# MASARYKOVA UNIVERZITA Přírodovědecká fakulta

# Vztahy mezi strukturou, dynamikou a funkcí halogenalkandehalogenáz

Mgr. Martin Klvaňa

Autoreferát disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D. v oboru Mikrobiologie

Jméno:	Martin Klvaňa	
Název disertační práce:	Vztahy mezi strukturou, dynamikou a fur halogenalkandehalogenáz	
Vědní obor:	Mikrobiologie 15-10-9	

Autoreferát dizertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D.

Brno, dne 14. 11. 2009

Disertační práce byla vypracována v prezenčním a kombinovaném doktorském studijním programu na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity.

Uchazeč:	Mgr. Martin Klvaňa
Školitel:	<b>doc. RNDr. Miroslav Němec, Csc.</b> Ústav experimentální biologie Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Tvrdého 14, 602 00 Brno
Výzkumný vedouci:	<b>doc. Jiří Damborský</b> Ústav experimentální biologie Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Kamenice 5/A4, 625 00 Brno
Oponenti:	doc. Luděk Bláha RECETOX Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita Kamenice 3/A4, 625 00 Brno doc. Jan Florián Department of Chemistry Loyola University Chicago Chicago, IL 60660
	<b>Dr. Jiří Vondrášek</b> Ústav organické chemie a biochemie Akademie věd ČR, v.v.i. Flemingovo nám. 2. 166 10 Praha 6

Stanovisko k disertační práci vypracovala: Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

Obhajoba disertační práce se koná dne ...... před komisí pro obhajoby disertačních prací doktorského studijního programu Mikrobiologie v knihovně Oddělení mikrobiologie, Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU, Tvrdého 14, v ........... hodin.

S disertační prací je možné se seznámit v knihovně Oddělení mikrobiologie, Ústavu experimentální biologie Přírodovědecké fakulty MU, Tvrdého 14.

Předseda komise pro obhajobu disertačních prací ve vědním oboru Mikrobiologie:

**Prof. RNDr. Zdeněk Hubálek, DrSc.** Ústavu experimentální biologie Přírodovědecká fakulta Masarykova univerzita

# Poděkování

Výzkum v rámci mého doktorského studia by možný díky: Masarykova Univerzita, Superpočítačové centrum Brno, EML Research, Kobe University

... a za finanční podpory Ministerstva školství a tělovýchovy České republiky: Grant MSM0021622412

Níže následuje seznam lidí,	kterým bych chtěl říct děkuju:		
Školitel:	doc. RNDr. Miroslav Němec, Csc.		
	Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita		
	Brno, Česká republika		
Výzkumný vedoucí:	doc. Jiří Damborský		
	Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, Česká republika		
Metodický poradce:	Dr. Rebecca C. Wade		
	Molecular and Cellular Modeling Group, EML Research Heidelberg, Německo		
Technický poradce:	Mgr. Jan Brezovský		
	Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Brno, Česká republika		
Spoluautoři publikací:	Pavel Banáš, Radka Chaloupková, Jiří Damborský, Jan Dohnálek, Pavel Dvořák, Táňa Koudeláková, Petr Kulhánek, Ivana Kutá-Smatanová, Michal Kutý, Yuji Nagata, Michal Otyepka, Martina Pavlová, Zbyněk Prokop, Alena Stsiapanava, Masataka Tsuda, Rebeca C. Wade.		
Spoluautoři programu:	Filip Andres, Petr Beneš, Jan Brezovský, Eva Chovancová, Jiří Damborský, Petr Jaša, Barbora Kozlíková, Petr Medek, Antonín Pavelka, Jiří Sochor, Tibor Szabó, Matúš Zamborský.		
Kolegové z laboratoří:	Šárka Bidmanová, Jan Brezovský, Radka Chaloupková, Eva Chovancová, Pavel Dvořák, Andrea Fořtová, Khomaini Hasan, Petr Jeřábek, Táňa Koudeláková, Marta Monincová, Tomáš Mozga, Antonín Pavelka, Martina Pavlová, Zbyněk Prokop, Veronika Šťěpánková.		
Další vědci:	Takashi Nakamura, Alexander Shug, Shigenori Tanaka, Hirofumi Watanabe.		

# Abstrakt

Pomocí simulací klasické a náhodně urychlené molekulové dynamiky byly navrženy aminokyselinové zbytky v halogenalkandehalogenáze DhaA z Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13064 pro místně cílenou a saturační mutagenezi, která poskytla varianty enzymu se zvýšenou katalytickou účinností pro přeměnu jedovaté sloučeniny 1,2,3-trichlorpropanu až 26krát ve srovnání s divokým typem DhaA. Vnesené mutace cílily dva krystalograficky pozorovatelné tunely vedoucí do aktivního místa a zlepšily odstínění vnořeného aktivního místa od okolního vodního rozpouštědla, což poskytuje výhodnější prostředí pro počáteční chemický krok enzymatického reakčního cyklu. Kromě těch dvou tunelů byly v rentgenové krystalové struktuře divokého typu enzymu pomocí molekulově-dynamických simulací zjištěny další tři cesty a vliv mutací a chemického stavu aktivního místa na přístupnost všech pěti cest byl prozkoumán. Získané molekulově-dynamické trajektorie byly dále použity pro hodnocení přechodných verzí programu CAVER 2.0 sloužícího k výpočtu tunelů. CAVER spolu s molekulovou dvnamikou se tak mohou stát užitečným nástrojem pro zkoumání tunelů v bílkovinách a pro navrhování mutací pro vylepšení jejich funkce, čímž mohou přispět k lepšímu pochopení vztahů mezi strukturou, dynamikou a funkcí bílkovin s vnořeným vazebným místem.

Klíčová slova: Bílkovina, enzym, halogenalkandehalogenáza, vnořené aktivní místo, tunel, uvolnění produktu, výměna vody, molekulově–dynamická simulace, návrh mutantů, CAVER

# Úvod

Bílkoviny, geny a genetický kód jsou nejdůležitější funkce života (Ruiz-Mirazo a kol., 2004; Ikehara, 2005). V rámci bílkovin jsou nejdůležitější ty s katalytickou funkcí, tzv. enzymy, protože tyto urychlují specifické chemické reakce (Koshland Jr., 2002b), které by jinak byly příliš pomalé pro udržení životních procesů (Radzicka a Wolfenden, 1995; Koshland Jr., 2002b). Pochopení základních principů života proto vyžaduje hluboké pochopení funkce enzymů (Koshland Jr., 2002b). Funkce je dána jeho strukturou a dynamikou (Karush, 1950; Koshland Jr., 1958; Sullivan a Holyoak, 2008; Kurakin, 2009), proto objasnění základních principů enzymatické funkce vyžaduje důkladné pochopení vysoce komplexních vztahů mezi strukturou, dynamikou a funkcí pro každý jednotlivý enzym. Navíc musí být tyto vlastnosti uvažovány z evolučního hlediska, protože nic v biologii nemá smysl, pokud to není vnímáno z pohledu evoluce (Dobzhansky, 1964; Koshland Jr., 1976; Woese, 2001). Každý jednotlivý enzym si zaslouží být studován, protože každý může prozradit důležité informace o strukturně-dynamicko-funkčních vztazích (Kendrew, 1962). Získané poznatky pak mohou být případně zobecněny pro některé další enzymy potažmo bílkoviny jiných funkcí, uvážíme-li omezený počet trojrozměrných uspořádání bílkovin (Chothia, 1992).

α/β-hydrolázové uspočádání (Ollis a kol., 1992) je jedním z nejvšestrannějších (Hegyi a Gerstein, 1999), protože podporuje různé hydrolytické funkce včetně hydrolytické dehalogenace katalyzované halogenalkandehalogenázami (Verschueren a kol., 1993d). Tyto enzymy přitahují pozornost vědců více než 20 let a to z mnoha důvodů, včetně příslušnosti k všestrannému strukturnímu uspořádání a toho, že mohou sehrávat důležitou ekologickou roli spočívající v odstraňování jedovatých halogenovaných sloučenin vnesených do životního

prostředí člověkem (**Janssen a kol., 1985**). Halogenalkandehalogenázy (EC 3.8.1.5) provádějí hydrolytickou dehalogenaci halogenovaných alifatických uhlovodíků na odpovídajcí alkohol, halogenidový anion a proton v reakci sestávající se ze tří chemických kroků – bimolekulární nukleofilní substituce ( $S_N$ 2), nukleofilní adice a eliminace (**Schanstra a kol., 1996b; Bosma a kol., 2003; Prokop a kol., 2003**). Hydrofóbní charakter substrátu naznačuje důležitost vnoření aktivního másta do nitra bílkoviny tak, aby bylo chráněno od vnějšího vodného prostředí (**Koshland Jr., 1976**). Zároveň musí být pro účinnou dehalogenační funkci zajištěna výměna vody, substrátu a produktů mezi vnořeným aktivním místem a vnějším prostředím (**Koshland Jr., 1995**).

Bosma a kol. (2002) izoloval mutanty halogenalkandehalogenázy DhaA, s označením 04 (Cys176Tyr) a M2 (M1+Tyr273Phe), které vykazovaly 2.8krát a 7.8krát zvýšenou katalytickou účinnost pro přeměnu 1,2,3-trichlorpropanu (TCP) na 2,3-dichloropropan-1-ol (DCL) a chloridový anion (CL). Bosma a kol. (2002) také navrhli, že záměna v pozici 176, nacházející se v hlavním tunelu, a která je sdílená oběma mutanty, přispívá k zlepšení katalytické účinnosti zmenšením velikosti dutiny aktivního místa, čímž zvyšuje účinnost vazby substrátu TCP. V souladu s takto navrženým vlivem mutace Cys176Tyr následně Bosma a kol. (2003) navrhli na základě nepřítomnosti kinetického izotopového účinku  ${}^{2}\text{H}_{2}\text{O}$ , že S<sub>N</sub>2 krok reakčního cyklu je rychlost-limitujícím při přeměně TCP divokým typem enzymu DhaA. Banáš a kol. (2006) poznamenali, že mutace Cys176Tyr má za následek zmenšení velikosti hlavního tunelu a usoudili, že tato mutace způsobuje posun v rychlost-limitujícím kroku z S<sub>N</sub>2 reakce na odchod produktu DCL v důsledku nutného přesměrování výstupní cesty pro DCL z hlavního tunelu do štěrbinového tunelu, a doporučili provést mutagenezi ve štěrbinovém tunelu za účelem dalšího vylepšení katalytické účinnosti enzymu DhaA s TCP.

Jako pokračování výzkumu provedeného Bosmou a kol. (2002; 2003) and Banášem a kol. (2006), a s cílem lepšího pochopení výměnných procesů v halogenalkandehalogenáze DhaA z Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13064 na atomární úrovni, bylo použito klasických molekulově-dynamických (MD) simulací (**McCammon a Karplus, 1977**) a náhodně urychlených MD ("RAMD"; z angl. random acceleration molecular dynamics) simulací (Lüdemann a kol., 2000a) k návrhu mutací a míst pro mutagenezi ve výměnných cestách, k zjištění výstupních cest pro produkty a výměnných cest pro vodu, k popisu vzájemných interakcí mezi enzymem, produkty a vodou a k interpretaci těchto zjištění ve světle experimentálních dat zahrnujících mutagenezi, dehalogenační aktivity, stability sekundárních prvků, a trojrozměrných struktur variant enzymu DhaA řešených metodou rentgenové krystalografie (RK). Nabyté znalosti strukturně-dynamicko-funkčních vztahů halogenalkandehalogenázy DhaA byl následně využity při vývoji programu CAVER 2.0 pro automatické hledání tunelů ve strukturách bílkovin.

# Cíle

1. In silico návrh mutantů divokého typu enzymu DhaA pro zlepšení přeměny substrátu TCP. Cílem bylo poskytnout experimentátorům seznam aminokyselinových zbytků pro nahrazení, a bylo-li to možné, doporučit vhodné záměny.

2. In silico analýza a interpretace vlivu mutací na zlepšenou přeměnu TCP mutantními formami enzymu DhaA. Cílem bylo navrhnout, která část reakčního cyklu byla záměnami vylepšena, a navrhnout, jaká by mohla být podstata toho zlepšení.

3. In silico určení cest a mechanismů pro odchod dvou produktů hydrolytické dehalogenace, tj. DCL a CL, z vnořeného aktivního místa divokého typu enzymu DhaA a jeho mutantů. Cílem bylo určit všechny potenciálně funkční cesty pro odchod produktů a popsat samotný výstupní proces ve smyslu dynamiky interakcí mezi produkty, enzymem a vodou.

4. In silico určení cest a mechanismů pro výměnu vod mezi vnořeným aktivním místem a povrchem divokého typu enzymu DhaA a jeho mutantů. Cílem bylo určit všechny potenciálně funkční cesty pro výměnu vod a popsat samotný výměnný proces ve smyslu dynamiky interakcí mezi vodou, enzymem a produkty.

**5. Srovnání RK struktur variant DhaA enzymu.** Cílem bylo prozkoumat otevřené a zavřené tunely v těchto strukturách a popsat vliv mutací na jejich přístupnost.

6. Testování přechodných verzí algoritmu CAVER 2.0 a aplikace CAVER Viewer pro vypočet cest vedoucích z vnořené dutiny na povrch ve strukturách proteinů. Cílem bylo poskytnout vývojářům algoritmu a aplikace zpětnou vazbu ohledně věrohodnosti cest nalezených algoritmem CAVER 2.0 a na uživatelskou přívětivost grafického uživatelského rozhraní programu CAVER Viewer.

# Metody

Výzkum halogenalkanehalogenázy DhaA byl multidisciplinární, vyžadující úzkou spolupráci odborníků z různých oblastí vědy o bílkovinách: manipulace s DNA, místně-cílená mutageneze, saturační mutageneze, exprese bílkovin, purifikace bílkovin, spektroskopie cirkulárního dichroismu, měření specifické enzymatické aktivity, měření rovnovážné a nerovnovážné kinetiky, měření kinetického izotopového účinku rozpouštědla, RK bílkovin, výpočty molekulového dokování, MD simulace a RAMD simulace. Všechny experimentální úkony byly provedeny mými spolupracovníky pod vedením Jiřího Damobrského, Yujiho Nagaty, Michala Kutého a Ivany Kuté-Smatanové, zatímco všechny úkony metodami molekulového modelování byly provedeny mnou pod vedením Jiřího Damborského a Rebeccy C. Wade. Program CAVER 2.0 byl vyvíjen ve spolupráci s odborníky z oblasti molekulového modelování a bioinformatiky vedených Jiřím Damborským a s odborníky z oblasti počítačové grafiky a interakce člověka s počítačem vedených Jiřím Sochorem.

## Experimenty

Nukleotidová sekvence genu *dhaA* lokalizovaném na plasmidu pRTL1 (přístupové číslo pro GenBank: AF060871) bakterie *Rhodoccocus rhodochrous* NCIMB 13064 (**Kulakova a kol., 1997**) byla upravena přidáním restrikčních míst *Bam*HI and *Hin*DIII, Shine-Dalgarnova sekvence (**Shine a Dalgarno, 1975**) a šesti kodonů pro His metodou PCR pomocí syntetických oligonukleotidových primerů k tomu navržených. Gen *dhaAHis* v plasmidu pUC18 a pAQN byl použit jako počáteční vzor pro mutagenezi. Místně-cílená a saturační mutageneze byla provedena metodou obrácené PCR (**Ochman a kol., 1988; Triglia a kol., 1988**) pomocí syntetických oligonukleotidových primerů k tomu navržených (**Tab. 1 a 2).** Dvě podknihovny *A* a dvě podknihovny *B* byly zkombinovány do knihoven *A* a *B*. Vysoce kapacitní prohledání knihoven pro zvýšenou aktivitu variant DhaA enzymu s TCP byl proveden v mikrotitračních destičkách s fenolovou červení, která detekuje pokles pH, jež je důsledkem tvorby protonů při hydrolytické dehalogenaci TCP. Nukleotidové sekvence genů dhaA byly určeny pro 51 nejaktivnějších variant metodou dideoxyterminačního sekvencování.

