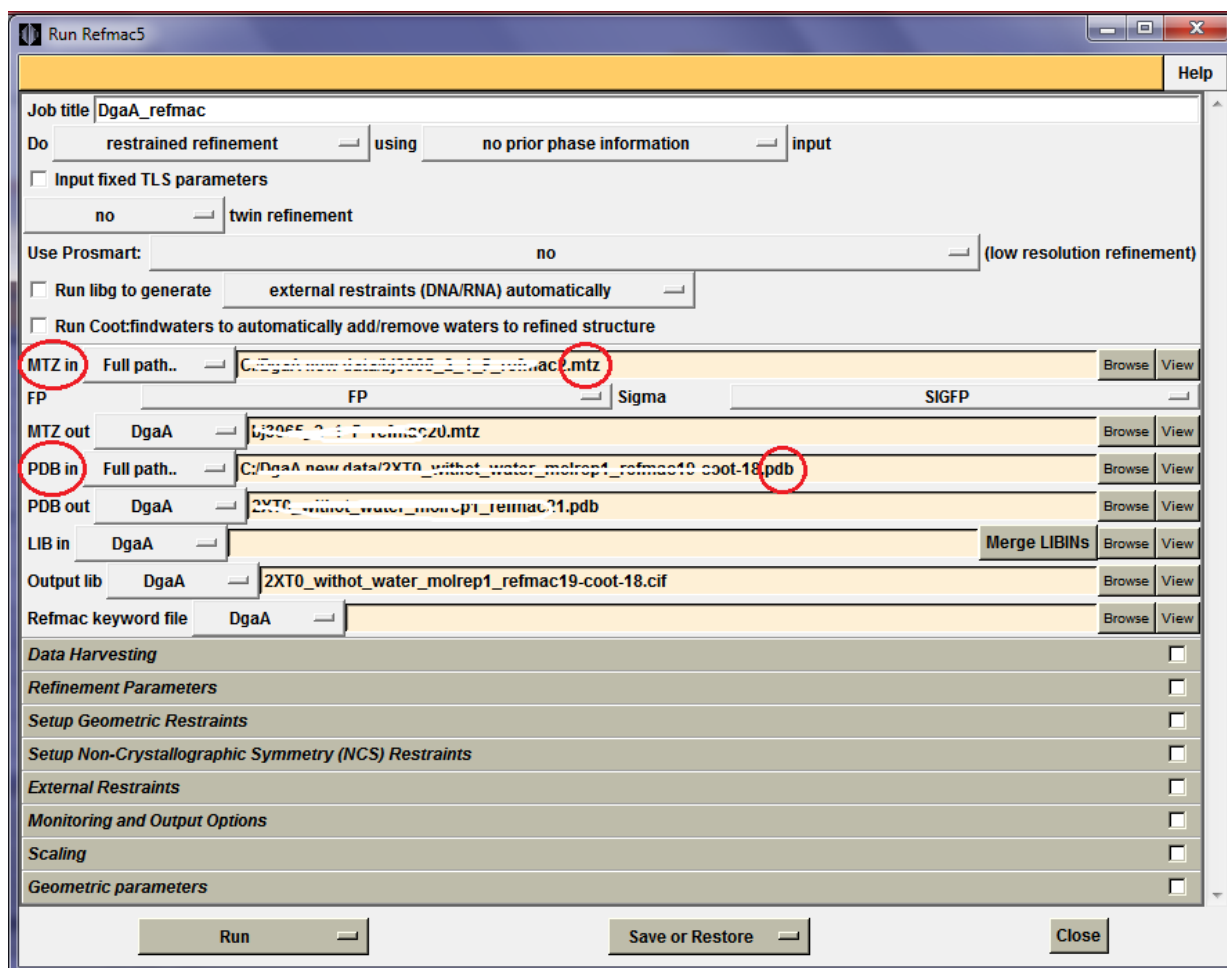
3.4. Upřesnění struktury

Počáteční model vytvořený programem MOLREP, byl následně upraven softwarem REFMAC. Program REFMAC dále slouží pro zpřesnění a úpravu proteinových struktur.

Další úpravy struktury byly provedeny v programu WinCoot. Zpočátku byly kontrolovány jednotlivé aminokyseliny v řetězci, zda se shodují s aminokyselinovou sekvencí proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2. Pokud se objevily chybné aminokyseliny, byla zapotřebí úprava pomocí tzv. mutace. Poté bylo provedeno fitování řetězců do mapy elektronové hustoty pomocí příkazů - „Real Space Refine Zone“ a „Regularize Zone“. V oblastech bez mapy elektronové hustoty byly aminokyseliny vymazány. Veškeré tyto úpravy se dělají s cílem zlepšení geometrie molekuly.

Vždy, pokud jsou provedeny úpravy v programu WinCoot, je zapotřebí spuštění programu REFMAC. Program REFMAC slouží ke zdokonalení souřadnic modelu. Jako vstupní data byl použit pdb soubor z programu MOLREP a mtz soubor proteinu DgaA z XDSAPP. Vložení těchto souborů je vyznačeno na Obr. 15. Při každém dalším zdokonalení souřadnic programem REFMAC byla použita složka pdb, která byla vygenerována z předchozího cyklu s uloženými změnami, vytvořené z programu WinCoot.

Pro kontrolu, zda dochází k zpřesňování a zdokonalení geometrie a souřadnic, je vhodné sledovat hodnotu R-faktoru, Ramachandranův diagram a teplotní faktor (uvedeno v kapitole 4.5 a 4.6).



Obr. 15: Vložení vstupních dat do programu REFMAC.

3.5. Validace struktury

Validace struktury byla provedena pomocí programů Molprobity a ProCHECK, které jsou volně dostupné na webových stránkách *molprobity.biochem.duke.edu* a *servicesn.mbi.ucla.edu*.

Pro validaci struktury byla použita výchozí data pdb souboru proteinu DgaA obsahující finální verzi modelu po upřesnění struktury pomocí programů WinCoot a REFMAC. V MolProbity po vložení souboru pdb byla zvolena funkce „add hydrogens“ do struktury a posléze provedena analýza kontaktů všech atomů v modelu, za použití funkce „analyze all-atom contacts and geometry“. Výsledky pomocí MolProbity a ProCHECK jsou uvedeny v kapitole 4.5.

