

**Załącznik nr 2**  
do wniosku o nadanie stopnia doktora habilitowanego

**Autoreferat**

**Jan Brezovský, Ph.D.**

Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu  
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie

## Spis treści

1	Imię i nazwisko .....	3
2	Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.....	3
3	Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych .....	3
4	Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) .....	4
4.1	Tytuł osiągnięcia naukowego .....	4
4.2	Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej..	4
4.3	Opis osiągnięcia naukowego .....	6
4.3.1	Wprowadzenie .....	6
4.3.2	Badanie powiązań między hydratacją, transportem ligandów i funkcją enzymów.....	10
4.3.3	Zwiększanie dostępności i zakresu narzędzi do analizy tuneli i migracji ligandów .....	21
5	Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej.....	26
5.1	Wyniki badań uzyskane w trakcie studiów doktoranckich na Uniwersytecie Masaryka .....	26
5.2	Wyniki badań uzyskane w wyniku zatrudnienia po studiach doktoranckich na Uniwersytecie Masaryka i w Międzynarodowym Centrum Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego św. Anny .....	27
5.2.1	Odkrywanie zależności struktura-dynamika-funkcja w enzymach .....	28
5.2.2	Opracowywanie narzędzi obliczeniowych do inżynierii białek.....	29
5.2.3	Opracowywanie narzędzi obliczeniowych na potrzeby medycyny precyzyjnej .....	30
5.2.4	Opracowanie narzędzi obliczeniowych do analizy transportu ligandów.....	30
5.2.5	Racjonalna inżynieria białek .....	31
5.2.6	Pozostałe wyniki badań .....	32
5.3	Wyniki badań uzyskane w Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu .....	33
6	Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę .....	35
6.1	Działalność dydaktyczna.....	35
6.2	Nadzór nad studentami.....	36
6.3	Działalność organizacyjna .....	37
6.4	Działalność popularyzująca naukę .....	37
7	Referencje .....	38

## 1 Imię i nazwisko

**Jan Brezovský**

ORCID: [0000-0001-9677-5078](https://orcid.org/0000-0001-9677-5078)

Researcher-ID: [C-8290-2012](https://orcid.org/C-8290-2012)

Google Scholar: <https://scholar.google.com/citations?user=I9nB-MwAAAAJ&hl=en>

## 2 Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne – z podaniem podmiotu nadającego stopień, roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

- 2011:** Doktorat w dziedzinie chemii środowiskowej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Tytuł pracy: *Komputerowe modelowanie enzymów.*
- 2006:** Magister w dziedzinie biofizyki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Tytuł pracy: *Wspomagane komputerowo badanie enzymatycznej dehalogenacji DDT.*
- 2004:** Licencjat w dziedzinie biofizyki, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Tytuł pracy: *Wpływ przeciwnowotworowych kompleksów metali na stabilność termodynamiczną DNA.*

## 3 Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

- 12/2016–teraz:** Kierownik Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu, afiliowane wspólnie w Instytucie Biologii Molekularnej i Biotechnologii Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu oraz w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie.
- 1–10/2016:** Adiunkt w Zakładzie Biologii Doświadczalnej, Wydziału Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Republika Czeska.
- 2013–2016:** Stażysta podoktorski, Międzynarodowe Centrum Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego św. Anny, Republika Czeska.
- 2012–2015:** Młodszy Lider Zespołu, Laboratoria Loschmidta, Centrum Badań nad Związkami Toksykami w Środowisku, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Republika Czeska.

#### 4 Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.)

##### 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

##### ***Rola szlaków transportu ligandów i ich uwodnienia w katalizie enzymatycznej***

##### 4.2 Wykaz publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zawarte w niniejszej rozprawie habilitacyjnej

Przedstawione osiągnięcie naukowe składa się z sześciu oryginalnych, wzajemnie powiązanych ze sobą prac badawczych (P1-P6), które skupiają się na oddziaływaniach enzymów z cząsteczkami wody oraz transporcie ligandów, a także dotyczą narzędzi obliczeniowych do ich analiz. Publikacje te zostały opublikowane w latach 2014-2021 (\* - pierwsi współautorzy; # – autor/autorzy do korespondencji:

- P1.** Sykora J,\* Brezovsky J,\* Koudelakova T,\* Lahoda M, Fortova A, Chernovets T, Chaloupkova R, Stepankova V, Prokop Z, Kuta Smatanova I, Hof M,# Damborsky J,# 2014: Dynamics and Hydration Explain Failed Functional Transformation in Dehalogenase Design. **Nature Chemical Biology** 10: 428-430.

**IF<sub>2014</sub> = 12,996 IF<sub>5-letni</sub> = 15,668 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 37**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: zaprojektowanie protokołów obliczeniowych, wykonanie symulacji dynamiki molekularnej i ich analiza, interpretacja danych w kontekście wyników eksperymentalnych, udział w napisaniu manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 20%.*

- P2.** Amaro M, Brezovsky J, Kovacova S, Sykora J, Bednar D, Nemeč V, Liskova V, Kurumbang NP, Beerens K, Chaloupkova R, Paruch K, # Hof M, # Damborsky J, # 2015: Site-Specific Analysis of Protein Hydration Based on Unnatural Amino Acid Fluorescence. **Journal of the American Chemical Society** 137: 4988-4992.

**IF<sub>2015</sub> = 13,038 IF<sub>5-letni</sub> = 15,801 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 20**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: zaprojektowanie protokołów obliczeniowych, nadzór nad badaniami obliczeniowymi, wykonanie symulacji dynamiki molekularnej enzymów DbjA, analiza danych z symulacji molekularnych dla wszystkich badanych układów, interpretacja danych w kontekście wyników eksperymentalnych, udział w napisaniu manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 20%.*

- P3.** Brezovsky J,\* Babkova P,\* Degtjarik O, Fortova A, Gora A, Iermak I, Rezacova P, Dvorak P, Kuta Smatanova I, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J,# 2016: Engineering a De Novo Transport Tunnel. **ACS Catalysis** 6: 7597-7610.

**IF<sub>2016</sub> = 10,614 IF<sub>5-letni</sub> = 13,721 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 47**

*Mój wkład w powstanie tej publikacji był następujący: zaprojektowanie protokołów obliczeniowych, nadzór nad badaniami obliczeniowymi, wykonanie i analiza symulacji dynamiki molekularnej w celu wyjaśnienia mechanizmów stojących za obserwowanymi efektami mutacji,*

objęcie kierownictwa nad pisaniem manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 25%.

- P4.** Vavra O, Filipovic J, Plhak J, Bednar D, Marques SM, Brezovsky J, Stourac J, Matyska L, Damborsky J,<sup>#</sup> 2019: CaverDock: A Molecular Docking-Based Tool to Analyse Ligand Transport through Protein Tunnels and Channels. *Bioinformatics* 35: 4986-4993

**IF<sub>2019</sub> = 5,610 IF<sub>5-letni</sub> = 8,470 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 20**

Mój wkład w te badania był następujący: opracowanie wstępnej metody weryfikacji koncepcji, która zmotywowała i umożliwiła rozwój narzędzia CaverDock, udział w napisaniu manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 10%.

- P5.** Stourac J, Vavra O, Kokkonen P, Filipovic J, Pinto G, Brezovsky J, Damborsky J, Bednar D,<sup>#</sup> 2019: Caver Web 1.0: Identification of Tunnels and Channels in Proteins and Analysis of Ligand Transport. *Nucleic Acids Research* 46: W414-422.

**IF<sub>2019</sub> = 11,502 IF<sub>5-letni</sub> = 15,542 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 44**

Mój wkład w te badania był następujący: nadzorowanie rozwoju zautomatyzowanego przepływu pracy dla analiz tuneli stanowiących zaplecze prezentowanego serwera, z wyjątkiem analiz z jawną reprezentacją ligandów w oparciu o CaverDock, udział w napisaniu manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 10%.

- P6.** Brezovsky J,<sup>#</sup> Thirunavukarasu AS, Surpeta B, Sequeiros-Borja CE, Mandal N, Sarkar DK, Dongmo Fomthum CJ, Agrawal N, 2021: TransportTools: A Library for High-Throughput Analyses of Internal Voids in Biomolecules and Ligand Transport Through Them. *Bioinformatics* DOI: 10.1093/bioinformatics/btab872.

**IF<sub>2020</sub> = 6,937 IF<sub>5-letni</sub> = 8,470 punkty MNiSW<sub>2021</sub> = 200 cytowania<sub>WoS-Luty-2022</sub> = 0**

Mój wkład w to badanie był następujący: opracowanie projektu badawczego i nowego narzędzia obliczeniowego, zaprojektowanie i zaimplementowanie znacznej większości algorytmów i testów oraz przygotowanie dokumentacji użytkowej i technicznej narzędzia, koordynacja pracy zespołu nad projektem, analiza i interpretacja danych, napisanie manuskryptu. Mój wkład w powstanie tej publikacji oceniam na 60%.

**Całkowity współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych publikacji: 60,7**

**Średni współczynnik oddziaływania (IF) wymienionych publikacji: 10,1**

**Suma punktów MNiSW<sub>2021</sub> wymienionych publikacji: 1 200**

## 4.3 Opis osiągnięcia naukowego

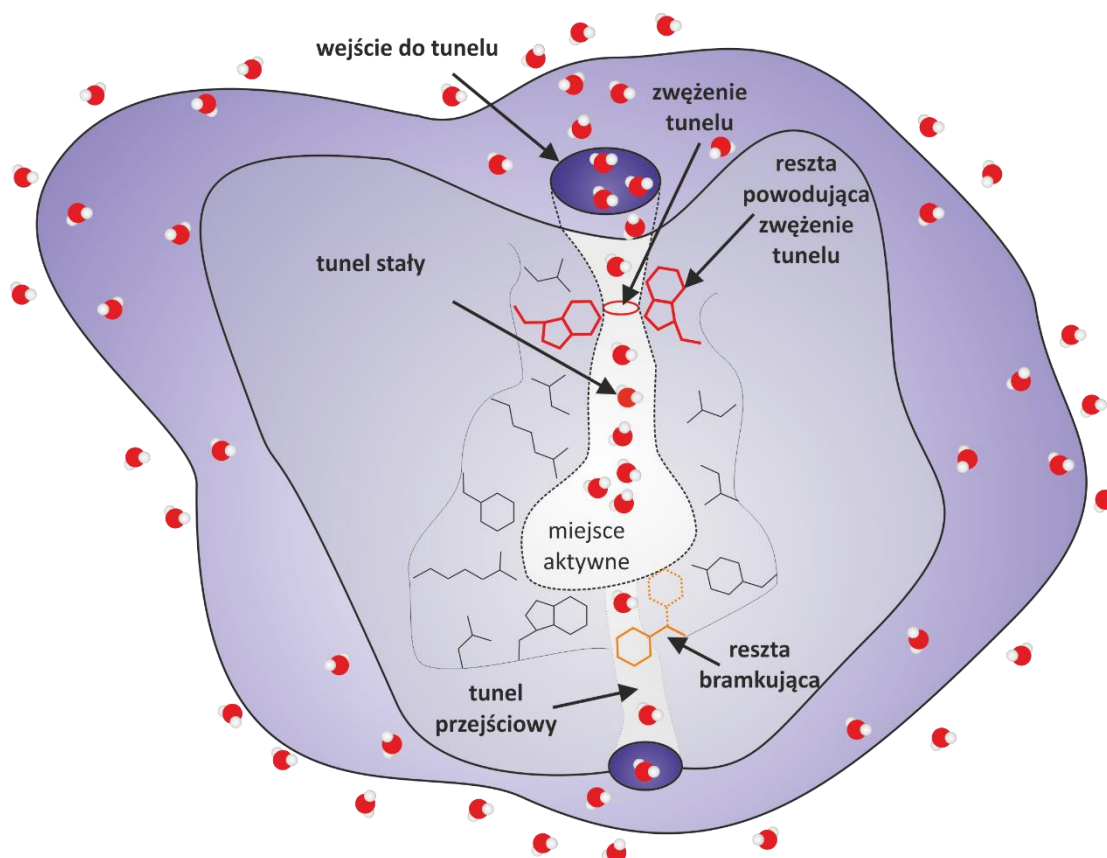
### 4.3.1 Wprowadzenie

W każdej chwili żywa komórka wymaga bardzo sprawnego przeprowadzenia wielu równoległych reakcji chemicznych katalizowanych przez enzymy, które zwykle są połączone w szlaki biochemiczne, które muszą być ściśle regulowane w celu utrzymania homeostazy biologicznej. Reakcje te zachodzą w miejscach aktywnych enzymów, które muszą osiągnąć pewien poziom plastyczności, od fluktuacji na poziomie niższym niż 1 Å do znaczących zmian konformacyjnych (Callender and Dyer, 2015; Gora *et al.*, 2013). Dynamiczna natura enzymów jest zależna od ich osadzenia w środowisku komórkowym, gdzie ich najważniejszymi partnerami interakcji są cząsteczki wody. Konkurując o wiązania wodorowe wewnątrz cząsteczki białka, cząsteczki wody działają jak smar molekularny, rozluźniając strukturę białka do poziomu krytycznego dla jego funkcji (Ball, 2008). Występuje również wzajemny wpływ na dynamikę obu partnerów, w wyniku czego ruchliwość cząsteczek wody w pobliżu powierzchni białek ulega niewielkiemu, 3-5-krotnemu spowolnieniu (Daniel *et al.*, 2004; Grebenkov *et al.*, 2009). Wreszcie, interakcja między powstającym peptydem a cząsteczkami wody jest główną siłą napędową procesu związania przestrzennego białek.

Ze względu na dużą ilość cząsteczek wody w komórce, mogą one wnikać głęboko w strukturę białka. W rzeczywistości, zasadniczo wszystkie amidy szkieletu białkowego w pewnym momencie wchodzą w kontakt z cząsteczkami rozpuszczalnika, co wykazały eksperymenty polegające na monitorowaniu wymiany wodoru na deuter w białku. Z tego względu nie jest zbyt zaskakujące, że nawet w enzymach, których miejsca aktywne są głęboko osadzone w hydrofobowych rdzeniach, cząsteczki wody są często uwięzione w tych zagłębieniach (**Rysunek 1**), tworząc ściśle połączone wiązaniami wodorowymi klastry lub sieci ze względu na przeważnie niepolarny charakter tych miejsc (Rasaiah *et al.*, 2008). Z funkcjonalnego punktu widzenia, te znajdujące się wewnątrz struktury białka cząsteczki wody mogą pośredniczyć w oddziaływaniach stabilizujących ligandy w miejscach aktywnych, przyczyniając się w ten sposób do promiskuityczności takiego rozpoznawania, i odwrotnie, przemieszczenie związanych cząsteczek wody może stanowić karę za desolvatację, która zwiększa specyficzność enzymu (Ball, 2008). Cząsteczki wody są również niezbędnymi kosubstratami w reakcjach hydrolitycznych. Ponadto cząsteczki wody często odgrywają ważną rolę w końcowej części cykli katalitycznych, rozpuszczając polarne produkty reakcji (Biedermannova *et al.*, 2012; Fan *et al.*, 2019), przyspieszając w ten sposób ich uwalnianie, a także wypłukując produkty uwięzione w rozległych sieciach szczelin (Kaieda and Halle, 2013).

Tak głęboko osadzone miejsca aktywne są połączone z rozpuszczalnikiem poprzez molekularne ścieżki transportowe zwane tunelami (**Rysunek 1**). Obecność tuneli została opisana w przypadku wielu

enzymów z sześciu klas komisji enzymatycznej, jak również czterech głównych klas strukturalnych (Prokop *et al.*, 2012; Gora *et al.*, 2013). Autorzy najnowszych badań szacują, że tunele są obecne w ponad 50% enzymów (Pravda *et al.*, 2014; Monzon *et al.*, 2017). Anatomia, właściwości fizykochemiczne i dynamika tuneli decydują o szybkości wymiany substratów i produktów między miejscami aktywnymi a przestrzenią rozpuszczalnika (Kingsley and Lill, 2015). Ponadto tunele mogą pełnić bardziej zaawansowane funkcje, takie jak (i) umożliwianie dostępu do preferowanych substratów, przy jednoczesnym uniemożliwianiu dostępu do substratów niepreferowanych, a tym samym zapobieganie tworzenia nieproduktywnych kompleksów, (ii) ochrona metali przejściowych znajdujących się w miejscach aktywnych, (iii) zapobieganie uszkodzeniu komórki przez uwalnianie toksycznych produktów pośrednich, (iv) umożliwianie reakcji wymagających braku wody oraz (v) synchronizowanie reakcji wymagających kontaktu dużej liczby substratów, produktów pośrednich lub kofaktorów (Marques *et al.*, 2016). Inżynieria reszt aminokwasowych, które tworzą tunele, prowadzi często do powstania zmutowanych enzymów o znacznie zmienionych właściwościach katalitycznych, w tym aktywności enzymatycznej (Brezovsky *et al.*, 2016; Pavlova *et al.*, 2009; Biedermannova *et al.*, 2012), specyficzności (Chaloupkova *et al.*, 2003) lub enancjoselektywności (Prokop *et al.*, 2010). Znaczenie biologiczne tuneli dodatkowo podkreśla fakt, że wiele enzymów, o których wiadomo, że zawierają tunele molekularne, ma związek z rozwojem różnych chorób (Marques, Daniel, *et al.*, 2017) oraz że inhibitory wiążące się z tymi tunelami mogą stać się skutecznymi lekami (Liu *et al.*, 2000; Sanson *et al.*, 2011).



