



STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Design halogenalkandehalogenas pro
enzymatickou degradaci bojového plynu yperitu

AUTOR Vít Všíanský
ŠKOLA Gymnázium Matyáše Lercha, Brno
KRAJ Jihomoravský
ŠKOLITEL Mgr. David Bednář
OBOR 3. Chemie

Brno 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že svou práci na téma Design halogenalkandehalogenas pro enzymatickou degradaci bojového plynu yperitu jsem vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Davida Bednáře a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Dále prohlašuji, že tištěná i elektronická verze práce SOČ jsou shodné a 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 změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Brně dne 3. 3. 2015

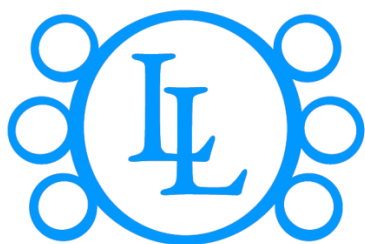
Podpis:



MASARYKOVA UNIVERZITA

Přírodovědecká fakulta

Ústav experimentální biologie



LOSCHMIDT
LABORATORIES

Poděkování

Rád bych poděkoval Mgr. Davidovi Bednářovi za provedení mě celou prací a obětování mnoha hodin času ať už při navrhování výpočtů nebo při opravě tohoto textu. Také děkuji Mgr. Janu Brezovskému, Ph.D. a prof. Mgr. Jiřímu Damborskému, Dr. za jejich pomoc při realizaci této práce. V poslední řadě chci poděkovat Barboře Čechové, která tento rok zdržela dokončení mé práce pouze o měsíc, protože měla starosti s vlastní SOČ.

Anotace

Halogenalkandehalogenasy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu halogenalkanů na primární alkoholy. V minulosti byla zjištěna jejich aktivita vůči bojovému plynu yperitu. Rychlost reakce byla ovšem poměrně nízká, kvůli specifitě těchto enzymů k jiným substrátům. Tato práce se zabývá návrhem mutací halogenalkandehalogenas, které by měly vyústit v jejich širší uplatnění při degradaci yperitu. Kurčení vhodných úprav struktury bylo využito metod molekulového modelování a počítačového designu proteinů.

Klíčová slova

yperit; dehalogenasy; proteinové inženýrství; Rosetta

Abstract

Haloalkane dehalogenases are enzymes catalyzing hydrolysis of haloalkanes to primary alcohols. Previous research discovered their activity towards yperite, a potent chemical weapon. However, a rate of this catalyzed reaction was fairly low because of dehalogenase's specificity to other substrates. This study concerns with determining mutations of dehalogenases which would result in their possible use in degradation of yperite. Methods of molecular modeling and computer protein design were employed to achieve this goal, mainly the software package Rosetta.

Keywords

yperite; dehalogenases; protein engineering; Rosetta

Obsah

ÚVOD	5
TEORETICKÁ ČÁST	6
1.1 YPERIT	6
1.1.1 <i>Historie</i>	6
1.1.2 <i>Účinky</i>	6
1.1.3 <i>Výroba a užívání</i>	7
1.1.4 <i>Degradace</i>	7
1.2 HALOGENALKANDEHALOGENASY	8
1.2.1 <i>Původ a funkce</i>	8
1.2.2 <i>Struktura a mechanismus</i>	8
1.3 DESIGN ENZYMŮ	11
1.3.1 <i>Docking</i>	11
1.3.2 <i>Kvantová a molekulová mechanika</i>	12
1.3.3 <i>RosettaDesign</i>	12
2 METODIKA	14
2.1 PŘÍPRAVA STRUKTUR.....	14
2.2 DOCKING.....	14
2.3 KVANTOVÁ A MOLEKULOVÁ MECHANIKA	15
2.4 ROSETTA DESIGN	15
2.5 PREDIKCE STABILITY	16
3 VÝSLEDKY	17
3.1 DOCKING	17
3.2 KVANTOVÁ A MOLEKULOVÁ MECHANIKA	18
3.3 NÁVRH MUTACÍ	19
4 DISKUSE	23
ZÁVĚR	24
LITERATURA	25
SEZNAM SYMBOLŮ, VELIČIN A ZKRATEK	30
SEZNAM PŘÍLOH	31

Úvod

Po využití v bitvách 1. i 2. světové války a několika následujících střetnutí byl yperit spolu s dalšími chemickými zbraněmi zahrnut v Úmluvě o chemických zbraních roku 1993. Ta zakazuje jeho použití, výrobu, hromadění nebo přechovávání. Po ratifikaci této úmluvy se začaly státy yperitu systematicky zbavovat především metodami spalování nebo neutralizací. Při těchto způsobech degradace ale vzniká množství nebezpečných meziproductů a potenciálně ekologicky závadných zplodin. Použití těchto metod je také omezené například při dekontaminaci vnitřních prostor.

Jako alternativa k těmto zavedeným metodám se nově zkoumá možnost degradace yperitu pomocí enzymatické katalýzy. Oproti spalování nebo neutralizaci jsou enzymy ekologicky šetrné a navíc pracují při běžných teplotách a pH.

Halogenalkandehalogenasy jsou enzymy katalyzující hydrolýzu halogenovaných alkanů na primární alkohol a halogenvodík. V minulosti již byla prokázána aktivita některých dehalogenáz vůči yperitu, rychlost reakce byla ovšem pomalá, patrně z důvodu uzpůsobení těchto enzymů k jiným substrátům.

Cílem této práce je navrhnout úpravy sekvence (mutace) dehalogenas, které by zlepšily jejich schopnosti v oblasti odbourávání yperitu a umožnily jejich rozsáhlejší industriální využití. Pro identifikaci správných mutací je využito moderních metod počítačového designu proteinů.

Teoretická část

1.1 Yperit

1.1.1 Historie

Yperit, jinak také hořčičný plyn nebo systematicky bis(2-chlorethyl)sulfid, je bojový plyn, poprvé syntetizovaný a popsáný už v polovině 19. století.¹ Svou nechvalnou pověst si ovšem vydobyl až v roce 1917, po bitvě u belgického města Ypry, od kterého také zdědil svoje jméno. Zde byl použit Němci proti britským a kanadským jednotkám ve formě dělostřeleckých střel. Po uvolnění dopadal yperit na zem, kde vytvářel olejovitý povlak nahnědlé barvy. Vsáknutý v zemi mohl tento jed zůstat aktivní ve vhodných meteorologických podmínkách až po dobu několika měsíců. Tento fakt se zdál být, kvůli charakteru zákopové války, velmi výhodný, protože mohl naprosto narušit nepřátelské pozice. Na druhou stranu ovšem také znemožňoval postup vítězní strany.²

1.1.2 Účinky

24 hodin po styku s yperitem se začnou projevovat příznaky jako svědění a podráždění kůže. Následně se objevují velké, žluté puchýře, známky chemických popálenin. Častým projevem je také krátkodobá slepota, způsobená napuchnutím očních víček (Obr. 1). Při vyšších dávkách inhalovaného yperitu dochází k otokům plic a poškození sliznice.

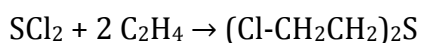


Obr. 1: Kanadský voják zasažený yperitem³

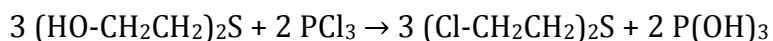
I když vystavení yperitu většinou není smrtelné, způsobuje postiženému velké bolesti a vyžaduje dlouhou dobu rekonvalescence.⁴ V poslední době bylo navíc zjištěno, že yperit je silným karcinogenem, způsobujícím především rakovinu plic.⁵

1.1.3 Výroba a užívání

Původní metoda syntézy, navržená César-Mansuètem Despretzem, spočívá v reakci chloridu sirnatého s dvěma ekvivalenty ethenu⁶:

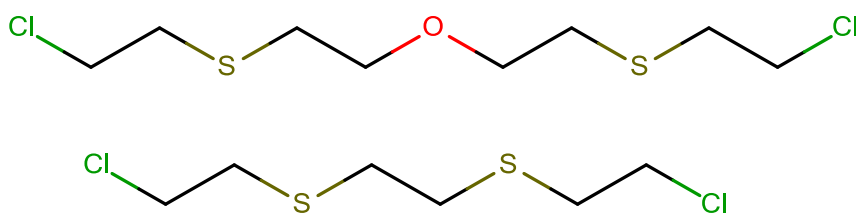


V roce 1886 vyvinul Viktor Meyer způsob výroby, který vykazoval slušné výtěžky a byl nakonec použit během války k produkci mnoha tun yperitu. Zakládá se na chloraci thiodiglykolu za použití chloridu fosforitého⁷:



Yperit se běžně používá ve formě různých směsí, často např. slewisitem (2-chlorethyldichlorarsen), chemickou zbraní způsobující puchýře a poleptání, která navíc snižuje bod tuhnutí celé směsi.⁸