3.6. Zobrazení struktury

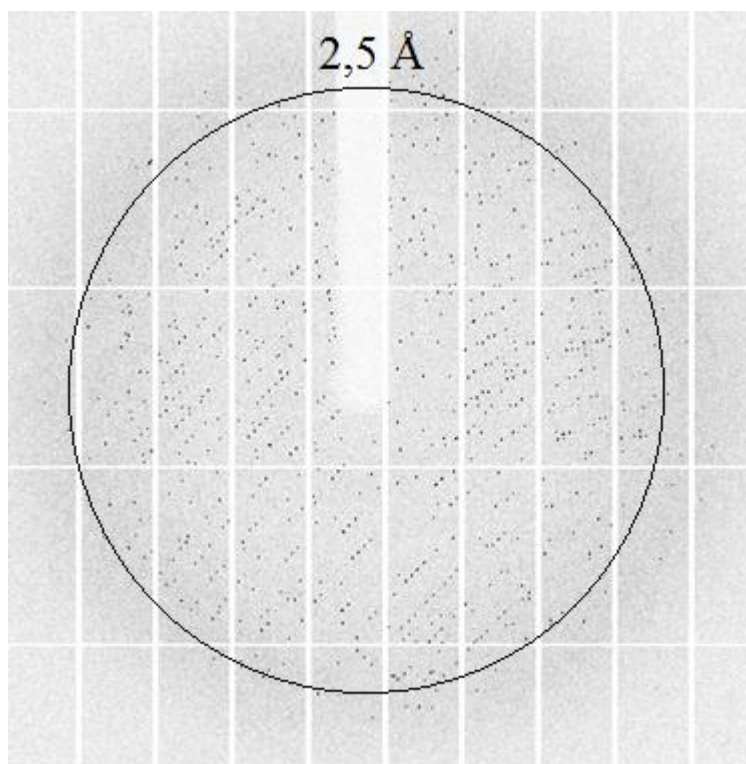
Pro zobrazení finální struktury proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 byl použit grafický program PyMol (DeLano, 2002). Software PyMol slouží ke grafickému zobrazování dat, které byly získány pomocí rentgenové krystalografie a NMR spektroskopie. Pro získání konečné struktury je potřeba vložit soubor ve formátu pdb, který byl získán po konečných úpravách z programu WinCoot.

Po vložení pdb souboru do programu PyMol je možné danou strukturu upravovat, např. zvýraznění α -helixů, β -listů, dále umožňuje zobrazení struktury v podobě tyčinkového modelu, mašličkového a další. Ostatní příkazy lze dohledat na webových stránkách pymol.sourceforge.net. Grafické zobrazení proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 je v kapitole 4.7.

4. Experimentální výsledky

4.1. Výsledky rentgenové analýzy

Během rentgenové difrakční analýzy bylo na detektoru získáno více než 2000 difrakčních snímků proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 s rozlišením do 2,5 Å viz Obr. 16.



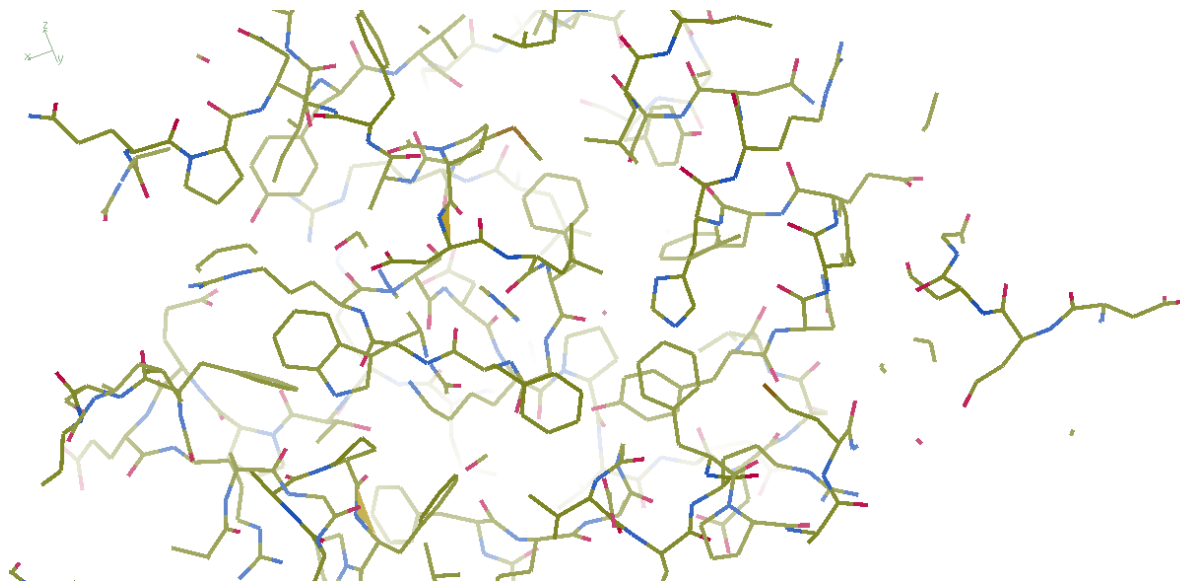
Obr. 16: Jeden z difrakčních snímků proteinu DgaA.

4.2. Výsledky zpracování difrakčních dat

Program XDSAPP zpracoval 15 135 skvrn (85,5%) z difrakčních snímků a výsledkem byly stručné informace o daném proteinu, které jsou shrnuty v Tab. II.

Tab. II: Shrnutí informací poskytnuté program XDSAPP.

Prostorová grupa	P2(1)2(1)2(1) (19)
Parametry elem. buňky [Å]	176,46 177,38 253,67 90,0 90,0 90,0
I/sigI	8,00 (1,98)
R faktor [%]	26,8 (95,5)
Kompletnost [%]	99,4 (97,8)
Mozaicita [°]	0,042
Isa	28,32
Multiplicita	6,02
Limit rozlišení [Å]	49,45-2,93 (3,11-2,93)



Obr. 18: Počáteční model vygenerovaný programem MOLREP. Žluté značení – uhlíkový skelet, modře – dusík, červeně – kyslík a zeleně - síra.

Tab. III: Ověření prostorové grupy pomocí programu MOLREP.