Substrátová specifita divokého tvpu DhaA a mutanta s nejvyšší aktivitou vůči TCP (č. 31) byla měřena sledovaním uvolněných halogenidových aniontů Iwasakiho metodou (Iwasaki a **kol., 1952**). Rovnovážné kinetické konstanty,  $k_{cat}$  a  $K_m$ , pro přeměnu TCP divokým typem DhaA a mutanty M2, M3, 04, 14, 15, 21, 27, 31, 51, and 52 byly zjištěny měřením počáteční rychlosti reakce podle již dříve popsaného postupu (Chaloupková a kol., 2003): koncentrace substrátu byla určena plynovou chromatografií, dehalogenační reakce byla provedena při 37 °C a zastavena přidáním metanolu v čase 10 a 20 min nebo 15 a 30 min; měření v jednotlivých časových bodech byla provedena 2krát až 3krát; koncentrace halogenidového iontu byla určena Iwasakiho metodou. Rychlost-limitující krok reakčního cyklu dehalogenace TCP divokým typem DhaA a mutantem č. 31 byl určen při 37 °C kombinací dvou přístupů: (1.) kinetický izotopový účinek rozpouštědla určený měřením dehalogenační aktivity při vzrůstající koncentraci <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O z 0 na 100% a (2.) předrovnovážné kinetické experimenty technikou "rapid quench-flow".

Charakteristický otisk sekundární struktury byl určen naměřením spekter cirkulárního dichroismu ve vzdálené UV oblasti světla, a to pro divoký typ DhaA a mutanty č. 04, M2, M3 a pro šest nejaktivnějších mutantů získaných prohledáním knihoven A (mutanty č. 17, 19 a 21) a B (mutanty č. 27, 31 and 33), a mutantů č. 51 a 52. RK struktury byly vyřešeny pro mutanty č. 04 (PDB kód: 3FBW), 14 (PDB kód: 3G9X) a 15 (PDB kód: 3FWH) do vysokého až atomového rozlišení 1,23, 0,95 rs. 1,22 Å; RK struktura DhaA z bakterie Rhodococcus sp. (PDB kód: 1BN6) a mutanta č. 15 byly použity jako výchozí modely pro molekulové nahrazení (Stsiapanava a kol., 2008).

Vzor	Primery (5' - 3') <sup>a, b</sup>	Výsledek	Vnesená
			mutace <sup>d</sup>
pUC18::dhaAHis	T <u>A</u> CGTCGTCCGT CCGCTTAC <sup>fw</sup>	pUC18::dhaA04His	Cys176Tyr
	TTTCGGGAGCGCACCCTC <sup>rev</sup>		
pAQN::dhaAHis	$GGAATTCATCCGGCCTTTTCCCGACGTGG^{fw}$	pUC18::dhaA14His	Ile135Phe
	$CCACGTCGGGA\underline{A}AGGCCGGATGAATTCC^{rev}$		
pAQN::dhaA04His	$GGAATTCATCCGGCCT\underline{T}TCCCGACGTGG^{\mathrm{fw}}$	pAQN::dhaA15His	Ile135Phe
	CCACGTCGGGAAAGGCCGGATGAATTCC <sup>rev</sup>		
pAQN::dhaA04His	$T\underline{T}CCTCCAGGAAGACAACCC^{fw}$	pAQN::dhaAM2His	Tyr273Phe
	GTGCAATCCCGGGGGC <sup>rev</sup>		
pAQN:: dha AM2H is	GGACGAAT <u>TT</u> CCGGAATTCG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAM3His	Trp141Phe
	CACGTCGGGATAGGCC <sup>rev</sup>		
pAQN::dhaA31His	T <u>TC</u> CTCCCGAAATACGTCGTCC <sup>fw</sup>	pAQN::dhaA51His	Ala172Phe
	ACCCTCGATGAAAGCGTTCTG <sup>fw</sup>		
pAQN::dhaA51His	TTCCGTGAGACCTTCCAGGC <sup>fw</sup>	pAQN::dhaA52His	Ala145Phe
	GAATTCCGGCCATTCGTCCC <sup>rev</sup>		
<sup>a</sup> Vnesené mutace jso	ou zvýrazněny tučně a podtržením.		
<sup>b</sup> fw – dopředný prim	er; rev – zpětný primer.		

**m.i. i i M**() × (1

Vzor	Primery (5' - 3') <sup>a, b, c</sup>	Výsledek	Vnesená	
			mutace <sup>d</sup>	
pAQN::dhaAM2His	GGCCT <u>NNK</u> CCGACGTG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryA1His	Ile135X	
	<b>GGATGAATTCCATACATGCAATAC</b> <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAM2His	NNK ATCCCCCCGGCCGAAG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryA2His	Val245X	
	MNNGCCGGGTGTGCCCCAG <sup>rev</sup>		Leu246X	
pAQN::dhaAM3His	GGCCT <u>NNK</u> CCGACGTG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryB1His	Ile135X	
	<b>GGATGAATTCCATACATGCAATAC</b> <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAM3His	NNK ATCCCCCCGGCCGAAG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryB2His	Val245X	
	MNNGCCGGGTGTGCCCCAG <sup>rev</sup>		Leu246X	
<sup>a</sup> Vnesené mutace jsou zvýrazněny tučně a podtržením.				
<sup>b</sup> N = A, G, C nebo T; K = G nebo T; M = A nebo C.				
°fw – dopředný primer; rev – zpětný primer.				
$^{4}\!\mathrm{X}$ – kterákoliv z 20ti standardních aminokyselinových zbytků.				

Tab. 2 | Saturační mutageneze.

#### Molekulové modelování

RK struktura DhaA z bakterie *Rhodococcus* sp. (PDB kód: 1CQW) byla zkrácena o pět aminokyselinových zbytků na C-konci, přečíslována dle genu *dhaA* a upravena třemi záměnami (Val172Ala, Ile209Leu a Ala292Gly) pomocí programu PYMOL 0.97 (**DeLano**, **2002**), čímž byla zrekonstruována struktura DhaA z bakterie *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (divoký typ DhaA), která byla použita v experimentech. Struktura divokého typu DhaA sloužila jako vzor pro záměny aminokyselinových zbytků pomocí programu PYMOL; takto byly připraveny struktury mutantů č. 04, 14, 15, 21', 27', 31', 51' a 52'. Tyto in silico mutanty odpovídají mutantům získaným místně-cílenou a saturační mutagenezí dle čísel, kromě nepřítomnosti mutace Tyr273Phe v in silico mutantech s čárkou. Trojrozměrné modely (*R*)-2,3-dichlorpropan-1-olu (R-DCL), (*S*)-2,3-dichlorpropan-1-olu (S-DCL) a TCP byly postaveny pomocí programu PYMOL a geometricky upraveny pomocí programu MOPAC 2000 (**Stewart, 1990**) a GAUSSIAN 94 (**Frisch a kol., 1994**). Částečné atomové náboje byly přiřazeny pomocí RESP (**Bayly a kol., 1993; Cornell a kol., 1993**) modulu programu AMBER 8 (**Case a kol., 2004**) tak, aby reprodukovaly elektrostatický potenciál vypočítaný programem GAUSSIAN.

Počáteční orientace substrátu TCP a produktů R-DCL a S-DCL v aktivním místě divokého typu DhaA s nebo bez CL byly modelovány pomocí programu AUTODOCK 3.0.5 (Morris a kol., 1998). Získané orientace pro R-DCL a S-DCL byly použity i pro mutanty. Klasické vyrovnávací MD simulace byly provedeny pro divoký typ DhaA a mutant 31' v komplexu s TCP, a pro všechny varianty DhaA s R-DCL nebo S-DCL a s/bez CL, a to pomocí programu AMBER 8 s využitím Cornellova silového pole 1994 (Cornell a kol., 1995; Cornell a kol., 1996). Na vyrovnávací MD simulace komplexů enzym-substrát navazovaly produkční klasické MD simulace při 300 K a po dobu 2 ns s pomocí stejných parametrů jakých bylo použito pro vyrovnávací MD simulace. Na vyrovnávací MD simulace komplexů enzymprodukt(y) navazovaly produkční RAMD simulace.

RAMD simulace (Lüdemann a kol., 2000a) je MD technika zvýšeného vzorkování, která umožňuje simulovat vypuzení ligandu z vnořeného aktivního místa enzymu na povrch v dosažitelných výpočetních časech (Lüdemann a kol., 2000a; Winn a kol., 2002; Wade a kol., 2004; Schleinkofer a kol., 2005; Wang a Duan, 2007). RAMD simulace se podobá klasické MD simulace s tím rozdílem, že v RAMD simulaci se navíc používá přídatné síly, která působí na těžiště molekuly v náhodně vybraném směru. Po určitém počtu kroků definovaných uživatelem se vzdálenost, kterou ligand ucestoval porovná s hodnotou parametru hraniční vzdálenosti. Pokud ligand nedosáhl hraniční či větší vzdálenost, je vybrán nový náhodný směr pro působení přídatné síly; v opačném případě je směr působení přídatné síly zachován. Tento proces je opakován tak dlouho, dokud ligand není uvolněn do okolního rozpouštědla nebo dokud není dosaženo maximálního času simulace. RAMD simulace byly provedeny pro odchod DCL u všech variant DhaA, a to pomocí modulu Sander programu AMBER 8 s využitím záplaty RAMD (http://projects.villa-bosch.de/mcm/software/amber). Celkem bylo získáno 86 RAMD trajektorií. Žádný rozdíl v upřednostňování odchodu různými cestami nebo v mechanismu odchodu nebyl pozorován pro R- a S-enantiomery DCL. Proto byly R-DCL and S-DCL dále považovány pouze jakožto poskytujíce různorodost MD trajektorií. U divokého typu DhaA byly RAMD simulace provedeny také pro odchod DCL v přítomnosti CL v aktivním místě, ale tyto simulace nebyly dále rozšířeny pro mutanty z důvodu výrazně sníženého počtu pozorovaných odchodů DCL.

#### Programové Inženýrství

Přechodné verze algoritmu CAVER 2.0 byly testovány formou pluginu pro PYMOL, a to na RK strukturách DhaA z bakterie *Rhodococcus* sp. (PDB kódy: 1CQW a 1BN6) a na vybraných snímcích z MD simulací divokého typu DhaA a jeho mutantů. Vypočítané tunely byly porovnávány s manuálně určenými tunely. Věrohodnost výsledků poskytnutých přechodnými verzemi algoritmu CAVER 2.0 a správná funkčnost pluginu pro PYMOL byly vyhodnocovány a nahlášovány vývojářům algoritmu.

Grafické uživatelské rozhraní aplikace CAVER Viewer bylo navrženo a přechodné verze aplikace byly testovány pro základní funkčnost. Pozorované problémy a návrhy na zlepšení uživatelského pohodlí byly nahlášovány vývojářům aplikace.

# Výsledky

#### In silico návrh mutantů DhaA pro zlepšení přeměny TCP

<u>Klvaňa M., Pavlová M.</u>, Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R. C., Nagata Y. a Damborský J. (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

Kandidáti pro mutagenezi byli vybráni z aminokyselinových zbytků lemujících přístupové tunely na základě RAMD simulací odchodu DCL v divokém typu a mutantu č. 04 (**Obr. 1**). Vybrané aminokyselinové zbytky se nacházejí podél cesty odchodu DCL hlavním tunelem, p1 (Cys176), slotovým tunelem, p2a (Trp141, Ile135 and Leu246), a podél obou tunelů (Val245). Trp141Phe byl navržen k vnesení do mutanta M2, čímž byl získán mutant M3. Mutanty M2 a M3 pak posloužily jako vzory pro saturační mutagenezi v pozicích Ile135+Val245+Leu246, vedoucí ke knihovnám A (2568 klonů) a B (2,705 klonů).



**Obr. 1** I Kandidáti pro mutagenezi. DhaA je zobrazena stuhou obarvenou dle domén: hlavní šedě a čepičková bíle. Cesty odchodu DCL jsou zobrazeny modelem povrchu: p1 odpovídá cestou hlavním tunelem; p2a odpovídá cestou štěrbinovým tunelem. Aminokyselinové zbytky vybrané pro mutagenezi jsou zvýrazněny kuličkami a tyčkami.

## Analýza a interpretace vlivu mutací na zlepšenou přeměnu TCP mutantními formami DhaA

<u>Klvaňa M., Pavlová M.</u>, Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R. C., Nagata Y. a Damborský J. (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

<u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. (**2009**). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Prohledání knihoven saturační mutageneze DhaA pro zvýšenou aktivitu s TCP odhalilo tři výrazně nejlepší mutanty, a to č. 27 and 31 z knihovny A a č. 21 z knihovny B. Všechny tři mutanty sdílí mutace Val245Phe a Leu246Ile a liší se v pozici 135. Katalytická účinnost mutantů č. 21 (s mutací Ile135Val), 27 (s mutací Ile135Leu) a 31 (s mutací Ile135Phe), kvantifikována poměrem  $k_{eat}/K_m$ , byla 12-, 23- a 26-krát vyšší ve srovnání s hodnotou 36 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> u divokého typu DhaA. RAMD simulace vyloučily odchod produktu jako možný zdroj zlepšení aktivity v mutantech, protože nejaktivnější mutant č. 31' byl nejméně poddajný k odchodu DCL. Klasické MD simulace s TCP ukázaly, že aktivní místo divokého typu DhaA je snadno přístupné pro molekuly vody z vnějšího prostředí, a že vzrůstající počet molekul vod v aktivním míste soupeřil s TCP pro interakci s nukleofilem Asp106. Oproti tomu, objemné aromatické záměny v přístupových tunelech mutanta č. 31' odstínily aktivní místo od vnějšího rozpouštědla v rámci MD simulace trvající 2 ns (**Obr. 2**). Měření kinetický izotopového účinku <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O a předrovnovážné kinetické experimenty ukázaly, že rychlost-limitující krok u mutanta

31 se změnil z S<sub>N</sub>2 reakce na odchod produktu, tj. v souladu se simulacemi. Přídatné aromatické záměny v hlavním tunelu, Ala172Phe a Ala172Phe+Ala145Phe, již nevedly k dalšímu zvýšení aktivity DhaA mutantů s TCP.



Obr. 2 | Vliv přístupnosti aktivního místa pro molekuly vody z okolního prostředí v divokém tvpu DhaA a mutantu č. 31' na tvorbu reaktivního komplexu ("NAC", z angl. Near Attack Conformation) s TCP v klasických MD simulacích. (a) Přístupnost aktivního místa pro vodu z vnějšího prostředí: aktivní místo divokého typu je přístupné pro vodu (červeně); aktivní místo mutanta 31' je nepřístupné, pouze strukturní molekuly vody jsou přítomny na několika místech uvnitř enzymu (modře); koule představující molekuly vody mají poloměr 0.5 Å a jsou centrované na střed atomů kvslíku. (b) NAC populace (orámováno) pro TCP v divokém typu DhaA (červeně) a v mutantu č. 31' (modře) v MD simulacích; snímky zobrazené v obrázku d jsou označeny (□). (c) Vývoj vzdálenostního parametru NAC dvou reagujících atomů během MD simulací; snímky zobrazené v obrázku d jsou označeny  $(\bullet)$ . (d) Snímky z MD simulací nereaktivního uspořádání TCP v divokém typu DhaA  $\mathbf{s}$ vodami soupeřícími o nukleofil NAC а uspořádání pro TCP v mutantu č. 31'; nepolární vodíkové atomy nejsou zobrazeny pro lepší přehlednost.