**Rysunek 1. Schemat tuneli transportowych łączących głęboko osadzone miejsca aktywne z przestrzenią rozpuszczalnika.** Cząsteczki wody oznaczono biało-czerwonymi sferami. (Źródło: Ta praca)

W wielu enzymach zidentyfikować można kilka przypuszczalnych tuneli, tworzących sieci o nietrywialnej topologii. W niektórych z tych enzymów poznano preferencje poszczególnych ligandów do wychodzenia/wchodzenia przez poszczególne tunele, zakładając niezależność tych procesów transportu (Cojocar *et al.*, 2007; Klvana *et al.*, 2009). Jednakże w rzeczywistych scenariuszach, w których zarówno substraty, jak i produkty muszą współistnieć, a ze względu na podobieństwa często mają podobne pierwszeństwo w przechodzeniu przez dostępne tunele (Brezovsky *et al.*, 2016; Marques, Dunajova, *et al.*, 2017), możemy spodziewać się poważnych zakłóceń w takich procesach transportu. Na przykład w przypadku acetylocholinoesterazy z aflatoksyną związaną w głównym tunelu (Sanson *et al.*, 2011) oraz dehalogenaz z produktami reakcji blokującymi wylot głównego tunelu prowadzącego do miejsca aktywnego (Brezovsky *et al.*, 2016), zaobserwowano wyraźniejsze przemieszczanie się cząsteczek wody przez alternatywne tunele. Co ciekawe, enzymy z głęboko osadzonymi miejscami aktywnymi mogą wykazywać złożone zachowania kinetyczne (Zhu *et al.*, 2016; Pang and Zhou, 2017). Dowiedziono, że różne ligandy związane z powierzchnią białka w pobliżu wejścia do tunelu lub wewnątrz tunelu mogą wpływać na konformację lub dynamikę tego tunelu i innych tuneli w enzymie (Stepankova, Khabiri, *et al.*, 2013; Kingsley and Lill, 2014a). Przy wyższym stężeniu ligandów owe miejsca wiązania ligandów byłyby często zajmowane, co w znacznym stopniu



wpływałyby na ruch w tunelach. Takie efekty allosteryczne stanowią jedno z prawdopodobnych źródeł nietypowej kinetyki enzymów (Denisov and Sligar, 2012), tj. inhibicji substratowej i kooperatywności. Oba zjawiska są szeroko rozpowszechnione w enzymach i dowiedziono, że zapewniają szeroki zakres istotnych funkcji biologicznych, np. zapewniają stabilne tempo syntezy dopaminy, zapobiegają nadmiernej degradacji acetylocholin w szczelinie synaptycznej lub umożliwiają wysoce czułe wykrywanie glukozy w całym zakresie stężeń fizjologicznych (Porter and Miller, 2012; Reed *et al.*, 2010). W szczególności, takie zjawiska kinetyczne występują w wielu enzymach z tunelami, takich jak cytochrom P450 (Denisov *et al.*, 2009; Wu, 2011), acetylocholinoesteraza (Colletier *et al.*, 2006), lub dehalogenaza haloalkanowa (Stepankova, Paterova, *et al.*, 2013; Marques, Dunajova, *et al.*, 2017; Biedermannova *et al.*, 2012; Brezovsky *et al.*, 2016). Na przykład, mutanty tych enzymów ze zmodyfikowanymi tunelami transportowymi wykazują znaczące zmiany w inhibicji substratowej i kooperatywności, co wskazuje na tunele enzymatyczne jako cechy strukturalne odpowiedzialne za te mechanizmy regulacyjne (Denisov and Sligar, 2012; Marques, Dunajova, *et al.*, 2017; Stepankova, Paterova, *et al.*, 2013; Biedermannova *et al.*, 2012; Brezovsky *et al.*, 2016).

W niektórych przypadkach geometrię tuneli poznać można badając struktury białek. Krystalografia rentgenowska jest jednym z podstawowych źródeł informacji strukturalnej o białkach, jednak w większości przypadków dostarcza jedynie statycznych obrazów pojedynczej konformacji. Pomimo tego, struktury niektórych białek zostały określone w kilku różnych konformacjach, co umożliwia wgląd w ich dynamikę bezpośrednio z danych strukturalnych (Flores *et al.*, 2006). Jeśli chodzi o znaczenie biologiczne tuneli, to obecność ligandów (Xu *et al.*, 2012), cząsteczek wody (Oprea *et al.*, 1997) lub ksenonu pod ciśnieniem (Winter *et al.*, 2011) w tunelach stanowi dowód na ich znaczenie. W przypadku braku tego typu danych strukturalnych, będącego częstą sytuacją, najnowocześniejszym podejściem do badania wykorzystania poszczególnych tuneli przez konkretne ligandy w danym białku jest połączenie symulacji dynamiki molekularnej (MD – ang. *Molecular Dynamics*) z pośrednimi metodami eksperymentalnymi (Chovancova *et al.*, 2012; Liskova *et al.*, 2015; Paloncyova *et al.*, 2016; Biedermannova *et al.*, 2012; Brezovsky *et al.*, 2016), takimi jak np. określenie zmiany aktywności enzymu lub szybkości wiązania/uwalniania ligandu po wprowadzeniu mutacji do tunelu (Pavlova *et al.*, 2009; Liskova *et al.*, 2015; Chaloupkova *et al.*, 2003; Biedermannova *et al.*, 2012). Jeśli chodzi o doświadczalny wgląd w migrację cząsteczek wody przez wnętrza białek, do badania wolno migrujących cząsteczek wody można zastosować eksperymenty dyspersji relaksacji magnetycznej (ang. *magnetic relaxation dispersion*). Z drugiej strony, pomiary spektroskopowe zależnych od czasu przesunięć Stokesa mogą być wykorzystane do badania lokalnej dynamiki rozpuszczalnika wokół sondy fluorescencyjnej (Laage *et al.*, 2017).

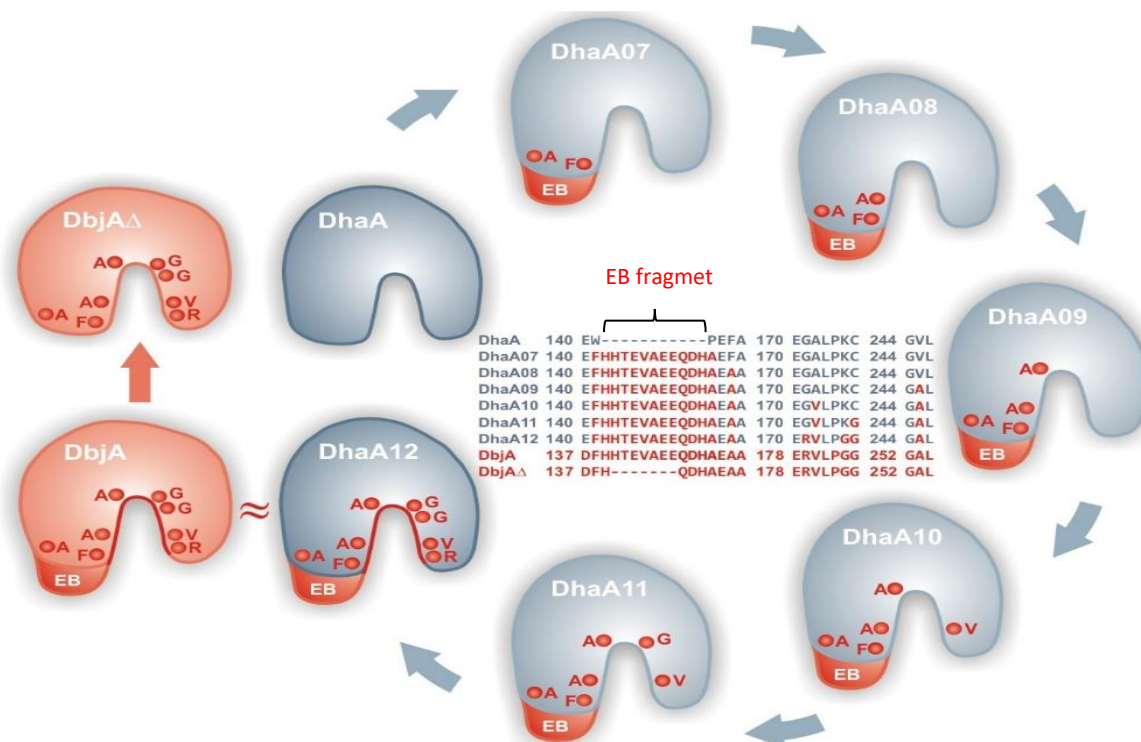
Główne wyzwania w zrozumieniu transportu ligandów wynikają z faktu, że tunele są przejściowe (**Rysunek 1**), wyposażone w różne formy bram molekularnych (Gora *et al.*, 2013), i dlatego nawet ich wstępna identyfikacja musi być przeprowadzona na zespołach struktur białkowych (Chovancova *et al.*, 2012; Kingsley and Lill, 2014a, 2015; Marques *et al.*, 2016). Ze względu na niską częstotliwość otwierania tuneli i następującej po tym migracji ligandów, ich dokładne zbadanie wymaga masowego próbkowania przestrzeni konformacyjnej, nawet w przypadku transportu nadmiernej ilości cząsteczek wody. Mimo to, dzięki intensywnemu rozwojowi możliwości obliczeniowych, ulepszonym algorytmom próbkowania i ich wydajnym implementacjom, nastąpił znaczny postęp w badaniach migracji ligandów wewnątrz enzymów (Bernetti *et al.*, 2017; Schuetz *et al.*, 2017; Pang and Zhou, 2017). Dotychczas symulacje MD wykorzystujące różne metody biasingu (ang. *biasing methods*) zostały z powodzeniem zastosowane do ujawnienia kluczowych szczegółów molekularnych migracji ligandów w wielu enzymach, np. w kinazie Src (Shan *et al.*, 2011), fosforylaze nukleozydów purynowych (Decherchi *et al.*, 2015), cytochromach P450 (Kingsley and Lill, 2014b), izomerazie peptydylowo-prolylowej (Dickson and Lotz, 2016), i proteazie serynowej (Plattner and Noé, 2015). Obecnie, wśród najbardziej popularnych metod badania wolnych stopni swobody istotnych dla procesów wiązania/uwalniania ligandów, znajdują się różne implementacje metod takich jak próbkowanie parasolowe (ang. *umbrella sampling*) (Torrie and Valleau, 1977), sterowana MD (ang. *steered MD*) (Grubmüller *et al.*, 1996), przyspieszona temperaturowo MD (ang. *temperature-accelerated MD*) (Maragliano and Vanden-Eijnden, 2006), metadynamika (ang. *metadynamics*) (Laio and Parrinello, 2002; Limongelli *et al.*, 2010), losowo przyspieszona MD (ang. *random acceleration MD*) (Lüdemann *et al.*, 2000), skalowana MD (ang. *scaled MD*) (Mollica *et al.*, 2015), Gaussowsko przyspieszona MD (ang. *Gaussian accelerated MD*) (Miao *et al.*, 2015), różne odmiany milestoneingu (ang. *milestoning*) (Vanden-Eijnden and Venturoli, 2009; Votapka *et al.*, 2017), a także kilka wysoce równoległych metod próbkowania adaptacyjnego (ang. *adaptive sampling*) (Doerr and De Fabritiis, 2014; Bowman *et al.*, 2010). Dodatkowy poziom złożoności pojawia się podczas analiz dotyczących transportu cząsteczek wody z tych symulacji. Należy wziąć pod uwagę ogromną liczbę cząsteczek wody i prześledzić ich ruch, co wymaga specjalnych narzędzi obliczeniowych (Mitusińska *et al.*, 2020).

#### 4.3.2 Badanie powiązań między hydratacją, transportem ligandów i funkcją enzymów

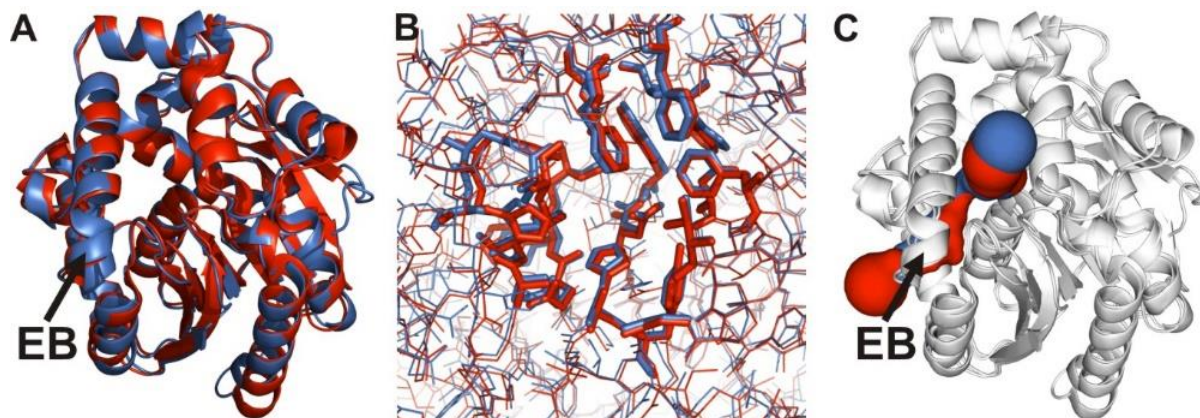
Nasza podróż w kierunku głębszego zrozumienia wzajemnego oddziaływania pomiędzy hydratacją, transportem molekularnym i działaniem enzymów była motywowana dwoma kluczowymi odkryciami uzyskanymi w trakcie moich badań doktoranckich (więcej szczegółów w **Rozdziale 5.1**). (i) W trakcie opracowywania metod badania dynamiki hydratacji w precyzyjnej lokalizacji określonej przez kowalencyjnie połączony znacznik fluorescencyjny, dowiedzieliśmy się, że dehalogenaza haloalkanowa DbjA z *Bradyrhizobium japonicum* ma około dwukrotnie większy poziom hydratacji na

wejściu do tunelu, jak również znacznie większą dynamikę tego regionu w porównaniu z homologicznym enzymem DhaA z *Rhodococcus rhodochrous* (Jesenská *et al.*, 2009). (ii) Z badań nad molekularnymi podstawami enancjoselektywności w dehalogenazach wynika, że większość przedstawicieli tej rodziny potrafi rozróżniać enancjomery 2-bromopropionianu etylu, chociaż z różną skutecznością. Jednakże tylko enzym DbjA wykazywał tak wysoką enancjoselektywność w stosunku do strukturalnie znacznie prostszej cząsteczki 2-bromopentanu, co stanowi charakterystyczną cechę rozpoznawania molekularnego. Ta wyjątkowa selektywność DbjA była związana ze znacznym udziałem entropowym i okazała się podatna na inżynierię elastycznej pętli na powierzchni obok wejścia do tunelu (zwanego tutaj fragmentem EB – ang. *Extra fragment of Bradyrhizobium dehalogenase*), co sugeruje rolę hydratacji i/lub dynamiki enzymu w tym procesie rozpoznawania (Prokop *et al.*, 2010). W celu zbadania roli hydratacji i dynamiki w enancjodysryminacji 2-bromopentanu, stanowiącej **osiągnięcie naukowe P1**, przeprowadziliśmy wieloetapową transplantację miejsca aktywnego i pętli powierzchniowej EB z enzymu DbjA do enzymu DhaA (**Rysunek 2**), co doprowadziło do powstania stabilnego mutantu DhaA12 o zauważalnej aktywności dehalogenazowej (Sykora *et al.*, 2014).

Następnie, wykorzystaliśmy krystalografię rentgenowską do uzyskania struktury konstruktu DhaA12 o wysokiej rozdzielczości i porównaliśmy ją ze strukturą krystaliczną docelowego enzymu DbjA. Porównanie to pozwoliło nam potwierdzić udaną transplantację fragmentu EB z RMSD wszystkich atomów wynoszącym 1,6 Å, co wskazuje zbliżone ogólne sfałdowanie zarówno DbjA, jak i DhaA12 (**Rysunek 3A**). Skupiając się na regionach ważnych funkcjonalnie, zaobserwowaliśmy zasadniczo identyczne struktury ich miejsc aktywnych z RMSD równym 0,7 Å (**Rysunek 3B**) i równoważne tunele transportowe (**Rysunek 3C**). Ogólny wniosek z porównania tych teoretycznie najprawdopodobniejszych konformacji DbjA i DhaA12 był taki, że ich regiony funkcjonalne przyjęły tę samą strukturę. Co ciekawe, identyczność tych struktur przełożyła się również na wyraźny wzrost enancjoselektywności DhaA12 wobec  $\alpha$ -bromoestrów, osiągając poziom docelowego DbjA, ale nie przyniosła oczekiwanego wzrostu enancjoselektywności wobec 2-bromopentanu (**Tabela 1**).



**Rysunek 2. Transplantacja miejsca aktywnego i tunelu transportowego z DbjA do DhaA.** Enzymy te wykazują 59% podobieństwa sekwencji, a ich miejsca funkcjonalne różnią się fragmentem EB i ośmioma substytucjami aminokwasowymi (kolor czerwony). Transplantację przeprowadzono w kilku etapach, uzyskując konstrukty pośrednie, DhaA07-DhaA11. Mutant DhaA12 został zaprojektowany tak, aby posiadał to samo miejsce aktywne i tunel dostępowy, co docelowy DbjA (ciemnoczerwona linia), zachowując resztę kontekstu białkowego identyczną z wzorcowym DhaA (niebieski). Zaadaptowano z (Sykora *et al.*, 2014). Umiarkowanie enancjoselektywny wariant DbjAΔ, w którym brakuje fragmentu EB, może służyć jako kontrola (*dane niepublikowane*).



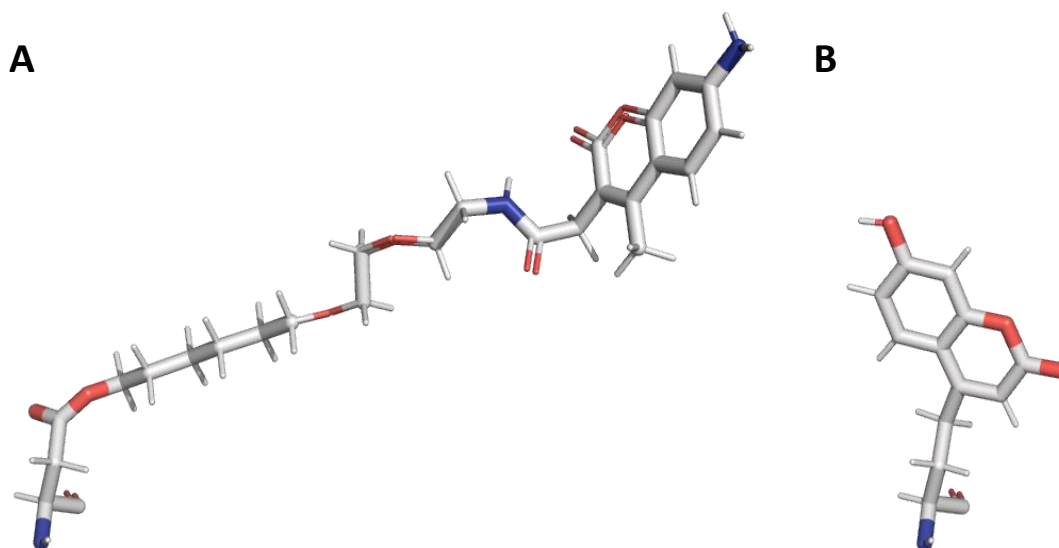
**Rysunek 3. Charakterystyka strukturalna zmodyfikowanej dehalogenazy DhaA12 (niebieski) z docelową DbjA (czerwony).** A) Superpozycja struktury całej cząsteczki w reprezentacji rysunkowej (ang. *cartoon representation*). B) Superpozycja reszt miejsca aktywnego przedstawionych za pomocą pogrubionych linii (ang. *sticks*). C) Zestawienie tuneli transportowych (powierzchnie niebieska i czerwona). Strzałka wskazuje położenie fragmentu EB. Zaadaptowano z (Sykora *et al.*, 2014).