Obvyklé je také použití v kombinaci s dalšími hořčičnými plyny, hlavně s 1,2-bis-(2-chloroethylthio)-ethanem a bis-(2-chloroethylthio)-etherem (Obr. 2).⁹



Obr. 2: Bis-(2-chloroethylthioethyl)-ether a 1,2-bis-(2-chloroethylthio)-ethan, běžné příměsi bojových plynů s yperitem

1.1.4 Degradace

Až do 70. let minulého století se státy zbavovaly yperitu především prostým vyhazováním do moře nebo případně odpálením střel s yperitem pod hladinou oceánu. V takovýchto podmínkách ovšem může yperit reagovat s přídatnými zhušťujícími látkami ve střele a vytvářet hrudky. Nedojde tedy k jeho degradaci hydrolýzou, a při vylovení rybáři nebo zavlčení na pláž tedy představuje zdravotní riziko.¹⁰

Od 90. let dochází na základě Úmluvy o chemických zbraních k postupné systematické likvidaci zásob yperitu především metodou spalování. V menším měřítku je pak využívána také metoda neutralizační, při níž se zkapalněný bojový plyn nechává reagovat s hydroxidem sodným v horké vodě. Obě tyto metody mají ovšem nevýhody, jimiž je produkce nebezpečných meziproductů případně odpadu nebezpečného pro životní prostředí.¹¹

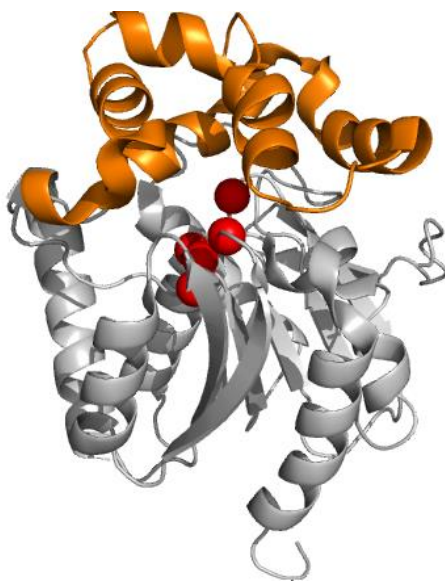
1.2 Halogenalkandehalogenasy

1.2.1 Původ a funkce

Halogenalkandehalogenasy (EC:3.8.1.5) je skupina enzymů katalyzujících hydrolýzu chlor-, brom- nebo jódalkanu na příslušný primární alkohol a halogenovodík. Enzymy se vyskytují především v bakteriích schopných využívat halogenalkany jako zdroj energie a uhlíku¹², ale také u některých lidských patogenních druhů (např. rod *Mycobacterium*) nebo i eukaryotických organismů (*Strongylocentrotus purpuratus*).¹³ Přesná funkce dehalogenas v těchto organismech však ještě není objasněna.¹⁴

1.2.2 Struktura a mechanismus

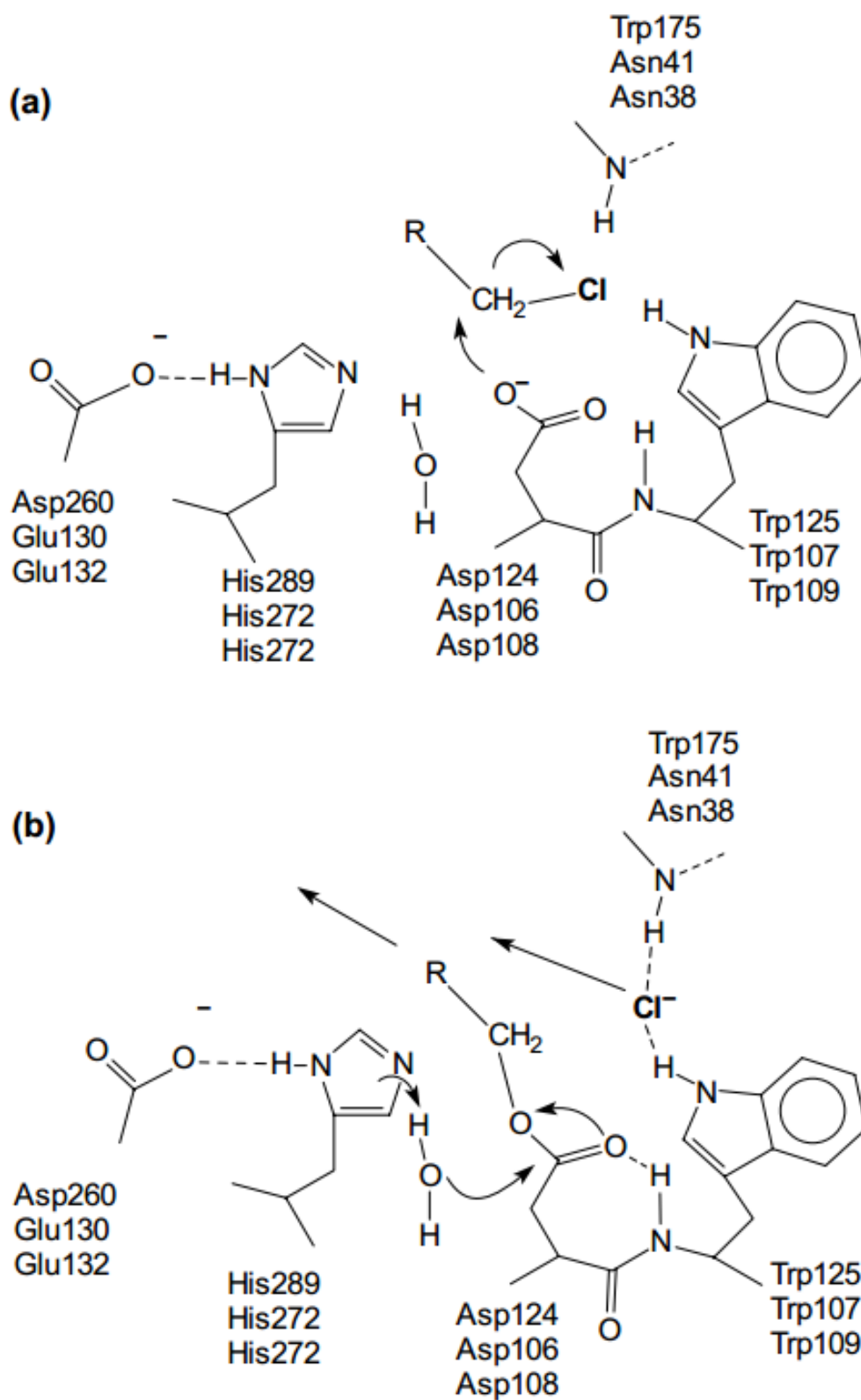
Halogenalkandehalogenasy patří do strukturní kategorie alfa/beta-hydrolas (Obr. 3). Skládají se ze dvou domén: charakteristické alfa/beta hydrolasové domény, zodpovědné za katalytickou schopnost enzymu, a čepičkové domény, určující substrátovou specifitu. Aktivní místo se nachází na pomezí těchto dvou domén. Dehalogenasami katalyzovaná reakce probíhá přes kovalentní alkylenzymový meziprodukt.¹⁵ V současné době je známých přibližně 30 struktur různých halogenalkandehalogenas.



Obr. 3: Halogenalkandehalogenasa, šedě je znázorněna alfa/beta hydrolasová doména, oranžově čepičková doména a červeně katalytická pentáda

V aktivním místě těchto dehalogenas hraje zásadní roli celkem pět aminokyselinových zbytků, označovaných jako katalytická pentáda. Tři z nich představují skupinu, která vytváří a následně přerušuje kovalentní vazbu mezi kyslíkem katalytického aspartátu a uhlíkem nesoucím odbourávaný halogen. Zbylé dva zbytky stabilizují odstupující halogenový aniont svými vodíkovými můstky.