# Cesty a mechanismy odchodu produktů a výměny vody v divokém typu DhaA a jeho mutantech

**<u>Klvaňa M.</u>**, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. (**2009**). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Cesty pro odchod produktů (DCL a CL) a výměnu vod v divokém typu DhAA a osmi mutantech byly podrobně prozkoumány. Klasické MD trajektorie byly prozkoumány pro samovolný odchod produktů a výměnu vod mezi aktivním místem a vnějším prostředím. Celkem byla pozorována jedna cesta pro CL (p1), žádná cesta pro DCL a pět cest pro vodu (p1, p2a, p2b, p2c, and p3). Další sada MD simulací byla provedena s CL zaměněným za molekulu vody za účelem modelování systému po odchodu halogenidového aniontu z aktivního místa. MD trajektorie byly prozkoumány pro samovolný odchod DCL a výměnu molekul vod. Celkem byly pozorovány tři cesty pro molekuly vody (p1, p2a, and p2b), zatímco odchod DCL nebyl pozorován v žádné klasické MD simulaci, ospravedlňujíc tak užití RAMD simulací k podpoře odchodu DCL. RAMD simulacemi byl pozorován odchod DCL v divokém typu a mutantech celkem pěti různými cestami – p1, p2a, p2b, p2c, and p3 (**Obr. 3**). Cesty ukázaly závislost na druhu ligandu (**Obr. 4**). Rovněž byly zjištěny různé mechanismy výměny ligandů mezi vnořeným aktivním místem a vnějším prostředím (**Obr. 5 and Tab. 3**).



Obr. 3 | Cesty pro odchod DCL u variant DhaA. Cesty jsou znázorněny modelem povrchu a přiloženv na RK bakterie strukturu DhaA z Rhodococcus sp. (PDB kód: 1CQW). Tloušťka stuhy odpovídá krystalografickým B-faktorům, vyjadřujícím pohyblivost. Proměnné aminokyselinové zbytky u variant DhaA jsou znázorněny černými koulemi a označeny pořadovým číslem v proteinové sekvenci. p1 a p2a odpovídají hlavnímu a štěrbinovému tunelu. NC-smyčka N-koncová smyčka čepičkové domény; CC-smyčka C-koncová smvčka čepičkové domény.



**Obr. 4** l Názorné zobrazení cest ligandů u variant DhaA. (a) Cesty pro CL pozorované v klasických MD simulacích; (b) cesty pro DCL pozorovaných v RAMD simulacích; (c) cesty pro molekuly vody pozorovaných v klasických MD simulacích. Šipky ukazují směr průchodu ligandů v tunelech (p1, p2a, p2b a p2c pro DCL a vodu a p3 pro DCL) nebo matrix proteinu (p3 pro vodu); p1 – hlavní tunel; p2a – štěrbinový tunel.



**Obr. 5** I Názorné zobrazení tří mechanismů výměny ligandů mezi vnořeným aktivním místem DhaA a vnějším prostředím. (a) Průchod ligandu trvale otevřeným tunelem; (b) průchod ligandu přechodně otevřeným tunelem; (c) průchod ligandu skry matrix proteinu. Protein a ligand jsou zobrazeny šedě a červeně. Oblast matrix proteinu s nižší hustotou jsou zvýrazněny světle šedě, části s vyšší hustotou pak černě.

Ligand	Cesta	Tunel		Matrix
		Trvalý	Přechodný	proteinu
Klasická MD				
CL	p1	wt	15	_
	p2a	_	_	_
	p2b	_	_	_
	p2c	_	_	_
	p3	_	_	_
Voda	p1	wt, 14	04, 15, 21', 27', 31', 52'	_
	p2a	_	04, 27'	_
	p2b	-	wt, 04, 14, 15, 27', 31', 51', 52'	_
	p2c	_	04	_
	p3	_	-	21'
RAMD				
DCL	p1	wt, 14	04, 15, 21', 27', 31', 51', 52'	_
	p2a	_	wt, 04	_
	p2b	_	27'	_
	p2c	-	21'	-
	pЗ	-	wt, 27'	_

**Tab. 3** l Výskyt mechanismů výměny ligandů mezi vnořeným aktivním místem a vnějším prostředím u divokého typu (wt) DhaA a osmi mutantů v MD simulacích.

#### Strukturní charakterizace tří mutantů se změněnými tunely

<u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. (**2009**). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

RK struktury mutantů č. 04 (PDB kód: 3FBW), 14 (PDB kód: 3G9X) a 15 (PDB kód: 3FWH) byly určeny do vysokého až atomového rozlišení (Stsiapanava a kol., nepublikované výsledky). Mutantní struktury byly srovnány s RK strukturami DhAA z bakterie *Rhodococcus* sp. dostupných v PDB databázi (Newman a kol., 1999). Tato analýza přinesla experimentální důkaz vlivu záměn aminokyselinových zbytků v hlavním tunelu (mutant č. 04), štěrbinovém tunelu (mutant č. 14) a obou tunelech (mutant č. 15) na přístupnost aktivního místa a mechanismy výměny ligandů pozorovaných v MD simulacích (Fig 6). Hlavní tunel je otevřený pouze v RK strukturách variant DhaA nesoucích Cys176 divokého typu. Štěrbinový tunel je otevřen pouze ve struktuře 1BN6 a to v důsledku přítomnosti odlišných rotamerů postranních řetězců aminokyselinových zbytků Ile135 a Arg133 spolu s posunem hlavního řetězce pěti aminokyselinových zbytků NC-smyčky (133-ArgProIleProThr-137) o 0.8 Å ve srovnání se strukturami 1CQW a 1BN7. Štěrbinový tunel ve strukturách 1CQW a 1BN7 je reprezentován jen izolovanou dutinou obsahující dvě molekuly vody. Vnesení objemné záměny Ile135Phe v RK strukturách mutantů č. 14 a 15 vedlo k ještě většímu omezení přístupnosti štěrbinového tunelu.



**Obr. 6** I RK struktury DhaA a jeho mutantů v pořadí dle přístupnosti jejich aktivního místa hlavním (p1) a štěrbinovým (p2a) tunelem. (a) DhaA z *Rhodococcus* sp. (PDB kód: 1BN6) s otevřeným hlavním i štěrbinovým tunelem; (b-d) DhaA z *Rhodococcus* sp. (PDB kód: 1CQW), DhaA z *Rhodococcus* sp. (PDB kód: 1BN7) a mutant č. 14 divokého typu DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB kód: 3G9X) s otevřeným hlavním a uzavřeným štěrbinovým tunelem; (e-f) mutant č. 04 divokého typu DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB kód: 3FBW) a mutant č. 15 divokého typu DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB kód: 3FWH) s uzavřeným hlavním i štěrbinovým tunelem. Struktury proteinů jsou zobrazeny formou řezu modelem povrchu; tunely a dutiny jsou zbarveny tmavě šedě.

#### Vývoj programu CAVER 2.0 pro výpočet tunelů ve strukturách proteinů

Andres F., Beneš P., Brezovský J., Chovancová E., Jaša P., **Klvaňa M.,** Kozlíková B., Medek P., Pavelka A., Szabó T., Zamborský M., Zruban M. (*in alphabetical order*), <u>Sochor J.</u> a <u>Damborský J.</u> (2009). CAVER 2.0: tunnel calculation program. Human Computer Interaction Laboratory and Loschmidt Laboratories (*in alphabetical order*), Masaryk University, Brno, Czech Republic. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

CAVER 2.0 poskytuje rychlé, přesné a automatické vypočítání tunelů vedoucích z vnořené dutiny na povrch ve strukturních modelech proteinů, nukleových kyselin i anorganických materiálů. Věrohodnost tunelů určených přechodnými verzemi algoritmu CAVER 2.0 byla testována opakovaně na sadě struktur proteinů zahrnujících snímky z MD simulací divokého typu a osmi mutantů (**Obr. 7**). Ač mohou být otevřené tunely snadno určeny manuálním prozkoumáním struktur proteinů zobrazených modelem povrchu, např. v programu PYMOL, CAVER přináší řadu výhod: (1.) přesnost v nalezení tunelů lišících se místem vyústění na povrch (**Obr. 7**); (2.) automatizace; (3.) rychlost, umožňujíc zpracování velkého množství struktur v krátkém čase; (4.) určení aminokyselinových zbytků a konkrétních jejich atomů,

které lemují daný tunel; (5.) určení šířky tunelu v různých místech podél tunelu, což umožňuje určit hrdla tunelu; a (6.) určení tunelů, které jsou nepozorovatelné manuálním prohlédnutím struktur, ale které by se mohly případně otevírat pro průchod ligandu v důsledku dynamického chování proteinu v čase (**Obr. 7a, 7d a 7e**). Známé omezení současné verze algoritmu CAVER je selhání ve schopnosti nalézt jeden ze dvou tunelů sdílejících jedno ústí na povrch (**Obr. 7d a 7e**), Tento problém je důsledkem zahrazení ústí tunelu po nalezení prvního ze dvou tunelů, což je současná strategie pro hledání dvou či více tunelů.

Dnem 14. 11. 2009 bylo registrováno pro plugin CAVER 2.0 pro PYMOL 2174 uživatelů; webová presentace CAVER byla navštívena ze 15013 různých IP adres.



**Obr. 7** I Tunely ve snímcích z MD simulací DhaA určených v programu PYMOL manuálně a automaticky pomocí pluginu CAVER 2.0. (a) Otevřený tunel p1 a p2a v mutantu č. 27; (b) otevřený tunel p1 a p2b v mutantu č. 27; (c) otevřený tunel p1 a p2c v mutantu č. 04; (d) otevřený tunel p2a a p2b v mutantu č. 04; (e) otevřený tunel p1, p2a a p2b v mutantu č. 04. Pět tunelů bylo napočítáno pro každou strukturu. Počáteční bod výpočtu byl stanoven jako střed tří atomů: atom  $N_{52}$  aminokyselinového zbytku Asn41, atom  $O_{51}$  aminokyselinového zbytku Asp106 a atom  $N_{s2}$  aminokyselinového zbytku Asn41, atom  $O_{51}$  aminokyselinového zbytku Asp106 a atom  $N_{s2}$  aminokyselinového zbytku Trp107. Všechny otevřené tunely byly určeny pomocí pluginu CAVER 2.0 pro struktury v obrázcích *a*, *b* and *c*. Tunel p2b v obrázku *d* a tunel p2a v obrázku *e* nebyl nalezen pluginem CAVER 2.0 v důsledku společného ústí s tunelem p2a rs. p2b. V obrázcích *a*, *d* a *e* určil CAVER 2.0 další tunely (p2c, p1 a p2c, rs. p2c), které byly uzavřeny v daných snímcích, ale o kterých je zároveň známo, že se otevírají v MD simulacích. Struktury proteinu jsou znázorněny řezem modelem povrch; tunely jsou zbarveny tmavě šedě. Tunely nalezené pluginem CAVER 2.0 jsou zobrazeny modelem mřížky a zbarveny dle tunelu: p1 – žlutě, p2a – tmavě modře, p2b – červeně, p2c – světle modře.

# Diskuze

<u>Klvaňa M., Pavlová M.</u>, Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R.C., Nagata Y. a Damborský J. (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

**<u>Klvaňa M.</u>**, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R.C. a Damborský J. (**2009**). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Andres F., Beneš P., Brezovský J., Chovancová E., Jaša P., **Klvaňa M.,** Kozlíková B., Medek P., Pavelka A., Szabó T., Zamborský M., Zruban M. (v abecedním pořadí), <u>Sochor J.</u> a <u>Damborský J.</u> (2009). CAVER: program pro výpočet tunelů. Laboratoř interakce člověka s počítačem a Loschmidtovy laboratoře (v abecedním pořadí), Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

Účinný mechanismus kontrolované výměny molekul byl vytvořen v enzymu DhaA vnesením aromatických aminokyselinových zbytků namísto jiných v hlavní výměnné cestě, tzv. hlavním tunelu, mající za následek až 26-ti násobné zvýšení katalytické účinnosti mutantů DhaA vůči sloučenině TCP. Tento mechanismus byl již popsán v jiných enzymech, např. P450 (Lüdemann a kol., 2000a; Lüdemann a kol., 2000b; Winn a kol., 2002; Li a kol., 2005), acetylcholinesteráze (Ripoll a kol., 1993; Enyedy a kol., 1998; Zhou a kol., 1998; Tara a kol., 1999; Van Belle a kol., 2000; Xu a kol., 2003), NADH oxidáze (Hritz a kol., 2006) a křenové peroxidáze (Khajehpour a kol., 2003; Zelent a kol., 2004).

Mutace vnesené do DhaA způsobily změnu hlavního tunelu ze stále otevřeného na přechodně otevřený, který se otevírá dle fáze reakčního cyklu. Přechodné otevření může být vyvoláno vodou z vnějšího prostředí, která vstupuje do aktivního místa, kde hydratuje produkty dehalogenační reakce. Na druhou stranu, v nepřítomnosti halogenidového iontu v aktivním místem je toto účinně odstíněno od vody ve vnějším prostředí, které je tak zabráněno vstupu do aktivního místa, kde by nepříznivě soutěžila se substrátem o vazebné místo a narušovala by tak vazbu substrátu do reaktivní pozice pro počáteční chemický krok dehalogenační reakce. Cesty zjištěné v halogenalkandehalogenáze DhaA a jejích mutantech a mechanismy uvolnění produktů a výměny vodního rozpouštědla naznačují důležitou úlohu dynamiky pro funkci halogenalkandehalogenáz. Toto zjištění je v souladu s početnými zprávami, které důrazně navrhují, že všeobecný pohled na bílkoviny by se měl změnit ze statického na vysoce dynamický (Karush, 1950; Wolfenden, 1974; Parak, 2003; Busenlehner a Armstrong, 2005; Igumenova a kol., 2006; Jarymowycz a Stone, 2006). Bílkoviny jsou stroje, a stroje nezbytně fungují činností v čase; a tato činnost zahrnuje pohyby (Koshland Jr., 1976; Koshland Jr., 1996; Parak, 2003; Karplus a Kuriyan, 2005; Igumenova a kol., 2006; Rueda a kol., 2007).

Nalezené cesty také posloužily jako počáteční validační sada pro vývoj programu CAVER 2.0 pro rychlý výpočet tunelů a dalších možných cest vedoucích z dutiny uvnitř bílkoviny na povrch. Tento program má potencíal stimulovat další výzkum s cílem pochopit strukturnědynamicko-funkční vztahy u bílkovin s vnořeným vazebným místem. Soutěž mezi programem CAVER a dalšími podobnými výpočetnámi přistupy, např. MOLE (**Petřek a kol., 2007**), MOLAXIS (**Yaffe a kol., 2008**), CHUNNEL (**Coleman a Sharp, 2009**), and SLITHER (**Lee a kol., 2009**), je vysoce prospěšný s ohledem na hlavní obecný cíl lidského konání – *pochopit*.

# Závěry

1. Pomocí klasických a náhodně urychlených MD simulací byly navrženy tři aminokyselinové zbytky, Ile135, Val245 and Leu246, pro saturační mutagenezi halogenalkandehalogenázy DhaA nesoucí mutace Cys176Tyr+Tyr273Phe. Saturační mutageneze poskytla mutanty s až 26-ti násobně zvýšenou katalytickou účinností přeměny 1,2,3-trichlorpropanu (mutant č. 31).

2. Zvýšená aktivita mutantů DhaA s TCP je důsledkem zlepšeného odstínění vnořeného aktivního místa od vnějšího prostředí v průběhu vazby substrátu a/nebo  $S_N 2$  kroku reakčního cyklu. Nejúčinnější odstínění bylo dosaženo kombinací tří substitucí, Cys176Tyr+Val245Phe+Ile135Phe, přítomných v mutantu č. 31.

**3.** Dvě cesty spojující aktivní místo s povrchem, p1 a p2a, odpovídající hlavnímu a štěrbinovému tunelu pozorovaných v RK strukturách, a tři další cesty, p2b, p2c and p3, byly určeny mezi 9ti variantami DhaA pomocí klasických a náhodně urychlených MD simulací.

**4.** Odchod CL produktu přeměny TCP je spouštěn a podporován vodou; odchod DCL produktu je také spouštěn vodou, a naváděný aromatickými aminokyselinovými zbytky a interakcemi typu vodíkové vazby.