**Tabela 1. Dynamika i hydratacja mikrośrodowiska wokół sondy zlokalizowanej na wejściu do tunelu czterech badanych dehalogenaz (Sykora *et al.*, 2014).**

	DhaA	DhaA12	DbjA	DbjAΔ
<b>Dynamika</b>				
Integralny czas relaksacji [ns]	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,3	2,8 ± 0,2	5,4 ± 0,4*
Integralny współczynnik temperaturowy (ang. <i>B-factor</i> ) wokół sondy [Å <sup>2</sup> ]	132	217	315	119*
<b>Hydratacja</b>				
Dynamiczne przesunięcie Stokesa [cm <sup>-1</sup> ]	950 ± 50	1000 ± 50	1300 ± 50	1100 ± 50*
Liczba cząsteczek wody w pierwszej powłoce solwatacyjnej sondy	6±2	6±2	10 ± 2	9±2*
<b>Enancjoselektywność jako wartości <i>E</i> (ang. <i>E-values</i>)</b>				
2-bromopentan	8	7	145	58#
2-bromopropionian etylu	72	>200	>200	>200#

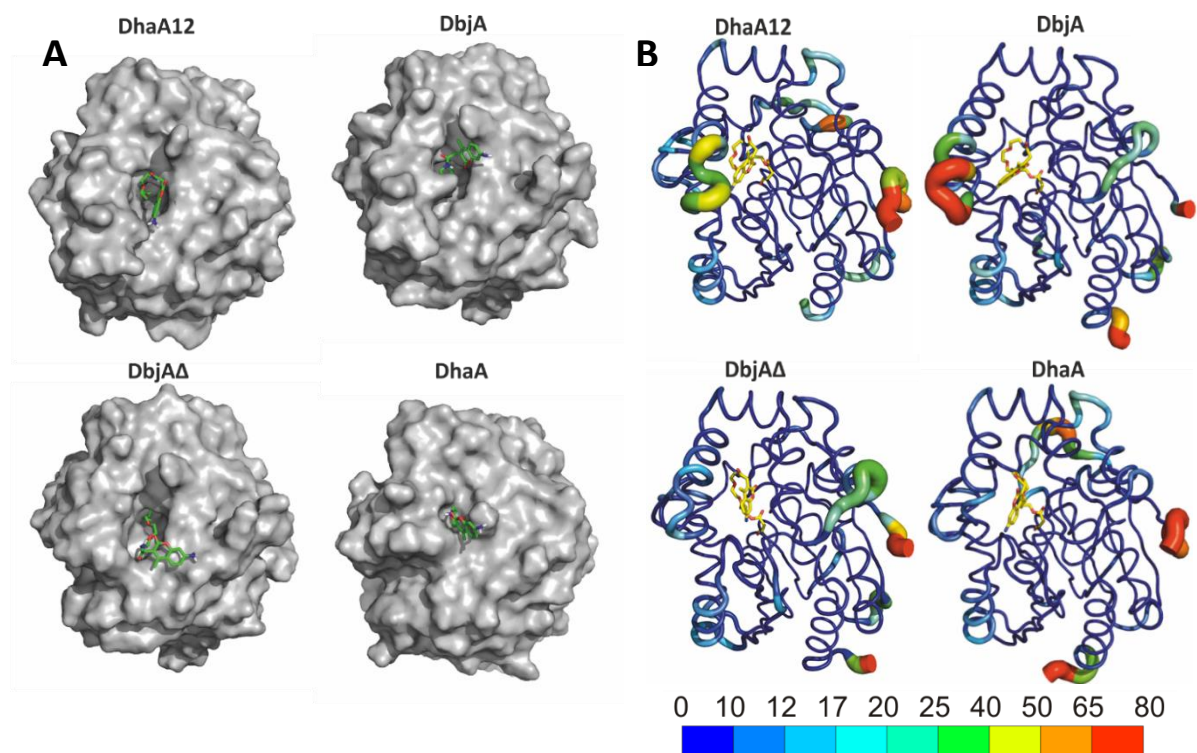
\* dane nieopublikowane; # z (Prokop *et al.*, 2010)

To ciekawe niepowodzenie w transplantacji pełnej funkcji potwierdziło, że inne czynniki kryjące się za strukturą regionów enzymatycznych, które konwencjonalnie uważano za funkcjonalnie niezbędne, mogą również znacząco zmieniać ich funkcję. Zainspirowani wspomnianym powyżej zwiększonym uwodnieniem i dynamiką wykrytą w wejściu do tunelu docelowego DbjA, skonstruowaliśmy mutanty histydyny katalitycznej i oznakowaliśmy te enzymy za pomocą kowalencyjnie przyłączonych znaczników fluorescencyjnych (**Rysunek 4A**). Procedura ta umieszcza barwnik reporterowy w pobliżu wejścia do tunelu prowadzącego do miejsca aktywnego enzymów (**Rysunek 5A**), co pozwala nam zastosować nasz protokół łączący symulacje i metody spektroskopowe (Jesenská *et al.*, 2009) do oceny tych czynników również w zmutowanych dehalogenazach.



**Rysunek 4. Struktury sond fluorescencyjnych użytych w badaniach prowadzących do osiągnięć P1 i P2.** A) Barwnik kumarynowy z długim linkerem węglowodorowym przyłączony kowalencyjnie do kwasu asparaginowego. B) Sztuczny aminokwas na bazie 7-hydroksy-4-metylokumaryny.

Podczas gdy wprowadzony fragment EB wyraźnie zwiększył dynamikę DhaA12 przy wejściu do tunelu (**Tabela 1 i Rysunek 5B**), relaksacja mikrośrodowiska wokół barwnika reporterowego znajdującego się w pobliżu wejścia do tunelu była tylko nieco szybsza niż w przypadku wzorca DhaA (**Tabela 1**), co wskazuje, że dynamika badanej warstwy hydratacyjnej pozostała zasadniczo niezmienną przez procedurę inżynieriyną pomimo zwiększonej dynamiki białka. Jeśli chodzi o poziom hydratacji na wejściach do tuneli, to zarówno dane symulacyjne, jak i wielkość zmiany fluorescencji zależnej od czasu wskazują na prawie niezakłóconą ilość cząsteczek wody w przypadku DhaA12, porównywalną do jego macierzystego DhaA i znacznie niższą niż hydratacja docelowego DbjA. W tym miejscu warto również rozważyć dane dostępne dla mutantu DbjAΔ (Prokop *et al.*, 2010). Mutant ten pozbawiony jest fragmentu EB i dlatego posiada węższe miejsce aktywne, co skutkuje umiarkowaną enancjoselektywnością wobec 2-bromopentanu (**Tabela 1**). Ponieważ w strukturze DbjAΔ nie występuje elastyczny fragment EB, ruchliwość wejścia do tunelu również znacznie się zmniejszyła, znacznie poniżej wartości obserwowanych w przypadku nioselektywnych wariantów DhaA (**Tabela 1 i Rysunek 5B**). Ta obserwacja może pomóc nam dostrzec zbieżność enancjoselektywności z 2-bromopentaniem wykazywaną przez mutantu DbjAΔ i jego hydratację wejścia do tunelu porównywalną z DbjA typu dzikiego.

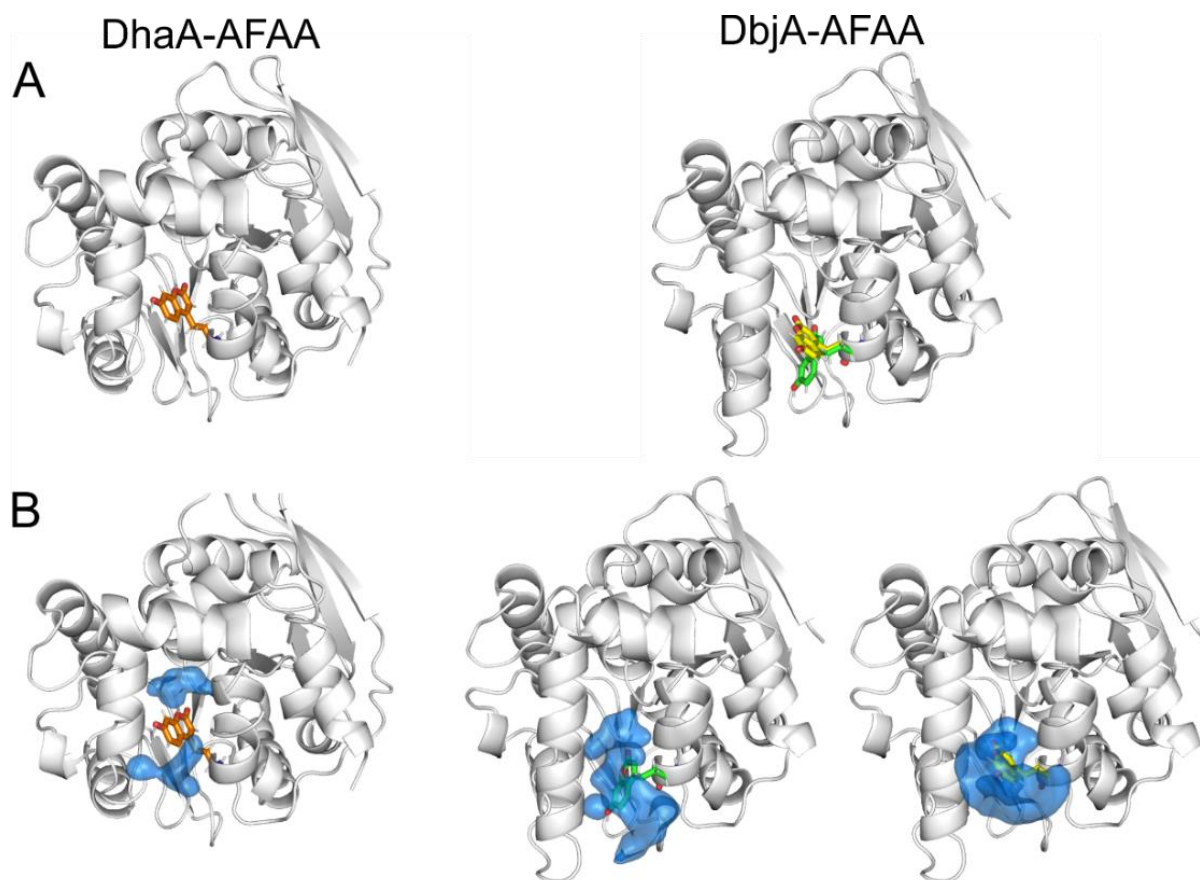


**Rysunek 5. Lokalizacja sond na powierzchni dehalogenaz typu dzikiego i zmutowanych oraz dynamika tych białek.** A) Lokalizacja kowalencyjnie przyłączonych reporterów fluorescencyjnych (w postaci zielonych pogrubionych linii ang. *sticks*) na powierzchni analizowanych białek (w kolorze szarym). B) Dynamika reszt określona przez współczynnik temperaturowy (ang. *B-factor*) z symulacji jest przedstawiona za pomocą skali kolorów oraz grubości wstęgi (ang. *ribbon*). Uśrednione struktury sond fluorescencyjnych z symulacji są zaznaczone żółtymi pogrubionymi liniami (ang. *sticks*), wskazującymi region badany przez eksperymenty spektroskopii zależnej od czasu. Zaadaptowano z (Sykora *et al.*, 2014).



Jeśli połączymy te odkrycia z obserwowaną rolą cząsteczek wody w zróżnicowanej stabilizacji enancjomerów 2-bromopentanu w pobliżu przeciwległych ścian miejsca aktywnego w obu wariantach DbjA (Prokop *et al.*, 2010), możemy zasadnie przyjąć, że hydratacja na wejściu do tunelu prowadzącego do miejsca aktywnego będzie również wpływać na liczbę i zachowanie cząsteczek wody obecnych w tych miejscach aktywnych, a tym samym na enancjoselektywność. Nasza obserwacja, że geometrycznie zoptymalizowane miejsce aktywne wprowadzone do enzymu DhaA12 może nadal znacznie różnić się od docelowego DbjA pod względem innych właściwości, takich jak hydratacja, która może znacząco wpływać na enancjoselektywność enzymu, sugeruje, że kontekst białkowy, składający się z regionów położonych daleko poza miejscem aktywnym, jest kluczowy dla katalizy enzymatycznej i dlatego powinien być brany pod uwagę podczas obliczeniowych strategii projektowania białek.

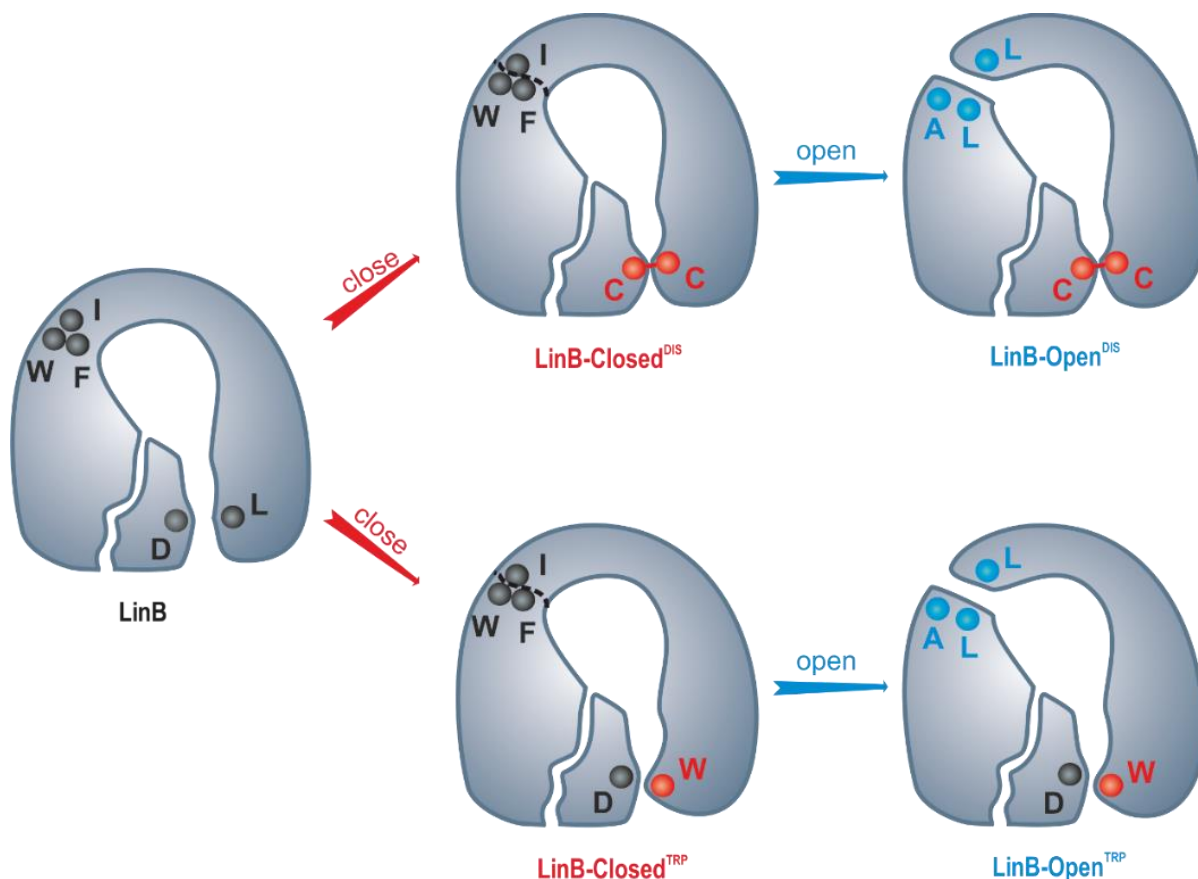
**Realizując kolejne osiągnięcie naukowe P2**, poszukiwaliśmy sposobu na skrócenie odległości między miejscem aktywnym a regionem badanym za pomocą spektroskopii fluorescencyjnej, aby móc potwierdzić zarysowaną zależność między strukturą i dynamiką cząsteczek wody przy wejściu do tunelu, a selektywnością względem enancjomerów 2-bromopentanu w miejscu aktywnym. Podjęliśmy to wyzwanie syntetyzując sztuczny aminokwas fluorescencyjny (AFAA – ang. *artificial fluorescent amino acid*) zawierający barwnik 7-hydroksy-4-metylokumarynowy i włączając go bezpośrednio do struktury dehalogenaz DhaA i DbjA (Amaro *et al.*, 2015). Zaletą zastosowania AFAA było to, że miejsce aktywne enzymu pozostało w większości niezmienione, co potwierdziły analizy dichroizmu kołowego i pomiary aktywności. Ponadto, ze względu na stosunkowo niewielki rozmiar AFAA (**Rysunek 4B**), który jest porównywalny do reszty tryptofanu, oraz brak długiego linkera wymaganego przez poprzednie reporterowe sondy fluorescencyjne, AFAA można było osadzić głębiej w tunelu transportowym (**Rysunek 6A**), w przeciwieństwie do bardziej odsłoniętych miejsc sond fluorescencyjnych wykorzystujących kowalencyjne linkery oparte na węglowodorach w **osiągnięciu naukowym P1** (**Rysunek 5A**). Pomimo bardziej zagłębionej lokalizacji, nadal potwierdziliśmy około dwukrotnie większą hydratację enancjoselektywnego DbjA niż nieselektywnego DhaA (**Rysunek 6B**). W rzeczywistości, wykryliśmy większą średnią liczbę cząsteczek wody przy użyciu AFAA, co można przypisać nieobecności długiego kowalencyjnego linkera łączącego fluorescencyjny reporter z nukleofilem katalitycznym na dnie kieszeni miejsca aktywnego, co uniemożliwiało pozycjonowanie cząsteczek wody w pobliżu sondy od wewnątrz kieszeni. Opracowane podejście gwarantuje specyficzne dla danego miejsca znakowanie AFAA, które jest niezależne od mechanizmu reakcji enzymatycznej, a dzięki niewielkiemu rozmiarowi łańcucha bocznego AFAA stanowi przejście w kierunku bardziej uniwersalnej procedury eksperymentalnej ukierunkowanej na badanie hydratacji białek.



**Rysunek 6. Położenie i hydratacja AFAA w dehalogenazach DhaA i DbjA.** A) Najbardziej dominujące konformacje AFAA (pomarańczowe, zielone i żółte pogrubione linie ang. *sticks*) w obu dehalogenazach (białe struktury w reprezentacji rysunkowej ang. *cartoon representation*). Zaobserwowaliśmy jedną przeważającą konformację AFAA w DhaA. Natomiast w DbjA AFAA może przyjmować dwie różne, ale równie prawdopodobne konformacje przy znacznie szerszym wejściu do tunelu. B) Niebieska powierzchnia przedstawia regiony w odległości do 5 Å od AFAA zajęte przez cząsteczki wody przez co najmniej 40% czasu symulacji. Zaadaptowano z (Amaro *et al.*, 2015).

Wreszcie, rozszerzyliśmy naszą uwagę z roli głównego tunelu transportowego w funkcjonowaniu enzymu na badanie sieci tuneli o bardziej złożonej topologii, obecnej w dehalogenazie LinB ze *Sphingomonas japonicum*, która stanowi test naszego zrozumienia transportu substratów, produktów i cząsteczek wody między przestrzenią rozpuszczalnika a miejscem aktywnym enzymów, czyli **osiągnięcie naukowe P3**. Na tym etapie najpierw zmniejszyliśmy znaczenie głównego tunelu, zamykając go za pomocą dwóch różnych metod. Następnie zbadaliśmy możliwość utworzenia nowego tunelu prowadzącego do miejsca aktywnego enzymu LinB poprzez sfunkcjonalizowanie potencjalnego, bardzo wąskiego tunelu za pomocą ewolucji ukierunkowanej (**Rysunek 7**), oceniając jednocześnie aktywność, stabilność, strukturę i mechanizmy reakcji uzyskanych konstruktów (Brezovsky *et al.*, 2016).