Po vniknutí halogenalkanu do kavity aktivního místa dochází k útoku nukleofilního kyslíku aspartátu na uhlík, na kterém je navázán halogen a mechanismem nukleofilní substituce S_N2 se halogen vytěsňuje. Tento odstupující halogen je stabilizován dvěma tzv. halid-stabilizujícími zbytky – jedná se o aminokyseliny s bočními řetězci, které jsou schopné tvořit vodíkovou vazbu (nejčastěji tryptofan, asparagin nebo glutamin) a tím záporně nabitý iont uvnitř enzymu stabilizovat. V druhém kroku reakce je molekula vody aktivována histidinovým zbytkem a následně hydrolyzuje vzniklý alkylenzymový meziprodukt. Kladný náboj vznikající na histidinu je stabilizován pomocí dalšího aspartátu nebo glutamátu (Obr. 4).¹⁶



Obr. 4: Mechanismus katalýzy halogenalkandehalogenas (zbytky a jejich pořadí v sekvenci odpovídá enzymům Dh1A, DhaA a LinB, v tomto pořadí).¹⁵

- a) vznik kovalentního meziproduktu S_N2 substitucí
- b) proces hydrolyzy meziproduktu

1.3 Design enzymů

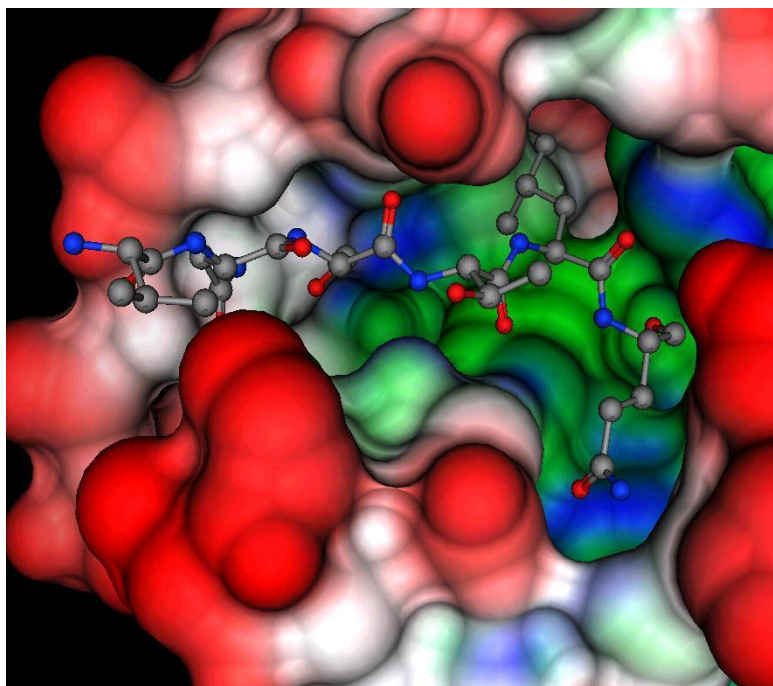
Enzymy, jakožto biologické katalyzátory, mají oproti běžným chemickým katalyzátorům několik výhod: pracují s vysokou efektivitou při běžných teplotách a tlacích, jsou ekologicky šetrné a většinou úzce substrátově specifické. Tato jejich substrátová specifita může ovšem představovat problém, chceme-li potenciál enzymu využít ke katalýze reakce, která v přírodě neprobíhá vůbec nebo pouze velmi pomalu.

S rozvojem silné výpočetní techniky v tomto století se nám otevírají nové možnosti, jak racionálně navrhovat upravené sekvence bílkovin anebo dokonce vytvářet funkční struktury *de novo*. V poslední době byl např. pomocí počítačového designu syntetizován enzym katalyzující Kempovu eliminaci, což je reakce, která v přírodě nebyla nikdy zaznamenána.¹⁷

Při počítačovém designu enzymů se běžně používá mnoha různých nástrojů a metod k dosažení kýženého cíle - výsledné funkční sekvence proteinu:

1.3.1 Docking

Molekulový docking je metoda sloužící k odhadnutí preferované orientace jedné molekuly k molekule druhé za vytvoření stabilního nekovalentního komplexu. Ze znalosti této orientace se dá dále vycházet při predikci síly vazeb a výpočtu disociační konstanty. V praxi se dockingu využívá hlavně pro zkoumání interakcí mezi proteinem a určitou malou molekulou, která by mohla sloužit např. jako substrát či inhibitor daného enzymu (Obr.5).¹⁸



Obr. 5: Příklad výsledné struktury z molekulového dokování. Povrch proteinu a kavita aktivního místa jsou zbarveny podle hydrofobicity. Molekula inhibitoru je zobrazena pomocí tyček a koulí.

Pro dosažení cíle ideálně simulované vazby mezi ligandem a proteinem se při dokování používá několik různých přístupů, každý se svými výhodami a nevýhodami.

Systematické metody se vyznačují vysokou rychlostí, využívají totiž již předem zvolených konformerů molekuly, které jsou pak jenom rigidně vkládány do aktivního místa enzymu. V praxi se používají zejména při výběru menší skupiny molekul z velkých knihoven potenciálních kandidátů.¹⁹

Metoda přírůstkové konstrukce spočívá v rozštěpení testované látky na několik menších dílů, které jsou potom sestaveny ve vazebném místě zpět do formy původní molekuly. Jeden z dílů většinou slouží jako „kotva“, na kterou se připojují díly zbývající.²⁰

Dnes asi nejběžnějším přístupem k dockingu jsou tzv. stochastické metody, umožňující optimalizaci konformerů přímo ve vazebném místě. K hledání ideálních konformací se často používá tzv. genetický algoritmus: jednotlivé torzní úhly, rotační stavy molekul apod. představují geny. Konformační stavy s danými geny (vlastnostmi) potom podléhají evoluci - kříží se a mutují - a tak vznikají další generace konformerů. Do následujícího kola evoluce vždy postupují pouze molekuly s nejnižší energií.²¹

1.3.2 Kvantová a molekulová mechanika

V tomto přístupu k molekulovému modelování je využíváno výhod kvantové a molekulové mechaniky (QM/MM) tak, aby byl výsledek co nejpresnější, ale přitom rychle zpracovatelný. Zkoumanou molekulu musíme nejdříve rozdělit na dvě části: jednu, jejíž energie a geometrie bude počítána za pomoci Schrödingerovy rovnice (např. molekula substrátu a aminokyseliny aktivního místa a jeho okolí v enzymu) a druhou (zbytek enzymu), kde se při výpočtu využije molekulové mechaniky, tedy klasické Newtonovské fyziky.

Kombinace těchto dvou přístupů se využívá hlavně při zkoumání enzymatických reakcí, kdy potřebujeme velmi přesné údaje o místě, kde se reakce odehrává, zároveň však nechceme zanedbat zbytek enzymu, jenž by byl ovšem pro kvantovou mechaniku příliš výpočetně náročný.²²

1.3.3 RosettaDesign

Rosetta je softwarový balík, sestávající z několika různých modulů, vyvinutý v laboratoři vedené Davidem Bakerem na Washingtonské univerzitě.²³ Hlavní uplatnění Rosetty spočívá v oblasti makromolekulového modelování. Po jejím úspěšném použití při *de novo* návrzích několika enzymů katalyzujících v přírodě neprobíhající reakce (Diels-Alderova reakce²⁴, retro-aldolová reakce²⁵ a již zmíněná Kempova eliminace¹⁷) se tento nástroj stal jedním z nejrespektovanějších ve svém oboru.

Pro svou práci využívá Rosetta předpokladu, že enzymy urychlují reakce skrze interakce, které stabilizují její tranzitní stav.²⁶ Nejprve je využito minimalistických

popisů aktivního místa, sestávajících z modelů tranzitního stavu obklopených samostatnými zbytky a funkčními skupinami, které jsou optimálně uspořádány pro podmínky katalýzy. Takovéto idealistické uspořádání, stabilizující tranzitní stav, se nazývá teozym (theozyme).

Po této proceduře se Rosetta snaží najít konformaci a sekvenci bílkoviny, která by odpovídala teozymu. Konečným výsledkem je upravená primární sekvence enzymu, která by měla více stabilizovat tranzitní stav a mít tedy větší aktivitu.²⁷

2 Metodika

2.1 Příprava struktur

Struktura yperitu byla připravena v molekulovém editoru Avogadro.²⁸ Její energie byla optimalizována R.E.D. Serverem, který provádí kvantově mechanické výpočty s využitím programu Gaussian09.²⁹

Struktury proteinů byly staženy z RCSB proteinové databáze (nebo případně ještě nebyly publikovány) (Tabulka 1), zbaveny vod a heteroatomů v programu PyMOL³⁰ a naprotonovány při pH 8,5 za využití serveru H++.³¹

Tabulka 1: Názvy použitých dehalogenas a jejich PDB kódy.

Enzym	PDB-ID
DmmA	3U1T
DmxA	nepublikováno
DhaA	1CQW
DhlA	2HAD
DbjA	3A2M
DbeA	4K2A
DpcA	nepublikováno
LinB	1MJ5

2.2 Docking

Struktury enzymů a yperitu byly připraveny pro dokování v programu MGLtools 1.5.2.³² Předvýpočty elektrostatické potenciální energie, van der Waalsových sil, vodíkových vazeb a desolvatační volné energie byly provedeny za využití programu AutoGrid 4.0.³³ Parametry mřížky byly zvoleny tak, aby pokrývala aktivní místo a kavitu s velikostí 80 x 80 x 80 gridových bodů a mezerami 0.25 Å. Yperit byl nadockován do enzymů v programu AutoDock 4.0.³³

Byl využit lamarkistický genetický algoritmus s 250 běhy, pracující s následujícími parametry: počáteční velikost populace 300, maximální počet kroků při vyhodnocování energie $3 \cdot 10^6$ a počet generací 30000, hodnota elitismu 1, míra mutací 0,02, míra křížení 0,8. Vyhledávání bylo provedeno za pomoci Solis & Wetsova algoritmu s maximem 300 iterací.³⁴ Výsledné struktury z každého dockování byly klastrovány s maximální střední kvadratickou odchylkou 2 Å pro konformační klastrovou analýzu. U nejlepších struktur byly změřeny úhly a vzdálenosti v reakčním místě.