**5.** p1 je hlavní cesta pro odchod produktů a hlavní výměnná cesta pro vodu, a odolný proti uzavření, kterého nebylo dosaženo ani vnesením čtyř aromatických aminokyselinových zbytků (Cys176Tyr+Val245Phe+Ala172Phe+Ala145Phe). Ostatní cesty jsou přídavné (p2a, p2b and p2c) nebo vzácné (p3). Přístupnost přídavných cest je různá pro DCL a vodu a vykazuje vysokou citlivost na záměnu v pozici Ile135 divokého typu DhaA.

**6.** Tři mechanismy výměny ligandů jsou využívány mezi variantami DhaA: průchod trvale otevřeným tunelem, průchod přechodně otevřeným tunelem a průchod skrz matrix enzymu. Hlavní tunel se změnil z trvale otevřeného na přechodně otevřený záměnou Cys176Tyr.

7. Program pro výpočet tunelů ve strukturách proteinů, CAVER 2.0, je dostupný: http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver. CAVER může být použit formou pluginu v programu PYMOL, nebo jako Java Web Start aplikace, CAVER Viewer.

# Citovaná literatura

- Banáš P., Otyepka M., Jeřábek P., Petřek M. a Damborský J. (2006). Mechanism of enhanced conversion of 1,2,3-trichloropropane by mutant haloalkane dehalogenase revealed by molecular modeling. *Journal of Comput. Aided Mol. Des.* 20, 375-383.
- Bayly C. I., Cieplak P., Cornell W. a Kollman P. A. (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. J. Phys. Chem. 97: 10269-10280.
- Bosma T., Damborský J., Stucki G. a Janssen D. B. (2002). Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3582-3587.

- Bosma T., Pikkemaat M. G., Kingma J., Dijk J. a Janssen D. B. (2003). Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of halopropane conversion by a *Rhodococcus* haloalkane dehalogenase. *Biochemistry*, 42: 8047-8053.
- Busenlehner L. S. a Armstrong R. N. (2005). Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. Arch. Biochem. Biophys. 433: 34-46.
- Case D. A., Darden T. A., Cheatham T. E., Simmerling C. L., Wang J., Duke R. E., Luo R., Merz K. M., Wang B., Pearlman D. A., Crowley M., Brozell S., Tsui V., Gohlke H., Mongan J., Hornak V., Cui G., Beroza P., Schafmeister C., Caldwell J. W., Ross W. S. a Kollman P. A. (2004). AMBER 8. University of California, San Francisco, CA, USA.
- Chothia C. (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. Nature, 357: 543-544.
- Coleman R. G. a Sharp K. A. (2009). Finding and characterizing tunnels in macromolecules with application to ion channels and pores. *Biophys. J.* 96: 632-645.
- Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I. a Kollmann P. A. (1993). Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. J. Am. Chem. Soc. 115: 9620-9631.
- Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W. a Kollman P. A. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. J. Am. Chem. Soc. 117: 5179-5197.
- Cornell W. D., Cieplak P., Bayly C. I., Gould I. R., Merz K. M., Ferguson D. M., Spellmeyer D. C., Fox T., Caldwell J. W. a Kollman P. A. (1996). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5179–5197. J. Am. Chem. Soc. 118: 2309.
- DeLano W. L. (2002) The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- Dobzhansky T. (1964). Biology, molecular and organismic. Am. Zool. 4: 443-452.
- Enyedy I., Kovach I. a Brooks B. (1998). Alternate pathways for acetic acid and acetate ion release from acetylcholinesterase: a molecular dynamics study. J. Am. Chem. Soc. 120: 8043-8050.
- Frisch M. J., Trucks G. W., Schlegel H. B., Gill P. M. W., Johnson B. J., Robb M. A., Cheeseman J. R., Keith T., Petersson G. A., Montgomery J. A., Raghavachari K., Al-Laham M. A., Zakrzewski V. G., Ortiz J. V., Foresman J. B., Cioslowski J., Stefanov B. B., Nanayakkara A., Challacombe M., Peng C. Y., Ayala P. Y., Chen W., Wong M. W., Andres J. L., Replogle E. S., Gomperts R., Martin R. L., Fox D. J., Binkley J. S., Defrees D. J., Baker J., Stewart J. P., Head-Gordon M., Gonzalez C. a Pople J. A. (1994) Gaussian 94 (Revision D4). Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, USA.
- Hegyi H. a Gerstein M. (1999). The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. J. Mol. Biol. 288: 147-164.
- Hritz J., Zoldák G. a Sedlák E. (2006). Cofactor assisted gating mechanism in the active site of NADH oxidase from Thermus thermophilus. *Proteins*, 64: 465-476.
- Igumenova T. I., Frederick K. K. a Wand A. J. (2006). Characterization of the fast dynamics of protein amino acid side chains using NMR relaxation in solution. *Chem. Rev.* 106: 1672-1699.

- Ikehara K. (2005). Possible steps to the emergence of life: the [GADV]-protein world hypothesis. Chem. Rec. 5: 107-118.
- Iwasaki I, Utsumi S & Ozawa T (1952). New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. Bull. Chem. Soc. Jap. 25: 226.
- Janssen D. B., Scheper A., Dijkhuizen L. a Witholt B. (1985). Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10. Appl. Environ. Microbiol. 49: 673-677.
- Jarymowycz V. A. a Stone M. J. (2006). Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. *Chem. Rev.* 106: 1624-1671.
- Karplus M. a Kuriyan J. (2005). Molecular dynamics and protein function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 6679-6685.
- Karush F. (1950). Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin. J. Am. Chem. Soc. 72: 2705-2713.
- Kendrew J. C. (1962). Myoglobin and the structure of proteins. In Nobel Lectures Chemistry 1942-1962 (pp. 676-698). Elsevier Publishing Co. (1964), Amsterdam, The Netherlands.
- Khajehpour M., Rietveld I., Vinogradov S., Prabhu N. V., Sharp K. A. a Vanderkooi J. M. (2003). Accessibility of oxygen with respect to the heme pocket in horseradish peroxidase. *Proteins*, 53: 656-666.
- Koshland Jr. D. E. (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44: 98-104.
- Koshland Jr. D. E. (1976). Role of flexibility in the specificity, control and evolution of enzymes. FEBS Lett. 62: E47-52.
- Koshland Jr. D. E. (1995). The key-lock theory and the induced fit theory. Angew. Chem. Int. Ed. 33: 2375-2378.
- Koshland Jr. D. E. (1996). The structural basis of negative cooperativity: receptors and enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 757-761.
- Koshland Jr. D. E. (2002b). The seven pillars of life. Science, 295: 2215-2216.
- Kulakova A. N., Larkin M. J. a Kulakov L. A. (1997). The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiol*. 143: 109-115.
- Kurakin A. (2009). Scale-free flow of life: on the biology, economics, and physics of the cell. Theor. Biol. Med. Modell. 6: 6-33.
- Li W., Liu H., Scott E. E., Gräter F., Halpert J. R., Luo X., Shen J. a Jiang H. (2005). Possible pathway(s) of testosterone egress from the active site of cytochrome P450 2B1: A steered molecular dynamics simulation. Drug Metab. Dispos. 33: 910-919.
- Lüdemann S. K., Lounnas V. a Wade R. C. (2000a). How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. J. Mol. Biol. 303: 797-811.

- Lüdemann S. K., Lounnas V. a Wade R. C. (2000b). How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. J. Mol. Biol. 303: 813-830.
- McCammon J. A. a Karplus M. (1977). Internal motions of antibody molecules. Nature, 268: 765-766.
- Morris G. M., Goodsell D. S., Halliday R. S., Huey R., Hart W. E., Belew R. K. a Olson A. J. (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem. 19: 1639-1662.
- Ochman H., Gerber A. S. a Hartl D. L. (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics, 120: 621-623.
- Ollis D. L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S. M., Harel M., Remington S. J., Silman I. a Schrag J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197-211.
- Parak F. G. (2003). Proteins in action: the physics of structural fluctuations and conformational changes. Curr. Opin. Struct. Biol. 13: 552-557.
- Petřek M., Kosinová P., Koča J. a Otyepka M. (2007). MOLE: a Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels. *Structure*, 15: 1357-1363.
- Prokop Z., Monincová M., Chaloupková R., Klvaňa M., Nagata Y., Janssen D. B. a Damborský J. (2003). Catalytic mechanism of the maloalkane dehalogenase LinB from Sphingomonas paucimobilis UT26. J. Biol. Chem. 278: 45094-45100.
- Radzicka A. a Wolfenden R. (1995). A proficient enzyme. Science, 267: 90-93.
- Ripoll D. R., Faerman C. H., Axelsen P. H., Silman I. a Sussman J. L. (1993). An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 5128-5132.
- Rueda M., Ferrer-Costa C., Meyer T., Pérez A., Camps J., Hospital A., Gelpí J. L. a Orozco M. (2007). A consensus view of protein dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 796-801.
- Ruiz-Mirazo K., Peretó J. a Moreno A. (2004). A universal definition of life: autonomy and open-ended evolution. Origins Life Evol. Biosphere, 34: 323-346.
- Schanstra J. P., Kingma J. a Janssen D. B. (1996b). Specificity and kinetics of haloalkane dehalogenase. J. Biol. Chem. 271: 14747-14753.
- Schleinkofer K., Sudarko, Winn P. J., Lüdemann S. K. a Wade R. C. (2005). Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling? *EMBO Rep.* 6: 584-589.
- Shine J. a Dalgarno L. (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature, 254: 34-38.
- Stewart J. J. (1990). MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. J. Comput. Aided Mol. Des. 4: 1-105.

- Stsiapanava A., Koudelaková T., Lapkouski M., Pavlová M., Damborský J. a Kutá-Smatanová I. (2008). Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultrahigh resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64: 137-140.
- Sullivan S. M. a Holyoak T. (2008). Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 13829-13834.
- Tara S., Helms V., Straatsma T. P. a McCammon J. A. (1999). Molecular dynamics of mouse acetylcholinesterase complexed with huperzine A. *Biopolymers*, 50: 347-359.
- Triglia T., Peterson M. G. a Kemp D. J. (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.
- Van Belle D., De Maria L., Iurcu G. a Wodak S. J. (2000). Pathways of ligand clearance in acetylcholinesterase by multiple copy sampling. J. Mol. Biol. 298: 705-726.
- Verschueren K. H., Seljée F., Rozeboom H. J., Kalk K. H. a Dijkstra B. W. (1993d). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. *Nature*, 363: 693-698.
- Wade R. C., Winn P. J., Schlichting I. a Sudarko (2004). A survey of active site access channels in cytochromes P450. J. Inorg. Biochem. 98: 1175-1182.
- Wang T. a Duan Y. (2007). Chromophore channeling in the G-protein coupled receptor rhodopsin. J. Am. Chem. Soc. 129: 6970-6971.
- Winn P. J., Lüdemann S. K., Gauges R., Lounnas V. a Wade R. C. (2002). Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 5361-5366.
- Woese C. R. (2001). Translation: in retrospect and prospect. RNA, 7: 1055-1067.
- Wolfenden R. (1974). Enzyme catalysis: conflicting requirements of substrate access and transition state affinity. Mol. Cell. Biochem. 3: 207-211.
- Xu Y., Shen J., Luo X., Silman I., Sussman J. L., Chen K. a Jiang H. (2003). How does huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? Steered molecular dynamics simulations. J. Am. Chem. Soc. 125: 11340-11349.
- Yaffe E., Fishelovitch D., Wolfson H. J., Halperin D. a Nussinov R. (2008). MolAxis: efficient and accurate identification of channels in macromolecules. *Proteins*, 73: 72-86.
- Zelent B., Kaposi A., Nucci N., Sharp K., Dalosto S., Wright W. a Vanderkooi J. (2004). Water channel of horseradish peroxidase studied by the charge-transfer absorption band of ferric heme. J. Phys. Chem. B, 108: 10317-10324.
- Zhou H. X., Wlodek S. T. a McCammon J. A. (1998). Conformation gating as a mechanism for enzyme specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 9280-9283.

# Životopis

Jméno: Martin Příjmení: Klvaňa Národnost: Česká Jazyky: čeština (rodný), angličtina (pokročilý) Bydliště: Brno, Česká republika E-mailová adresa: martin.mk.klvana@gmail.com Tel.: +420 737 319 948 Webové stránky: http://www.martinklvana.com/



# Vzdělání

Mgr. v Obecné biologii, specializace Mikrobiologie (2004): Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

# Příslušnost

Žádná: od 13. 3. 2009 do současnosti.

Loschmidtovy laboratoře (dříve pod názvem Skupina proteinového inženýrství): 6. 5. 2002 až 12. 3. 2009, Národní centrum pro výzkum biomolekul (2002 – 2008) a Ústav experimentální biologie (2009), Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

## Zahraniční stáže

Computational Chemistry Group Prof. Shigenoriho Tanaky: 1. 9. až 29. 11. 2005, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe, Japonsko.

Molecular and Cellular Modelling group Dr. Rebeccy C. Wade: 24. 9. až 18. 12. 2004, EML Research, Heidelberg, Německo.

Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering Dr. Janusze M. Bujnického: 30. 6. - 11, 7. 2003. International Institute of Molecular and Cell Biology Varšava, Polsko.

# Ocenění

Cena rektora Masarykovy univerzity (2004): Brno, Česká republika. 2. cena za přednášku na Studentské vědecké konferenci (2003): Komenského univerzita, Bratislava, Slovensko.

# Výzkumné zájmy

**Klíčová slova:** (Mikro)biologie; základní principy života; vztahy mezi strukturou, dynamikou, funkcí a evolucí bílkovin; molekulové dokování; molekulová dynamika; spolupráce s experimentátory. **Hlavní cíl:** Poznání.

## Teze

**Diplomová práce (2004):** Počítačové modelování bakteriálních enzymů podílejících se na rozkladu halogenovaných uhlovodíků (výzkumný školitel: Jiří Damborský; metodičtí poradci: Michal Boháč a Jan Kmuníček). Katedra Mikrobiologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká republika.

## Výzkumné články

6. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356. PMID: 19577578.

5. <u>Klvaňa M.</u>, <u>Pavlová M.</u>, Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R. C., Nagata Y. a Damborský J. (2009). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733. PMID: 19701186.

4. <u>Ito M.</u>, Prokop Z., Klvaňa M., Otsubo Y., Tsuda M., Damborský J. a Nagata Y. (2007). Degradation of β-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium Sphingobium sp. MI1205. Arch. Microbiol. 188: 313-325. PMID: 17516046.

<u>Pavlová M.</u>, Klvaňa M., Jesenská A., Prokop Z., Konečná H., Sato T., Tsuda M., Nagata Y. a Damborský J.
(2007). The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: Reaction mechanism and molecular evolution. J. Struct. Biol. 157: 384-392. PMID: 17084094.

2. Oakley A., Klvaňa M., Otyepka M., Nagata Y., Wilce M. C. J. a Damborský J. (2004). Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 Å resolution: Dynamics of catalytic residues. *Biochemistry* 43: 870-878. PMID: 14744129.

1. <u>Prokop Z.</u>, Monincová M., Chaloupková R., **Klvaňa M.**, Nagata Y., Janssen D. B. a Damborský J. (2003). Catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. J. Biol. Chem. 278: 45094-45100. PMID: 12952988.

#### Počítačový program

Andres F., Beneš P., Brezovský J., Chovancová E., Jaša P., **Klvaňa M.,** Kozlíková B., Medek P., Pavelka A., Szabó T., Zamborský M., Zruban M. (v abecedním pořadí), <u>Sochor J.</u> a <u>Damborský J.</u> (2009). CAVER: program pro výpočet tunelů. Laboratoř interakce člověka s počítačem a Loschmidtovy laboratoře (v abecedním pořadí), Masarykova Univerzita, Brno, Česká republika. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

#### Přednášky

6. <u>Klvaňa M.</u> a Damborský J. Dutiny a tunely ve struktuře enzymů (česky). Bioinformatika III – Strukturní bioinformatika a molekulové modelování. 12. 10. 2006; Brno, Česká republika.