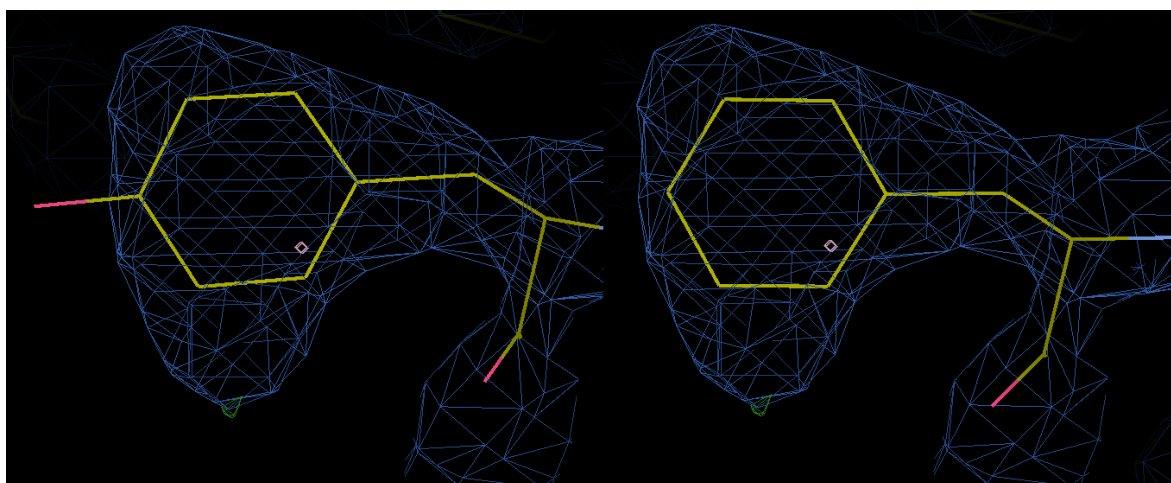
	Nsg	sg	Score	Cntr
1	19	P 21 21 21	0, 361	6, 679
2	16	P 2 2 2	0, 341	4, 260
3	17	P 2 2 21	0, 336	4, 703
4	1017	P 21 2 2	0, 338	4, 101
5	2017	P 2 21 2	0, 339	5, 141
6	18	P 21 21 2	0, 349	5, 860
7	2018	P 21 2 21	0, 343	4, 774
8	3018	P 2 21 21	0, 346	4, 480

Porovnání Cntr (kontrast), je hodnota u č. 1 největší a lze tedy předpokládat, že prostorová grupa bude 19.

4.4. Výsledky upřesnění struktury

Upřesnění struktury proteinu DgaA probíhalo v několika cyklech, aby došlo ke zdokonalení struktury (zlepšení geometrie molekuly). Zdokonalení probíhalo tak, že jakákoliv změna (úprava aminokyselin – změna úhlu, mutace, vymazání a jiné další, Obr. 19) v programu WinCoot byla vždy uložena jako soubor pdb a vložena do programu REFMAC. Během těchto cyklů se sledovalo zlepšení několika hodnot; R-faktor a R_{free} -faktor, které ukazují shodu mezi krystalografickým modelem a experimentálními daty rentgenovou difrakcí, viz Tab. IV. Pro kontrolu zda dochází, k upřesňování struktury bylo vhodné také sledovat teplotní faktor.

Aminokyselinová sekvence proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 obsahuje 307 aminokyselin, nicméně koncové aminokyseliny (1 Met, 2 Tyr, 301 Ile a 302-307 Met) byly smazány z důvodu chybějící mapy elektronové hustoty, protože tyto koncové aminokyseliny jsou ve struktuře pohyblivé a často dochází ke změně konformace.



Obr. 19: Mutace aminokyseliny tyrosinu na phenylalanin. Během kontrolování aminokyselinové sekvence se často vyskytovaly chyby – jako v případě tyrosinu, kdy na jeho místě měla být aminokyselina phenylalanin.

Tab. IV: Shrnutí hodnot R během upřesňování struktury.

Refmac 5	R factor IN	R factor OUT	R_{free} IN	R_{free} OUT
1	0,5064	0,4988	0,5308	0,5300
2	0,4987	0,4965	0,5284	0,5269
3	0,4951	0,4904	0,5264	0,5257
4	0,4898	0,4897	0,5264	0,5246
5	0,4884	0,4859	0,5232	0,5228
6	0,4868	0,4863	0,5205	0,5198
7	0,3965	0,3958	0,4519	0,4499
8	0,3931	0,3877	0,4498	0,4481
9	0,3861	0,3864	0,4475	0,4469
10	0,3830	0,3847	0,4482	0,4478
11	0,3833	0,3831	0,4487	0,4487
12	0,3826	0,3230	0,4023	0,3820
13	0,3130	0,3120	0,3620	0,3450

4.5. Výsledky validace struktury

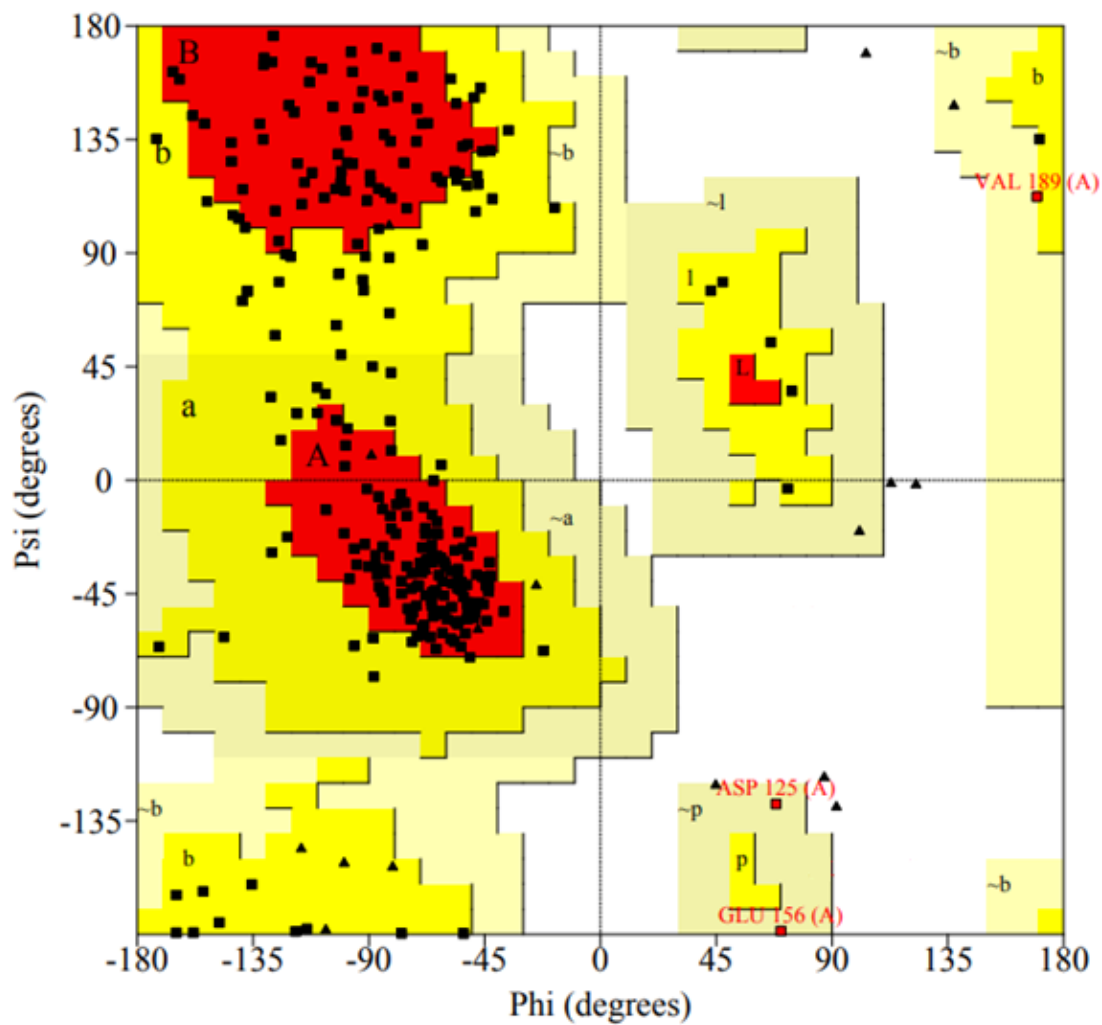
Výsledky validace struktury byly provedeny pomocí internetového serveru MolProbity, který prověřil 298 reziduí (aminokyselin). Tato struktura byla vyřešena pro rozlišení 2,40 Å a obsahuje 1 hlavní a 1 postranní řetězec. R faktory této domény jsou R_{free} : 0,3450 a R : 0,3120.