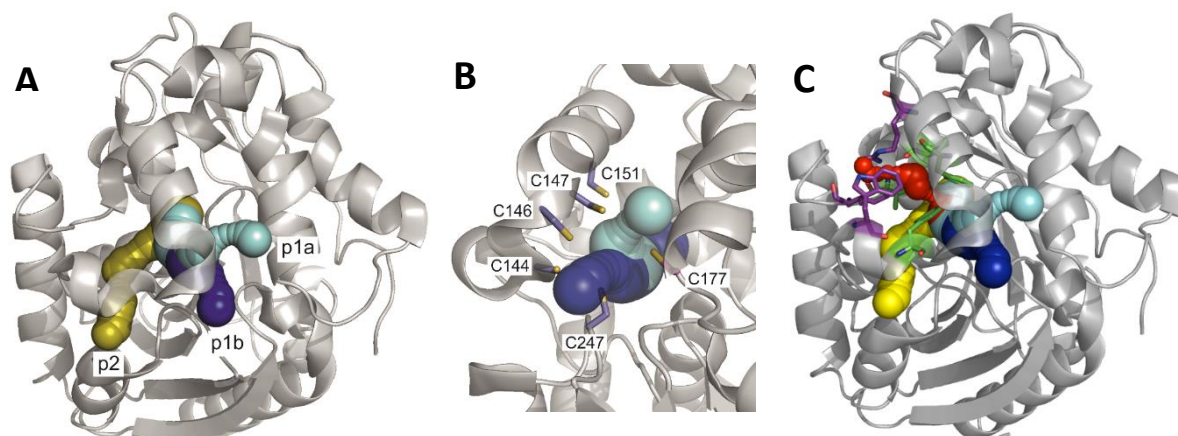




**Rysunek 7. Schemat strategii inżynierii stosowanej do badania tuneli transportowych w enzymie LinB.** W pierwszym etapie główny tunel enzymu LinB był zamykany albo przez mostek disiarczkowy w LinB-Closed<sup>DIS</sup>, albo przez wprowadzenie obszernego tryptofanu w LinB-Closed<sup>TRP</sup>. W drugim etapie, w wyniku ukierunkowanej ewolucji skupionej na trzech pozycjach, aktywowano nowy, potencjalny tunel. Struktury enzymów są zaznaczone kolorem szarym, a reszty biorące udział w inżynierii są zaznaczone czarnymi (typ dziki), czerwonymi (zamykającymi główny tunel) i niebieskimi (otwierającymi nowy tunel) sferami. Zaadaptowano z (Brezovsky *et al.*, 2016).

W pierwszym etapie skupiliśmy się na zamknięciu tunelu p1 enzymu LinB (**Rysunek 8A**) poprzez wprowadzenie mostka disiarczkowego do struktury, tak aby mostek disiarczkowy połączył przeciwległe helisy, pomiędzy którymi tworzą się tunele p1 (**Rysunek 8B**). Skonstruowano dwie pary mutacji o najkrótszej odległości między atomami siarki, L177C+D147C i L177C+A247C, i oceniono je za pomocą analizy MALDI-TOF, potwierdzając, że LinB-Closed<sup>DIS</sup> niosący mutacje L177C+D147C rzeczywiście posiada dobrze uformowany mostek disiarczkowy (Brezovsky *et al.*, 2016). Pomiary aktywności przy użyciu standardowego zestawu 30 substratów dehalogenaz (Koudelakova *et al.*, 2011) systematycznie wykazywały znaczny spadek obserwowanej aktywności specyficznej dla większości z tych substratów. Jednocześnie mutant ten wykazywał zmniejszoną szybkość katalityczną i bardzo silną inhibicję substratową podczas przekształcania 1,2-dibromoetanu. Eksperymenty prowadzone w warunkach przed osiągnięciem stanu równowagi wykazały, że uwalnianie produktu jest etapem ograniczającym szybkość tego cyklu katalitycznego, co potwierdza udane zamknięcie tunelu p1.

Niestety, zaobserwowaliśmy również obniżoną szybkość w chemicznych etapach cyklu, co wskazuje na niekorzystne efekty uboczne kowalencyjnego wiązania dwóch helis na strukturę lub dynamikę miejsca aktywnego.



**Rysunek 8. Sieć tuneli transportowych w enzymie LinB.** A) Struktura LinB jest przedstawiona za pomocą reprezentacji rysunkowej (ang. *cartoon representation*) w kolorze szarym, natomiast tunele zidentyfikowane w zestawie 12 struktur krystalicznych o minimalnej średnicy 2 Å są przedstawione jako sfery: p1a (cyjan), p1b (niebieski) i p2 (ciemnożółty). B) Pozycje cystein (zaznaczone w formie fioletowych pogrubionych linii ang. *sticks*) brane pod uwagę przy mutagenezie w celu zamknięcia tunelu p1 przez mostek disiarczkowy. Zaadaptowano z (Brezovsky *et al.*, 2016). C) Położenie potencjalnego tunelu p3 wybranego do otwarcia (na czerwono). Należy zauważyć, że tunel p3 jest w przybliżeniu prostopadły do wszystkich szerszych tuneli obecnych w enzymie typu dzikiego (p1a, p1b i p2), a więc stanowi obiecujący cel niezależnej modyfikacji. Reszty odpowiedzialne za utworzenie dwóch różnych regionów zwężenia są przedstawione w formie fioletowych i zielonych pogrubionych linii (ang. *sticks*). Zaadaptowano z (Brezovsky *et al.*, 2016).

Korzystając z kowalencyjnego zamknięcia tunelu p1 w LinB-Closed<sup>DIS</sup>, wykorzystaliśmy go jako matrycę do otwarcia nowego tunelu funkcjonalnego poprzez aktywację potencjalnego tunelu p3 (**Rysunek 8C**), który prowadzi przez inny region struktury białka niż znane tunele funkcjonalne. Trzy reszty, które w największym stopniu przyczyniły się do powstania dwóch zwężeń o wymiarach subatomowych, zidentyfikowanych w tym potencjalnym tunelu, zostały wybrane do mutagenezy (ang. *site-saturation mutagenesis*), umożliwiającej zastąpienie tych reszt mniejszymi. Późniejsze badania aktywności z użyciem od jednego do sześciu substratów i potwierdzenie obecności mostka disiarczkowego doprowadziły do identyfikacji mutantu LinB Open<sup>DIS</sup> niosącego następujące trzy mutacje w dawnych zwężeniach tunelu p3, W140+F143L+I211L. Mutant LinB Open<sup>DIS</sup> wykazywał około 35% wzrost aktywności w stosunku do zestawu 30 substratów, jak również wyraźnie zmniejszoną inhibicję substratową z 1,2-dibromoetanem w porównaniu z LinB Closed<sup>DIS</sup>. Jednak szybkość katalityczna mutantu otwartego z tym substratem pozostawała na poziomie mutantu zamkniętego (Brezovsky *et al.*, 2016). Na tym etapie postawiliśmy hipotezę, że o ile zamknięcie głównego tunelu opartego na mostku disiarczkowym było pomocnym narzędziem w części screeningowej projektu, ze względu na łatwo osiągalne potwierdzenie zamkniętych tuneli w ocenianych konstrukcjach za pomocą analiz

MALDI-MS/MS, to jednocześnie stanowiło radykalny zabieg o niepożądanych skutkach ubocznych dla niezwiązanych z transportem etapów katalitycznych.

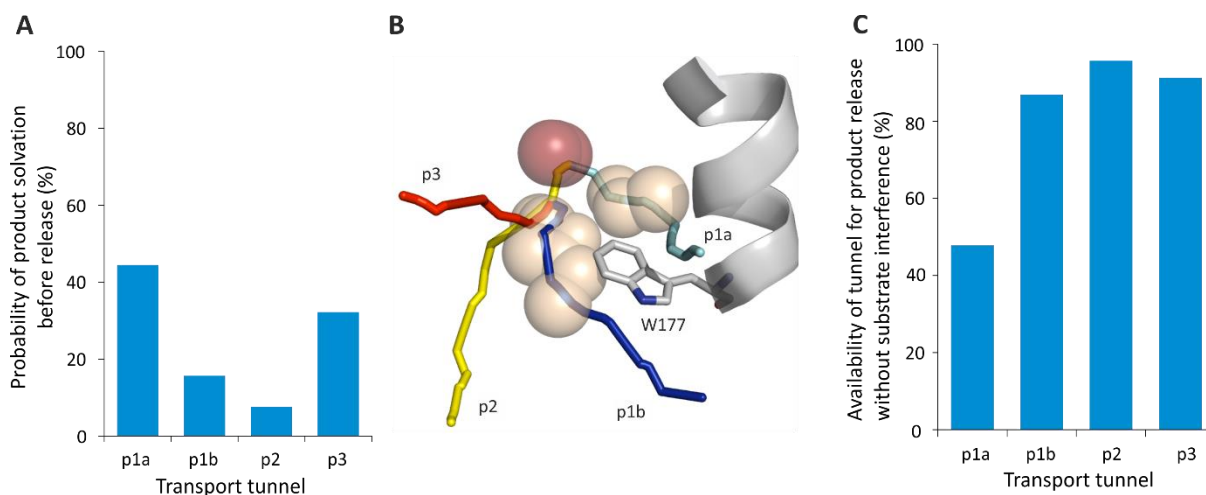
Co więcej, nie udało nam się uzyskać struktur krystalicznych ani LinB-Closed<sup>DIS</sup>, ani LinB-Open<sup>DIS</sup>, co uniemożliwiło nam potwierdzenie naszych przypuszczeń na temat natury obserwowanych zaburzeń w mechanizmach katalitycznych tych mutantów. Co ciekawe, późniejsze próby krystalizacji mutantu LinB-Closed<sup>DIS</sup> zakończyły się sukcesem po wyrastaniu kryształów białka przez 1.5 roku zamiast kilku dni typowych dla dehalogenaz typu dzikiego (Iermak *et al.*, 2021). Jednak uzyskana struktura krystaliczna o wysokiej rozdzielczości wykazała brak kowalencyjnego wiązania disiarczkowego, wskazując na obecność znacznych naprężeń w strukturze, spowodowanych jego wprowadzeniem.

W międzyczasie zwróciliśmy uwagę na inny konstrukt, LinB-Closed<sup>TRP</sup>, w którym transport przez tunel p1 był znacznie ograniczony przez wprowadzenie obszernego tryptofanu w pozycji 177 (Biedermannova *et al.*, 2012) i wprowadziliśmy mutacje otwierające tunel p3 do tego konstrukt, co doprowadziło do powstania mutantu LinB-Open<sup>TRP</sup> (**Rysunek 7**). Pomiarzy aktywności z tymi mutantami były zgodne z wcześniejszymi tendencjami, z niską ogólną aktywnością dla większości substratów wykazywaną przez mutant zamkniętego i przywróconymi poziomami aktywności przez mutant otwartego. Co więcej, aktywność mutantu LinB-Open<sup>TRP</sup> w przypadku 20 z 30 badanych substratów nawet przewyższała aktywność enzymu typu dzikiego. Ponadto, zaobserwowaliśmy silną inhibicję substratową i spadek szybkości katalitycznej w stosunku do 1,2-dibromoetanu w przypadku LinB-Closed<sup>TRP</sup>. W mutancie otwartym oba te efekty są odwrócone, znacznie przewyższając sprawność katalityczną LinB typu dzikiego. Co interesujące, korzystny wpływ otwarcia tunelu p3 na LinB Open<sup>TRP</sup> był powiązany nie tylko z poprawą szybkości uwalniania produktu, ale także ze znacznym zwiększeniem szybkości wszystkich etapów chemicznych (Brezovsky *et al.*, 2016).

Badania strukturalne z wykorzystaniem krystalografii rentgenowskiej potwierdziły udane zamknięcie tuneli p1 w obu mutantach zawierających mutacje L177W, a także obecność dobrze zdefiniowanego tunelu p3 w mutancie LinB Open<sup>TRP</sup>. Obserwacje te były zgodne z symulacjami MD tych enzymów, które potwierdziły znacznie mniejsze prawdopodobieństwo otwierania tuneli p1 i ich wykorzystania przez cząsteczki wody, w przeciwieństwie do enzymu typu dzikiego. Otwarcie tunelu p3 było znaczące tylko w mutancie LinB Open<sup>TRP</sup>, a częstotliwość i wydajność transportu cząsteczek wody była taka sama jak w przypadku innego znanego tunelu pomocniczego, p2. Co ważne, setki powtórzeń przyspieszonych symulacji MD uwalniania produktów wykazały podobne prawdopodobieństwo migracji produktów reakcji przez tunele p3 i p2. Chociaż większość uwalniania produktu zachodziła przez tunel p1a we wszystkich badanych wariantach LinB, rozpuszczanie produktu przez kilka cząsteczek wody, wymagane do skutecznego uwolnienia, zachodziło z równym prawdopodobieństwem przez tunele p1 i p3 (**Rysunek 9A**). Z tego punktu widzenia tunel p3 zapewniał

dotatkowy kanał dla cząsteczek wody, który dodatkowo nie był utrudniony przez masę związanych produktów, jak w przypadku tuneli p1 (**Rysunek 9B**), co w rezultacie przyczyniało się do zwiększonej wydajności katalitycznej mutantu LinB Open<sup>TRP</sup>.

Ponadto zauważyliśmy, że tunel p1a jest nie tylko preferowany przez opuszczające go cząsteczki produktów, ale także jest najczęstszą drogą wykorzystywaną przez cząsteczki substratów podczas ich wejścia do miejsca aktywnego (**Rysunek 9C**); dlatego też uwalnianie produktów przez tunel p1a będzie w wielu przypadkach utrudnione przez cząsteczki substratów, zwiększając w ten sposób względne znaczenie innych tuneli dla transportu produktów, w szczególności w warunkach nadmiaru cząsteczek substratów. Można również przypuszczać, że konkurencja między cząsteczkami substratu i produktu na drodze transportu jest odpowiedzialna za obserwowane wyraźne inhibicje substratowe w mutantach zamkniętych, które ulegają złagodzeniu w mutantach otwartych, zapewniających alternatywną drogę równoległej migracji tych cząsteczek przez rdzeń enzymu. Hipoteza ta została niedawno potwierdzona w dalszych badaniach, które wykazały, że cząsteczka substratu rzeczywiście uniemożliwia wyjście produktu halogenkowego poprzez bezpośrednie zablokowanie oraz prawdopodobne ograniczenie elastyczności konformacyjnej tunelu, w którym się wiąże (Kokkonen *et al.*, 2021).



**Rysunek 9. Wpływ inżynierii tuneli na uwalnianie produktów.** A) Prawdopodobieństwo początkowej solwatacji produktów przez określony tunel w symulacjach mutantu LinB-Open<sup>TRP</sup>, umożliwiającego wydajne uwalnianie produktów przez preferowany tunel p1a. B) Średnie położenie związanych produktów (jony bromku jako czerwone sfery i 2-bromoetanolu jako beżowe sfery) w stosunku do tuneli transportowych mutantu LinB-Open<sup>TRP</sup>. Poszczególne tunele pokazano jako kolorowe pogrubione linie (ang. *sticks*), strukturę białka przedstawiono na w rysunkowej reprezentacji (ang. *cartoon representation*) w kolorze szarym, a wprowadzony W177 jako szare pogrubione linie (ang. *sticks*). Najbardziej prawdopodobna lokalizacja produktów alkoholowych odpowiada tunelom p1a i p1b, utrudniając ich wykorzystanie przez cząsteczki wody. C) Prawdopodobieństwo uwolnienia produktów przez dany tunel bez interferencji z substratem zajmującym ten sam tunel. Zaadaptowano z (Brezovsky *et al.*, 2016).

Podsumowując, **osiągnięcie P3** pokazuje, że choć obecnie możliwe jest otwieranie i zamykanie tuneli transportowych z zadowalającą skutecznością, to przewidywanie wpływu takiej inżynierii na właściwości katalityczne jest niezwykle trudne. Biorąc pod uwagę skomplikowaną naturę procesów zachodzących w bardziej złożonych sieciach tuneli, w których tunele mogą mieć różną selektywność w stosunku do poszczególnych związków chemicznych biorących udział w cyklu enzymatycznym, konieczny krok naprzód będzie wymagał jednoznacznej oceny wpływu mutacji na wykorzystanie zaprojektowanych i wszystkich pozostałych funkcjonalnie istotnych tuneli obecnych w badanym enzymie przez substraty, produkty i cząsteczki wody (lub innego rozpuszczalnika), możliwie na wszystkich istotnych etapach cyklu katalitycznego.

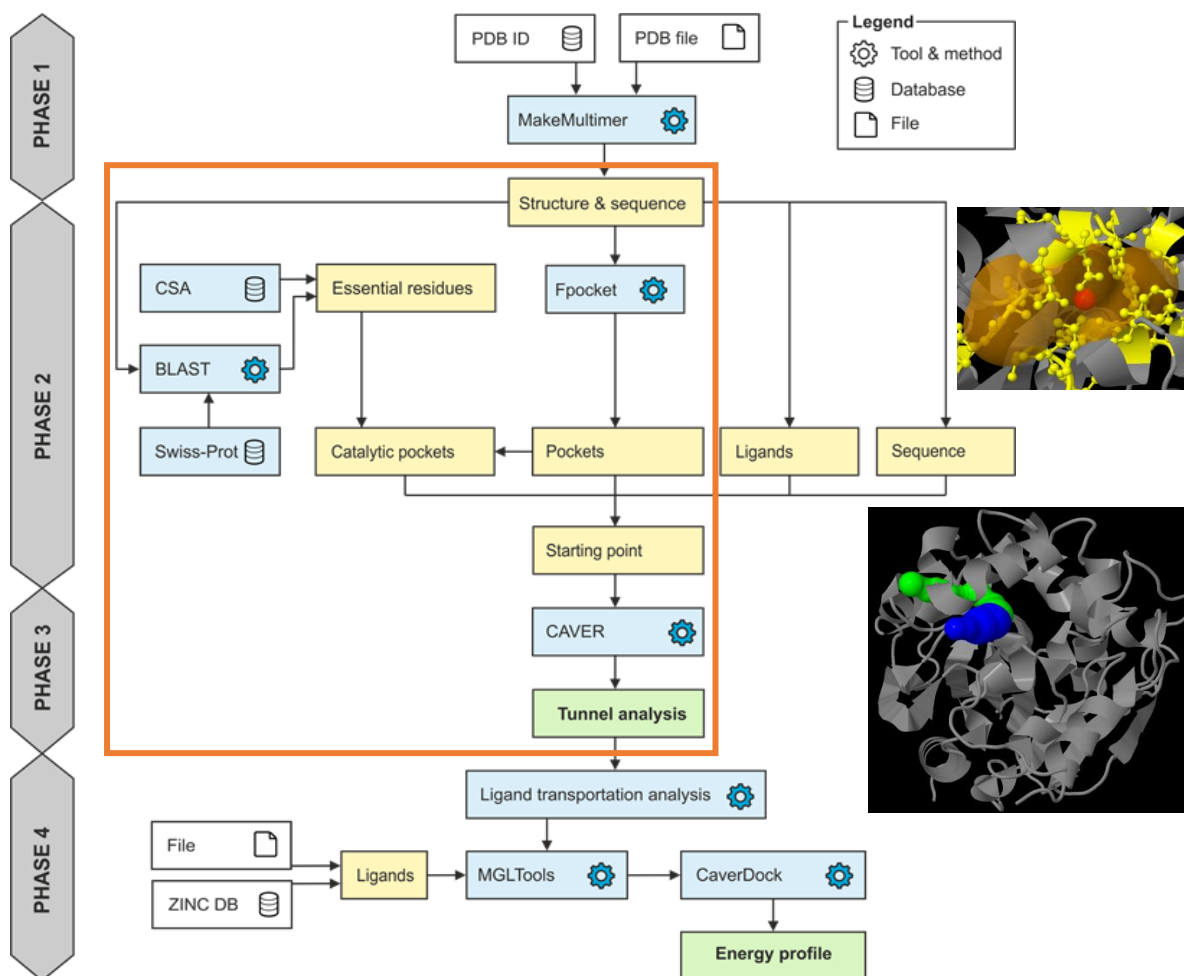
#### 4.3.3 Zwiększanie dostępności i zakresu narzędzi do analizy tuneli i migracji ligandów

Badania nad efektami transportu ligandów pomiędzy głęboko osadzonymi miejscami aktywnymi enzymów i ich inżynierią, prowadzone w ostatnich latach przez innych badaczy oraz przez nas, wyraźnie pokazały zalety takiego podejścia w uzyskiwaniu interesujących biokatalizatorów, jak również w zdobywaniu fundamentalnego wglądu w szerszą rolę transportu ligandów i hydratacji w katalizie enzymatycznej. Niektóre z najczęstszych barier w uwzględnianiu transportu ligandów w badaniach biochemicznych i bioinżynieryjnych opisano w **Rozdziałach 4.3.1 i 4.3.2**. Można je podzielić na potrzebę uchwycenia sporadycznego otwierania tuneli transportowych lub potrzebę precyzyjnego zbadania selektywności transportu wielu ligandów przez kilka tuneli. Podczas gdy bardzo dokładne analizy transportu ligandów należą do dziedziny zaawansowanych symulacji MD, które często wymagają znacznych zasobów obliczeniowych i specjalistycznej wiedzy, w oparciu o nasze narzędzie CAVER3 do analizy tuneli opartych na geometrii (Chovancova *et al.*, 2012) opracowaliśmy szybką metodę szacowania kosztów energetycznych związanych z migracją ligandów w takim tunelu (**osiągnięcie naukowe P4**).