Do kvantové a molekulové mechaniky postupovaly pouze konformery s vlastnostmi odpovídajícími hodnotám NAC (Near Attack Conformation)³⁵:

- vzdálenost $\text{-COO}^- \cdots \text{C-Cl} \leq 3,3 \text{ \AA}$
- úhel $\text{-COO}^- \cdots \text{C-Cl} = 140\text{-}180^\circ$
- vzdálenost $\text{-H} \cdots \text{Cl-C}$ (halid-stabilizující zbytky) $\leq 4,5 \text{ \AA}$

2.3 Kvantová a molekulová mechanika

Parametry silového pole pro dokované konformace ligandů byly připraveny moduly antechamber a prchk programu AmberTools 14.³⁶ Modul antechamber byl rovněž použit pro přiřazení AM1-BCC nábojů jednotlivým atomům ligandu. Topologie enzym-ligandových komplexů byly připraveny s pomocí modulu Tleap AMBER14 za využití silového pole ff14SB pro proteiny³⁷ a obecného silového pole GAFF pro ligandy.³⁸

Komplexy byly minimalizovány ve vakuu s parametrem $\text{igb}=6$. Pět kol minimalizace sestávajících z 500 kroků metody největšího spádu bylo následováno 500 kroky metody konjugovaného gradientu s penalizací $500 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$ aplikovanou na všechny těžké atomy a následně pak s klesajícími penalizacemi (500, 125, , 25 a $1 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$) aplikovanými na proteinovou kostru (CA, C a N atomy).

Adiabatické mapování reakční koordináty bylo provedeno modulem Sander programu AMBER14. Kvantová část výpočtu obsahovala postranní řetězce halid-stabilizujících zbytků, katalytického aspartátu a celou molekulu ligandu, zbytek komplexu byl počítán molekulovou mechanikou. Pro kvantovou část byl použit semiempirický hamiltonián PM6³⁹, pro molekulově mechanickou silové pole ff14SB. Přejchod kvantové a molekulové části byl ošetřen explicitním spojením atomů. Hranice pro interakce mezi náboji byla nastavena na 999 \AA . Pro kostru proteinu byla použita penalizace $1 \text{ kcal.mol}^{-1}\text{\AA}^{-2}$. Reakční koordináta byla definována jako vzdálenost mezi OD1 atomem nukleofilu a C2 atomem ligandu. Postup po koordinátě byl realizován s krokem $0,05 \text{ \AA}$, kde každý krok byl tvořen 1000 minimalizačními kroky Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno kvazi-Newtonovského algoritmu.

2.4 Rosetta design

Soubor .cst vygenerovaný na základě tranzitního stavu z kvantové a molekulové mechaniky byl rozdělen do 3 částí – 1 popisující geometrii interakcí aspartátu s yperitem a 2 popisující geometrii halid-stabilizujících zbytků (Příloha 1). Následně byla vytvořena knihovna rotamerů pro substrát pomocí nástroje generate_ligens. Použitá struktura proteinu byla vyčištěna od všech heteroatomů a vodíků, pořadová čísla aminokyselin byla přepsána tak, aby začínala od čísla 1.

Zbytky ve vzdálenosti do 6 Å od substrátu, kromě katalytické pentády, byly nastaveny jako mutovatelné za všechny aminokyseliny. Zbytky do 8 Å byly nastaveny jako repackovatelné, byla tedy umožněna optimalizace jejich rotamerů.

EnzRepackMinimize mover, který je součástí RosettaScripts⁴⁰, byl použit pro design mutovatelných zbytků. Nativní rotamery byly zahrnuty do výpočtu pomocí IncludeCurrent a rotamery aromatických zbytků byly omezeny pomocí LimitAromaChi2. Následná minimalizace bočních řetězců i proteinové kostry byla provedena stejným moverem. Nativní zbytky byly favorizovány bonusem 1.5 REU. Mutovatelné a repackovatelné zbytky byly nastaveny pomocí resfile souboru.

2.5 Predikce stability

Pro předpovězení stability výsledných nadesignovaných struktur byl využit modul ddg monomer balíku Rosetta s nastavením podle Kellogg a kolektiv.⁴¹ Výchozí struktury byly nejprve minimalizovány pomocí funkce minimize_with_cst s následujícím nastavením: optimalizace jak kostry proteinu tak postranních řetězců (sc_min_only false), vzdálenost pro atomový párový potenciál 9 Å (fa_max_dis 9.0), pro funkci energie byly použity standardní váhy, stejně jako pro constraint (constraint_weight 1.0). Výsledek optimalizace byl pomocí skriptu convert_to_cst_file.sh převeden na .cst soubor.

Vlastní výpočet stability byl nastaven podle protokolu 16 umožňující flexibilitu páteře s následujícím nastavením.⁴¹ Pro repacking postranních řetězců byla použita funkce soft_rep_design weights. Celý protein byl optimalizován bez restriktce vzdáleností (local_opt_only false). Již vytvořený .cst soubor byl použit jako omezení během minimalizace kostry proteinu (min_cst true). Následovaly tři kola optimalizace se zvětšující se vahou odpuzivých sil (ramp_repulsive true). Minimální energie z 50 opakování byla použita pro predikci efektu na stabilitu.

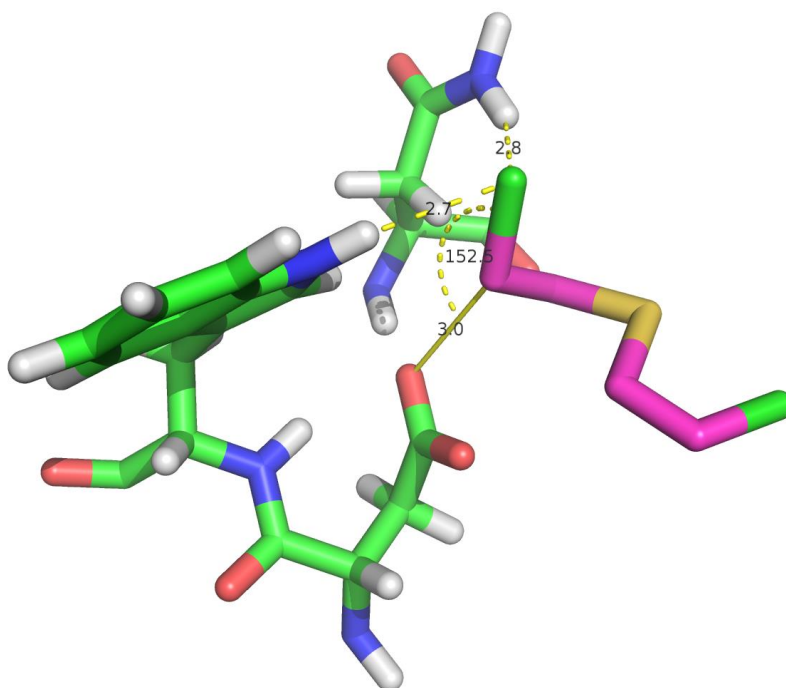
3 Výsledky

3.1 Docking

K získání struktury komplexu enzym-substrát v aktivním byl proveden molekulový docking. K tomuto účelu byla připravena a zoptimalizována molekula yperitu a celkem 8 různých dehalogenáz (DbeA, DbjA, DhaA, DhIA, DmmA, DmxA, DpcA a LinB), které mají vysokou hladinu exprese, a které lze tedy purifikovat v dostatečném množství.

Celé dokování bylo provedeno v programu AutoDock 4.0 Po 250 bžích bylo získáno u každého proteinu dohromady 1-6 výsledných vazebných modů. Následně byly tyto struktury analyzovány – nejdříve byly vyřazeny ty výsledky, které neodpovídaly následujícím parametrům podle NAC³⁵ (Obr. 6):

- vzdálenost $\text{-COO}^- \cdots \text{C-Cl} \leq 3,3 \text{ \AA}$
- úhel $\text{-COO}^- \cdots \text{C-Cl} = 140\text{-}180^\circ$
- vzdálenost $\text{-H} \cdots \text{Cl-C}$ (halid-stabilizující zbytky) $\leq 4,5 \text{ \AA}$



Obr. 6: Geometrické parametry vazby yperitu v aktivním místě DhaA. Katalytický aspartát a halid-stabilizující zbytky jsou znázorněny zeleně, molekula ligandu fialově.