5. <u>Klvaňa M.</u>, Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. Modelling of product release and identification of export routes in the haloalkane dehalogenase DhaA (anglicky). 5<sup>th</sup> Discussions in Structural Biology and Bioinformatics. 16. - 18. 3. 2006; Nové Hrady, Česká republika.

4. <u>Klvaňa M.</u>, Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. Modelling of export routes in haloalkane dehalogenase DhaA (*anglicky*). 6. 9. **2005**; Kobe University, Japonsko.

3. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Jesenská A., Konečná H., Nagata Y. a Damborský J. Homologní modelování halogenalkandehalogenázy DhmA (česky). Česká a Slovenská studentská vědecká konference. 1. 5. 2004; Brno, Česká republika.

2. <u>Klvaňa M.</u>, Oakley A. a Damborský J. Dynamics of catalytic residues of haloalkane dehalogenase LinB: Insight from X-ray crystallography and quantum mechanical calculations (*anglicky*). 9. 7. 2003; International Institute of Molecular and Cell Biology, Varšava, Polsko.

1. <u>Klvaňa M.</u>, Boháč M. a Damborský J. Computer modelling of bacterial hydrolytic dehalogenation reaction (česky). Studentská vědecká konference. 9. - 10. 4. **2003**; Bratislava, Slovensko.

### Plakáty

2. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. Pathways and mechanisms of product exit and water exchange pathways in engineered haloalkane dehalogenase DhaA explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations (*anglicky*). *ESF Conference: Protein Design and Evolution for Biocatalysis*, 25. - 30. 10. 2008; Saint-Feliu de Guixols, Španělsko.

1. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Konečná H., Nagata Y. a Damborský J. Homology modelling of haloalkane dehalogenase DhmA (anglicky). EMBO Course on Biomolecular Simulation, 18. - 25. 7. 2004; Paříž, Francie.

# Publikace vztahující se k dizertační práci

# Původní výzkumné články

2. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Prokop Z., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356. PMID: 19577578.

1. <u>Klvaňa M.</u>, <u>Pavlová M.</u>, Prokop Z., Chaloupková R., Banáš P., Otyepka M., Wade R.C., Nagata Y. a Damborský J. (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733. PMID: 19701186.

## Počítačový program

Andres F., Beneš P., Brezovský J., Chovancová E., Jaša P., **Klvaňa M.,** Kozlíková B., Medek P., Pavelka A., Szabó T., Zamborský M., Zruban M. (v abecedním pořadí), <u>Sochor J.</u> & <u>Damborský J.</u> (2009). CAVER 2.0 program pro výpočet tunelů. Laboratoř interakce člověka s počítačem (v abecedním pořadí), Masarykova univerzita, Brno, Česká republika. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

### Konferenční bulletiny

2. <u>Klvaňa M.</u>, Pavlová M., Koudeláková T., Chaloupková R., Dvořák P., Stsiapanava A., Kutý M., Kutá-Smatanová I., Dohnálek J., Kulhánek P., Wade R.C. a Damborský J. Pathways and mechanisms of product exit and water exchange pathways in engineered haloalkane dehalogenase DhaA explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations (*plakát; anglicky*). ESF Conference: Protein Design and Evolution for Biocatalysis (str. 78). 25. - 30. 10. 2008, Saint-Feliu de Guixols, Španělsko.

1. <u>Klvaňa M.</u>, Kulhánek P., Wade R. C. a Damborský J. Modelling of product release and identification of export routes in the haloalkane dehalogenase DhaA (*přednáška; anglicky*). 5<sup>th</sup> Discussions in Structural Biology and Bioinformatics (str. 18). 16. - 18. 3. **2006**; Nové Hrady, Česká republika.

MASARYK UNIVERSITY Faculty of Science

# Structure-dynamics-function relationships of haloalkane dehalgoenases

Martin Klvaňa, MSc.

Summary of Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology

Name:	Martin Klvaňa	
Dissertation Thesis Title:	Structure-Dyna of Haloalkane I	mics-Function Relationships Dehalgoenases
Field of Study:	Mikrobiology	15-10-9

Summary of Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Microbiology

Brno, November 14, 2009

The dissertation thesis was prepared in presence and combined study program at the Faculty of Science, Masaryk University (Brno, Czech Republic).

Candidate:	Martin Klvaňa, MSc.
Supervisor:	Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Němec, Csc. Department of Experimental Biology Faculty of Science Masaryk University Tvrdého 14, 602 00 Brno
Specialist:	Assoc. Prof. Jiří Damborský, Ph.D. Department of Experimental Biology Faculty of Science Masaryk University Kamenice 5/A4, 625 00 Brno
Opponents:	Assoc. Prof. Luděk Bláha, Ph.D. RECETOX Faculty of Science Masaryk University Kamenice 3/A4, 625 00 Brno
	Assoc. Prof. Jan Florián Department of Chemistry Loyola University Chicago Chicago, IL 60660
	<b>RNDr. Jiří Vondrášek, CSc.</b> Institute of Organic Chemistry and Biochemistry Academy of Sciences of the Czech Republic Flemingovo nám. 2. 166 10 Praha 6

The attitude to the dissertation thesis was conducted by: Faculty of Science, Masaryk University

The dissertation thesis defence will be held on ...... at ...... in the library at the Department of Microbiology, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdého 14, Brno in the presence of the dissertation theses defence committee for the doctoral study program Microbiology.

Dissertation thesis is available in the library at the Department of Microbiology, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdého 14, Brno.

The committee chairman for dissertation theses defence in the field of microbiology is:

**Prof. RNDr. Zdeněk Hubálek, DrSc.** Department of Experimental Biology Faculty of Science Masaryk University

# Acknowledgement

My PhD research has been made possible by the following institutions: Masaryk University, Supercomputing Center Brno, EML Research, Kobe University

. . . and with financial support from the Ministry of Education of the Czech Republic:  ${\bf Grant}~{\bf MSM0021622412}$ 

Below follows my list of peop	ple to whom I would like to say <i>thank you</i> :
Study supervisor:	Assoc. Prof. RNDr. Miroslav Němec, Csc.
	Faculty of Science, Masaryk University
	Brno, Czech Republic
Research supervisor:	Assoc. Prof. Jiří Damborský, Dr.
	Faculty of Science, Masaryk University
	Brno, Czech Republic
Methodological advisor:	Dr. Rebecca C. Wade
	Molecular and Cellular Modeling Group, EML Research
	Heidelberg, Germany
Technical advisor:	Mgr. Jan Brezovský
	Faculty of Science, Masaryk University
	Brno, Czech Republic
Publications co-authors:	Pavel Banáš, Radka Chaloupková, Jiří Damborský, Jan
	Dohnálek, Pavel Dvořák, Táňa Koudeláková, Petr Kulhánek,
	Ivana Kutá-Smatanová, Michal Kutý, Yuji Nagata, Michal
	Otyepka, Martina Pavlova, Zbynek Prokop, Alena Stsiapanava,
	Masataka Isuua, nebeca 0. waue.
Software co-authors:	Filip Andres, Petr Beneš, Jan Brezovský, Eva Chovancová, Jiří
	Damborský, Petr Jaša, Barbora Kozlíková, Petr Medek, Antonín
	Pavelka, Jiří Sochor, Tibor Szabó, Matúš Zamborský.
Laboratory colleagues:	Šárka Bidmanová, Jan Brezovský, Radka Chaloupková, Eva
	Chovancová, Pavel Dvořák, Andrea Fořtová, Khomaini Hasan,
	Petr Jeřábek, Táňa Koudeláková, Marta Monincová, Tomáš
	Mozga, Antonin Pavelka, Martina Pavlová, Zbyněk Prokop,
	чегошка элерапкоvа.
Other scientists:	Takashi Nakamura, Alexander Shug, Shigenori Tanaka,
	Hirofumi Watanabe.

# Abstract

Using classical and random acceleration molecular dynamics simulations, amino acid residues were proposed in haloalkane dehalogenase DhaA from Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13064 for site-directed and saturation mutagenesis that yielded enzyme variants with up to 26-fold improved catalytic performance for conversion of toxic xenobiotic, 1,2,3trichloropropane, compared to the wild-type DhaA. The introduced mutations targeted two crystalographically observable active site access tunnels and improved shielding of the buried active site from bulk water, thus providing more favourable environment for the initial chemical step of the enzyme reaction cycle. Besides the two tunnels, three additional pathways were identified in the wild-type enzyme using the molecular dynamics simulations and the effect of the mutations and chemical state of the active site on accessibility of all the five pathways was investigated. The acquired molecular dynamics trajectories were further used for validation of temporary versions of CAVER 2.0 tunnel calculation algorithm, that will be, in combination with molecular dynamics simulations, a helpful tool for investigating tunnels in proteins as well as for designing mutations for tuning protein function and thus contributing to better understanding of the structure-dynamics-function relationships of proteins with buried binding sites.

**Keywords:** Protein, enzyme, haloalkane dehalogenase, buried active site, tunnel, product release, water exchange, molecular dynamics simulation, design of mutants, CAVER

# Introduction

Proteins, genes and genetic code are the most fundamental functions of life (Ruiz-Mirazo et al., 2004; Ikehara, 2005). Among proteins, those with catalytic functions, the so-called enzymes, are fundamentally the most important (Koshland Jr., 2002b) because they speed up specific and otherwise too slow chemical reactions to sustain living processes (Radzicka & Wolfenden, 1995; (Koshland Jr., 2002b)). Understanding the underlying principles of life thus requires understanding enzyme function to the very deepest level (Koshland Jr., 2002b). Since the function is determined by protein structure and dynamics (Karush, 1950; Koshland Jr., 1958; Sullivan & Holyoak, 2008; Kurakin, 2009), elucidation of the underlying principles of enzyme function requires detailed understanding of the highly complex relationships between structure, dynamics and function for every particular enzyme. Moreover, these properties must be considered from evolutionary perspective because nothing in biology has sense unless in the view of evolution (Dobzhansky, 1964; Koshland Jr., 1976; Woese, 2001). Every single enzyme is worth of study because every enzyme can reveal important information on the structure-dynamics-function relationships (Kendrew, 1962), that might be possibly generalised to some other enzymes and proteins of different functions when considering limited space of three-dimensional protein folds (Chothia, 1992).

 $\alpha/\beta$ -hydrolase fold (**Ollis et al., 1992**) is one of the most versatile protein folds (**Hegyi & Gerstein, 1999**) as it supports various hydrolytic functions including hydrolytic dehalogenation catalysed by haloalkane dehalogenases (**Verschueren et al., 1993d**). These enzymes have attracted scientists since 80s for many reasons, including their belonging to the versatile fold and potentially high ecological importance in removal of toxic halogenated

xenobiotics from polluted environment (**Janssen et al., 1985**). Haloalkane dehalogenases (EC 3.8.1.5) perform hydrolytic substitutive dehalogenation of halogenated aliphatic hydrocarbons to corresponding alcohol, halide anion and proton via bimolecular nucleophilic substitution ( $S_N 2$ ), nucleophilic adition and elimination reactions (**Schanstra et al., 1996b; Bosma et al., 2003; Prokop et al., 2003**). Hydrophobic nature of the substrate implies necessity for the active site to be buried in the protein core, shielded from the bulk solvent (**Koshland Jr., 1976**). Contrary, exchange of water, substrate and products between the buried active site and bulk solvent must be efficient for effective dehalogenating function (**Koshland Jr., 1995**).

Bosma et al. (2002) isolated mutants of haloalkane dehalogenase DhaA, 04 (Cys176Tyr) and M2 (M1+Tyr273Phe) that showed 2.8-fold and 7.8-fold increase in catalytic performance for conversion of 1,2,3-trichloropropane (TCP) to 2,3-dichloropropane-1-ol (DCL) and chloride anion (CL). Bosma et al. (2002) then proposed that the common substitution at the position 176 in the main tunnel contributes to the improvement by reducing the size of the active site cavity and thus enhancing efficiency of TCP substrate binding. In line with the proposed effect of Cys176Tyr, Bosma et al. (2003) proposed the  $S_N2$  reaction to be the rate-limiting step in the conversion of TCP by wild-type DhaA based on absence of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O kinetic isotope effect. Banáš et al. (2006) noted decreased size of the main tunnel by Cys176Tyr and presumed that the substitution causes shift in the rate-limiting step from the  $S_N2$  step to DCL release due to re-direction of DCL release from the main tunnel to the slot tunnel and suggested to perform substitutive mutagenesis in the slot tunnel for further improvement of the catalytic performance of DhaA with TCP.

As a follow-up of the research conducted by Bosma et al. (2002; 2003) and Banáš et al. (2006), and aimed at gaining better understanding of the exchange processes in haloalkane dehalogenase DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 at atomic level, classical molecular dynamics (MD) simulations (McCammon & Karplus, 1977) and random acceleration molecular dynamics (RAMD) simulations (Lüdemann et al., 2000a) were employed: (i) to design mutations and hot spots for mutagenesis in exchange pathways; (ii) to identify product release and water exchange pathways, protein-product, protein-water and product-water interactions; and (iii) to interpret them in the light of experimental data: mutagenesis, dehalogenating activities, secondary structure stabilities and three-dimensional protein X-ray crystal (XC) structures. The acquired knowledge of the structure-dynamics-function relationships of the haloalkane dehalgoenase DhaA was then applied during development of the CAVER 2.0 program for automated identification of tunnels in protein structures.

# Objectives

**1.** In silico design of mutants of the wild-type DhaA for enhanced conversion of TCP. The goal was to provide experimentalists with a list of amino acid residues for substitution, and if possible, to suggest suitable substitutes.

2. In silico analysis and interpretation of the effects of mutations on the enhanced conversion of TCP by DhaA mutants. The goal was to suggest what part of the reaction cycle is improved by the substitutions in the mutants, and to propose what is the basis of the improvement.

**3.** In silico identification of pathways and mechanisms for release of two products of TCP hydrolytic dehalogenation, i.e. DCL and CL, from the buried active site of the wild-type DhaA and the mutants. The goal was to identify all potentially functional product release pathways for the two products and to describe the release process in terms of product-enzyme and product-water interactions and dynamics.

**4.** In silico identification of pathways and mechanisms for water exchange between the buried active site and the surface of the wild-type DhaA and the mutants. The goal was to identify all potentially functional water exchange pathways and to describe the exchange process in terms of water-enzyme and water-product interactions and dynamics.

**5.** Comparison of XC structures of DhaA variants. The goal was to explore open and closed tunnels in the structures and describe the effect of mutations on the accessibility of the tunnels.

6. Testing temporary versions of CAVER 2.0 algorithm and CAVER Viewer application for calculation of pathways leading from buried cavities to surface in protein structures. The goal was to provide developers of the algorithm and the application with feedback response on the reliability of pathways identified by the CAVER 2.0 algorithm and on the user-friendliness of the graphical user interface of the CAVER Viewer.

# Methods

The research on the haloalkane dehalogenase DhaA was multidisciplinary, requiring tight collaboration of specialists from various fields/niches of protein science: DNA manipulation, site-directed and saturation mutagenesis, protein expression, protein purification, circular dichroism spectroscopy, specific enzymatic activity measurements, steady-steate and presteady state kinetics, solvent kinetic isotope effect measurements, protein XC, molecular docking calculations, classical MD simulations, and RAMD simulations. All experimental methods were employed by collaborators under the supervision of Jiří Damobrský, Yuji Nagata, Michal Kutý and Ivana Kutá-Smatanová, whereas all molecular modelling methods were employed by myself under the supervision of Jiří Damborský and Rebecca C. Wade. CAVER program was developed in the collaboration of molecular modelling and bioinformatics specialists led by Jiří Damborský with specialists in the field of computer graphics and interaction of humans with computer led by Jiří Sochor.