Opracowane narzędzie CaverDock wykorzystuje algorytm dokowania AutoDock Vina do zbadania migracji liganda przez dany tunel zidentyfikowany przez narzędzia do ich analizy, takie jak CAVER3, MOLE czy MOLAXIS (Brezovsky *et al.*, 2013) poprzez iteracyjne dokowanie cząsteczki liganda z jednoczesnym ograniczeniem jednego z jego atomów do wycinków przekroju poprzecznego uzyskanego z tunelu (Vavra *et al.*, 2019). W ten sposób CaverDock może określić w przybliżeniu najbardziej prawdopodobną trajektorię obroną przez ligand oraz odpowiednie energie wiązania wzdłuż jego ścieżki. Poprawność zastosowania tego narzędzia została zweryfikowana na zbiorze danych 26 białek z 113 zidentyfikowanymi tunelami o różnej geometrii dla 33 naturalnych substratów. Co więcej, zastosowanie tej metody w przypadku inżynierii tuneli p1 i p3, omówionym w poprzednim rozdziale, pozwoliło jakościowo odtworzyć łatwość wykorzystania tych tuneli do uwalniania

produktów w mutantach otwartych i zamkniętych, jak wynika z wyczerpujących symulacji MD (Vavra *et al.*, 2019). Ze względu na swoją przybliżoną naturę i wynikającą z niej możliwość wykonania większości obliczeń w ciągu kilku minut, CaverDock może być z powodzeniem stosowany w analizach o dużej przepustowości związanych z transportem dużej liczby ligandów przez wiele tuneli, jak pokazują ostatnie badania (Pinto *et al.*, 2019, 2021). Ogólnie rzecz biorąc, narzędzie CaverDock stanowi pierwszy krok w kierunku zrozumienia specyficzności tuneli poprzez bezpośrednią analizę transportu ligandów (Contente *et al.*, 2020; Brodsky *et al.*, 2020; Hu *et al.*, 2020).

W ramach **osiągnięcia naukowego P5** zintegrowaliśmy dobrze ugruntowane analizy geometryczne tuneli przy użyciu CAVER3 z niedawno opublikowanymi symulacjami transportu ligandów za pomocą CaverDock i stworzyliśmy serwer Caver Web, aby zapewnić przyjazny dla użytkownika dostęp do tych analiz dla szerokiej społeczności naukowej (Stourac *et al.*, 2019). Podstawą procesu obliczeniowego był serwer internetowy HotSpot Wizard 2, przeznaczony dla społeczności inżynierii białek (Bendl, Stourac, *et al.*, 2016), który już wcześniej zawierał zoptymalizowaną strategię identyfikacji odpowiednich kieszeni w enzymach, a tym samym umożliwiał badanie tuneli wychodzących z takich kieszeni (**Rysunek 10**). W Caver Web udostępniliśmy bardziej zaawansowane opcje definiowania właściwych punktów początkowych dla obliczeń tuneli na podstawie pozycji ligandów związanych w strukturze białka lub na podstawie środka masy reszt zdefiniowanych przez użytkownika, a także dedykowaną wizualizację tuneli i ich właściwości. Co więcej, zidentyfikowane tunele mogą być wykorzystane na żądanie jako dane wejściowe do symulacji transportu ligandów przy użyciu narzędzia CaverDock, rozszerzając w ten sposób zakres zastosowania tego serwera o podstawowe możliwości prowadzenia wirtualnego screeningu. Bazując na naszym praktycznym doświadczeniu z krytycznymi błędami występującymi podczas analiz tuneli (Brezovsky *et al.*, 2018), Caver Web został wyposażony w szereg zautomatyzowanych narzędzi pomocniczych opartych na kontekście, które prowadzą użytkownika przez prawidłowe ustawienia obliczeń i interpretację wyników. Funkcje te znacznie zwiększają wygodę użytkownika i przyczyniają się do zredukowania wymagań podstawowych umiejętności bioinformatycznych potrzebnych do uzyskania przydatnych danych dotyczących transportu ligandów, o czym świadczy około 40 000 obliczeń wykonanych do lutego 2022 r.



**Rysunek 10. Przebieg obliczeń zaimplementowany w Caver Web 1.0.** FAZA1 zapewnia przygotowanie biologicznie istotnych struktur; FAZA2 umożliwia zdefiniowanie punktu startowego (czerwona sfera w żółtej kieszeni białka) dla obliczeń tuneli wykonywanych w FAZIE3 (tunele są przedstawione jako zestawy niebieskich i zielonych sfer). Opcjonalnie, bezpośredni transport ligandów przez wykryte tunele może być wykonany za pomocą CaverDock w FAZIE4. Pomarańczowa ramka wskazuje część przepływu pracy pierwotnie opracowanego dla serwera HotSpot Wizard2 (Bendl, Stourac, *et al.*, 2016). Zaadaptowano z (Stourac *et al.*, 2019).

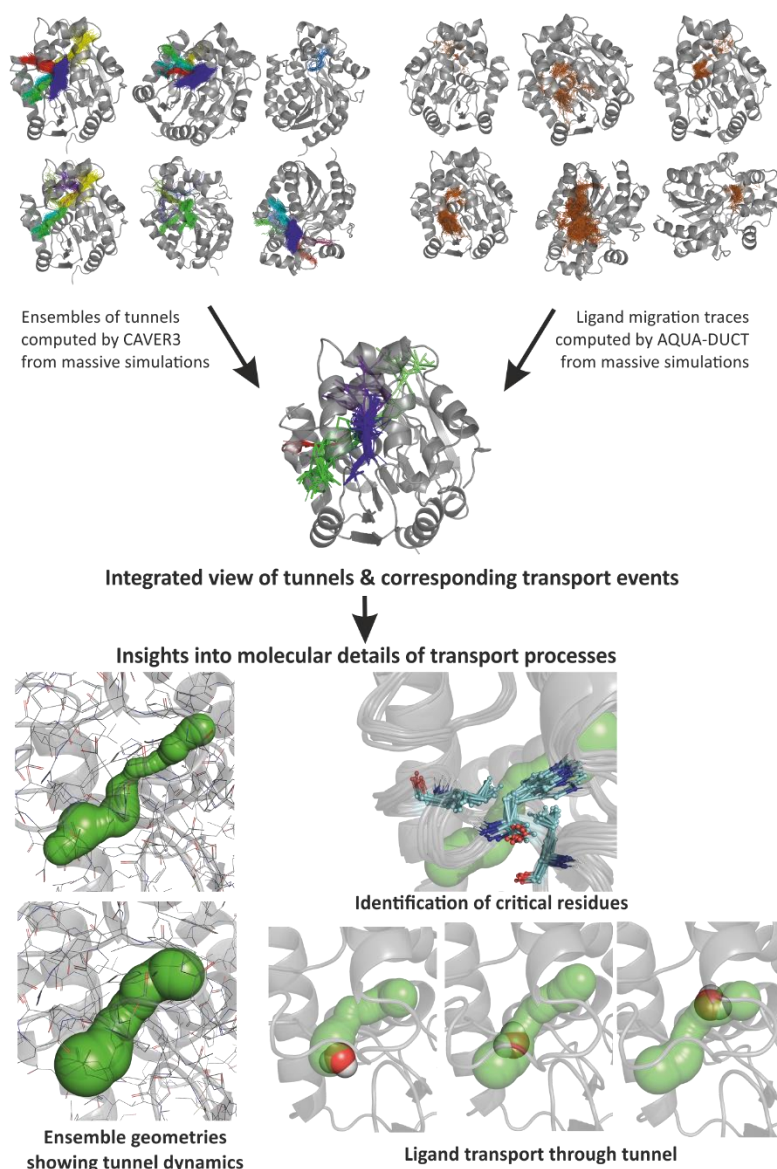
Ponadto, aby przyczyścić się do radzenia sobie z ogromną ilością i złożonością danych pochodzących z wysokoprzepustowych symulacji MD (ang. *high-throughput MD*), niezbędnych do badania zdarzeń transportu o niskiej częstotliwości (ang. *rare transport events*), stworzyliśmy bibliotekę TransportTools (Brezovsky *et al.*, 2021), co stanowi **osiągnięcie naukowe P6**. Biblioteka ta została zaprojektowana w celu umożliwienia zidentyfikowania tuneli zaobserwowanych w dużych zestawach symulowanych zespołów molekularnych, określenia, które tunele są wykorzystywane przez poszczególne ligandy, których ruchy były śledzone w tych zestawach danych, oraz opracowania sposobów specyficznej analizy ilościowej tych procesów (**Rysunek 11**). Ponieważ narzędzie TransportTools zostało opracowane z myślą o zastosowaniu w aplikacjach prawdziwie wysokoprzepustowych, opiera się na zoptymalizowanej metodzie umożliwiającej gruboziarnistą (ang. *coarse-grained*) reprezentację wszystkich danych związanych z transportem, co pozwala na analizę

około 5 000 000 tuneli transportu pochodzących z narzędzia CAVER3 i przypisanie 50 000 zdarzeń dotyczących śladów wodnych (ang. *water traces*) uzyskanych za pomocą pakietu AQUA-DUCT (Magdziarz *et al.*, 2017) do faktycznych tuneli przemierzanych przez te cząsteczki w czasie krótszym niż jeden dzień przy użyciu standardowej stacji roboczej. Biblioteka oferuje wiele klas i metod umożliwiających przetwarzanie, manipulowanie i analizowanie tuneli i zdarzeń transportu. Różnorodność opcji sprawia, że jest to odpowiednia platforma do przygotowania analiz dostosowanych do potrzeb użytkownika. Ponadto uważamy, że ma ona potencjał do stymulowania rozwoju nowych pakietów skupiających się na procesach transportu w biomolekułach lub obejmujących te procesy w bardziej ogólnym ujęciu.

Oceniliśmy przydatność naszej biblioteki na podstawie trzech praktycznych przykładów zastosowania. Po pierwsze, pokazaliśmy użyteczność analizy zestawu symulacji MD w celu ujawnienia sporadycznych migracji cząsteczek wody przez długi tunel transportowy wyposażony w wiele bram, które wykazywały tylko sporadyczne otwarcia. Taka sytuacja sprawia, że przypisanie zdarzenia transportu do takiego tunelu jest mało prawdopodobne, dlatego korzystne może być zintegrowanie danych o tunelu ze zdarzeniami transportu z wielu różnych symulacji w celu zwiększenia czułości wykrywania zdarzeń o niskiej częstotliwości (ang. *rare events*) i przypisywania ich do masowo bramkowanych tuneli przejściowych. W ten sposób narzędzie TransportTools może wykrywać przypadki transportu ligandów w symulacjach, w których odpowiednie tunele nie były obserwowane z powodu zamknięcia jednej z ich bram, a więc zmniejsza liczbę przypadków, w których moglibyśmy przeoczyć sporadycznie występujące i trudne do uchwycenia przypadki otwierania tuneli i ich wykorzystania, co zwiększa skuteczność i wszechstronność badania tuneli przejściowych. Następnie z wykorzystaniem analizy porównawczej zaimplementowanej w programie TransportTools podkreśliliśmy różnice pomiędzy sieciami tuneli i ich wykorzystaniem przez ligandy w enzymie LinB i dwóch jego mutantach o zmienionych tunelach (LinB-Closed<sup>TRP</sup> i LinB-Open<sup>TRP</sup> omówionych w **Rozdziale 4.3.2**). W tym przypadku narzędzie TransportTools ułatwiło badanie porównawcze niezależnych symulacji tych wariantów enzymów, ujawniając wszystkie krytyczne zmiany w dynamice tuneli, geometrii i transporcie wody po wprowadzeniu mutacji, które były zgodne z wynikami wcześniejszych badań procesów transportu w tych systemach (Brezovsky *et al.*, 2016; Kokkonen *et al.*, 2018). Analogicznie, analiza porównawcza zaimplementowana w TransportTools może być wykorzystywana do rygorystycznych porównań procesów transportu w różnych scenariuszach, np. porównywania białek typu dzikiego i mutantów, zestawiania tuneli białkowych w obecności mieszaniny różnych rozpuszczalników, w różnym pH lub temperaturze, a także analizowania zmian w sieciach tuneli wywołanych wiązaniem ligandów. Wreszcie, zbadaliśmy selektywność tuneli LinB-Open<sup>TRP</sup> dla substratu 1,2-dibromoetanu, analizując migrację substratu z 593 symulacji adaptacyjnego



próbkowania (ang. *adaptive sampling simulations*) (Doerr and De Fabritiis, 2014) i mapując zidentyfikowane zdarzenia transportu do sieci tuneli tego mutantu. Z odpowiednio przypisanych zdarzeń wynika, że tunele p1b i p1a były wykorzystywane głównie do transportu substratu w porównaniu z tunelem p3, który nadal był preferowany w stosunku do pomocniczego tunelu p2. Wynioskowane selektywności tuneli dla tego substratu były zgodne z wcześniejszymi doniesieniami obliczeniowymi i eksperymentalnymi na temat LinB-Open<sup>TRP</sup> (Brezovsky et al., 2016). Podsumowując, TransportTools oferuje wszechstronne narzędzia do badania tuneli i ich wykorzystania przez ligandy w dużych zbiorach danych, umożliwiając jednocześnie dostęp do istotnych szczegółów procesów transportu.



**Rysunek 11. Schemat przebiegu analizy zaimplementowanej w programie TransportTool.** Zaadaptowano z (Brezovsky et al., 2021).

## 5 Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej, w szczególności zagranicznej

### 5.1 Wyniki badań uzyskane w trakcie studiów doktoranckich na Uniwersytecie Masaryka

W trakcie studiów doktoranckich na Uniwersytecie Masaryka specjalizowałam się w modelowaniu zależności struktura-funkcja w białkach, jak również z udziałem różnych związków chemicznych, stosując symulacje dynamiki molekularnej do badania wpływu mutacji na funkcję białek oraz badając metody i narzędzia racjonalnej inżynierii białek. Prowadziliśmy również badania nad wadami i zaletami obecnie dostępnych narzędzi związanych z analizą transportu ligandów (Brezovsky *et al.*, 2013). W wyniku tych prac powstało **sześć kolejnych publikacji, które nie zostały włączone do głównego osiągnięcia naukowego**. Niemniej jednak publikacje 4 i 6 dostarczyły kilku niezbędnych technicznych kroków i inspiracji do badań opisanych w **Rozdziale 4.3.2**.

1. **Brezovsky J**, Chovancova E, Gora A, Pavelka A, Biedermannova L, Damborsky J,<sup>#</sup> 2013: Software Tools for Identification, Visualization and Analysis of Protein Tunnels and Channels. *Biotechnology Advances* 31: 38-49
2. Kobeticova K, Simek Z, **Brezovsky J**, Hofman J,<sup>#</sup> 2011: Toxic Effects of Nine Polycyclic Aromatic Compounds on *Enchytraeus crypticus* in Artificial Soil in Relation to their Properties. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74: 1727-1733
3. Koudelakova T, Chovancova E, **Brezovsky J**, Monincova M, Fortova A, Jarkovsky J, Damborsky J,<sup>#</sup> 2011: Substrate Specificity of Haloalkane Dehalogenases. *Biochemical Journal* 435: 345-354
4. Prokop Z,<sup>\*</sup> Sato Y,<sup>\*</sup> **Brezovsky J**,<sup>\*</sup> Mozga T, Chaloupkova R, Koudelakova T, Jerabek P, Stepankova V, Natsume R, Leeuwen JGE, Janssen DB, Florian J, Nagata Y, Senda T, Damborsky J,<sup>#</sup> 2010: Enantioselectivity of Haloalkane Dehalogenases and its Modulation by Surface Loop Engineering. *Angewandte Chemie International Edition* 49: 6111-6115
5. Damborsky J,<sup>#</sup> **Brezovsky J**, 2009: Computational Tools for Designing and Engineering Biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 13: 26-34
6. Jesenska A, Sykora J, Olzyska A, **Brezovsky J**, Zdrahal Z, Damborsky J,<sup>#</sup> Hof M,<sup>#</sup> 2009: Nanosecond Time-Dependent Stokes Shift at the Tunnel Mouth of Haloalkane Dehalogenases. *Journal of the American Chemical Society* 131: 494-501

W publikacji (Prokop *et al.*, 2010), zbadaliśmy molekularne mechanizmy kontrolujące enancjoselektywność dehalogenazy DbjA i wykorzystaliśmy tę wiedzę do semi-racjonalnego zaprojektowania tej właściwości poprzez zmianę pętli na powierzchni znajdującej się obok wejścia do głównego tunelu transportowego prowadzącego do miejsca aktywnego. Co ważne, zaobserwowaliśmy, że enancjoselektywność DbjA w stosunku do liniowych bromowanych alkanów ma znaczący udział entropowy, który na poziomie molekularnym został wyrażony przez konieczność istnienia istotnych oddziaływań hydrofobowych stabilizujących różne enancjomery na przeciwległych ścianach kieszeni miejsca aktywnego. Ta wielokierunkowa praca była możliwa tylko dzięki intensywnej współpracy z następującymi instytutami badawczymi na całym świecie: **(i)** „Department of Life Sciences, Graduate School of Life Sciences, Tohoku University”, Sendai, Japonia, **(ii)** „Japan Biological

*Informatics Consortium*”, Tokio, Japonia, **(iii)** „*Biomedical Information Research Center, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*”, Tokio, Japonia, **(iv)** „*Department of Biochemistry, University of Groningen*”, Holandia, i **(v)** „*Department of Chemistry, Loyola University Chicago*”, USA

W publikacji (Jesenská *et al.*, 2009), opracowaliśmy podejście łączące metody eksperymentalne i komputerowe do badania dynamiki cząsteczek wody w oparciu o znakowanie białek kowalencyjnie przyłączonym znacznikiem fluorescencyjnym, wykorzystując mechanizm reakcji dehalogenaz, które po mutacji histydyny katalitycznej zatrzymują się po utworzeniu kowalencyjnego produktu pośredniego alkilo-enzymu, osadzając sondę fluorescencyjną w tunelu prowadzącym do miejsca aktywnego enzymu. Pokazaliśmy, jak taki układ może być scharakteryzowany za pomocą spektroskopii zależnej od czasu i zinterpretowany do szczegółów molekularnych za pomocą symulacji dynamiki molekularnej. Ponadto, wykazaliśmy, że wejście do miejsca aktywnego enzymu DbjA wykazuje silne uwodnienie w stopniu niespotykanym w tej rodzinie enzymów, co wskazuje na znaczenie uwodnienia dla enancjoselektywności tego enzymu wobec liniowych bromowanych alkanów. Praca ta została wykonana w ścisłej współpracy z grupą Prof. Martin Hof z Instytutu Chemii Fizycznej im. J. Heyrovskiego, Akademii Nauk Republiki Czeskiej, który zapewnił ekspertyzę spektroskopową.