Po zahrnutí funkce „analyze all-atom contacts and geometry“ byly získány informace o geometrii proteinu a kontaktech jednotlivých atomů. Tyto výsledky jsou shrnuty v Tab. V.

Tab. V: Shrnutí validace struktury pomocí MolProbity:

Kontakty atomů	Clashscore, all atoms	22.13	54 th percentile
Geometrie proteinu	Ramachandran outliers	10	3,38%
	Ramachandran favored	240	81,08
	MolProbity score	2,56	64 th percentile
	Bad bonds	0/2399	0,00 %
	Bad angles	8/3254	0,25 %

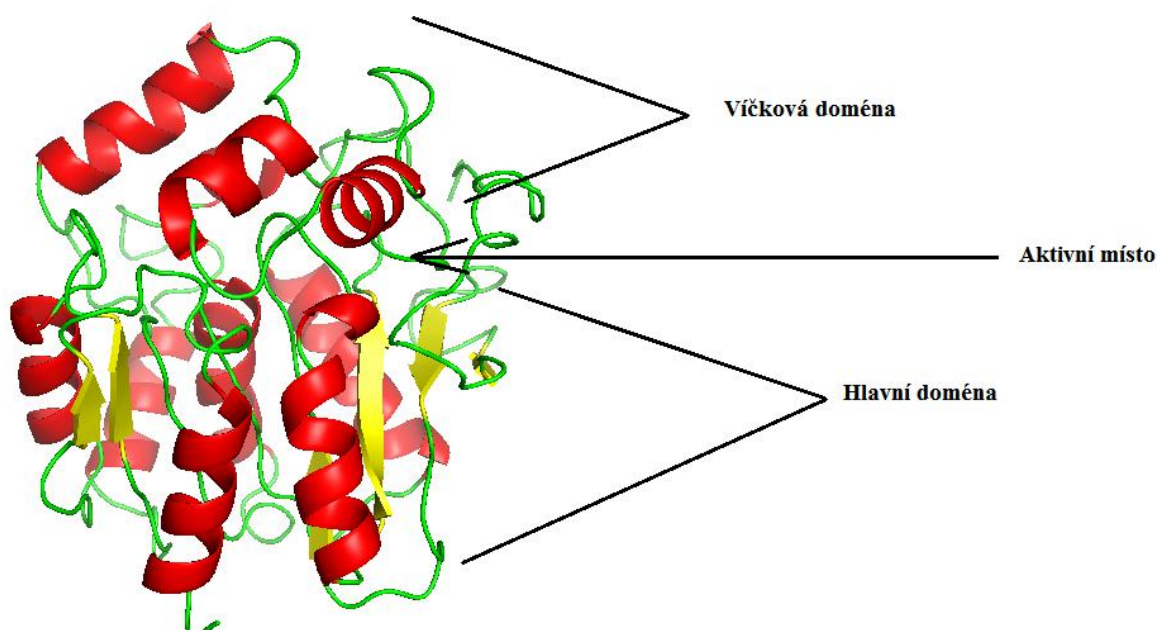
Kromě MolProbity byl použit pro validaci struktury ProCheck, který také prověřil 298 reziduí a zobrazil všechny kombinace torzních úhlů Φ a Ψ Ramachandranovým diagramem, viz Obr. 20. Podle Ramachandranova diagramu leží 190 reziduí (73,9 %) v přednostně povolené oblasti, 62 (24,1 %) v povolené oblasti, 3 (1,2 %) ve výjimečně povolené oblasti a 2 (0,8 %) reziduí v zakázané oblasti. V zakázané oblasti se nachází aminokyselina Glycin a Prolin, s tím že na Glycin se Ramachandranův diagram nevztahuje, je to dáno tím, že jeho postranní skupina je nahrazena atomem vodíku a tím se značně zvyšuje plocha povolených skupin v grafu a jeho flexibilita.



Obr. 20: Ramachandranův diagram proteinu DgaA. Červeně je značena přednostně povolená oblast, tmavě žlutě povolená oblast, světle žlutě výjimečná oblast a bíle zakázaná oblast.

4.6. Výsledky zobrazení struktury

Finální grafické zobrazení struktury proteinu DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 bylo provedeno pomocí programu PyMol, viz Obr. 21. Jedná se o polymer (z důvodu náročnosti zobrazení struktury byla zobrazena jedna molekula), který se skládá ze dvou domén – hlavní doména a na ní přiléhající víčková doména. Mezi těmito doménami se nachází aktivní místo. Hlavní doména se skládá z β -listů, s tím že obsahuje paralelní a antiparalelní listy. Tato doména je dále po stranách lemována α -šroubovicemi. Hlavní doména je velmi rigidní oproti víčkové doméně, která je naopak velmi flexibilní. Víčková doména se skládá převážně z α -šroubovic (Otyepka a kol., 2002; Damborský a kol., 2010).