Do dalšího kola, kvantové/molekulové mechaniky, byly vybrány pouze struktury s geometrií odpovídající NAC a s nejnižší vazebnou energií (Tabulka 2). Z geometrických parametrů vyplývá, že pouze DhIA a DmxA nesplňují NAC aspoň v jedné hodnotě. Ostatní proteiny optimální geometrii vykazují.

Tabulka 2: Výsledné vazebné mody všech proteinů s jejich geometrií, vazebnou energií a procentuálním zastoupením v celkem 250 bězích.

Název proteinu	Vazebná energie [kcal/mol]	Zastoupení v klastru [%]	Vzdálenost -COO- •• •C-Cl [Å]	Vzdálenost -H•••Cl-C [Å]	Úhel -COO- •••C-Cl [°]
LinB	-3,14	78,8	3,2	2,5; 2,5	173,8
DbeA	-3,41	100	3,1	2,5; 2,6	165,5
DbjA	-3,36	78,4	3,2	2,7; 2,6	176,7
DhaA	-3,50	90,8	3,1	2,7; 2,8	159,9
DhlA	-2,92	100	3,6	2,4; 2,9	157,7
DmmA	-2,94	33,6	3,0	2,9; 3,1	169,9
DmxA	-3,58	100	3,3	2,6; 2,6	138,0
DpcA	-3,42	16,4	3,1	2,5; 2,4	157,8

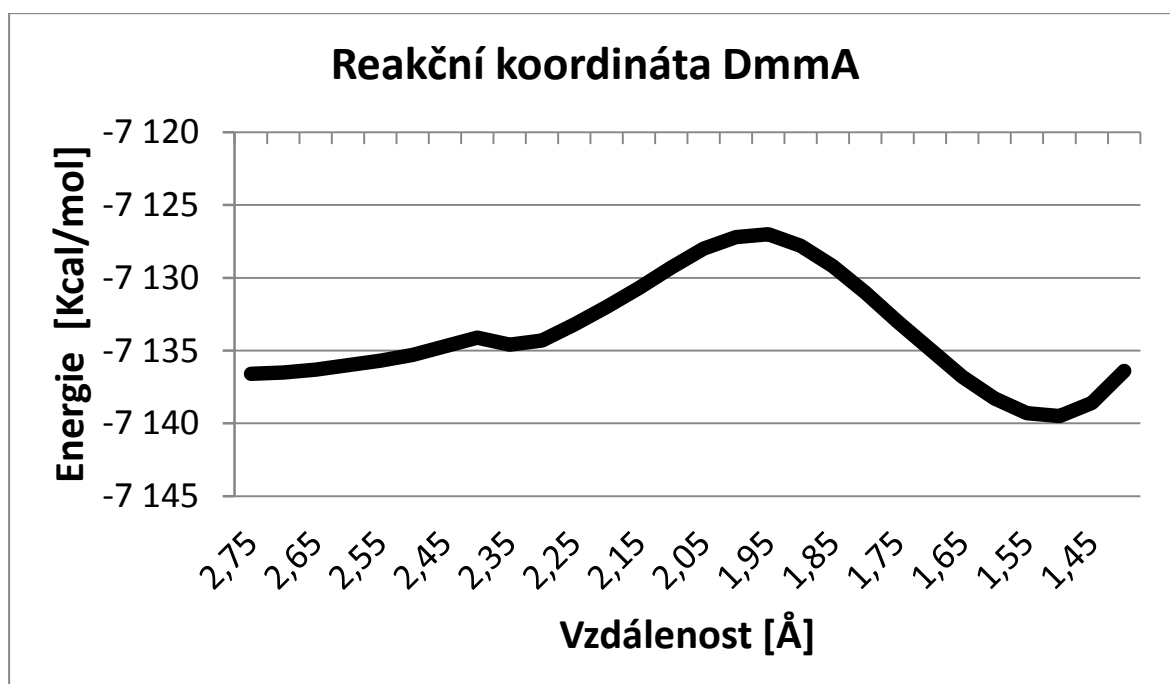
3.2 Kvantová a molekulová mechanika

Metoda QM/MM byla použita získání tranzitního stavu prvního kroku dehalogenační reakce. Geometrie tranzitního stavu byla dále využita při návržení mutací pomocí Rosetty.

K výpočtu byl využit softwarový balík Amber 14. Reakce byla definována jako přibližování atomu uhlíku vázajícího odstupující atom chloru v yperitu a atomu kyslíku na katalytickém aspartátu. Jeden výpočetní krok byl nastaven jako přiblížení těchto dvou atomů o 0,05 Å následované optimalizací energie. Výsledný počet kroků každého proteinu se pohyboval mezi 30 a 50 (na základě rozdílných vzdáleností z dockingu). Z energií všech kroků byla sestavena reakční koordináta pro každou zkoumanou dehalogenasu. Nejlepší výsledek zaznamenala DmmA, u níž byla aktivační energie o 4-10 kcal/mol nižší než v ostatních případech (Tabulka 3). DmmA byla také jediným enzymem, kde stabilizace produktu byla lepší než stabilizace substrátu (Graf 1).

Tabulka 3: Výsledné energie pro jednotlivé enzymy z QM/MM prvního kroku dehalogenační reakce

Název proteinu	Aktivační energie [kcal/mol]	Rozdíl E substrátů a produktů [kcal/mol]
LinB	15,5	5,1
DbeA	14,4	4,1
DbjA	13,4	1,3
DhaA	13,8	4,3
DhlA	16,8	5,3
DmmA	9,6	-2,9
DmxA	18,3	10,7
DpcA	13,5	5,1



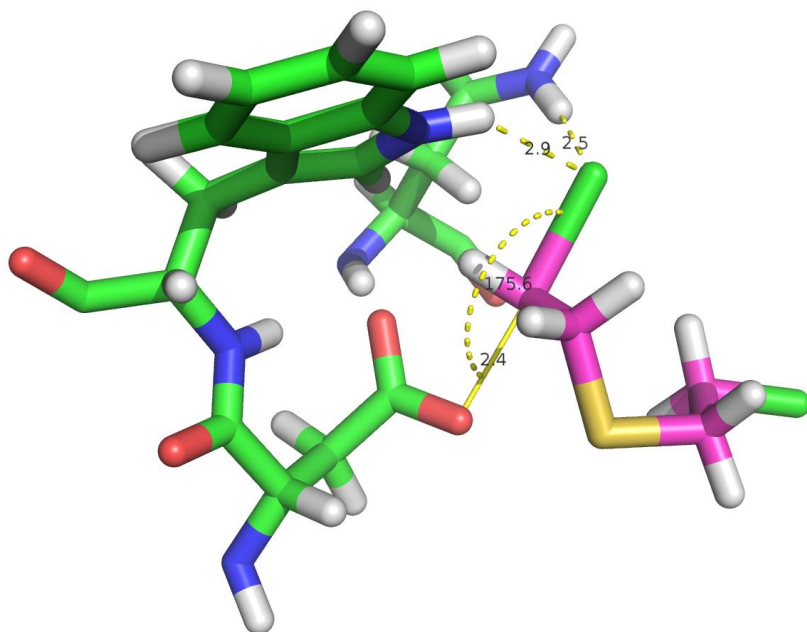
Graf 1: Reakční koordináta hydrolyzy yperitu v dehalogenase Dmma

Jako tranzitní stav (stav s nejvyšší potenciální energií) byla označena struktura v kroku 30 se vzdáleností 1,95 Å. Tento komplex byl dále optimalizován a sloužil jako výchozí molekula při návrhu mutací v Rosettě.

3.3 Návrh mutací

Na základě výsledků kvantové a molekulové mechaniky byl pro návrh potenciálních mutací v Rosettě zvolen enzym Dmma, který vykazoval nejvýhodnější energetické předpoklady pro danou reakci. Aminokyseliny ve vzdálenosti do 6 Å od substrátu (s výjimkou katalytické pentády) byly nastaveny jako mutovatelné za všech 20 proteinogenních aminokyselin. Zbytky od 6 do 8 Å od ligandu byla repackována, tedy byly optimalizovány jejich torzní úhly.