## 5.2 Wyniki badań uzyskane w wyniku zatrudnienia po studiach doktoranckich na Uniwersytecie Masaryka i w Międzynarodowym Centrum Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego św. Anny

Po ukończeniu studiów w 2011 r. do 2016 r. kierowałem zespołem badawczym w Laboratoriach Loschmidta na Uniwersytecie Masaryka oraz odbyłem staż podoktorski w Międzynarodowym Centrum Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego św. Anny, Republika Czeska. Wraz z moim zespołem połączyliśmy metody bioinformatyczne i symulacji molekularnej z technikami eksperymentalnymi stosowanymi przez naszych współpracowników. Systematycznie dążyliśmy do odkrywania nowych koncepcji i zasad związanych z funkcjonowaniem białek, aby umożliwić ich racjonalną inżynierię. Następnie wdrożyliśmy najbardziej obiecujące pomysły jako oprogramowanie użytkowe. Korzystając z bliskiej współpracy ze współpracownikami eksperymentalnymi, podjęliśmy starania, by opracować przyjazne dla użytkownika narzędzia, dostosowane do ich potrzeb i możliwe do wykorzystania przez szerokie środowisko naukowe. Ogólnie rzecz biorąc, realizowaliśmy pięć głównych kierunków badań opisanych w kolejnych częściach, które zaowocowały **37 publikacjami naukowymi niewuwzględnionymi w głównym osiągnięciu naukowym**.

### 5.2.1 Odkrywanie zależności struktura-dynamika-funkcja w enzymach

Aby lepiej zrozumieć molekularne uwarunkowania funkcji enzymu, zbadaliśmy czynniki odpowiedzialne za zwiększoną stabilność dehalogenazy z bakterii psychrofilnej (Chrast *et al.*, 2019). Następnie zbadaliśmy rolę bram molekularnych kontrolujących dostępność miejsc aktywnych, zarówno doświadczalnie, jak i poprzez obszerne przeglądy literatury (Kokkonen *et al.*, 2018; Gora *et al.*, 2013; Marques, Dunajova, *et al.*, 2017). Skupiając się na molekularnych mechanizmach katalizy enzymatycznej, zbadaliśmy strukturalne podstawy enancjoselektywności dehalogenaz (Liskova *et al.*, 2017) oraz acylaz penicyliny G (Grulich *et al.*, 2015), opisaliśmy zasady rozpoznawania ligandów przez receptor estrogenowy (Nehybova *et al.*, 2015) i regulator Cra (Chavarría *et al.*, 2014), a także wyjaśniliśmy rolę nietypowych reszt w miejscu aktywnym dehalogenaz (Chaloupkova *et al.*, 2014; Hasan *et al.*, 2013). Ponadto scharakteryzowaliśmy wpływ mieszaniny rozpuszczalników organicznych na strukturę i funkcję dehalogenaz (Khabiri *et al.*, 2013; Stepankova, Khabiri, *et al.*, 2013) oraz rozwikłaliśmy oddziaływanie białko - sonda fluorescencyjna, które determinują przesunięcia Stokesa mierzone na wejściu tunelu dehalogenów (Amaro *et al.*, 2013) — co stanowi rozszerzenie naszych wcześniejszych badań nad zgłębianiem kwestii hydratacji i dynamiki (Jesenská *et al.*, 2009). Wreszcie, zwróciliśmy uwagę na tunele transportowe i ich bramy w wielu enzymach jako ważne cele dla leków (Marques, Daniel, *et al.*, 2017). Wyniki tych projektów badawczych zostały opisane w następujących 14 publikacjach.

1. Chrast L, Tratsiak K, Planas-Iglesias J, Daniel L, Prudnikova T, **Brezovsky J**, Bednar D, Kuta Smatanova I, Chaloupkova R, Damborsky J,<sup>#</sup> 2019: Deciphering the Structural Basis of High Thermostability of Dehalogenase from Psychrophilic Bacterium *Marinobacter* sp. ELB17. *Microorganisms* 7: 498
2. Kokkonen P, Sykora J, Prokop Z, Ghose A, Bednar D, Amaro M, Beerens K, Bidmanova S, Slanska M, **Brezovsky J**, Damborsky J,<sup>#</sup> Hof M,<sup>#</sup> 2018: Molecular Gating of an Engineered Enzyme Captured in Real Time. *Journal of the American Chemical Society* 140: 17999-18008
3. Liskova V, Stepankova V, Bednar D, **Brezovsky J**, Prokop Z, Chaloupkova R, Damborsky J,<sup>#</sup> 2017: Different Structural Origins of the Enantioselectivity of Haloalkane Dehalogenases toward Linear  $\beta$ -Haloalkanes: Open-Solvated versus Occluded-Desolvated Active Sites. *Angewandte Chemie International Edition* 56: 4719-4723
4. Marques SM, Dunajova Z, Prokop Z, Chaloupkova R, **Brezovsky J**, Damborsky J,<sup>#</sup> 2017: Catalytic Cycle of Haloalkane Dehalogenases towards Unnatural Substrates Explored by Computational Modeling. *Journal of Chemical Information and Modeling* 57: 1970-1989
5. Marques SM, Daniel L, Buryska T, Prokop Z, **Brezovsky J**, Damborsky J,<sup>#</sup> 2017: Enzyme Tunnels and Gates as Relevant Targets in Drug Design. *Medicinal Research Reviews* 37: 1095-1139
6. Grulich M,<sup>#</sup> **Brezovsky J**, Stepanek V, Palyzova A, Kyslikova E, Kyslik P, 2015: Resolution of  $\alpha/\beta$ -Amino Acids by Enantioselective Penicillin G Acylase from *Achromobacter* sp. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 122: 240-247
7. Nehybova T, Smarda J, Daniel L, **Brezovsky J**, Benes P,<sup>#</sup> 2015: Wedelolactone Induces Growth of Breast Cancer Cells by Stimulation of Estrogen Receptor Signalling. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 152: 76-83
8. Chavarría M, Durante-Rodríguez G, Krell T, Santiago C, **Brezovsky J**, Damborsky J, de Lorenzo V,<sup>#</sup> 2014: Fructose 1-Phosphate is the One and Only Physiological Effector of the Cra (FruR) Regulator of *Pseudomonas putida*. *FEBS Open Bio* 4: 377-386
9. Chaloupkova R, Prudnikova T, Rezacova P, Prokop Z, Koudelakova T, Daniel L, **Brezovsky J**, Ikeda-Ohtsubo W, Sato Y, Kutý M, Nagata Y, Kuta Smatanova I,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2014: Structural and Functional Analysis of

- a Novel Haloalkane Dehalogenase with Two Halide-Binding Sites. *Acta Crystallographica D* 70: 1884-1897
10. Gora A, **Brezovsky J**, Damborsky J,<sup>#</sup> 2013: Gates of Enzymes. *Chemical Reviews* 113: 5871–5923
  11. Amaro M, **Brezovsky J**, Kovacova S, Maier L, Chaloupkova R,<sup>#</sup> Sykora J,<sup>#</sup> Paruch K,<sup>#</sup> Damborsky J, Hof M, 2013: Are Time-Dependent Stokes Shifts at the Tunnel Mouth of Haloalkane Dehalogenase Enzymes Dependent on the Choice of the Chromophore? *Journal of Physical Chemistry B* 117: 7898-7906
  12. Hasan K, Gora A, **Brezovsky J**, Chaloupkova R, Moskalikova H, Fortova A, Nagata Y, Damborsky J, Prokop Z,<sup>#</sup> 2013: The Effect of a Unique Halide-Stabilising Residue on the Catalytic Properties of Haloalkane Dehalogenase DatA from *Agrobacterium tumefaciens* C58. *FEBS Journal* 280: 3149-3159
  13. Stepankova V, Khabiri M, **Brezovsky J**, Pavelka A, Sykora J, Amaro M, Minofar B, Prokop Z, Hof M, Ettrich R, Chaloupkova R,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2013: Expansion of Access Tunnels and Active-Site Cavities Influence Activity of Haloalkane Dehalogenases in Organic Cosolvents. *ChemBioChem* 14: 890-897
  14. Khabiri M, Minofar B, **Brezovsky J**, Damborsky J, Ettrich R,<sup>#</sup> 2013: Interaction of Organic Solvents with Protein Structures at Protein-Solvent Interface. *Journal of Molecular Modeling* 19: 4701-4711

Wiele z tych projektów badawczych powstało dzięki dalszej owocnej współpracy z grupą Prof. Martin Hof z Instytutu Chemii Fizycznej im. J. Heyrovskiego, Akademii Nauk Republiki Czeskiej (Kokkonen *et al.*, 2018; Amaro *et al.*, 2013; Stepankova, Khabiri, *et al.*, 2013). Kolejny znaczący wkład w powstanie dwóch publikacji (Chrast *et al.*, 2019; Chaloupkova *et al.*, 2014) dotyczących strukturalnej charakterystyki kilku dehalogenaz metodą krystalografii rentgenowskiej wniosła grupa Prof. Ivana Kuta-Smatanova z „University of South Bohemia”, Republika Czeska. Praca wykonana przez Chaloupkova *et al.*, 2014 dodatkowo wspierana przez krystalografów z „Graduate School of Life Sciences, Tohoku University”, Sendai, Japonia. Wreszcie, badania nad efektorami regulatora Cra przeprowadzono pod kierownictwem Prof. Victor de Lorenzo z „Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC)”, Madryt, Hiszpania. Główną rolę w badaniach nad enancjoselektywnością acylaz penicyliny G odegrał Dr. Grulich z Instytutu Mikrobiologii, Akademii Nauk Republiki Czeskiej.

## 5.2.2 Opracowywanie narzędzi obliczeniowych do inżynierii białek

Opierając się na naszym pierwotnym doświadczeniu w dziedzinie inżynierii białek, opracowaliśmy narzędzie obliczeniowe FireProt, służące do projektowania bardziej stabilnych białek bez negatywnego wpływu na ich funkcję (Bednar *et al.*, 2015; Musil *et al.*, 2017; Beerens *et al.*, 2018), podczas którego znacząco skorzystaliśmy na współpracy z grupą Prof. David Baker z „University of Washington”, USA. Następnie zaprojektowaliśmy i przetestowaliśmy metodę selekcji atrakcyjnych - funkcjonalnych, a jednocześnie różnorodnych - enzymów z puli sekwencji nadrodzin białkowych (Vanacek *et al.*, 2018). Ponadto stworzyliśmy nową platformę do inżynierii białek, HotSpotWizard 2, zdolną w pełni zautomatyzować przewidywanie hotspotów (ang. *hotspots*) w inżynierii stabilności, aktywności, specyficzności i enancjoselektywności białek oraz projektowanie inteligentnych bibliotek (Bendl, Stourac, *et al.*, 2016). Te prace badawcze zaowocowały następującymi sześcioma publikacjami.

15. Beerens K, Mazurenko S, Kunka A, Marques SM, Hansen N, Musil M, Chaloupkova R, Waterman J, **Brezovsky J**, Bednar D, Prokop Z,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2018: Evolutionary Analysis is a Powerful Complement to Energy Calculations for Protein Stabilization. *ACS Catalysis* 8: 9420-9428
16. Vanacek P, Sebestova E, Babkova P, Bidmanova S, Daniel L, Dvorak P, Stepankova V, Chaloupkova R, **Brezovsky J**, Prokop Z,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2018: Exploration of Enzyme Diversity by Integrating Bioinformatics

with Expression Analysis and Biochemical Characterization. *ACS Catalysis* 8: 2402-2412

17. Musil M, Stourac J, Bendl J, **Brezovsky J**, Prokop Z, Zendulka J, Martinek T, Bednar D,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2017: FireProt: Web Server for Automated Design of Thermostable Proteins. *Nucleic Acids Research* 45: W393-399
18. Bendl J, Stourac J, Sebestova E, Vavra O, Musil M, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2016: HotSpot Wizard 2: Automated Design of Site-Specific Mutations and Smart Libraries in Protein Engineering. *Nucleic Acids Research* 44: W479-487
19. Bednar D, Beerens K, Sebestova E, Bendl J, Khare S, Chaloupkova R, Prokop Z, **Brezovsky J**, Baker D, Damborsky J,<sup>#</sup> 2015: FireProt: Energy- and Evolution-Based Computational Design of Thermostable Multiple-Point Mutants. *PLoS Computational Biology* 11: e1004556
20. Damborsky J,<sup>#</sup> **Brezovsky J**, 2014: Computational Tools for Designing and Engineering Enzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* 19: 8-16

### 5.2.3 Opracowywanie narzędzi obliczeniowych na potrzeby medycyny precyzyjnej

Inny kierunek badań był motywowany kontaktami z *Prof. Eric D. Wieben* z „Mayo Clinic”, Nowy Jork, USA, który zainspirował nas do zbadania konsekwencji nakładania się zbiorów danych wykorzystywanych do trenowania i testowania narzędzi do przewidywania patogenności (Bendl *et al.*, 2014). W wyniku tych rozważań zebraliśmy trzy w pełni niezależne zbiory danych i wykorzystaliśmy je do opracowania solidnych meta-klasyfikatorów efektów mutacji białek (Bendl *et al.*, 2014) oraz polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w różnych regionach genomu (Bendl, Musil, *et al.*, 2016). Narzędzia te zostały wykorzystane przez >5 000 niezależnych, aktywnych użytkowników, którzy przeanalizowali >300 000 mutacji w >10 000 różnych białek i zostały opublikowane w dwóch następujących artykułach.

21. Bendl J, Musil M, Stourac J, Zendulka J, Damborsky J,<sup>#</sup> **Brezovsky J**,<sup>#</sup> 2016: PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. *PLoS Computational Biology* 12: e1004962
22. Bendl J, Stourac J, Salanda O, Pavelka A, Wieben ED, Zendulka J, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2014: PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Computational Biology* 10: e1003440

### 5.2.4 Opracowanie narzędzi obliczeniowych do analizy transportu ligandów

Mając świadomość kluczowego znaczenia tuneli molekularnych dla funkcjonowania białek oraz problemów związanych z ich wykrywaniem w statycznej strukturze krystalicznej białek, opracowaliśmy narzędzia umożliwiające wstępne badania dynamiki tuneli (Chovancova *et al.*, 2012; Pavelka *et al.*, 2016). Aby ograniczyć niektóre z najbardziej istotnych, wcześniej zidentyfikowanych ograniczeń, opracowaliśmy narzędzia, dostarczając zaawansowany interfejs użytkownika do iteracyjnej eksploracji tuneli molekularnych w czasie rzeczywistym (Kozlikova *et al.*, 2014) oraz stworzyliśmy środki do jawnego uwzględniania cząsteczek ligandów (Filipovič *et al.*, 2020). Opis narzędzi, metod i przegląd literatury jest dostępny w następujących czterech publikacjach.

23. Filipovic J,<sup>#</sup> Vavra O, Plhak J, Bednar D, Marques SM, **Brezovsky J**, Matyska L, Damborsky J,<sup>#</sup> 2019: CaverDock: A Novel Method for the Fast Analysis of Ligand Transport. *IEEE Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 17: 1625-1638
24. Pavelka A, Kozlikova B, Sochor J, Sebestova E, **Brezovsky J**, Damborsky J,<sup>#</sup> 2016: CAVER: Algorithms for

- Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules. *IEEE Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 13: 505-517
25. Kozlikova B, Sebestova E, Sustr V, **Brezovsky J**, Strnad O, Daniel L, Bednar D, Pavelka A, Manak M, Bezdeka M, Benes P, Kotry M, Gora A, Damborsky J, # Sochor J, # 2014: CAVER Analyst 1.0: Graphic Tool for Interactive Visualization and Analysis of Tunnels and Channels in Protein Structures. *Bioinformatics* 30: 2684-2685
26. Chovancova E, Pavelka A, Benes P, Strnad O, **Brezovsky J**, Kozlikova B, Gora A, Sustr V, Klvana M, Medek P, Biedermannova L, Sochor J, # Damborsky J, # 2012: CAVER 3.0: A Tool for Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLoS Computational Biology* 8: e1002708

### 5.2.5 Racjonalna inżynieria białek

W ramach współpracy na szeroką skalę z grupami Prof. Ivana Kuta-Smatanova z „University of South Bohemia”, Republika Czeska, Prof. Rudiger Ettrich z Instytutu Nanobiologii i Biologii Strukturalnej, Akademii Nauk Republiki Czeskiej, oraz Prof. Uwe T. Bornscheuer z “Ernst-Moritz-Arndt-University”, Greifswald, Niemcy, zastosowaliśmy metodę ewolucji ukierunkowanej do zmiany stabilności i aktywności dehalogenaz w wysokich stężeniach kosolwentów organicznych (Koudelakova *et al.*, 2013). Co zaskakujące, odkryliśmy, że znaczący wkład na stabilność i odporność na działanie kosolwentu miały mutacje zlokalizowane w tunelu transportowym, co podkreśla, że tunele są istotnym celem inżynierii stabilizacji białek. Aby poszerzyć naszą wiedzę na temat molekularnych czynników wpływających na kompromis pomiędzy strukturą i funkcją enzymu, zaprojektowaliśmy i scharakteryzowaliśmy działanie kilku mutantów dehalogenaz ze zmienionymi regionami zwężenia ich głównego tunelu (Liskova *et al.*, 2015). Następnie ocenialiśmy wpływ inżynierii tuneli na aktywność i selektywność enzymu, wykazując, że mutacje te zaburzają działanie enzymu w różny sposób w przypadku różnych substratów (Kaushik *et al.*, 2018). Wreszcie, zaprojektowaliśmy *de novo* tunel transportowy w dehalogenazie, tworząc mutantą o radykalnie zmienionych właściwościach katalitycznych (Brezovsky *et al.*, 2016). Taka strategia inżynierska może być wykorzystana do stworzenia wielu cennych biokatalizatorów. Co ważne, niniejsze badania podkreślają, że nawet niewielkie modyfikacje struktury białka, które naturalnie występują także w regionach nieistotnych funkcjonalnie, mogą otworzyć nowy tunel w modyfikowanym regionie i prowadzić do istotnych konsekwencji funkcjonalnych.