Obr. 21: Finální struktura proteinu DgaA. Struktura zobrazená programem PyMOL. Vyznačené domény – hlavní a víčková. Vyznačené α -helixy (červeně) a β -listy (žlutě).

5. Diskuse

Během zpřesňování struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 byla vždy upřesňována pouze jedna molekula z osmi molekul v asymetrické jednotce a to z důvodu, že při pokusech upřesnění všech osmi molekul, byly výsledky nepřesné. Jinými slovy, během validace pomocí internetových programů MolProbity (Chen a kol., 2010) a ProCHECK (Laskowsky a kol., 1993), které umožňují upozornit na několik lokálních chyb v modelu (např.: špatné úhly, délka vazby a další), vždy vycházely výsledky v Ramachandranově diagramu negativně (velké množství aminokyselin se nacházelo v zakázané oblasti) a tudíž vycházelo, že struktura proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 neodpovídá skutečnosti. Tato komplikace je dána tím, že protein DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 je jednou z mála halogenalkandehalogenas (HLDs), která není monomerní. Při validaci jedné molekuly byly výsledky v Ramachandranově diagramu uspokojivé. V zakázané oblasti se nacházely pouze 2 aminokyseliny, jako například glycin, na který se Ramachandranův diagram nevztahuje. Z důvodu, že jeho postranní řetězec je nahrazen atomem vodíku a tím se značně zvyšuje plocha povolených skupin v grafu a jeho flexibilita.

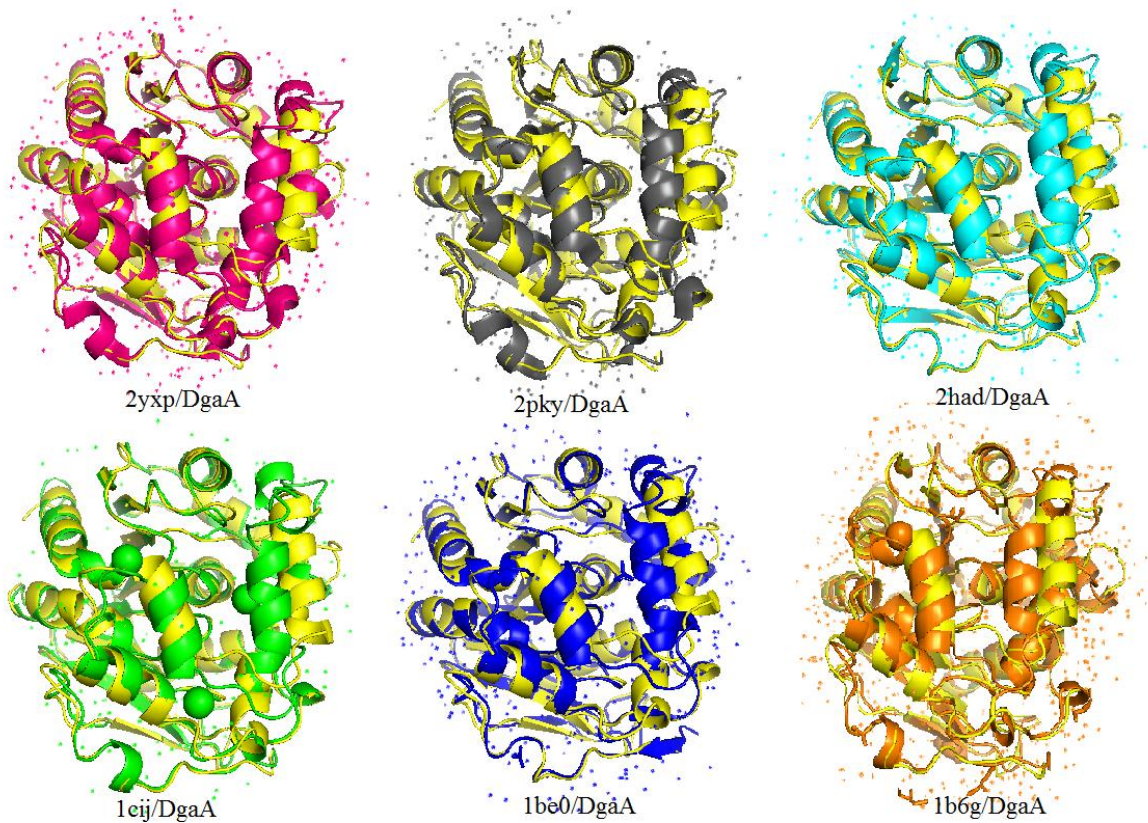
Asymetrická jednotka u DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 je složena z 8 molekul, z nich 2 molekuly jsou chybně orientovány. V Ramachandranově diagramu se nachází 190 reziduí (73,9 %) v přednostně povolené oblasti, 62 (24,1 %) v povolené oblasti, 3 (1,2 %) ve výjimečně povolené oblasti a 2 (0,8 %) v zakázané oblasti. Lokální chyby a fakt, že 73,9% reziduí leží v přednostně povolené oblasti Ramachandranova diagramu, i když by výsledek měl být nad 90 %, pravděpodobně také souvisí s horším rozlišením difrakčních dat (2,50 Å) (Laskowski a kol., 1993). Znakem správnosti finálního modelu je hodnota R-faktoru 0,3120, hodnota R_{free} - faktoru 0,3450 a kompletnost dat 99,4. Finální model byl zobrazen pomocí programu PyMol (DeLano, 2002).