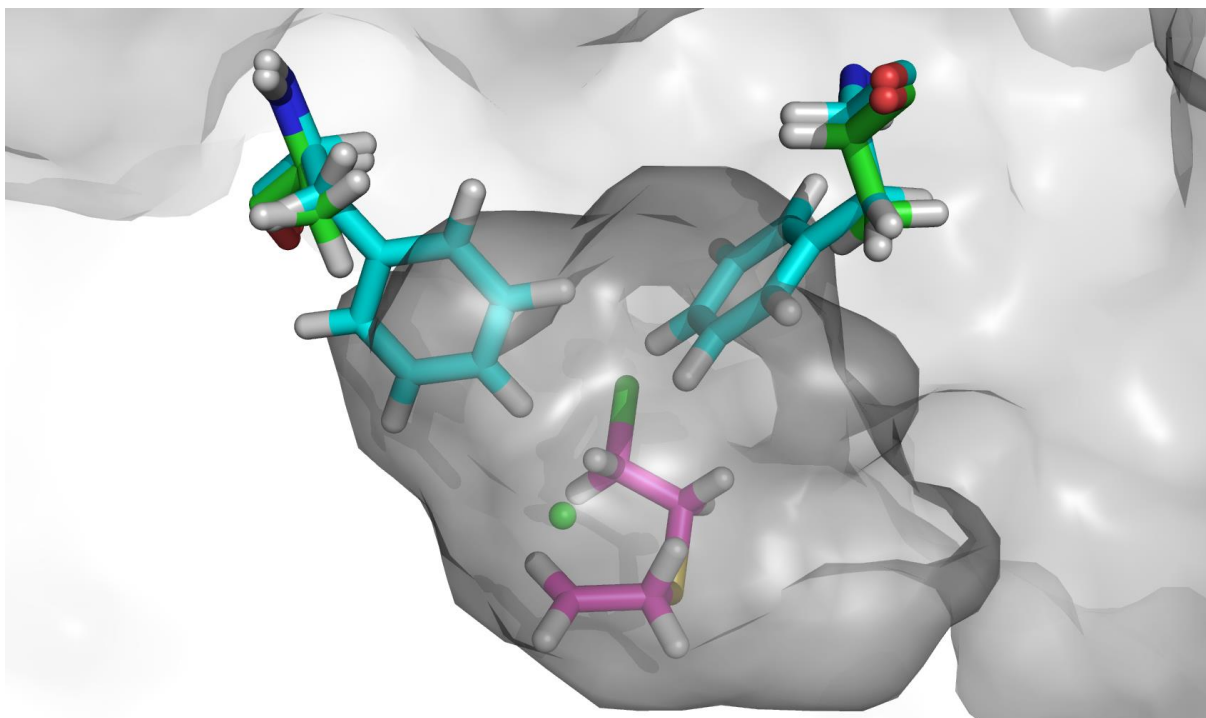
Z geometrie tranzitního stavu byl vytvořen teozym (Obr. 7), který byl převeden do Rosetty pomocí konstreinového souboru (cst file) specifikujícímu interakce mezi katalytickými zbytky a substrátem (Příloha 1). Samotný výpočet byl proveden celkem ve 30 opakováních.



Obr. 7: Teozym popisující geometrii tranzitního stavu nukleofilní substituce. Nukleofil a halid stabilizující zbytky jsou znázorněny zeleně, molekula yperitu fialově.

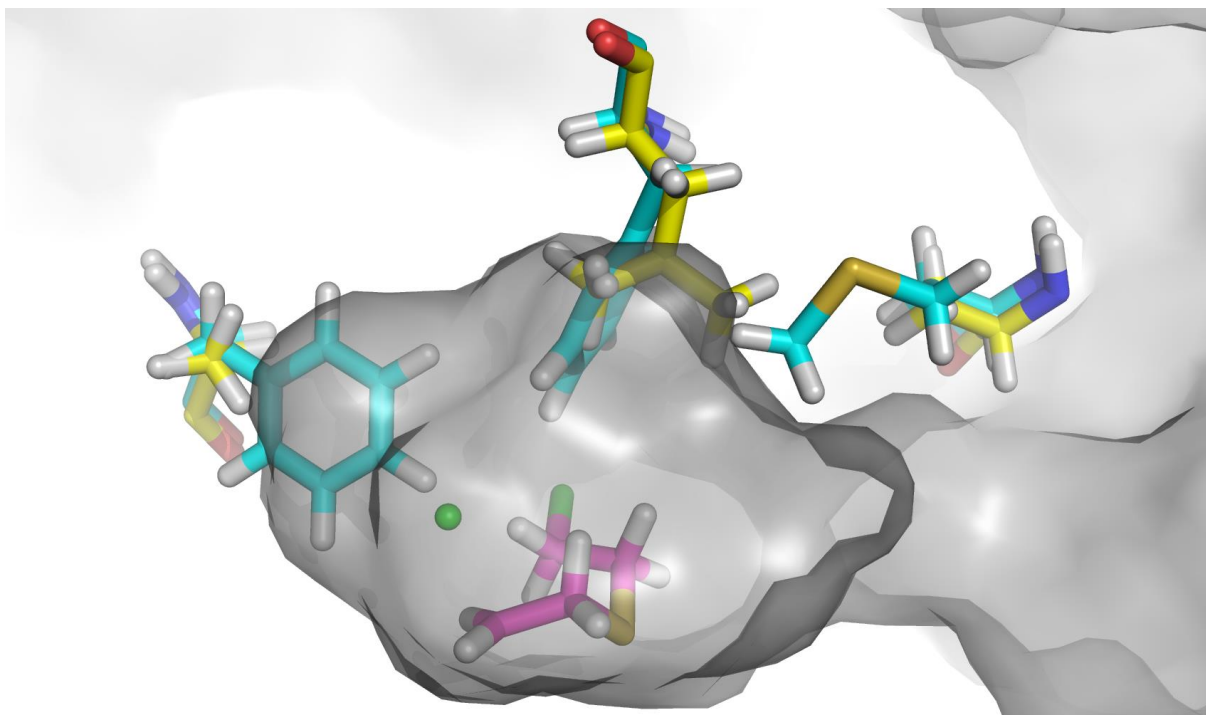
Výsledkem těchto třiceti opakování byly dva různé mutanti, jeden dvoubodový a druhý tříbodový.

První mutant (DmmA1) nesl dvě mutace: F148A a F167A (Obr. 8). Obě substituce velkých aromatických fenylalaninů za menší alaniny umožňují lepší vazbu yperitu v aktivním místě a odstraňují stérické zábrany, které by mohly velké aminokyseliny způsobovat. Interakční energie mezi substrátem a enzymem byla -1.9 REU.



Obr. 8: Pozice substitucí u mutanta DmmA1. Protein divokého typu je znázorněn modře a mutované zbytky zeleně. Kavita aktivního místa je vyobrazena šedou barvou.

V druhé sadě mutací (DmmA5) se objevila opět mutace F167A, nicméně fenylalanin v pozici 148 byl zmutován za leucin a blízký metionin v pozici 140 za alanin (Obr. 9). Stejně jako v předešlé sadě byly odstraněny velké aromatické cykly a na jejich místo dosazeny menší zbytky, které by měly umožnit lepší vazbu yperitu v aktivním místě bez stérických zábran, což podporuje také výhodná interakční energie -2.3 REU.



Obr. 9: Pozice substitucí u trojbodového mutanta DmmA5. Protein divokého typu je znázorněn modře a mutovaná residua žlutě. Kavita aktivního místa je vyobrazena šedou barvou

Na závěr byla porovnána stabilita obou mutantních enzymů vůči divokému typu pomocí modulu ddg monomer balíku Rosetta. U prvního navrženého enzymu, DmmA1, byl rozdíl volných energií $\Delta\Delta G = 6,37$ kcal / mol. Pro DmmA5 byla tato hodnota $\Delta\Delta G = 4,13$ kcal / mol. Je tedy zřejmé, že obě sady mutací jsou destabilizující.

4 Diskuse

Cílem mé práce bylo navrhnout úpravy enzymů dehalogenas, které by způsobily zvýšení jejich aktivity vůči yperitu. K určení vhodných mutací byl využit softwarový balík Rosetta. Ten je zatím v Česku poměrně neznámý, nicméně se s jeho pomocí podařilo několika vědeckým týmům dosáhnout zásadních úspěchů, např. *de novo* návrhu enzymů katalyzujících v přírodě běžně neprobíhající reakce, stabilizaci proteinů nebo optimalizaci již existujících enzymů.

Z výsledků dockingu vyplývá, že všechny použité dehalogenasy dokáží vázat yperit s výhodnou energií. Rozdíly ve vazebné energii mezi jednotlivými enzymy byly maximálně 0.7 kcal/mol. Byly nalezeny vhodné vazebné mody s geometrickými parametry odpovídajícími NAC pro všechny enzymy s výjimkou Dh1A a DmxA. Obě tyto dehalogenasy mají výrazně menší kavitu s aktivním místem a molekula yperitu nedokáže zaujmout vhodnou orientaci kvůli sterickým zábránám. Z QM/MM byla zjištěna aktivační energie reakce. Její hodnoty se pohybovaly mezi 10 a 20 kcal/mol. Nejnížší aktivační energii vykazoval enzym DmmA, který ve srovnání s ostatními enzymy měl energetickou bariéru nižší o 4-10 kcal/mol. DmmA byl také jediný enzym, kde celková stabilizace produktu byla výhodnější než stabilizace substrátu. Z těchto důvodů byl enzym DmmA vybrán jako nejvýhodnější a dále podroben *in silico* designu.