Korzystając z narzędzi obliczeniowych do inżynierii białek, opisanych w **Rozdziale 5.2.2**, stworzyliśmy kilka hiperstabilnych białek. Po pierwsze, zaprojektowaliśmy wysoce stabilny czynnik wzrostu fibroblastów 2 (FGF2, ang. *fibroblast growth factor 2*) odpowiedni do długotrwałych zastosowań biomedycznych (Dvorak *et al.*, 2018). Prace te stanowiły podstawę do uzyskania patentu EP3380508 B1: „Thermostable FGF2 Polypeptide, Use thereof and Culture Medium Containing Thermostable FGF2 Polypeptide”, przyznanego w 2020 r. Dodatkowo zastosowaliśmy rekonstrukcję przodków dehalogenaz, aby uzyskać wysoce stabilne, a jednocześnie bardzo aktywne enzymy jako alternatywną strategię stabilizacji (Babkova *et al.*, 2017). Później moi współpracownicy rozwinęli tę pracę do postaci

specjalnego narzędzia obliczeniowego FireProt<sup>ASR</sup> (Musil *et al.*, 2021). Ponadto, we współpracy z Dr. Grulich z Instytutu Mikrobiologii, Akademii Nauk Republiki Czeskiej, zastosowaliśmy strategię inżynierii komputerowej w celu zwiększenia enancjoselektywności acylazy penicyliny G w kierunku grupy  $\alpha/\beta$ -aminokwasów (Grulich *et al.*, 2016). Najbardziej obiecujący zmutowany enzym wykazywał znacznie podwyższoną selektywność dla N-fenylacetylo-p-F- $\alpha$ -fenyloalaniny, ważnego składnika w syntezie leku przeciwnowotworowego Abarelix. W sumie nasze badania w dziedzinie inżynierii białek zaowocowały następującymi sześcioma publikacjami.

27. Dvorak P, Bednar D, Vanacek P, Balek L, Eiselleova L, Stepankova V, Sebestova E, Kunova Bosakova M, Konecna Z, Mazurenko S, Kunka A, Vanova T, Zoufalova K, Chaloupkova R, **Brezovsky J**, Krejci P, Prokop Z, Dvorak P,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2018: Computer-Assisted Engineering of Hyperstable Fibroblast Growth Factor 2. *Biotechnology and Bioengineering* 115: 850-862
28. Kaushik S, Marques SM, Khirsariya P, Paruch K, Libichova L, **Brezovsky J**, Prokop Z, Chaloupkova R,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2018: Impact of the Access Tunnel Engineering on Catalysis is Strictly Ligand-Specific. *FEBS Journal* 285: 1456-1476
29. Babkova P, Sebestova E, **Brezovsky J**, Chaloupkova R,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2017: Ancestral Haloalkane Dehalogenases Show Robustness and Unique Substrate Specificity. *ChemBioChem* 18: 1448-1456.
30. Grulich M,<sup>#</sup> **Brezovsky J**, Stepanek V, Palyzova A, Maresova H, Zahradnik J, Kyslikova E, Kyslik P, 2016: *In-silico* Driven Engineering of Enantioselectivity of a Penicillin G Acylase towards Active Pharmaceutical Ingredients. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 133: S53-S59
31. Liskova V, Bednar D, Holubeva T, Prudnikova T, Rezacova P, Koudelakova T, Sebestova E, Kuta Smatanova I, **Brezovsky J**, Chaloupkova R, Damborsky J,<sup>#</sup> 2015: Balancing the Stability-Activity Trade-off by Fine-Tuning Dehalogenase Access Tunnels. *ChemCatChem* 7: 648-659
32. Koudelakova T, Chaloupkova R, **Brezovsky J**, Prokop Z, Sebestova E, Hesseler M, Khabiri M, Plevaka M, Kulik D, Kuta Smatanova I, Rezacova P, Ettrich R, Bornscheuer UT, Damborsky J,<sup>#</sup> 2013: Engineering Enzyme Stability and Resistance to an Organic Cosolvent by Modification of Residues in the Access Tunnel. *Angewandte Chemie International Edition* 52: 1959-1963

### 5.2.6 Pozostałe wyniki badań

W czasie pełnienia funkcji członka organu wykonawczego krajowego „*Head of Nodes Committee of the European Life-Science Infrastructure for Biological Information (ELIXIR-CZ)*”, uczestniczyłem w kierowanych przez społeczność działaniach mających na celu określenie i upowszechnienie standardów dostarczania informacji o dostępnych zasobach bioinformatycznych wspieranych przez konsorcjum ELIXIR oraz pomagałem w tworzeniu rejestru służącego do rozpowszechniania takich informacji (Ison *et al.*, 2016). Ponadto, badaliśmy metody odkrywania bioaktywnych ligandów - zarówno substratów, jak i inhibitorów enzymów. Opracowaliśmy nowatorską i wysoce wydajną metodę chemoinformatyczną do odkrywania substratów enzymatycznych, wykorzystującą geometryczne kryteria reaktywności oparte na mechanizmie, co pozwoliło nam na zidentyfikowanie nowych substratów, w tym sond fluorescencyjnych umożliwiających uzyskanie danych o wysokiej rozdzielczości na temat kinetyki enzymów (Daniel *et al.*, 2015), a także inhibitorów odpowiednich do szczegółowej charakterystyki biochemicznej działania dehalogenaz (Burycka *et al.*, 2016). Następnie zidentyfikowaliśmy również nowe inhibitory różnych nukleaz, które stanowią podstawę patentu EP2957562 B1: „*Pyrazolotriazines as Inhibitors of Nucleases*” przyznanego w 2017 r. Wreszcie,



zbadaliśmy możliwości optymalizacji wieloobiektowej sprzężonych ścieżek reakcji. Celem optymalizacji było ograniczenie toksyczności produktów pośrednich dla zastosowań *in vivo* (Kurumbang *et al.*, 2014) lub maksymalizacja wydajności reakcji *in vitro* przy jednoczesnym zminimalizowaniu ogólnego zużycia enzymów (Dvorak *et al.*, 2014). Te prace badawcze zostały opisane w pięciu następujących publikacjach.

33. Ison J,<sup>#</sup> Rapacki K, Menager H, Kalas M, Rydza E, Chmura P, Anthon C, Beard N, Berka K, Bolser D, Booth T, Bretaudeau A, **Brezovsky J**, Casadio R, Cesareni G, Coppens F, Cornell M, Cuccuru G, Davidsen K, Vedova GD, Dogan T, Doppelt-Azeroual O, Emery L, Gasteiger E, Gatter T, Goldberg T, Grosjean M, Grüning B, Helmer-Citterich M, Ienasescu H, Ioannidis V, Jespersen MC, Jimenez R, Juty N, Juvan P, Koch M, Laibe C, Li J-W, Licata L, Mareuil F, Mičetić I, Friberg RM, Moretti S, Morris C, Möller S, Nenadic A, Peterson H, Profiti G, Rice P, Romano P, Roncaglia P, Saidi R, Schafferhans A, Schwämmle V, Smith C, Sperotto MM, Stockinger H, Svobodová-Vařeková R, Tosatto SCE, de la Torre V, Uva P, Via A, Yachdav G, Zambelli F, Vriend G, Rost B, Parkinson H, Løngreen P, Brunak S, 2016: Tools and Data Services Registry: a Community Effort to Document Bioinformatics Resources. *Nucleic Acids Research* 44: D38-47
34. Buryska T, Daniel L, Kunka A, **Brezovsky J**, Damborsky J, Prokop Z,<sup>#</sup> 2016: Discovery of Novel Haloalkane Dehalogenase Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 82: 1958-1965
35. Daniel L, Buryska T, Prokop Z, Damborsky J, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> 2015: Mechanism-Based Discovery of Novel Substrates of Haloalkane Dehalogenases using *in Silico* Screening. *Journal of Chemical Information and Modeling* 55: 54-62
36. Kurumbang NP, Dvorak P, Bendl J, **Brezovsky J**, Prokop Z,<sup>#</sup> Damborsky J,<sup>#</sup> 2014: Computer-Assisted Engineering of Synthetic Pathway for Biodegradation of Toxic Persistent Pollutant. *ACS Synthetic Biology* 3: 172–181
37. Dvorak P, Kurumbang NP, Bendl J, **Brezovsky J**, Prokop Z, Damborsky J,<sup>#</sup> 2014: Maximizing the Efficiency of Multi-enzyme Process by Stoichiometry Optimization. *ChemBioChem* 15: 1891-1895

### 5.3 Wyniki badań uzyskane w Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu

Po utworzeniu nowego Laboratorium Biomolekularnych Interakcji i Transportu, we współpracy z moimi byłymi współpracownikami z Uniwersytetu Masaryka w Brnie, Republika Czeska, przyczyniliśmy się do rozwoju i testowania drugiej wersji CAVER Analyst (Jurcik *et al.*, 2018). Następnie pogłęбилиśmy współpracę z Dr. Grulich z Instytutu Mikrobiologii, Akademii Nauk Republiki Czeskiej, w celu odkrycia molekularnych uwarunkowań mechanizmu wygaszania kworum (ang. *quorum quenching*) w enzymach z nadrodziny N-końcowych hydrolaz serynowych (Surpeta *et al.*, 2022), które stanowią ekscytującą alternatywę dla antybiotykoterapii, w szczególności biorąc pod uwagę rosnącą antybiotykoooporność wielu bakterii chorobotwórczych. Uważamy, że odkryte uwarunkowania stanowią cenną wskazówkę dla inżynierii skutecznych środków, zdolnych do selektywnej kontroli wirulencji opornych gatunków bakterii jako alternatywy dla antybiotyków. Na koniec podsumowaliśmy aktualny stan wiedzy na temat łatwo dostępnych dla szerokiej społeczności naukowej narzędzi obliczeniowych, które mogą być wykorzystane w szerokim zakresie zastosowań inżynierskich (Sequeiros-Borja *et al.*, 2021), jak również zaawansowanych metod obliczeniowych zdolnych, przynajmniej w pewnym istotnym zakresie, do uwzględnienia dynamiki białek podczas

racjonalnej inżynierii (Surpeta *et al.*, 2020). Nasz udział został podsumowany w postaci „preprintu” i trzech recenzowanych publikacji.

1. Surpeta B, Grulich M, Palyzova A, Maresova H, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> 2022: Common Dynamic Determinants Govern Quorum Quenching Activity in N-terminal Serine Hydrolases. *BioRxiv*: 2022.01.13.476167
2. Sequeiros-Borja CE, Surpeta B, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> 2021: Recent Advances in User-Friendly Computational Tools to Engineer Protein Function. *Briefings in Bioinformatics* 22: bbaa150
3. Surpeta B, Sequeiros-Borja CE, **Brezovsky J**,<sup>#</sup> 2020: Dynamics, a Powerful Component of Current and Future in Silico Approaches for Protein Design and Engineering. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 2713
4. Jurcik A, Bednar D, Byska J, Marques SM, Furmanova K, Daniel L, Kokkonen P, **Brezovsky J**, Strnad O, Stourac J, Pavelka A, Manak M, Damborsky J,<sup>#</sup> Kozlikova B,<sup>#</sup> 2018: CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics* 34: 3586-3588

## 6 Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

### 6.1 Działalność dydaktyczna

Mam ponad dziesięcioletnie doświadczenie w nauczaniu bioinformatyki i biologii obliczeniowej oraz prowadzeniu seminariów badawczych, które miałem okazję realizować w dwóch różnych ośrodkach akademickich.

#### **Kursy na Uniwersytecie Adama Mickiewicza:**

- 2019-obecnie: Od molekuł do komórek, współtworzenie wykładu, 3 godziny/rok
- 2017-obecnie: Bioinformatyka strukturalna, wykład i ćwiczenia praktyczne, 15+30 godzin/rok
- 2017-obecnie: Stosowana bioinformatyka strukturalna dla biotechnologii, seminaria i ćwiczenia praktyczne, 10+20 godzin/rok

Zaprojektowałem program kursu „Bioinformatyka strukturalna” i dostosowałem go do potrzeb studentów studiów licencjackich na kierunku bioinformatyka, zapewniając szerokie podstawy w zakresie najistotniejszych zadań bioinformatyki strukturalnej, jak również praktyczne doświadczenie z najnowocześniejszymi narzędziami w tej dziedzinie. Ze względu na okresy zdalnego nauczania, wspólnie z moimi studentami opracowaliśmy interaktywne materiały i materiały wideo do platformy Moodle. Kurs „Stosowana bioinformatyka strukturalna dla biotechnologii” jest zaprojektowany z myślą o doktorantach, którzy nie mają dużego doświadczenia z bioinformatyką. Jego celem jest przekazanie praktycznej wiedzy na temat zasad i przede wszystkim praktycznego doświadczenia z przepływami pracy bioinformatycznej dla (semi)racjonalnej inżynierii białek i odkrywania związków bioaktywnych. Ponadto prowadziłem wykłady w ramach serii wykładów „Od molekuł do komórek”.

#### **Kursy na Uniwersytecie Masaryka:**

- 2014-2015: Inżynieria białek, udział w wykładzie, 2 godziny/rok
- 2013-2015: Bioinformatyka-praktyka, ćwiczenia praktyczne, 12 godzin/rok
- 2013-2015: Chemia biofizyczna, udział w wykładzie, 2 godziny/rok
- 2012-2015: Obliczeniowa biologia strukturalna, wykład i ćwiczenia praktyczne, 24+24 godziny/rok
- 2012-2015: Seminarium Laboratoriów Loschmidta, seminarium, 24 godziny/rok
- 2011-2015: Seminarium zespołów badawczych Laboratoriów Loschmidta, seminarium, 24 godziny/rok

Kursy te były przeznaczone dla studentów biologii i biochemii, a ich celem było przekazanie praktycznej wiedzy na temat bioinformatycznych baz danych i narzędzi powszechnie stosowanych w badaniach biologicznych, z naciskiem na powiązanie teorii z odpowiednimi zastosowaniami praktycznymi. W przypadku kursu „Obliczeniowa biologia strukturalna” byłem odpowiedzialny za utworzenie kursu, opracowanie jego programu nauczania i przygotowanie materiałów do nauki, w tym interaktywnych materiałów e-learningowych z materiałami wideo. W przypadku innych kursów opracowywałem i prowadziłem wykłady lub ćwiczenia praktyczne.

## 6.2 Nadzór nad studentami

Dotychczas nadzorowałem lub współnadzorowałem prace **dwóch doktorantów, czterech magistrantów i dziewięciu licencjatów** uczestniczących w różnych programach studiów, **których prace zostały obronione z wynikiem pozytywnym**. W chwili obecnej sprawuję opiekę merytoryczną nad jedną pracą magisterską, pięcioma pracami licencjackimi i pięcioma pracami doktorskimi.

### **Promotor pomocniczy obronionych prac doktorskich:**

1. „*Molecular modelling of structure-function relationships in enzymes*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biologia molekularna i komórkowa (2017)
2. „*Molecular modelling of enzymes' substrate specificity*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Ekotoksykologia (2016)

### **Promotor obronionych prac magisterskich:**

1. „*Computational engineering of enzymes with buried active site*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Chemia Strukturalna (2018)
2. „*Software tool for automated design of mutations and smart libraries for protein engineering*”, Wydział Informatyki, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Bioinformatyka (2017)
3. „*Methods for identification of biologically relevant tunnels in proteins*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Genomika i Proteomika (2017)

### **Promotor pomocniczy obronionych prac magisterskich:**

4. „*In silico study of substrate specificity of haloalkane dehalogenases*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biochemia (2011)

### **Promotor obronionych prac licencjackich:**

1. „*Exploration of complex pores in structural ensembles of transmembrane proteins*”, Wydział Informatyki, Politechnika Poznańska, Studia: Bioinformatyka (2019)
2. „*A system for integration of bioinformatics tools for analyzing protein tunnels*”, Wydział Informatyki, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Systemy Komputerowe i Przetwarzanie Danych (2015)
3. „*Correlated mutations in proteins*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biologia molekularna i genetyka (2014)
4. „*Computational analysis of protein tunnels*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biologia matematyczna (2013)
5. „*Virtual screening of biologically active compounds*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Chemoinformatyka i bioinformatyka (2011)
6. „*Teoretical tools for design of tunnels in proteins*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Chemoinformatyka i bioinformatyka (2011)

### **Promotor pomocniczy obronionych prac licencjackich:**

7. „*Development of fluorescence substrates for enzymological applications*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Chemia biofizyczna (2015)

8. „*Molecular modeling of haloalkane dehalogenase activity with cyclodiene insecticides*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biochemia (2010)
9. „*Investigation of substrate specificity of haloalkane dehalogenase by virtual screening*”, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Masaryka, Brno, Republika Czeska, Studia: Biochemia (2009)

### 6.3 Działalność organizacyjna

W latach 2018 i 2019 byłem **członkiem komitetu programowego** dwóch uznanych na świecie konferencji z dziedziny biologii obliczeniowej: *27<sup>th</sup> Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology and 18<sup>th</sup> European Conference on Computational Biology (ISMB/ECCB 2019)* i *26<sup>th</sup> Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology (ISMB2018)*. Mój główny wkład polegał na ocenie i recenzowaniu manuskryptów nadesłanych do ang. „Conference Proceedings”. Ponadto w latach 2015-2016 **pełniłem funkcję wybranego członka organu wykonawczego krajowego komitetu „Head of Nodes Committee of the European Life-Science Infrastructure for Biological Information consortium (ELIXIR-CZ)”** z ramienia Międzynarodowego Ośrodka Badań Klinicznych Szpitala Uniwersyteckiego św. Anny, Republika Czeska.