# Experiments

Nucleotide sequence of pRTL1 plasmid-located *dhaA* gene (GenBank accession number AF060871) from *Rhodoccocus rhodochrous* NCIMB 13064 (Kulakova et al., 1997) was modified at its termini by addition of *Bam*HI and *Hin*DIII restriction sites, Shine-Dalgarno sequence (Shine & Dalgarno, 1975), six codons for His in PCR using synthetic oligonucleotide primers designed accordingly. *dhaAHis* gene in pUC18 and pAQN plasmids was used as the initial template for mutagenesis. Site-directed and saturation mutagenesis was carried out by inverted PCR (Ochman et al., 1988; Triglia et al., 1988) using synthetic oligonucleotides designed accordingly (Tables 1 and 2). Two sub-libraries A and two sub-libraries B were combined to yield library A and B. High-throughput screening of the libraries

for enhanced activity of DhaA variants with TCP was assayed in microplates by phenol red dye indicator, detecting decreased pH due to production of protons by hydrolytic dehalogenation of TCP. The nucleotide sequences of the mutant *dhaA* genes of 51 most active variants were determined by the dideoxy chain termination method.

Substrate specificity of wild-type DhaA and the most active mutant 31 towards a set of 31 substrates was assayed by monitoring released halide anions by Iwasaki method (**Iwasaki et al., 1952**). Steady-state kinetic constants,  $k_{cat}$  and  $K_m$ , for the conversion of TCP by wild-type DhaA and mutants M2, M3, 04, 14, 15, 21, 27, 31, 51, and 52 were assayed with TCP by the initial velocity measurements as described previously (**Chaloupková et al., 2003**): the substrate concentration was determined by a gas chromatography; dehalogenation reaction was performed at 37 °C; reaction was stopped by the addition of methanol at 10 and 20 min or 15 and 30 min time points; all the data points were measured in duplicates or triplicates; concentration of halide anion product was determined by the Iwasaki method. Rate-limiting step in reaction cycle of TCP dehalogenation by wild-type DhaA and the mutant 31 was determined at 37 °C by combining two approaches: (i) solvent kinetic isotope effects determined by performing activity assays at increasing concentrations of <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O from 0 to 100%, and (ii) pre-steady state kinetic experiments using rapid quench-flow technique.

Secondary structure fingerprint of the wild-type DhaA, mutants 04, M2, M3, and six most active DhaA variants obtained by screening the saturation mutagenesis libraries A and B (mutants 17, 19, 21, 27, 31 and 33), and mutants 51 and 52, was determined by measuring far-UV circular dichroism (CD) spectra. High/atomic-resolution XC structure was determined for the mutants 04 (PDB-ID 3FBW), 14 (PDB-ID 3G9X) and 15 (PDB-ID 3FWH) at 1.23, 0.95 and 1.22 Å resolution, respectively, using XC structure of DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB-ID 1BN6) and XC structure of the mutant 15 as starting models for molecular replacement (Stsiapanava et al., 2008).

Template	Primers (5' - 3') <sup>a, b</sup>	Result	Introduced	
			<b>mutation</b> <sup>d</sup>	
pUC18::dhaAHis	T <u>A</u> CGTCGTCCGT CCGCTTAC <sup>fw</sup>	pUC18::dhaA04His	Cys176Tyr	
	TTTCGGGAGCGCACCCTC <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAHis	$GGAATTCATCCGGCCT\underline{T}TCCCGACGTGG^{fw}$	pUC18::dhaA14His	Ile135Phe	
	$CCACGTCGGGA\underline{A}AGGCCGGATGAATTCC^{rev}$			
pAQN::dhaA04His	$GGAATTCATCCGGCCT\underline{T}TCCCGACGTGG^{fw}$	pAQN::dhaA15His	Ile135Phe	
	CCACGTCGGGAAAGGCCGGATGAATTCC <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaA04His	TTCCTCCAGGAAGACAACCC <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAM2His	Tyr273Phe	
	GTGCAATCCCGGGGGC <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAM2His	GGACGAAT <u>TT</u> CCGGAATTCG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAM3His	Trp141Phe	
	CACGTCGGGATAGGCC <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaA31His	T <u>TC</u> CTCCCGAAATACGTCGTCC <sup>fw</sup>	pAQN::dhaA51His	Ala172Phe	
	ACCCTCGATGAAAGCGTTCTG <sup>fw</sup>			
pAQN::dhaA51His	TTCCGTGAGACCTTCCAGGC <sup>fw</sup>	pAQN::dhaA52His	Ala145Phe	
	GAATTCCGGCCATTCGTCCC <sup>rev</sup>			
<sup>a</sup> The introduced mutations are bold-faced and underlined.				
<sup>b</sup> fw, forward primer;	rev, reverse primer.			

Table 1	I Site-d	lirected	mutagenesis	

Table 2 | Saturation mutagenesis.

Template	Primers (5' - 3') <sup>a, b, c</sup>	Result	Introduced	
			<b>mutation</b> <sup>d</sup>	
pAQN::dhaAM2His	GGCCT <u>NNK</u> CCGACGTG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryA1His	Ile135X	
	<b>GGATGAATTCCATACATGCAATAC</b> <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAM2His	<b><u>NNK</u>ATCCCCCCGGCCGAAG<sup>fw</sup></b>	pAQN::dhaAsub-libraryA2His	Val245X	
	MNNGCCGGGTGTGCCCCAG <sup>rev</sup>		Leu246X	
pAQN::dhaAM3His	GGCCT <u>NNK</u> CCGACGTG <sup>fw</sup>	pAQN:: dha A sub-library B1 H is	Ile135X	
	<b>GGATGAATTCCATACATGCAATAC</b> <sup>rev</sup>			
pAQN::dhaAM3His	NNK ATCCCCCCGGCCGAAG <sup>fw</sup>	pAQN::dhaAsub-libraryB2His	Val245X	
	MNNGCCGGGTGTGCCCCAG <sup>rev</sup>		Leu246X	
<sup>a</sup> The introduced mut	tations are bold-faced and underlined.			
$^{b}N = A, G, C \text{ or } T; K$	= G or T; M = A or C.			
<sup>c</sup> fw, forward primer; rev, reverse primer.				
<sup>d</sup> X – any of the 20 sta	andard amino acid residues.			

#### **Molecular Modelling**

The XC structure of DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB-ID 1CQW) was truncated by five amino acid residues at the C-terminus, renumbered according to *dhaA* gene and modified with three amino acid residue substitutions, Val172Ala, Ile209Leu, and Ala292Gly, using PYMOL 0.97 (**DeLano, 2002**) to reconstruct the structure of DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (wild-type DhaA) used in experiments. The wild-type structure of DhaA served as the template for amino acid residue substitutions using PYMOL, yielding structures of mutant proteins 04, 14, 15, 21', 27', 31', 51', and 52'. The in silico mutants correspond to the mutants obtained by site-directed and saturation mutagenesis by the identifiers, except for absence of Tyr273Phe in the in silico mutants marked with the prime symbol. The three-dimensional models of (*R*)-2,3-dichloropropane-1-ol (*R*-DCL), (*S*)-2,3-dichloropropane-1-ol (*S*-DCL) and TCP were built using PYMOL, and geometry optimised using MOPAC 2000 (**Stewart, 1990**) and GAUSSIAN 94 (**Frisch et al., 1994**). Partial atomic charges were fitted to reproduce the electrostatic potential calculated with GAUSSIAN using the RESP (**Bayly et al., 1993**; **Cornell et al., 1993**), module of AMBER 8 (**Case et al., 2004**).

The initial orientation of the TCP substrate in the active site of wild-type DhaA and the initial orientation of the R- and S-DCL product in the active site of DhaA wild-type complexed with CL were modelled using AUTODOCK 3.0.5 (Morris et al., 1998). The conformations of R- and S-DCL obtained for the wild-type DhaA were applied to mutants. Classical equilibration MD simulations were performed for wild-type DhaA and mutant 31' complexed with TCP, and for all DhaA variants with R- and S-DCL and with/without CL in AMBER 8 using the 1994 Cornell force field (Cornell et al., 1995; Cornell et al., 1996). The equilibration MD simulations of the enzyme-substrate complexes were followed by 2 ns of production classical MD simulations; the equilibration MD simulations of the enzyme-product complexes were followed by production RAMD simulations.

RAMD simulation (Lüdemann et al., 2000a) is an enhanced sampling MD technique that makes the egress of a ligand from a buried enzyme active site observable in computationally accessible simulation times (Lüdemann et al., 2000a; Winn et al., 2002; Wade et al., 2004; Schleinkofer et al., 2005; Wang & Duan, 2007). RAMD simulation resembles classical MD simulation except that an additional force is applied to the centre of mass of the ligand in a randomly chosen direction. After a user-defined number of time steps, the distance traveled by the ligand is compared to a threshold parameter. If the ligand does not reach the threshold distance, a new, randomly chosen direction is given to the force on its centre of mass; otherwise, the force direction is maintained. The process is iterated until the ligand has been released into the bulk solvent or a specified maximum simulation time is reached. RAMD simulations were carried out to simulate DCL release in all DhaA variants Sander module of AMBER 8 with RAMD patch (http://projects.villausing bosch.de/mcm/software/amber). Altogether, 86 RAMD trajectories were recorded. No difference in the preferential release through different pathways or in the mechanism of the release was obvious for the R- and S- enantiomers of DCL. Therefore, R-DCL and S-DCL were further considered to provide variability in the MD trajectories only. RAMD simulations were also performed on DCL for the wild-type DhaA in the presence of CL but were not extended to the mutants for highly reduced number of observed DCL release events.

#### Software engineering

Temporary versions of CAVER 2.0 algorithm were tested as a PYMOL plugin with XC structures of DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB IDs: 1CQW and 1BN6) and with selected snapshots of MD simulations of the wild-type DhaA and its mutants. Calculated tunnels were compared with visually identified open tunnels. Reliability of the CAVER 2.0 algorithm results and proper functionality of the PYMOL plugin was assessed and reported to the software engineers.

The GUI of CAVER Viewer was designed and temporary versions of the application were tested for basic functionality. Observed functionality problems and suggestions for improving userfriendliness were reported to software engineers.

# Results

#### In silico design of DhaA mutants for improved conversion of TCP

<u>Klvaňa M, Pavlová M</u>, Prokop Z, Chaloupková R, Banáš P, Otyepka M, Wade RC, Nagata Y & Damborský J (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

Hot spot amino acid residues lining the access tunnels were selected for mutagenesis by RAMD simulations of DCL release in the wild-type DhaA and the 04 mutant (**Fig 1**). The selected amino acid residues are located along DCL release pathway through the main tunnel, p1 (Cys176), the slot tunnel, p2a (Trp141, Ile135 and Leu246), or both the tunnels (Val245). Trp141Phe was proposed to be introduced into the M2 mutant, yielding mutant M3. Both the M2 and M3 mutants served as the templates for the saturation mutagenesis of Ile135+Val245+Leu246, leading to libraries A (2,568 clones) and B (2,705 clones), respectively.



**Fig 1** I Hot spot amino acid residues for mutagenesis. DhaA is shown in cartoon model coloured by domains: grey, the main domain, white, the cap domain. DCL release pathways are shown in surface representation: p1 corresponds to the main tunnel; p2a corresponds to the slot tunnel. Amino acid residues selected for mutagenesis are highlighted by balls and sticks.

# Analysis and interpretation of the effects of mutations on the enhanced conversion of TCP by DhaA mutants

<u>Klvaňa M, Pavlová M</u>, Prokop Z, Chaloupková R, Banáš P, Otyepka M, Wade RC, Nagata Y & Damborský J (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

<u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Screening the saturation mutagenesis libraries of DhaA for enhanced activity with TCP revealed three superior mutants, 27 and 31 from library A and 21 from libraby B, all common in Val245Phe and Leu246Ile substitution and variable in the position 135. The catalytic efficiency of the mutants 21 (with Ile135Val), 27 (with Ile135Leu) and 31 (with Ile135Phe), quantified by  $k_{cat}/K_m$ , was 12-, 23- and 26-fold higher, respectively, compared to 36 s<sup>-1</sup> M<sup>-1</sup> of the wild-type DhaA. RAMD simulations discriminated DCL release to be the source of improvement of the activity in the mutants because the most active mutant 31' was the least amenable to DCL release. Classical MD simulations with TCP showed that the active site of the wild-type DhaA was easily accessible to water molecules from bulk solvent and that increasing numbers of water molecules in the active site competed with TCP for interaction with the nucleophile, Asp106. Contrary, the bulky aromatic substitutions in the access tunnels of the 31' mutant shielded the active site from the bulk solvent effeciently within the two-nanosecond MD simulation (**Fig 2**). <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O kinetic isotope effect measurements and

transient kinetic experiments showed that the rate-limiting step in the mutant 31 shifted from  $S_N 2$  to product release, in agreement with the simulations. Additional bulky aromatic substitions in the main tunnel, Ala172Phe and Ala172Phe+Ala145Phe, did not result in further enhancement of the activity of the mutants with TCP.



Fig 2 | Role of active site accessibility for bulk water molecules in the wildtype DhaA and the mutant 31' on formation of reactive complexes with TCP, the so-called NACs, in classical MD simulations. (a) Active site accessibility for bulk water: the active site of the wild-type DhaA is accessible to bulk water (red); the cavity of the 31' mutant is inaccessible, and only discrete internal positions are occupied by structural water molecules (blue); spheres representing waters have a radius of 0.5 Å centred on the oxygen atoms. (b) The population of NAC (boxed) for TCP in the wild-type DhaA (red) and the mutant 31' (blue) in the MD simulations; snapshots shown in dare indicated by (D). (c) Evolution of the NAC distance of two reacting atoms during MD simulations: snapshots shown in d are indicated by (•). (d) Snapshots from MD simulations of the non-reactive configuration of TCP competing with water molecules for the nucleophile in the wild-type DhaA and the NAC for TCP in the 31' mutant; only polar hydrogens are shown for clarity.

# Product release and water exchange pathways and mechanisms in DhaA and its mutants

Klvaňa M, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Product release and water exchange pathways in the wild-type DhaA and eight mutants were explored in detail. The classical MD trajectories were investigated for spontaneous release of the products (DCL and CL) and for exchange of water molecules between the buried active site and bulk solvent. In total, one release pathway for CL, p1, no release pathway for DCL, and five pathways for water molecules, p1, p2a, p2b, p2c, and p3 were observed for the DhaA variants. Another set of MD simulations was performed with CL replaced by a water molecule to model the system after release of the halide anion from the active site. The MD trajectories were investigated for exchange of water molecules and spontaneous release of DCL. Altogether, three pathways were observed for water molecules (p1, p2a, and p2b) with the DhaA variants. No release of DCL was observed in any of the classical MD simulations, justifying the use of RAMD simulations to enhance DCL release. RAMD simulations of DCL release in wild-type DhaA and its mutants resulted in five pathways, p1, p2a, p2b, p2c, and p3 (**Fig 3**). The pathways showed ligand specificity (**Fig 4**) and various mechanisms of ligand exchange between the buried active site and bulk solvent (**Fig 5 and Table 3**).



DCL release Fig 3 T pathways observed among DhaA variants. Pathways are represented by the surface and mapped on the XC structure of DhaA from Rhodococcus sp. (PDB-ID 1CQW). The thickness of the ribbon corresponds to the crystallographic B-factors. Variable amino acid residues among the DhaA variants are represented by black balls and labeled by the residue identifier. p1 and p2a correspond to the main tunnel and the slot tunnel, respectively. NC-loop, N-terminal cap domain loop; CC-loop, C-terminal cap domain loop.



**Fig 4** I Schematic representation of ligand pathways among DhaA variants. (a) Pathway for CL observed in classical MD simulations; (b) pathways for DCL observed in RAMD simulations; (c) pathways for water molecules observed in classical MD simulations. Arrows indicate direction of passage of ligands through a tunnel (p1, p2a, p2b and p2c for DCL and water, and p3 for DCL) or protein matrix (p3 for water); p1, the main tunnel; p2a, the slot tunnel.