Porovnání trojrozměrné struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 se strukturami uloženými v PDB databázi pomocí DALI serveru (Holm a Laakso, 2016), se ukázala podobnost s halogenalkandehalogenasami ID PDB: 2xt0 z *Plesiocystis pacifica* SIR-I (Hesseler a kol., 2011), 2yxp (Liu a kol., 2007), 1cij (Pikkemaat a kol., 1999), 1b6g (Ridder a kol., 1999), 1be0 (Krooshof a kol., 1998), 1bez (Krooshof a kol., 1998), 2pky (Liu a kol., 2007) a 2had (Franken a kol., 1991) z *Xanthobacter autotrophicus*. S tím, že

největší podobnost je s již dříve zmiňovaným proteinem 2xt0 z *Plesiocystis pacifica* SIR – I (Hesseler a kol., 2011), která činí 52%. Zbylé halogenalkandehalogenasy vykazují podobnost 50% a méně (RCSB PDB, 2019). V případě prvního proteinu 2xt0 z *Plesiocystis pacifica* SIR – I (Hesseler a kol., 2011), kdy podobnost aminokyselinové sekvence odpovídala 52 %, můžeme s jistotou určit, že protein DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 je řazen do stejné podrodiny HLD-1 jako v případě proteinu 2xt0 z *Plesiocystis pacifica* SIR – I (Hesseler a kol., 2011), viz Obr. 21. Po porovnání struktur u výše zmíněných proteinů, které byly izolovány z bakterie *Xantobacter autotrophicus* a jejichž shoda byla kolem 50%. Můžeme také pro ověření říci, že protein DgaA z *Glacieocola agarilytica* NO2 patří do podrodiny HLD-1 (Chovancová a kol., 2007). Rozdíl u těchto struktur spočívá v tom, že některé části (většinou α -helix) jsou vůči sobě mírně posunuty, viz Obr. 22.



Obr. 22: Překrývající se struktury proteinu DgaA (žlutě) a 2xt0 - DppA (červeně). Zobrazeno pomocí programu PyMol (DeLano, 2002).



Obr. 23: Překrývající se struktury proteinu DgaA (žlutě) s proteiny 2yxp (růžově), 2pky (šedivě), 2had (světle modře), 1cij (světle zeleně), 1be0 (tmavě modře) a 1b6g (oranžově), jejíž shoda je méně než 50%. Kdy každá z těchto struktur vykazovala mírné posunutí α -helixů. (DeLano, 2002).

6. Závěr

Teoretická část diplomové práce je zaměřena na rentgenovou difrakční analýzu, její principy a řešení proteinových struktur pomocí různých krystalografických a grafických programů. V neposlední řadě je v diplomové práci popsáno využití halogenalkandehalogenas.

V praktické části jsou uvedeny jednotlivé kroky, které vedly ke zjištění struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2. Prvotní krok – sběr difrakčních dat, je navazujícím spojníkem k bakalářské práci, od které se odvíjí následující kroky, jako je zpracování difrakčních dat, řešení fázového problému, upřesnění struktury, validace a závěrečné zobrazení struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2.

Hlavním cílem diplomové práce bylo řešení struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 pomocí několika programů. Postupně byly použity programy od XDSAPP až po konečné grafické zobrazení prostřednictvím programu PyMol. Pomocí programu pro grafické zobrazení struktury se potvrdilo, že se skutečně struktura skládá z víčkové (tzv. „cap domény“) domény, hlavní domény a mezi těmito doménami se nachází aktivní místo proteinu. Víčková doména je tvořena z α -šroubovic a hlavní doména je složená jak z α -šroubovic tak β -skládaných listů (Chovancová a kol., 2007; Damborský a kol., 2010).

Krystaly proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 krystalizovaly v kosočtverečné krystalové mřížce odpovídající prostorové grupě číslo 19 ($P2_1P2_1P2_1$) s rozměry elementární buňky: $a = 176,46 \text{ \AA}$, $b = 177,38 \text{ \AA}$, $c = 253,67 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,00^\circ$, $\beta = 90,00^\circ$ a $\lambda = 90,00^\circ$. Bylo zjištěno, že asymetrická jednotka proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 obsahuje 8 molekul, z nichž 2 molekuly jsou chybně orientovány. Struktura byla vyřešena pomocí molekulárního nahrazení s rozlišením $2,40 \text{ \AA}$. Finální model obsahuje 298 reziduí s tím, že 9 reziduí bylo z proteinu vymazáno z důvodu chybějící mapy elektronové hustoty.

Následně došlo k porovnání struktury proteinu DgaA z *Glaciecola agarilytica* NO2 s jinými halogenalkandehalogenasami, kdy se potvrdilo, že největší aminokyselinová sekvenční shoda je s proteinem DppA z *Plesiocystis pacifica* SIR – I (Hesseler a kol., 2011).

7. Seznam literatury

Allegra, G. (1980). *Principles of Direct Methods of Phase Determination in Crystal Structure Analysis.* In: Ladd, M. F. C., & Palmer, R. A. (1980). *Theory and Practise of Direct Methods in Crystallography.* New York, United States: Springer US.

Aroyo M. A. (2016). *International tables for crystallography volume A: Space-group symmetry.* Wiley.

Berková, I. (2016). *Krystalizační studie nově izolované halogenalkandehalogenasy DgaA z Glaciecola agarilytica NO2.* Bakalářská práce. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.

Brynda J. (2002). *X-ray protein diffractometer and basis of the rotation method: proteinový difraktometr – měření rotační metodou.* Academy of Science of the Czech Republic, Prague, 9(1).

Damborský, J., Rorije, E., Jesenská, A., Nagata, Y., Klopman, G., Peijnenburg, W. J. G. M. (2001). *Structure-specificity relationships for haloalkane dehalogenases.* *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(12). 2681-2689.

Damborský, J., Chaloupková, R., Pavlová, M., Chovancová, E., Brezovský, J. (2010). *Structure-Function Relationships and Engineering of Haloalkane dehalogenases.* Berlin Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

Dauter, Z. (2017). *Collection of X-ray diffraction data from macromolecular crystals.* *Methods Mol Bio*, 1607. 165-184.

Davis, I. W., Murray, L. W., Richardson, J. S., Richardson, D.C. (2004). *MolProbity: Structure validation and all-atom contact analysis for nucleic acids and their complexes.* *Nucleic Acids Research*, 32. 615-619.

Davis, I. W., Leaver-Fay, A., Chen, V. B., Block, J. N., Kapral, G. J., Wang, X., Murray, L. W., Arendal III, W. B., Snoeyink, J., Richardson, J. S., Richardson, D. C. (2007). *MolProbity: all-atom contacts and structure validation for proteins and nucleic acids.* *Nucleic Acids Research*, 35. 375-383.

Dreth J. (2007). *Principles of protein X-ray crystallography.* Springer, New York, NY.

DeLano, W. L. (2002). *PyMol.* DeLano Scientific, San Carlos, CA, 700.

Emsley P., Cowtan K. (2004). *Coot: model-building tools for molecular graphic.* *Acta Crystallographica*, D60. 2126-2132.