Pomocí Rosetty byli navrženi celkem dva finální mutanti – dvou- a tříbodový. V obou případech byly navrženy mutace fenylalaninů v aktivním místě za menší zbytky. I když klesla celková stabilita komplexů kvůli snížení množství kontaktů, vylepšená interakční energie enzymu s molekulou yperitu ukazuje, že zvětšení prostoru mělo za následek zlepšení sterických podmínek kavity pro yperit. Pokud nebude celková destabilizace příliš vysoká, aby se enzym správně neposkládal, aktivita enzymu s optimalizovaným aktivním místem by se z hlediska predikce zvýšit. V případě úspěchu nových mutantů by navíc bylo možné výpočetně navrhnout další mutace, které by celkově sníženou stabilitu kompenzovaly.

Další postup spočívá v syntéze genu odpovídajícímu navrženým mutantům, jeho naklonování, exprese a charakterizace v laboratoři. Bude studována tepelná stabilita mutantů a aktivita vůči analogům yperitu.

Závěr

Výsledkem této práce jsou dvě navržené sady mutací dehalogenasy DmmA, které by z tohoto enzymu měly vytvořit účinný nástroj pro degradaci nebo dekontaminaci yperitu. Zbavování se chemických zbraní současnými metodami není ideální, především kvůli jejich náročnosti na velmi vysoké teploty nebo nebezpečné chemikálie. Enzymatická degradace se naproti tomu vyznačuje šetrností k životnímu prostředí a dlouhodobou udržitelností.

Výsledné mutantní struktury budou v nejbližší době syntetizovány a analyzovány z hlediska jejich stability. Poté budou odeslány do vojenské laboratoře pro otestování jejich katalytické účinnosti při degradaci yperitu. Pokud budou tyto výsledky kladné, je možné přistoupit k optimalizaci syntézy ve větším měřítku a nasazení v praxi.

Pro mě osobně byla tato práce velmi přínosná – znalosti, které jsem při jejím řešení získal, budou, myslím si, velmi užitečné i v budoucnu. Oblast proteinového inženýrství vidím jako velice perspektivní. To, co ještě před několika lety bylo skoro nemožné nebo extrémně zdlouhavé, se nyní, s nástupem počítačové výpočetní síly, stává běžnou realitou mnoha laboratoří pracujících na návrhu nových proteinů, takže můžu čekat, že se s vyzkoušenými metodami zanedlouho opět setkám.

Literatura

- [1] DUCHOVIC, Ronald J. a Joel A. VILENSKY. Mustard Gas: Its Pre-World War I History. ISBN 10.1021/ed084p944.
- [2] HABER, L a Joel A. VILENSKY. The poisonous cloud: chemical warfare in the First World War. New York: Oxford University Press, 1986. xiv, 415 p. ISBN 01-985-8142-4.
- [3] Library and Archives Canada / C-080027; http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mustard_gas_burns.jpg
- [4] PECHURA, Constance M a David P RALL. Veterans at risk: the health effects of mustard gas and Lewisite. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993. xviii, 427 p. ISBN 0-309-04832-X.
- [5] WADA, Sunao, Michihiro MIYANISHI, Yukio NISHIMOTO, Shinji KAMBE a RobertW. MILLER. Mustard gas as a cause of respiratory neoplasia in man: the health effects of mustard gas and Lewisite. Washington, D.C.: National Academy Press, 1993. xviii, 427 p. ISBN 10.1016/s0140-6736(68)91863-1.
- [6] MALHOTRA, R. C., K. GANESAN, K. SUGENDRAN a R. V. SWAMY. Chemistry and toxicology of sulphur mustard- A review. ISBN 10.14429/dsj.49.3793.
- [7] MEYER, Victor. Weitere Studien zur Kenntniss der Thiophengruppe. ISBN 10.1002/cber.188601901142.
- [8] BORONIN, Alexander M, Inna T ERMAKOVA, Valentin G SAKHAROVSKY, Galina M GRECHKINA, Ivan I STAROVOITOV, Robin L AUTENRIETH a James R WILD. Ecologically safe destruction of the detoxification products of mustard-lewisite mixtures from the Russian chemical stockpile. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* . 2000, vol. 75, issue 1, s. 82-88. DOI: 10.1002/(sici)1097-4660(200001)75:1<82::aid-jctb178>3.0.co;2-m.
- [9] GATES, M.; MOORE, S. Mustard gas and other sulfur mustards. Chemical warfare agents, and related chemical problems, 1946.
- [10] MORRIS, George Michael. Truth in chemical weapons disposal: A call for an international convention on the full disclosure of chemical weapons disposed of at sea and pollution preparedness, response and co-operation. *U. Balt. J. Envntl. L.*, 2004, 12: 165.
- [11] Methods used to destroy chemical warfare agents. [cit. 27.2.2015] Dostupné z: <http://www.cdc.gov/nceh/demil/methods.htm>
- [12] JANSSEN, Dick B., Jan GERRITSE, Josephine BRACKMAN, Christiaan KALK, Dick JAGER a Bernard WITHOLT. Purification and characterization of a bacterial

dehalogenase with activity toward halogenated alkanes, alcohols and ethers. *European Journal of Biochemistry*. 1988, vol. 171, 1-2, s. 67-72. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13759.x.

[13] FORTOVA, Andrea, Eva SEBESTOVA, Veronika STEPANKOVA, Tana KOUDELAKOVA, Lenka PALKOVA, Jiri DAMBORSKY a Radka CHALOUPKOVA. DspA from *Strongylocentrotus purpuratus*: The first biochemically characterized haloalkane dehalogenase of non-microbial origin. *Biochimie*. 2013, vol. 95, issue 11, s. 2091-2096. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.07.025.

[14] JESENSKA, A. Dehalogenation of haloalkanes by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and other *Mycobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, issue 1, s. 219-222. DOI: 10.1128/aem.66.1.219-222.2000.

[15] JANSSEN, Dick. Evolving haloalkane dehalogenases. *Curr Opin Chem Biol*. 2004 Apr;8(2):150-9. ISBN 10.1016/j.cbpa.2004.02.012.

[16] VERSCHUEREN, Koen H.G., Sybille M. FRANKEN, Henriëtte J. ROZEBOOM, Kor H. KALK a Bauke W. DIJKSTRA. Refined X-ray structures of haloalkane dehalogenase at pH 6.2 and pH 8.2 and implications for the reaction mechanism. *Journal of Molecular Biology*. Volume 232, Issue 3, 5 srpen 1993, strany 856-872 ISBN 10.1006/jmbi.1993.1436.

[17] RÖTHLISBERGER, Daniela, Olga KHERSONSKY, Andrew M. WOLLACOTT, Lin JIANG, Jason DECHANCIE, Jamie BETKER, Jasmine L. GALLAHER, Eric A. ALTHOFF, Alexandre ZANGHELLINI, Orly DYM, Shira ALBECK, Kendall N. HOUK, Dan S. TAWFIK a David BAKER. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature* 453, 190-195 (8 May 2008) ISBN 10.1038/nature06879.

[18] KITCHEN, Douglas B., Hélène DECORNEZ, John R. FURR a Jürgen BAJORATH. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Nov;3(11):935-49. ISBN 10.1038/nrd1549.

[19] LYNE, Paul D. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*. 2002, vol. 7, issue 20, s. 1047-1055. DOI: 10.1016/s1359-6446(02)02483-2.

[20] KONTOYIANNI, Maria, Prakash MADHAV, Eric SUCHANEK, William SEIBEL a Kim SHARP. Theoretical and practical considerations in virtual screening: A beaten field?. *Current Medicinal Chemistry*. 2008, vol. 15, issue 2, s. 229-248. DOI: 10.1201/9781420028775.pt4.

[21] MOITESSIER, N, P ENGLEBIENNE, D LEE, J LAWANDI a C R CORBEIL. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*. 2008, vol. 153, S1, S7-S26. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707515.