Fig 5 | Schematic representation for three mechanisms of ligand exchange between the buried active site of DhaA and bulk solvent. (a) Ligand passage through a permanent tunnel; (b) ligand passage through a transient tunnel; (c) ligand passage through a protein matrix. Protein and ligand are depicted in grey and red, respectively. Lowdensity region of the protein matrix is in light grey; high-density region of the protein matrix is in black.

Ligand Classical MD CL	Pathway	Tunnel		Protein	
		Permanent	Transient	matrix	
Classical MD					
CL	p1	wt	15	-	
	p2a	-	_	-	
	p2b	-	_	-	
	p2c	-	_	_	
	p3	_	-	_	
Water	p1	wt, 14	04, 15, 21', 27', 31', 52'	_	
	p2a	_	04, 27'	_	
	p2b	-	wt, 04, 14, 15, 27', 31', 51', 52'	_	
	p2c	_	04	_	
	p3	_	-	21'	
RAMD					
DCL	p1	wt, 14	04, 15, 21', 27', 31', 51', 52'	_	
	p2a	_	wt, 04	_	
	p2b	-	27'	_	
	p2c	-	21'	-	
	p3	_	wt, 27'	_	

Table 3   Occurrence of mechanisms of ligand exchange between the burn	ed active	site ar	nd
bulk solvent in the wild-type (wt) DhaA and eight mutants in MD simulation	3.		

#### Structural characterisation of three mutants with modified tunnels

<u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (**2009**). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

XC structures of the mutants 04 (PDB-ID 3FBW), 14 (PDB-ID 3G9X), and 15 (PDB-ID 3FWH) were determined to high/atomic resolution (Stsiapanava et al., unpublished results). The mutant structures were compared with the XC structures of DhaA from *Rhodococcus* sp. available in the PDB (**Newman et al., 1999**). This analysis provided experimental evidence for the effect of the substitutions located in the main tunnel (mutant 04), the slot tunnel (mutant 14), and both the main and slot tunnels (mutant 15) on the accessibility of the active site and the mechanisms of ligand exchange observed in MD simulations (**Fig 6**). The main tunnel was open only in the XC structures of DhaA variants carrying the wild-type Cys176. The slot tunnel was open only in the structure 1BN6 due to the presence of different rotamers of Ile135 and Arg133 side-chains together with 0.8 Å displacement of the backbone of five residues of the NC loop (133-ArgProIleProThr-137), compared to structures 1CQW and 1BN7. The slot tunnel in structures 1CQW and 1BN7 was represented only by an isolated cavity containing two water molecules. The introduction of a bulky Ile135Phe substitution further reduced accessibility of the slot tunnel of the XC structures of mutants 14 and 15.



**Fig 6** I The XC structures of DhaA and its mutants ordered by the accessibility of their active sites via the main tunnel (p1) and the slot tunnel (p2a). (a) DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB-ID 1BN6) with the main tunnel and the slot tunnel open; (b-d) DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB-ID 1CQW), DhaA from *Rhodococcus* sp. (PDB-ID 1BN7) and mutant 14 of the wild-type DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB-ID 3G9X) with the main tunnel open and the slot tunnel closed; (e-f) mutant 04 of the wild-type DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB-ID 3FBW) and mutant 15 of the wild-type DhaA from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 (PDB-ID 3FWH) with both the main tunnel and the slot tunnel closed. The protein structures are visualised as a slice through the surface representation with tunnels and cavities coloured in dark grey.

#### Development of CAVER 2.0 program for calculation of tunnels in protein structures

Andres F, Beneš P, Brezovský J, Chovancová E, Jaša P, **Klvaňa M**, Kozlíková B, Medek P, Pavelka A, Szabó T, Zamborský M, Zruban M (*v abecedním pořadí*), <u>Sochor J</u> & <u>Damborský J</u> (2009). CAVER 2.0 program pro výpočet tunelů. Laboratoř interakce člověka s počítačem a Loschmidtovy laboratoře (*v abecedním pořadí*), Masaryk University, Brno, Czech Republic. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

CAVER 2.0 provides rapid, accurate, automated calculation of tunnels leading from buried cavities to the surface in the structural models of proteins, nucleic acids and inorganic materials. Reliability of tunnels identified by temporary versions of CAVER 2.0 algorithm was tested repeatedly against the set of protein structures comprising snapshots of MD simulations of wild-type DhaA and eight mutants (**Fig 7**). Although open tunnels can be easily identified by visual inspection of surface models of the protein structures e.g. in PYMOL, CAVER brings several benefits: (i) precision in finding tunnels differing in openings to the surface (**Fig 7a-c**); (ii) automation; (iii) speed, enabling processing of large set of

structures in short time; (iv) identification of atoms and amino acid residues lining the tunnel; (v) determination of tunnel width at discrete points along the tunnel, useful for identification of bottlenecks in tunnels; and (vi) identification of tunnels that are invisible by visual inspection yet they may open for a ligand to pass through due to dynamics of a protein in time (**Fig 7ade**). Known limitation of the current version of CAVER is failure to find one of two tunnels possessing a common mouth (**Fig 7de**), due to blocking the mouth after finding the first of the two tunnels, which is the current strategy used to force the algorithm to search for more than one tunnel.

As of November 14, 2009, 2,174 users registered for CAVER 2.0; the web site of CAVER was accessed from 15,013 unique IP addresses.



**Fig 7** I Tunnels in the snapshots from MD simulations of DhaA identified manually and automatically using CAVER 2.0. (a) open p1 and p2a in the mutant 27; (b) open p1 and p2b in the mutant 27; (c) open p1 and p2c in the mutant 04; (d) open p2a and p2b in the mutant 04; (e) open p1, p2a and p2b in the mutant 04. Five tunnels were calculated for each structure. Starting point was defined as a centroid of three atoms:  $N_{62}$  atom of Asn41,  $O_{51}$  atom of Asp106 and  $N_{c2}$  atom of Trp107. All open tunnels were identified by CAVER 2.0 in *a*, *b* and *c*. p2b tunnel in *d* and p2a tunnel in *e* was not found by CAVER 2.0 due to common mouth with p2a and p2b tunnel, respectively. In *a*, *d* and *e*, CAVER 2.0 identified additional tunnels (p2c, p1 and p2c, and p2c, respectively) that were closed in the snapshots, but that are at the same time known to open in MD simulations. Protein structures are shown in surface representation; tunnels are in dark grey. CAVER 2.0 tunnels are shown in mesh representation and coloured by tunnel as follows: p1, yellow; p2a, blue; p2b, red; p2c, cyan.

# Discussion

<u>Klvaňa M, Pavlová M</u>, Prokop Z, Chaloupková R, Banáš P, Otyepka M, Wade RC, Nagata Y & Damborský J (**2009**). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733.

<u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356.

Andres F, Beneš P, Brezovský J, Chovancová E, Jaša P, **Klvaňa M**, Kozlíková B, Medek P, Pavelka A, Szabó T, Zamborský M, Zruban M (*in alphabetical order*), <u>Sochor J & Damborský J</u> (2009). CAVER 2.0 tunnel calculation program. Human Computer Interaction Laboratory and Loschmidt Laboratories (*in alphabetical order*), Masaryk University, Brno, Czech Republic. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

An efficient gating mechanism allowing controlled exchange of molecules was established in the DhaA enzyme by introducing aromatic substitutions in the main exchange route, the socalled main tunnel, causing up to 26-fold improvement in catalytic performance of DhaA mutants towards non-natural xenobiotic, TCP. The gating mechanism has been already reported e.g. for P450 enzymes (Lüdemann et al., 2000a; Lüdemann et al., 2000b; Winn et al., 2002; Li et al., 2005), acetylcholinesterase (Ripoll et al., 1993; Enyedy et al., 1998; Zhou et al., 1998; Tara et al., 1999; Van Belle et al., 2000; Xu et al., 2003), NADH oxidase (Hritz et al., 2006) and horseradish peroxidase (Khajehpour et al., 2003; Zelent et al., 2004).

The mutations introduced in DhaA caused change the main tunnel from permanent to transient that opens temporarily according to the phase of reaction cycle. Transient opening can be induced by water from bulk solvent that enters the active site to solvate products. On the other hand, in the absence of the halide anion in the active site, the shielding is efficient to hinder water from entering the active site where it would unfavourably compete with a substrate and disturb its binding into reactive orientation for initial chemical step of the dehalogenating reaction. Pathways identified in the DhaA haloalkane dehalogenase and its mutants and mechanisms of substrate, product and solvent exchange signify importance of dynamics for the function of haloalkane dehalogenases which is in accordance with numerous reports that strongly suggest our view of proteins to be changed from static to highly dynamic one (Karush, 1950; Wolfenden, 1974; Parak, 2003; Busenlehner & Armstrong, 2005; Igumenova et al., 2006; Jarymowycz & Stone, 2006). Proteins are engines and engines essentially function by action in time which involves movements (Koshland Jr., 1976; Koshland Jr., 1996; Parak, 2003; Karplus & Kuriyan, 2005; Igumenova et al., 2007).

The identified pathways also served as an initial validation set for development of CAVER 2.0 tunnel calculation algorithm, an approach for rapid evaluation of possible pathways leading from a buried cavity to surface in proteins that has a potential to stimulate further research on proteins aimed at understanding structure-dynamics-function relationships of proteins with buried binding or active sites. Competition between the CAVER and other similar computational approaches, e.g. MOLE (**Petřek et al., 2007**), MOLAXIS (**Yaffe et al., 2008**), CHUNNEL (**Coleman & Sharp, 2009**), and SLITHER (**Lee et al., 2009**) is highly beneficial for the ultimate general goal of a human effort – *to understand*.

# Conclusions

**1.** Using classical MD and RAMD simulations, three amino acid residues, Ile135, Val245 and Leu246, were proposed for saturation mutagenesis of the Cys176Tyr+Tyr273Phe mutant of the haloalkane dehalogenase DhaA. The saturation mutagenesis then yielded mutants with catalytic performance of 1,2,3-trichloropropane (TCP) conversion increased up to 26-fold (mutant 31).

**2.** The enhanced activity of the DhaA mutants with TCP is due to improved shielding of the buried active site from bulk solvent at substrate binding and/or bimolecular nucleophilic substitution step of the reaction cycle. The shielding is best achieved by Cys176Tyr+Val245Phe+Ile135Phe substitutions of the mutant 31.

**3.** Two active site access pathways, p1 and p2a, corresponding to crystallographically observable main tunnel and slot tunnel, respectively, and three additional pathways, p2b, p2c and p3, were identified among wild-type DhaA and eight mutants using classical MD and RAMD simulations.

**4.** Release of chloride anion product of TCP conversion is triggered and assisted by water; release of 2,3-dichloropropane-1-ol (DCL) product is also triggered by water and guided by aromatic amino acid residues and by hydrogen bonding interactions.

**5.** p1 is the major product release and water exchange pathway, robust against sealing attempted by four aromatic amino acid residue substitutions (Cys176Tyr+Val245Phe+Ala172Phe+Ala145Phe). Other pathways are auxiliary (p2a, p2b and p2c) or rare (p3). Accessibility of the auxiliary pathways is DCL- and/or water-specific and shows high sensitivity to substitution at position of the wild-type Ile135.

**6.** Three mechanisms of ligand exchange are exploited among DhaA variants: passage through a permanent tunnel, passage through a transient tunnel and migration through a protein matrix. Main tunnel changes from permanently open to transiently open tunnel by single Cys176Tyr substitution.

**7.** CAVER 2.0, a program for calculation of tunnels in protein structures, is available at: http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver. The program can be used as a PYMOL plugin, or as a Java Web Start application, CAVER Viewer.

# References

- Banáš P, Otyepka M, Jeřábek P, Petřek M & Damborský J (2006). Mechanism of enhanced conversion of 1,2,3-trichloropropane by mutant haloalkane dehalogenase revealed by molecular modeling. *Journal of Comput. Aided Mol. Des.* 20, 375-383.
- Bayly CI, Cieplak P, Cornell W & Kollman PA (1993). A well-behaved electrostatic potential based method using charge restraints for deriving atomic charges: the RESP model. J. Phys. Chem. 97: 10269-10280.

- Bosma T, Damborský J, Stucki G & Janssen DB (2002). Biodegradation of 1,2,3-trichloropropane through directed evolution and heterologous expression of a haloalkane dehalogenase gene. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3582-3587.
- Bosma T, Pikkemaat MG, Kingma J, Dijk J & Janssen DB (2003). Steady-state and pre-steady-state kinetic analysis of halopropane conversion by a *Rhodococcus* haloalkane dehalogenase. *Biochemistry*, 42: 8047-8053.
- Busenlehner LS & Armstrong RN (2005). Insights into enzyme structure and dynamics elucidated by amide H/D exchange mass spectrometry. Arch. Biochem. Biophys. 433: 34-46.
- Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE, Luo R, Merz KM, Wang B, Pearlman DA, Crowley M, Brozell S, Tsui V, Gohlke H, Mongan J, Hornak V, Cui G, Beroza P, Schafmeister C, Caldwell JW, Ross WS & Kollman PA (2004). AMBER 8. University of California, San Francisco, CA, USA.
- Chothia C (1992). Proteins. One thousand families for the molecular biologist. Nature, 357: 543-544.
- Coleman RG & Sharp KA (2009). Finding and characterizing tunnels in macromolecules with application to ion channels and pores. *Biophys. J.* 96: 632-645.
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI & Kollmann PA (1993). Application of RESP charges to calculate conformational energies, hydrogen bond energies, and free energies of solvation. J. Am. Chem. Soc. 115: 9620-9631.
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW & Kollman PA (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. J. Am. Chem. Soc. 117: 5179-5197.
- Cornell WD, Cieplak P, Bayly CI, Gould IR, Merz KM, Ferguson DM, Spellmeyer DC, Fox T, Caldwell JW & Kollman PA (1996). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 5179–5197. J. Am. Chem. Soc. 118: 2309.
- DeLano WL (2002) The PyMOL molecular graphics system. DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA.
- Dobzhansky T (1964). Biology, molecular and organismic. Am. Zool. 4: 443-452.
- Enyedy I, Kovach I & Brooks B (1998). Alternate pathways for acetic acid and acetate ion release from acetylcholinesterase: a molecular dynamics study. J. Am. Chem. Soc. 120: 8043-8050.
- Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Gill PMW, Johnson BJ, Robb MA, Cheeseman JR, Keith T, Petersson GA, Montgomery JA, Raghavachari K, Al-Laham MA, Zakrzewski VG, Ortiz JV, Foresman JB, Cioslowski J, Stefanov BB, Nanayakkara A, Challacombe M, Peng CY, Ayala PY, Chen W, Wong MW, Andres JL, Replogle ES, Gomperts R, Martin RL, Fox DJ, Binkley JS, Defrees DJ, Baker J, Stewart JP, Head-Gordon M, Gonzalez C & Pople JA (1994) Gaussian 94 (Revision D4). Gaussian, Inc., Pittsburg, PA, USA.
- Hegyi H & Gerstein M (1999). The relationship between protein structure and function: a comprehensive survey with application to the yeast genome. J. Mol. Biol. 288: 147-164.
- Hritz J, Zoldák G & Sedlák E (2006). Cofactor assisted gating mechanism in the active site of NADH oxidase from Thermus thermophilus. Proteins, 64: 465-476.