Emsley P., Lohkamp B., Scottc W. G., Cowtan K. (2010). *Features and development of Coot.* *Acta Crystallographica*, D66. 486-501.

Fetzner, S., Lingens, F. (1994). *Bacterial dehalogenases: biochemistry, genetics, and biotechnological applications.* Microbiol, **58**. 641-685.

Fetzner, S. (1998). *Bacterial dehalogenation.* Appl Microbiol Biotechnol, **50**. 633-657.

Franken, S. M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W. (1991). *Crystal structure of haloalkane dehalogenase: an enzyme to detoxify halogenated alkanes.* EMBO J, **10**. 1297-1302.

Hesseler, M., Bogdanovic, X., Hidalgo, A., Berenguer, J., Palm, G. J., Hinrichs, W., Bornscheuer, U. T. (2011). *Cloning, Functional Expression, Biochemical Characterization, and Structural Analysis of a Haloalkane Dehalogenase from Plesiocystis Pacifica Sir – I.* App. Microbiol. Biotechnol, **91**. 1049.

Holm, L., & Laakso, L. M. (2016). Dali server update. Nucleic acids research 44 (W1), W351 – W355.

Chovancová, E., Kosinski, J., Bujnicki, J. M., Damborský, J. (2007). *Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases.* Protein: Structure, Function, and Bioinformatics, **67**(2). 305-316.

Ilari A., Savino C. (2008). *Protein structure determination by X-ray crystallography.* Methods Mol. Biol. **452**: 63-87.

Janssen, D. B., Scheper, A., Dijkhuizen, L., Witholt, B. (1985). *Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10.* Applied and Environmental Microbiology, **49**(3). 673-677.

Janssen, D. B., Gerritse, J., Brackman, J., Kalk, C., Jager, D., Witholt, B. (1988). *Purification and characterization of bacterial dehalogenase with activity toward halogenated alkanes, alcohols and ethers.* The FEBS Journal, **171** (1-2). 67-72.

Janssen, D. B., Pries, F., van der Ploeg, J., Kazemier, B., Terpstra, P., Witholt, B. (1989). *Cloning of 1,2-dichlorethane degradation genes of Xanthobacter autotrophicus GJ10 and expression and sequencing of the dhlA gene.* Journal of Bacteriology, **171** (12). 6791-6799.

Janssen, D. B. (2004). *Evolving haloalkane dehalogenases.* Current Opinion in Chemical Biology, **8**(2). 150-159.

Karine M. S., Krug M., Heinemann U., Mueller U., Manfre S. W. (2016). *XDSAPP2.0.* Journal of Applied Crystallography, **49**. 1085-1092.

Karplus, P. A., Diederichs, K. (2012). *Linking Crystallographic Model and Data Quality.* Science, **336**. 1030-1033.

Kleywegt, G. J., & Brüner, A.T. (1996). *Checking your imagination: applications of the free R value.* Structure, **4**(8). 897-904.

Kleywegt, G. J. (2000). *Validation of protein crystal structures.* Acta Crystallographica, **56**(3). 249-265.

Koudeláková, T., Chovancová, E., Brezovský, J., Monincová, M., Fortová, A., Jarkovský, J., Damborský, J. (2011). *Substrate specificity of haloalkane dehalogenases.* Biotechnol Journal, **435**(2). 345-354.

Kourist, R., Domínguez de Mería, P., Bornscheuer, U.T. (2008). *Enzymatic synthesis of optically active tertiary alcohols: expanding the biocatalysis toolbox.* ChemBioChem, **9**. 491-498.

Kratochvíl, B., Hušák, M., Brynda, J., Sedláček, J. (2008). *Co nabízí současná RTG strukturní analýza.* Chem.Listy, **102**. 889-901.

Krooshof, G. H., Ridder, I. S., Tepper, A. W., Vos, G. J., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W., Janssen, D. B. (1998). *Kinetic analysis and X ray structure of haloalkane dehalogenase with a modified halide-binding site.* Biochemistry, **37**. 15013-15023.

Krug M., S. W. Manfred, H. Udo. (2012). *XDSAPP: a graphical user interface for the convenient processing of diffraction data using XDS.* Journal of Applied Crystallography, **45**. 568-572.

Kurihara, T., Esaki, N. (2008). *Bacterial hydrolytic dehalogenases and related enzymes: occurrences, reaction mechanisms, and applications.* The Chemical Record, **8**. 67-74.

Lattman E. E., Loll P. J. (2008). *Protein crystallography: A concise guide.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland, 136 p.

Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). *PROCHECK – a program to check the stereochemical quality of protein structures.* Journal of Applied Crystallography, **26**(2). 283-291.

Lebedev A. A., Vagin A. A., Murshudov G. N. (2008). *Model preparation in MOLREP and examples of model improvement using X-ray data.* Acta Crystallographica, **D64**. 33-39.

Leslie A. G. W. (2006). *The integration of macromolecular diffraction data.* Acta Crystallographica, **D62**. 48-57.

Liu, X., Hanson, B. L., Langan, P., Viola, R. E. (2007). *The effect of deuteration on protein structure: a high-resolution comparison of hydrogenous and perdeuterated haloalkane dehalogenase.* Acta Crystallogr., Sect. D, **63**. 1000-1008.

McCoy A. J. (2007). *Solving structure of protein complexes by molecular replacement with Phaser.* Acta Crystallographica, **D63**. 32-41.