- [22] LIN, Hai a Donald G. TRUHLAR. QM/MM: What have we learned, where are we, and where do we go from here?. *ChemInform*. 2007, vol. 38, issue 22. DOI: 10.1002/chin.200722224.
- [23] SIMONS, Kim T., Rich BONNEAU, Ingo RUCZINSKI a David BAKER. Ab initio protein structure prediction of CASP III targets using ROSETTA. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 1999, vol. 37, S3, s. 171-176. DOI: 10.1002.
- [24] SIEGEL, J. B., A. ZANGHELLINI, H. M. LOVICK, G. KISS, A. R. LAMBERT, J. L. Clair STCLAIR, J. L. GALLAHER, D. HILVERT, M. H. GELB, B. L. STODDARD, K. N. HOUK, F. E. MICHAEL a D. BAKER. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular Diels-Alder reaction. *Science*. 2010, vol. 329, issue 5989, s. 309-313. DOI: 10.1126/science.1190239.
- [25] JIANG, L., E. A. ALTHOFF, F. R. CLEMENTE, L. DOYLE, D. ROTHLSBERGER, A. ZANGHELLINI, J. L. GALLAHER, J. L. BETKER, F. TANAKA, C. F. BARBAS, D. HILVERT, K. N. HOUK, B. L. STODDARD, D. BAKER a Jeffery G. SAVEN. *De novo* computational design of Retro-Aldol enzymes. *Science*. 2008, vol. 319, issue 5868, s. 467-493. DOI: 10.1002/9783527677016.ch19.
- [26] GARCIA-VILOCA, M. How enzymes work: analysis by modern rate theory and computer simulations. *Science*. 2004, vol. 303, issue 5655, s. 75-85. DOI: 10.1201/b18087-6.
- [27] RICHTER, Florian, Andrew LEAVER-FAY, Sagar D. KHARE, Sinisa BJELIC, David BAKER a Darren FAYNE. *De novo* enzyme design using Rosetta3. *PLoS ONE*. 2011, vol. 6, issue 5, s. 227-244. DOI: 10.1002/9783527677016.ch9.
- [28] HANWELL, Marcus D, Donald E CURTIS, David C LONIE, Tim VANDERMEERSCH, Eva ZUREK a Geoffrey R HUTCHISON. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*. 2012, vol. 4, issue 1. DOI: 10.1186/1758-2946-4-17.
- [29] VANQUELEF, E., S. SIMON, G. MARQUANT, E. GARCIA, G. KLIMERAK, J. C. DELEPINE, P. CIEPLAK a F.-Y. DUPRADEAU. R.E.D. Server: a web service for deriving RESP and ESP charges and building force field libraries for new molecules and molecular fragments. *Nucleic Acids Research*. 2011, vol. 39, suppl, W511-W517. DOI: 10.1093/nar/gkr288.
- [30] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.5.0.4 Schrödinger, LLC.
- [31] GORDON, J. C., J. B. MYERS, T. FOLTA, V. SHOJA, L. S. HEATH a A. ONUFRIEV. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Research*. 2005, vol. 33, Web Server, s. 217-243. DOI: 10.1002/9781118255865.ch9.

- [32] SANNER, F. Python: A programming language for software integration and development. *J. Mol. Graphics Mod.* 1999. 17:57-61.
- [33] MORRIS, Garrett M., David S. GOODSELL, Robert S. HALLIDAY, Ruth HUEY, William E. HART, Richard K. BELEW a Arthur J. OLSON. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *Journal of Computational Chemistry.* 1998, vol. 19, issue 14, s. 1639-1662. DOI: 10.1002/(sici)1096-987x(19981115)19:14<1639::aid-jcc10>3.0.co;2-b.
- [34] SOLIS, Francisco J. a Roger J.-B. WETS. Minimization by random search techniques. *Mathematics of Operations Research.* 1981, vol. 6, issue 1, s. 19-30. DOI: 10.1287/moor.6.1.19.
- [35] DANIEL, Lukas, Tomas BURYSKA, Zbynek PROKOP, Jiri DAMBORSKY, Jan BREZOVSKY, Donald R. KIRSCH a Beth J. DIDOMENICO. Mechanism-based discovery of novel substrates of haloalkane dehalogenases using *in silico* screening. *Journal of Chemical Information and Modeling.* 2015, vol. 55, issue 1, s. 177-221. DOI: 10.1016/b978-0-7506-9003-4.50012-5.
- [36] D.A. Case, V. Babin, J.T. Berryman, R.M. Betz, Q. Cai, D.S. Cerutti, T.E. Cheatham, III, T.A. Darden, R.E. Duke, H. Gohlke, A.W. Goetz, S. Gusarov, N. Homeyer, P. Janowski, J. Kaus, I. Kolossváry, A. Kovalenko, T.S. Lee, S. LeGrand, T. Luchko, R. Luo, B. Madej, K.M. Merz, F. Paesani, D.R. Roe, A. Roitberg, C. Sagui, R. Salomon-Ferrer, G. Seabra, C.L. Simmerling, W. Smith, J. Swails, R.C. Walker, J. Wang, R.M. Wolf, X. Wu a P.A. Kollman (2014), AMBER 14, University of California, San Francisco.
- [37] HORNAK, Viktor, Robert ABEL, Asim OKUR, Bentley STROCKBINE, Adrian ROITBERG a Carlos SIMMERLING. Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics.* 2006, vol. 65, issue 3, s. 712-725. DOI: 10.1002/prot.21123.
- [38] WANG, Junmei, Romain M. WOLF, James W. CALDWELL, Peter A. KOLLMAN a David A. CASE. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry.* 2004, vol. 25, issue 9, s. 1157-1174. DOI: 10.1002/jcc.20035.
- [39] ROCHA, Gerd B., Ricardo O. FREIRE, Alfredo M. SIMAS a James J. P. STEWART. RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I. *Journal of Computational Chemistry.* 2006, vol. 27, issue 10, s. 1101-1111. DOI: 10.1107/s0108768199003614/hr0041sup1.cif.
- [40] FLEISHMAN, Sarel J., Andrew LEAVER-FAY, Jacob E. CORN, Eva-Maria STRAUCH, Sagar D. KHARE, Nobuyasu KOHA, Justin ASHWORTH, Paul MURPHY, Florian RICHTER, Gordon LEMMON, Jens MEILER a David BAKER. RosettaScripts: a scripting language interface to the Rosetta macromolecular modeling suite. *PLoS ONE.* 2011, vol. 6, issue 6. DOI: 10.1371/journal.pone.0020161.

[41]www.rosettacommons.org/manuals/rosetta3.3_user_guide/d3/d28/ddg_monomer_application.html

Seznam symbolů, veličin a zkratek

EC	Enzyme Commission number (Číslo EC)
QM/MM	Kvantová/molekulová mechanika
PDB	Protein data bank, soubor struktury proteinu
CST	Constraint file
NAC	Near attack conformation
REU	Rosetta energy unit
DmmA1	Výsledný dvoubodový mutant
DmmA5	Výsledný trojbodový mutant

Seznam příloh

Příloha 1. CST file DmmA

PŘÍLOHA 1: CONSTRAINT FILE PRO DMMA

CST::BEGIN

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 1 atom_name: C4 C11 C7

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 1 residue3: LIG

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 2 atom_name: OD1 CG CB

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 2 residue1: D

CONSTRAINT:: distanceAB: 2.0 0.5 60.0 0 3
CONSTRAINT:: angle_A: 169.7 15.0 10.0 360. 2
CONSTRAINT:: angle_B: 113.5 20.0 10.0 360. 2
CONSTRAINT:: torsion_A: -174.2 25.0 10.0 360. 2
CONSTRAINT:: torsion_AB: -52.6 25.0 10.0 360. 2
CONSTRAINT:: torsion_B: -178.4 25.0 10.0 360. 2

ALGORITHM_INFO:: match_positions

num_neighbors min_neighbors 16

ALGORITHM_INFO::END

CST::END

CST::BEGIN

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 1 atom_name: C11 C4 C7

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 1 residue3: LIG

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 2 atom_type: HE1 NE1 CD1

TEMPLATE:: ATOM_MAP: 2 residue1: W

CONSTRAINT:: distanceAB: 2.8 0.4 60.0 0 2
#CONSTRAINT:: angle_A: 92.1 20.0 10.0 360. 1
CONSTRAINT:: angle_B: 132.6 25.0 10.0 360. 2
#CONSTRAINT:: torsion_A: -72.7 25.0 10.0 360. 2

```

#CONSTRAINT:: torsion_AB: -36.1  20.0  10.0  360.  2
#CONSTRAINT::  torsion_B: -26.1   30.0  10.0  180.  3

ALGORITHM_INFO:: match
    SECONDARY_MATCH: DOWNSTREAM
ALGORITHM_INFO::END
CST::END

CST::BEGIN
    TEMPLATE::  ATOM_MAP: 1 atom_name: C11 C4 C7
    TEMPLATE::  ATOM_MAP: 1 residue3: LIG

    TEMPLATE::  ATOM_MAP: 2 atom_type: HD21 ND2 CG
    TEMPLATE::  ATOM_MAP: 2 residue1:  N

CONSTRAINT:: distanceAB:  2.6    0.4  60.0  0    2
#CONSTRAINT::  angle_A: 120.4  20.0  10.0  360.  1
CONSTRAINT::  angle_B: 145.2  25.0  10.0  360.  2
#CONSTRAINT::  torsion_A: 166.7  25.0  10.0  360.  2
#CONSTRAINT::  torsion_AB: 92.9   20.0  10.0  360.  2
#CONSTRAINT::  torsion_B: -55.5  30.0  10.0  180.  3

ALGORITHM_INFO:: match
    SECONDARY_MATCH: DOWNSTREAM
ALGORITHM_INFO::END
CST::END

```