- Igumenova TI, Frederick KK & Wand AJ (2006). Characterization of the fast dynamics of protein amino acid side chains using NMR relaxation in solution. *Chem. Rev.* 106: 1672-1699.
- Ikehara K (2005). Possible steps to the emergence of life: the [GADV]-protein world hypothesis. *Chem. Rec.* 5: 107-118.
- Iwasaki I, Utsumi S & Ozawa T (1952). New colorimetric determination of chloride using mercuric thiocyanate and ferric ion. Bull. Chem. Soc. Jap. 25: 226.
- Janssen DB, Scheper A, Dijkhuizen L & Witholt B (1985). Degradation of halogenated aliphatic compounds by Xanthobacter autotrophicus GJ10. Appl. Environ. Microbiol. 49: 673-677.
- Jarymowycz VA & Stone MJ (2006). Fast time scale dynamics of protein backbones: NMR relaxation methods, applications, and functional consequences. Chem. Rev. 106: 1624-1671.
- Karplus M & Kuriyan J (2005). Molecular dynamics and protein function. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 102: 6679-6685.
- Karush F (1950). Heterogeneity of the binding sites of bovine serum albumin. J. Am. Chem. Soc. 72: 2705-2713.
- Kendrew JC (1962). Myoglobin and the structure of proteins. In Nobel Lectures Chemistry 1942-1962 (pp. 676-698). Elsevier Publishing Co. (1964), Amsterdam, The Netherlands.
- Khajehpour M, Rietveld I, Vinogradov S, Prabhu NV, Sharp KA & Vanderkooi JM (2003). Accessibility of oxygen with respect to the heme pocket in horseradish peroxidase. *Proteins*, 53: 656-666.
- Koshland Jr. DE (1958). Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44: 98-104.
- Koshland Jr. DE (1976). Role of flexibility in the specificity, control and evolutiion of enzymes. FEBS Lett. 62: E47-52.
- Koshland Jr. DE (1995). The key-lock theory and the induced fit theory. Angew. Chem. Int. Ed. 33: 2375-2378.
- Koshland Jr. DE (1996). The structural basis of negative cooperativity: receptors and enzymes. Curr. Opin. Struct. Biol. 6: 757-761.
- Koshland Jr. DE (2002b). The seven pillars of life. Science, 295: 2215-2216.
- Kulakova AN, Larkin MJ & Kulakov LA (1997). The plasmid-located haloalkane dehalogenase gene from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064. *Microbiol.* 143: 109-115.
- Kurakin A (2009). Scale-free flow of life: on the biology, economics, and physics of the cell. Theor. Biol. Med. Modell. 6: 6-33.
- Li W, Liu H, Scott EE, Gräter F, Halpert JR, Luo X, Shen J & Jiang H (2005). Possible pathway(s) of testosterone egress from the active site of cytochrome P450 2B1: A steered molecular dynamics simulation. Drug Metab. Dispos. 33: 910-919.

- Lüdemann SK, Lounnas V & Wade RC (2000a). How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 1. Random expulsion molecular dynamics investigation of ligand access channels and mechanisms. J. Mol. Biol. 303: 797-811.
- Lüdemann SK, Lounnas V & Wade RC (2000b). How do substrates enter and products exit the buried active site of cytochrome P450cam? 2. Steered molecular dynamics and adiabatic mapping of substrate pathways. J. Mol. Biol. 303: 813-830.
- McCammon JA & Karplus M (1977). Internal motions of antibody molecules. Nature, 268: 765-766.
- Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK & Olson AJ (1998). Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. J. Comput. Chem. 19: 1639-1662.
- Ochman H, Gerber AS & Hartl DL (1988). Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. Genetics, 120: 621-623.
- Ollis DL, Cheah E, Cygler M, Dijkstra B, Frolow F, Franken SM, Harel M, Remington SJ, Silman I & Schrag J (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5: 197-211.
- Parak FG (2003). Proteins in action: the physics of structural fluctuations and conformational changes. Curr. Opin. Struct. Biol. 13: 552-557.
- Petřek M, Kosinová P, Koča J & Otyepka M (2007). MOLE: a Voronoi diagram-based explorer of molecular channels, pores, and tunnels. *Structure*, 15: 1357-1363.
- Prokop Z, Monincová M, Chaloupková R, Klvaňa M, Nagata Y, Janssen DB & Damborský J (2003). Catalytic mechanism of the maloalkane dehalogenase LinB from Sphingomonas paucimobilis UT26. J. Biol. Chem. 278: 45094-45100.
- Radzicka A & Wolfenden R (1995). A proficient enzyme. Science, 267: 90-93.
- Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I & Sussman JL (1993). An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 5128-5132.
- Rueda M, Ferrer-Costa C, Meyer T, Pérez A, Camps J, Hospital A, Gelpí JL & Orozco M (2007). A consensus view of protein dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104: 796-801.
- Ruiz-Mirazo K, Peretó J & Moreno A (2004). A universal definition of life: autonomy and open-ended evolution. Origins Life Evol. Biosphere, 34: 323-346.
- Schanstra JP, Kingma J & Janssen DB (1996b). Specificity and kinetics of haloalkane dehalogenase. J. Biol. Chem. 271: 14747-14753.
- Schleinkofer K, Sudarko, Winn PJ, Lüdemann SK & Wade RC (2005). Do mammalian cytochrome P450s show multiple ligand access pathways and ligand channelling? *EMBO Rep.* 6: 584-589.
- Shine J & Dalgarno L (1975). Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature, 254: 34-38.
- Stewart JJ (1990). MOPAC: a semiempirical molecular orbital program. J. Comput. Aided Mol. Des. 4: 1-105.

- Stsiapanava A, Koudelaková T, Lapkouski M, Pavlová M, Damborský J & Kutá-Smatanová I (2008). Crystals of DhaA mutants from *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13064 diffracted to ultrahigh resolution: crystallization and preliminary diffraction analysis. *Acta Crystallogr., Sect. F: Struct. Biol. Cryst. Commun.* 64: 137-140.
- Sullivan SM & Holyoak T (2008). Enzymes with lid-gated active sites must operate by an induced fit mechanism instead of conformational selection. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105: 13829-13834.
- Tara S, Helms V, Straatsma TP & McCammon JA (1999). Molecular dynamics of mouse acetylcholinesterase complexed with huperzine A. *Biopolymers*, 50: 347-359.
- Triglia T, Peterson MG & Kemp DJ (1988). A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* 16: 8186.
- Van Belle D, De Maria L, Iurcu G & Wodak SJ (2000). Pathways of ligand clearance in acetylcholinesterase by multiple copy sampling. J. Mol. Biol. 298: 705-726.
- Verschueren KH, Seljée F, Rozeboom HJ, Kalk KH & Dijkstra BW (1993d). Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. Nature, 363: 693-698.
- Wade RC, Winn PJ, Schlichting I & Sudarko (2004). A survey of active site access channels in cytochromes P450. J. Inorg. Biochem. 98: 1175-1182.
- Wang T & Duan Y (2007). Chromophore channeling in the G-protein coupled receptor rhodopsin. J. Am. Chem. Soc. 129: 6970-6971.
- Winn PJ, Lüdemann SK, Gauges R, Lounnas V & Wade RC (2002). Comparison of the dynamics of substrate access channels in three cytochrome P450s reveals different opening mechanisms and a novel functional role for a buried arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99: 5361-5366.
- Woese CR (2001). Translation: in retrospect and prospect. RNA, 7: 1055-1067.
- Wolfenden R (1974). Enzyme catalysis: conflicting requirements of substrate access and transition state affinity. Mol. Cell. Biochem. 3: 207-211.
- Xu Y, Shen J, Luo X, Silman I, Sussman JL, Chen K & Jiang H (2003). How does huperzine A enter and leave the binding gorge of acetylcholinesterase? Steered molecular dynamics simulations. J. Am. Chem. Soc. 125: 11340-11349.
- Yaffe E, Fishelovitch D, Wolfson HJ, Halperin D & Nussinov R (2008). MolAxis: efficient and accurate identification of channels in macromolecules. *Proteins*, 73: 72-86.
- Zelent B, Kaposi A, Nucci N, Sharp K, Dalosto S, Wright W & Vanderkooi J (2004). Water channel of horseradish peroxidase studied by the charge-transfer absorption band of ferric heme. J. Phys. Chem. B, 108: 10317-10324.
- Zhou HX, Wlodek ST & McCammon JA (1998). Conformation gating as a mechanism for enzyme specificity. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 9280-9283.

# **Curriculum vitae**

First Name: Martin Last Name: Klvaňa Nationality: Czech Languages: Czech (native), English (advanced) Residence: Brno, Czech Republic E-mail address: martin.mk.klvana@gmail.com Cell phone: +420 737 319 948 Web site: http://www.martinklvana.com/



## Education

**M.S. General Biology/Microbiology (2004):** Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

### Affiliation

#### None: Mar 13, 2009 to present.

Loschmidt Laboratories (formerly Protein Engineering Group): May 06, 2002 to Mar 12, 2009. National Centre for Biomolecular Research (2002-2008) and Department of Experimental Biology (2009), Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

#### Visits

**Computational Chemistry Group of Prof. Shigenori Tanaka:** Sep 01 to Nov 29, 2005, Graduate School of Science and Technology, Kobe University, Kobe, Japan.

Molecular and Cellular Modelling group of Dr. Rebecca C. Wade: Sep 24 to Dec 18, 2004, EML Research, Heidelberg, Germany.

Laboratory of Bioinformatics and Protein Engineering of Dr. Janusz M. Bujnicki: Jun 30 to Jul 11, 2003, International Institute of Molecular and Cell Biology Warsaw, Poland.

#### Awards

Award of the Rector of the Masaryk University (2004): Brno, Czech Republic. 2<sup>nd</sup> prize at Student Scientific Conference (2003): Komensky University, Bratislava, Slovakia.

#### **Research interests**

**Keywords:** (Micro)biology; general principles of life; relationships between structure, dynamics, function and evolution of proteins; molecular docking; molecular dynamics; collaboration with experimentalists. **Primary goal:** Knowledge.

#### Theses

**Diploma thesis (2004):** Computer modelling of bacterial enzymes involved in degradation of halogenated hydrocarbons (research supervisor: Jiří Damborský; methodological advisors: Michal Boháč and Jan Kmuníček). Department of Microbiology, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic.

#### **Research articles**

6. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356. PMID: 19577578.

5. <u>Klvaňa M</u>, <u>Pavlová M</u>, Prokop Z, Chaloupková R, Banáš P, Otyepka M, Wade R, Nagata Y & Damborský J (2009). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. Nat. Chem. Biol. 5: 727-733. PMID: 19701186.

**4.** <u>Ito M</u>, Prokop Z, **Klvaňa M**, Otsubo Y, Tsuda M, Damborský J & Nagata Y (**2007**). Degradation of β-hexachlorocyclohexane by haloalkane dehalogenase LinB from hexachlorocyclohexane-utilizing bacterium *Sphingobium* sp. MI1205. *Arch. Microbiol.* 188: 313-325. PMID: 17516046.

3. <u>Pavlová M</u>, Klvaňa M, Jesenská A, Prokop Z, Konečná H, Sato T, Tsuda M, Nagata Y & Damborský J (2007). The identification of catalytic pentad in the haloalkane dehalogenase DhmA from *Mycobacterium avium* N85: Reaction mechanism and molecular evolution. J. Struct. Biol. 157: 384-392. PMID: 17084094.

2. <u>Oakley A</u>, Klvaňa M, Otyepka M, Nagata Y, Wilce MCJ & Damborský J (2004). Crystal structure of haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 at 0.95 Å resolution: Dynamics of catalytic residues. *Biochemistry* 43: 870-878. PMID: 14744129.

1. <u>Prokop Z</u>, Monincová M, Chaloupková R, **Klvaňa M**, Nagata Y, Janssen DB & Damborský J (2003). Catalytic mechanism of the haloalkane dehalogenase LinB from *Sphingomonas paucimobilis* UT26. J. Biol. Chem. 278: 45094-45100. PMID: 12952988.

#### Software

Andres F, Beneš P, Brezovský J, Chovancová E, Jaša P, **Klvaňa M**, Kozlíková B, Medek P, Pavelka A, Szabó T, Zamborský M, Zruban M (*in alphabetical order*), <u>Sochor J & Damborský J</u> (2009). CAVER 2.0 tunnel calculation program. Human Computer Interaction Laboratory and Loschmidt Laboratories (*in alphabetical order*), Masaryk University, Brno, Czech Republic. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

#### Lectures

6. <u>Klvaňa M</u> & Damborský J: Cavities and tunnels in enzymes (*Czech*). Bioinformatics III – Structural bioinformatics and molecular modelling. Oct 12, 2006; Brno, Czech Republic.

5. <u>Klvaňa M</u>, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J: Modelling of product release and identification of export routes in the haloalkane dehalogenase DhaA (*English*). 5<sup>th</sup> Discussions in Structural Biology and Bioinformatics. Mar 16 - 18, **2006**; Nové Hrady, Czech Republic.

4. <u>Klvaňa M</u>, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J: Modelling of export routes in haloalkane dehalogenase DhaA (*English*). Sep 6, **2005**; Kobe University, Japan.

3. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Jesenská A, Konečná H, Nagata Y & Damborský J: Homology modelling of haloalkane dehalogenase DhmA (*Czech*). *Czech and Slovak Student Scientific Conference*. May 1, 2004; Brno, Czech Republic.

2. <u>Klvaňa M</u>, Oakley A & Damborský J: Dynamics of catalytic residues of haloalkane dehalogenase LinB: Insight from X-ray crystallography and quantum mechanical calculations (*English*). Jul 9, **2003**; International Institute of Molecular and Cell Biology, Warsaw, Poland.

1. <u>Klvaňa M</u>, Boháč M & Damborský J: Computer modelling of bacterial hydrolytic dehalogenation reaction (*Czech*). *Student Scientific Conference*. Apr 9 - 10, **2003**; Bratislava, Slovakia.

#### Posters

2. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J: Pathways and mechanisms of product exit and water exchange pathways in engineered haloalkane dehalogenase DhaA explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations (*English*). *ESF Conference: Protein Design and Evolution for Biocatalysis*, Oct 25 - 30, **2008**; Saint-Feliu de Guixols, Spain.

1. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Konečná H, Nagata Y & Damborský J: Homology modelling of haloalkane dehalogenase DhmA (*English*). *EMBO Course on Biomolecular Simulation*, Jul 18 - 25, **2004**; Paris, France.

# **Publications Associated with the Dissertation Thesis**

## Original research articles

2. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Prokop Z, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá-Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J (2009). Pathways and mechanisms for product release in the engineered haloalkane dehalogenases explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations. J. Mol. Biol. 392: 1339-1356. PMID: 19577578.

1. <u>Klvaňa M</u>, <u>Pavlová M</u>, Prokop Z, Chaloupková R, Banáš P, Otyepka M, Wade R, Nagata Y & Damborský J (2009). Redesigning dehalogenase access tunnels as a strategy for degrading an anthropogenic substrate. *Nat. Chem. Biol.* 5: 727-733. PMID: 19701186.

## Sofware

Andres F, Beneš P, Brezovský J, Chovancová E, Jaša P, **Klvaňa M**, Kozlíková B, Medek P, Pavelka A, Szabó T, Zamborský M, Zruban M (*in alphabetical order*), <u>Sochor J & Damborský J</u> (**2009**). CAVER 2.0 tunnel calculation program. Human Computer Interaction Laboratory and Loschmidt Laboratories (*in alphabetical order*), Masaryk University, Brno, Czech Republic. http://www.loschmidt.chemi.muni.cz/caver

### **Conference Proceedings**

2. <u>Klvaňa M</u>, Pavlová M, Koudeláková T, Chaloupková R, Dvořák P, Stsiapanava A, Kutý M, Kutá Smatanová I, Dohnálek J, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J: Pathways and mechanisms of product exit and water exchange pathways in engineered haloalkane dehalogenase DhaA explored using classical and random acceleration molecular dynamics simulations (*poster; English*). ESF Conference: Protein Design and Evolution for Biocatalysis (pp. 78). Oct 25 - 30, **2008**; Saint-Feliu de Guixols, Spain.

1. <u>Klvaňa M</u>, Kulhánek P, Wade RC & Damborský J: Modelling of product release and identification of export routes in the haloalkane dehalogenase DhaA (*lecture; English*). 5<sup>th</sup> Discussions in Structural Biology and Bioinformatics (pp. 18). Mar 16 - 18, **2006**; Nové Hrady, Czech Republic.