- McCoy A. J. (2013).** *Molecular replacement*. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg.
- McPherson, A. J. (2004).** *Introduction to protein crystallization*. *Methods*, **34**(3). 254-265.
- Murshudov G. N., Skubák P., Lebedev A. A., Pannu N. S., Steiner R. A., Nicholls R. A., Winn M. D., Long F., Vagin A. A. (2011).** *REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures*. *Acta Crystallographica*, **D67**. 355-367.
- Otwinowski Z., Minor W. (1997).** *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode*. Elsevier, **276**. 307-326.
- Otyepka, M., Damborský, I. (2002).** *Functionally relevant motions of haloalkane dehalogenases occur in the specificity-modulating cap domains*. *Protein Science*, **11**(5). 1206-1217.
- Pala Z., Štěpánková A. (2012).** *Rentgenová difrakce pomáhá poznávat materiály a struktury*. *Katedra inženýrství pevných látek, FJFI, Praha*, **5**. 20-21.
- Patel, R. N. (2006).** *Biocatalysis: synthesis of chiral intermediates for pharmaceuticals*. *Current Organic Chemistry*, **10**. 1289-1321.
- Peter, J., Hutter, W., Stollnberger, W., Hampel, W. (1996).** *Detection of chlorinated and brominated hydrocarbons by an ion sensitive whole cell biosensor*. *Biosensors and Bioelectronics*, **11**. 1215-1219.
- Pieters, R. J., Spelberg, L. J. H., Kellogg, R. M., Janssen, D. B. (2001).** *The enantioselectivity of haloalkane dehalogenases*. *Tetrahedron Letters*, **42**. 469-471.
- Pikkemaat, M. G., Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., Dijkstra, B. W., Janssen, D. B. (1999).** *Crystallographic and kinetic evidence of a collision complex formed during halide import in haloalkane dehalogenase*. *Biochemistry*, **38**. 12052-12061.
- Prokop, Z., Opluštil F., DeFrank J., Damborský, J. (2006).** *Enzymes fight chemical weapons*. *Journal of Biotechnology*, **1**. 1370-1380.
- Ridder, I. S., Rozeboom, H. J., Dijkstra, B. W. (1999).** *Haloalkane dehalogenase from Xanthobacter autotrophicus GJ10 refined at 1.15 Å resolution*. *Acta Crystallogr., Sect. D*, **55**. 1273-1290.
- Rinaldelli M., Ravera E., Calderone V., Parigi G., Murshudov G. N., Luchinat C. (2014).** *Simultaneous use of solution NMR and X-ray data in REFMAC5 for joint refinement/detection of structural differences*. *Acta Crystallographica*, **D70**. 958-967.
- Rupp B. (2009).** *Biomolecular crystallography: principles, practice, and application to structural biology*. Garland Science.

- Scapin G. (2013).** *Molecular replacement then and now.* Acta Crystallographica, **D69**. 2266-2275.
- Singh S. (2009).** *X-rays and wave mechanics.* India: Discovery Publishing Pvt.Ltd, 2009. ISBN 978-81-8356-417-5.
- Smyth M. S., Martin J. H. J. (2000).** *x Ray crystallography.* J Clin Pathol: Mol Pathol, **53**. 8-14.
- Stucki, G., Thuer, M. (1995).** *Experiences of a large-scale application of 1,2 dichlorethane degrading microorganisms for groundwater treatment.* Environmental Science and Technology, **29**. 2339-2345.
- Taylor G. (2003).** *The phase problem.* Acta Cryst D, **59**(11). 1881-1890.
- Thaimattam R., Tykarska E., Bierzynski A., Sheldrick G. M., Jaskolski M. (2002).** *Atomic resolution structure of squash trypsin inhibitor: unexpected metal coordination.* Acta Crystallographica, **D58**. 1448-1461.
- Ulbrich P., Füzik T., Píchalová R., Voráčková, I., Ruml T. (2012).** *Vyřešení struktury retrovirové částice jako klíč k inhibici HIV.* Chem. Listy, **106**. 911-919.
- Vagin A., Teplyakov A. (1997).** *MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement.* Applied Crystallography, **30**. 1022-1025.
- Vincent, B. CH., Bryan, W. A III., Jeffrey, J. H., Daniel, A. K., Robert, M. I., Gary, J. K., Laura, W. M., Jane, S. R., David, C. R. (2009).** *MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography.* Acta Crystallographica, **D66**. 12-21.
- Vondrášek, J., & Vymětal, J. (2016).** *Konformační chování aminokyselin v peptidech a proteinech z pohledu molekulárního modelování a výpočetních metod.* Chemické listy, **110**. 385-393.
- Weiss, M. S. (2001).** *Global indicators of X-ray data quality.* Journal of Applied Crystallography, **34**. 130-135.
- Westerbeek, A., Szymanski, W., Feringa, B. L., Janssen, D. B. (2011).** *Dynamic kinetic resolution process employing haloalkane dehalogenase.* ACS Catalysis, **1**. 1654-1660.
- Wlodawer A., Minor W., Dauter Z., Jaskolski M. (2013).** *Protien crystallography for aspiring crystallographers or how to avoid pitfalls and traps in macromolecular structure determinatuon.* FEBS J, **280**. 5705-5736.
- Židek L. (2005).** *Strukturní biochemie.* Národní centrum pro výzkum biomakromolekul, PřF, MU.

Internetové odkazy:

PDB-101 Molecular explorations through biology and medicine, 2019 [online].

Dostupné z WWW:

<https://pdb101.rcsb.org/learn/guide-to-understanding-pdb-data/biological-assemblies>

The Link to X-Ray Protein Crystallography, 2009 [online]. [cit: 11. 2. 2019]. Dostupné

z WWW:

<http://my.yetnet.ch/dergutemensch/crystallography/refinement.htm>

VÍTEK, Lubomír, Principi a metody monokrystalové strukturní analýzy [online], 11.

5. 2017 [cit. 5. 11. 2019]. Dostupné z WWW:

<http://www.mono.struktur.cz/article.pr=5568/>

Seznam obrázků

Obr. 1:	Laueovo experimentální uspořádání.....	4
Obr. 2:	Difrakční obrazec proteinu DgaA.....	5
Obr. 3:	Braggův zákon (Braggův rozptyl).....	6
Obr. 4:	Schéma difraktometru.....	7
Obr. 5:	Elementární buňka krystalové mřížky	8
Obr. 6:	Tridimenzionální krystalová mřížka tvořena základní (elementární) stavební jednotkou	9
Obr. 7:	Asymetrická podjednotka.....	10
Obr. 8:	Difrakční experiment	12
Obr. 9:	Molekulární nahrazení.....	13
Obr. 10:	Mapa elektronové hustoty molekuly proteinu (modře)	16
Obr. 11:	Shrnutí výsledků při zpracování difrakčních dat.....	20
Obr. 12:	Program Coot, poskytující makromolekulární modelování.....	23
Obr. 14:	Vložení vstupních dat do programu MOLREP.	31
Obr. 17:	Sekvenční podobnost proteinu DgaA (horní část obrázku) a proteinu DppA.	38
Obr. 18:	Počáteční model vygenerovaný programem MOLREP.....	39
Obr. 19:	Mutace aminokyseliny tyrosinu na phenylalanin.....	40
Obr. 20:	Ramachandranův diagram proteinu DgaA.	43
Obr. 21:	Finální struktura proteinu DgaA.	44
Obr. 22:	Překrývající se struktury proteinu DgaA (žlutě) a 2xt0 - DppA (červeně).....	46
Obr. 23:	Překrývající se struktury proteinu DgaA.....	47