### 6.4 Działalność popularyzująca naukę

W latach 2010-2014 byłem jednym z **organizatorów odbywającej się co dwa lata Letniej Szkoły Inżynierii Białek** na Uniwersytecie Masaryka w Brnie (Republika Czeska), **skierowanej do uczniów szkół średnich**. W ramach tego wydarzenia odbywały się tygodniowe szkolenia z zakresu produkcji i charakteryzacji białek, analizy bioinformatycznej oraz modelowania molekularnego. Byłem odpowiedzialny za przygotowanie materiałów dotyczących modelowania molekularnego, w tym krótkiego wprowadzenia do niezbędnej teorii i laboratoriów obliczeniowych dostosowanych do wiedzy słuchaczy. Szkoła spotkała się z dużym zainteresowaniem uczniów, o czym świadczy stosunek liczby przyjętych uczestników do całkowitej liczby chętnych (jeden do pięciu), a także fakt, że wielu uczestników zdecydowało się kontynuować naukę na różnych kierunkach studiów przyrodniczych na Uniwersytecie.

## 7 Referencje

- Amaro, M. *et al.* (2013) Are Time-Dependent Fluorescence Shifts at the Tunnel Mouth of Haloalkane Dehalogenase Enzymes Dependent on the Choice of the Chromophore? *J. Phys. Chem. B*, **117**, 7898–7906.
- Amaro, M. *et al.* (2015) Site-Specific Analysis of Protein Hydration Based on Unnatural Amino Acid Fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 4988–4992.
- Babkova, P. *et al.* (2017) Ancestral Haloalkane Dehalogenases Show Robustness and Unique Substrate Specificity. *ChemBioChem*, **18**, 1448–1456.
- Ball, P. (2008) Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem. Rev.*, **108**, 74–108.
- Bednar, D. *et al.* (2015) FireProt: Energy- and Evolution-Based Computational Design of Thermostable Multiple-Point Mutants. *PLoS Comput. Biol.*, **11**, e1004556.
- Beerens, K. *et al.* (2018) Evolutionary Analysis As a Powerful Complement to Energy Calculations for Protein Stabilization. *ACS Catal.*, **8**, 9420–9428.
- Bendl, J., Stourac, J., *et al.* (2016) HotSpot Wizard 2.0: Automated Design of Site-Specific Mutations and Smart Libraries in Protein Engineering. *Nucleic Acids Res.*, **44**, W479–W487.
- Bendl, J. *et al.* (2014) PredictSNP: Robust and Accurate Consensus Classifier for Prediction of Disease-Related Mutations. *PLoS Comput. Biol.*, **10**, e1003440.
- Bendl, J., Musil, M., *et al.* (2016) PredictSNP2: A Unified Platform for Accurately Evaluating SNP Effects by Exploiting the Different Characteristics of Variants in Distinct Genomic Regions. *PLoS Comput. Biol.*, **12**, e1004962.
- Bernetti, M. *et al.* (2017) Protein–Ligand (Un)binding Kinetics as a New Paradigm for Drug Discovery at the Crossroad Between Experiments and Modelling. *MedChemComm*, **8**, 534–550.
- Biedermannova, L. *et al.* (2012) A Single Mutation in a Tunnel to the Active Site Changes the Mechanism and Kinetics of Product Release in Haloalkane Dehalogenase LinB. *J. Biol. Chem.*, **287**, 29062–29074.
- Bowman, G.R. *et al.* (2010) Enhanced Modeling via Network Theory: Adaptive Sampling of Markov State Models. *J. Chem. Theory Comput.*, **6**, 787–794.
- Brezovsky, J. *et al.* (2018) Computational Analysis of Protein Tunnels and Channels. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ*, **1685**, 25–42.
- Brezovsky, J. *et al.* (2016) Engineering a de Novo Transport Tunnel. *ACS Catal.*, **6**, 7597–7610.
- Brezovsky, J. *et al.* (2013) Software Tools for Identification, Visualization and Analysis of Protein Tunnels and Channels. *Biotechnol. Adv.*, **31**, 38–49.
- Brezovsky, J. *et al.* (2021) TransportTools: a Library for High-Throughput Analyses of Internal Voids in Biomolecules and Ligand Transport Through Them. *Bioinformatics*, btab872.
- Brodsky, K. *et al.* (2020) Dual Substrate Specificity of the Rutinosidase from *Aspergillus niger* and the Role of Its Substrate Tunnel. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 5671.
- Buryska, T. *et al.* (2016) Discovery of Novel Haloalkane Dehalogenase Inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.*, **82**, 1958–1965.
- Callender, R. and Dyer, R.B. (2015) The Dynamical Nature of Enzymatic Catalysis. *Acc. Chem. Res.*, **48**, 407–413.
- Chaloupkova, R. *et al.* (2003) Modification of Activity and Specificity of Haloalkane Dehalogenase from *Sphingomonas paucimobilis* UT26 by Engineering of its Entrance Tunnel. *J. Biol. Chem.*, **278**, 52622–52628.
- Chaloupkova, R. *et al.* (2014) Structural and Functional Analysis of a Novel Haloalkane Dehalogenase with Two Halide-Binding Sites. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **70**, 1884–1897.
- Chavarría, M. *et al.* (2014) Fructose 1-Phosphate is the One and Only Physiological Effector of the Cra (FruR) Regulator of *Pseudomonas putida*. *FEBS Open Bio*, **4**, 377–386.

- Chovancova, E. *et al.* (2012) CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures. *PLOS Comput. Biol.*, **8**, e1002708.
- Chrast, L. *et al.* (2019) Deciphering the Structural Basis of High Thermostability of Dehalogenase from Psychrophilic Bacterium *Marinobacter* sp. ELB17. *Microorganisms*, **7**, 498.
- Cojocaru, V. *et al.* (2007) The Ins and Outs of Cytochrome P450s. *Biochim. Biophys. Acta*, **1770**, 390–401.
- Colletier, J.-P. *et al.* (2006) Structural Insights into Substrate Traffic and Inhibition in Acetylcholinesterase. *EMBO J.*, **25**, 2746–2756.
- Contente, M.L. *et al.* (2020) A Strategic Ser/Cys Exchange in the Catalytic Triad Unlocks an Acyltransferase-Mediated Synthesis of Thioesters and Tertiary Amides. *Nat. Catal.*, **3**, 1020–1026.
- Daniel, L. *et al.* (2015) Mechanism-Based Discovery of Novel Substrates of Haloalkane Dehalogenases Using in Silico Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, **55**, 54–62.
- Daniel, R.M. *et al.* (2004) Protein Hydration Dynamics in Solution: a Critical Survey. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **359**, 1207–1224.
- Decherchi, S. *et al.* (2015) The ligand binding mechanism to purine nucleoside phosphorylase elucidated via molecular dynamics and machine learning. *Nat. Commun.*, **6**, 6155.
- Denisov, I.G. *et al.* (2009) Cooperative properties of cytochromes P450. *Pharmacol. Ther.*, **124**, 151–167.
- Denisov, I.G. and Sligar, S.G. (2012) A Novel Type of Allosteric Regulation: Functional Cooperativity in Monomeric Proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **519**, 91–102.
- Dickson, A. and Lotz, S.D. (2016) Ligand Release Pathways Obtained with WExplore: Residence Times and Mechanisms. *J. Phys. Chem. B*, **120**, 5377–5385.
- Doerr, S. and De Fabritiis, G. (2014) On-the-Fly Learning and Sampling of Ligand Binding by High-Throughput Molecular Simulations. *J. Chem. Theory Comput.*, **10**, 2064–2069.
- Dvorak, P. *et al.* (2018) Computer-Assisted Engineering of Hyperstable Fibroblast Growth Factor 2. *Biotechnol. Bioeng.*, **115**, 850–862.
- Dvorak, P. *et al.* (2014) Maximizing the Efficiency of Multienzyme Process by Stoichiometry Optimization. *ChemBioChem*, **15**, 1891–1895.
- Fan, F. *et al.* (2019) A Comprehensive Understanding of Enzymatic Degradation of the G-Type Nerve Agent by Phosphotriesterase: Revised Role of Water Molecules and Rate-Limiting Product Release. *ACS Catal.*, **9**, 7038–7051.
- Filipovič, J. *et al.* (2020) CaverDock: A Novel Method for the Fast Analysis of Ligand Transport. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.*, **17**, 1625–1638.
- Flores, S. *et al.* (2006) The Database of Macromolecular Motions: New Features Added at the Decade Mark. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D296–301.
- Gora, A. *et al.* (2013) Gates of Enzymes. *Chem. Rev.*, **113**, 5871–5923.
- Grebenkov, D.S. *et al.* (2009) Dimensionality of Diffusive Exploration at the Protein Interface in Solution. *J. Phys. Chem. B*, **113**, 13347–13356.
- Grubmüller, H. *et al.* (1996) Ligand Binding: Molecular Mechanics Calculation of the Streptavidin-Biotin Rupture Force. *Science*, **271**, 997–999.
- Grulich, M. *et al.* (2016) In-silico Driven Engineering of Enantioselectivity of a Penicillin G Acylase Towards Active Pharmaceutical Ingredients. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **133**, S53–S59.
- Grulich, M. *et al.* (2015) Resolution of  $\alpha/\beta$ -Amino Acids by Enantioselective Penicillin G Acylase from *Achromobacter* sp. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **122**, 240–247.
- Hasan, K. *et al.* (2013) The Effect of a Unique Halide-Stabilizing Residue on the Catalytic Properties of Haloalkane Dehalogenase DatA from *Agrobacterium Tumefaciens* C58. *FEBS J.*, **280**, 3149–3159.

- Hu, K. *et al.* (2020) Human CYP2E1-Dependent Mutagenicity of Benzene and its Hydroxylated Metabolites in V79-Derived Vells: Suppression and Enhancement by Ethanol Pretreatment. *Environ. Mol. Mutagen.*, **61**, 622–634.
- Iermak, I. *et al.* (2021) Description of Transport Tunnel in Haloalkane Dehalogenase Variant LinB D147C+L177C from *Sphingobium Japonicum*. *Catalysts*, **11**, 5.
- Ison, J. *et al.* (2016) Tools and Data Services Registry: a Community Effort to Document Bioinformatics Resources. *Nucleic Acids Res.*, **44**, D38–D47.
- Jesenská, A. *et al.* (2009) Nanosecond Time-Dependent Stokes Shift at the Tunnel Mouth of Haloalkane Dehalogenases. *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 494–501.
- Jurcik, A. *et al.* (2018) CAVER Analyst 2.0: Analysis and Visualization of Channels and Tunnels in Protein Structures and Molecular Dynamics Trajectories. *Bioinformatics*, **34**, 3586–3588.
- Kaieda, S. and Halle, B. (2013) Internal Water and Microsecond Dynamics in Myoglobin. *J. Phys. Chem. B*, **117**, 14676–14687.
- Kaushik, S. *et al.* (2018) Impact of the Access Tunnel Engineering on Catalysis is Strictly Ligand-Specific. *FEBS J.*, **285**, 1456–1476.
- Khabiri, M. *et al.* (2013) Interaction of Organic Solvents with Protein Structures at Protein-Solvent Interface. *J. Mol. Model.*, **19**, 4701–4711.
- Kingsley, L.J. and Lill, M.A. (2014a) Ensemble Generation and the Influence of Protein Flexibility on Geometric Tunnel Prediction in Cytochrome P450 Enzymes. *PLoS One*, **9**, e99408.
- Kingsley, L.J. and Lill, M.A. (2014b) Including Ligand-Induced Protein Flexibility into Protein Tunnel Prediction. *J. Comput. Chem.*, **35**, 1748–1756.
- Kingsley, L.J. and Lill, M.A. (2015) Substrate Tunnels in Enzymes: Structure-Function Relationships and Computational Methodology. *Proteins*, **83**, 599–611.
- Klvana, M. *et al.* (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.
- Kokkonen, P. *et al.* (2018) Molecular Gating of an Engineered Enzyme Captured in Real Time. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 17999–18008.
- Kokkonen, P. *et al.* (2021) Substrate Inhibition by the Blockage of Product Release and its Control by Tunnel Engineering. *RSC Chem. Biol.*, **2**, 645–655.
- Koudelakova, T. *et al.* (2013) Engineering Enzyme Stability and Resistance to an Organic Cosolvent by Modification of Residues in the Access Tunnel. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **52**, 1959–1963.
- Koudelakova, T. *et al.* (2011) Substrate Specificity of Haloalkane Dehalogenases. *Biochem. J.*, **435**, 345–354.
- Kozlikova, B. *et al.* (2014) CAVER Analyst 1.0: Graphic Tool for Interactive Visualization and Analysis of Tunnels and Channels in Protein Structures. *Bioinformatics*, **30**, 2684–2685.
- Kurumbang, N.P. *et al.* (2014) Computer-Assisted Engineering of the Synthetic Pathway for Biodegradation of a Toxic Persistent Pollutant. *ACS Synth. Biol.*, **3**, 172–181.
- Laage, D. *et al.* (2017) Water Dynamics in the Hydration Shells of Biomolecules. *Chem. Rev.*, **117**, 10694–10725.
- Laio, A. and Parrinello, M. (2002) Escaping Free-Energy Minima. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **99**, 12562–12566.
- Limongelli, V. *et al.* (2010) Molecular Basis of Cyclooxygenase Enzymes (COXs) Selective Inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 5411–5416.
- Liskova, V. *et al.* (2015) Balancing the Stability–Activity Trade-Off by Fine-Tuning Dehalogenase Access Tunnels. *ChemCatChem*, **7**, 648–659.
- Liskova, V. *et al.* (2017) Different Structural Origins of the Enantioselectivity of Haloalkane Dehalogenases toward Linear  $\beta$ -Haloalkanes: Open–Solvated versus Occluded–Desolvated Active Sites. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **56**, 4719–4723.



- Liu, S. *et al.* (2000) Structures of Human Dihydroorotate Dehydrogenase in Complex with Antiproliferative Agents. *Structure*, **8**, 25–33.
- Lüdemann, S.K. *et al.* (2000) 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.
- Magdziarz, T. *et al.* (2017) AQUA-DUCT: a Ligands Tracking Tool. *Bioinformatics*, **33**, 2045–2046.
- Maragliano, L. and Vanden-Eijnden, E. (2006) A Temperature Accelerated Method for Sampling Free Energy and Determining Reaction Pathways in Rare Events Simulations. *Chem. Phys. Lett.*, **426**, 168–175.
- Marques, S., Dunajova, Z., *et al.* (2017) Catalytic Cycle of Haloalkane Dehalogenases Toward Unnatural Substrates Explored by Computational Modeling. *J. Chem. Inf. Model.*, **57**, 1970–1989.
- Marques, S., Daniel, L., *et al.* (2017) Enzyme Tunnels and Gates As Relevant Targets in Drug Design. *Med. Res. Rev.*, **37**, 1095–1139.
- Marques, S. *et al.* (2016) Role of Tunnels and Gates in Enzymatic Catalysis. In, Svendsen, A. (ed), *Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis*. CRC Press, Boca Raton, pp. 421–463.
- Miao, Y. *et al.* (2015) Gaussian Accelerated Molecular Dynamics: Unconstrained Enhanced Sampling and Free Energy Calculation. *J. Chem. Theory Comput.*, **11**, 3584–3595.
- Mitusińska, K. *et al.* (2020) Applications of Water Molecules for Analysis of Macromolecule Properties. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **18**, 355–365.
- Mollica, L. *et al.* (2015) Kinetics of Protein-Ligand Unbinding via Smoothed Potential Molecular Dynamics Simulations. *Sci. Rep.*, **5**, 11539.
- Monzon, A.M. *et al.* (2017) Conformational Diversity Analysis Reveals Three Functional Mechanisms in Proteins. *PLoS Comput. Biol.*, **13**, e1005398.
- Musil, M. *et al.* (2017) FireProt: Web Server for Automated Design of Thermostable Proteins. *Nucleic Acids Res.*, **45**, W393–W399.
- Musil, M. *et al.* (2021) FireProtASR: A Web Server for Fully Automated Ancestral Sequence Reconstruction. *Brief. Bioinform.*, **22**, bbaa337.
- Nehybova, T. *et al.* (2015) Wedelolactone Induces Growth of Breast Cancer Cells by Stimulation of Estrogen Receptor Signalling. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **152**, 76–83.
- Oprea, T.I. *et al.* (1997) Identification of a Functional Water Channel in Cytochrome P450 Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **94**, 2133–2138.
- Paloncyova, M. *et al.* (2016) Role of Enzyme Flexibility in Ligand Access and Egress to Active Site: Bias-Exchange Metadynamics Study of 1,3,7-Trimethyluric Acid in Cytochrome P450 3A4. *J. Chem. Theory Comput.*, **12**, 2101–2109.
- Pang, X. and Zhou, H.-X. (2017) Rate Constants and Mechanisms of Protein-Ligand Binding. *Annu. Rev. Biophys.*, **46**, 105–130.
- Pavelka, A. *et al.* (2016) CAVER: Algorithms for Analyzing Dynamics of Tunnels in Macromolecules. *IEEE/ACM Trans. Comput. Biol. Bioinform.*, **13**, 505–517.
- Pavlova, M. *et al.* (2009) Redesigning Dehalogenase Access Tunnels as a Strategy for Degrading an Anthropogenic Substrate. *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 727–733.
- Pinto, G.P. *et al.* (2019) Fast Screening of Inhibitor Binding/Unbinding Using Novel Software Tool CaverDock. *Front. Chem.*, **7**.
- Pinto, G.P. *et al.* (2021) Screening of World Approved Drugs Against Highly Dynamical Spike glycoprotein of SARS-CoV-2 using CaverDock and Machine Learning. *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **19**, 3187–3197.
- Plattner, N. and Noé, F. (2015) Protein Conformational Plasticity and Complex Ligand-Binding Kinetics Explored by Atomistic Simulations and Markov Models. *Nat. Commun.*, **6**, 7653.

- Porter, C.M. and Miller, B.G. (2012) Cooperativity in Monomeric Enzymes with Single Ligand-Binding Sites. *Bioorganic Chem.*, **43**, 44–50.
- Pravda, L. *et al.* (2014) Anatomy of Enzyme Channels. *BMC Bioinformatics*, **15**, 379.
- Prokop, Z. *et al.* (2010) Enantioselectivity of Haloalkane Dehalogenases and its Modulation by Surface Loop Engineering. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **49**, 6111–6115.
- Prokop, Z. *et al.* (2012) Engineering of protein tunnels: Keyhole-lock-key model for catalysis by the enzymes with buried active sites. In: Lutz, S. and Bornscheuer, U.T. (eds), *Protein Engineering Handbook*. Wiley-VCH, Weinheim, pp. 421–464.
- Rasaiah, J.C. *et al.* (2008) Water in Nonpolar Confinement: From Nanotubes to Proteins and Beyond. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **59**, 713–740.
- Reed, M.C. *et al.* (2010) The Biological Significance of Substrate Inhibition: a Mechanism with Diverse Functions. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.*, **32**, 422–429.
- Sanson, B. *et al.* (2011) Backdoor Opening Mechanism in Acetylcholinesterase Based on X-ray Crystallography and Molecular Dynamics Simulations. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, **20**, 1114–1118.
- Schuetz, D.A. *et al.* (2017) Kinetics for Drug Discovery: an Industry-Driven Effort to Target Drug Residence Time. *Drug Discov. Today*, **22**, 896–911.
- Sequeiros-Borja, C.E. *et al.* (2021) Recent Advances in User-Friendly Computational Tools to Engineer Protein Function. *Brief. Bioinform.*, **22**, bbaa150.
- Shan, Y. *et al.* (2011) How Does a Drug Molecule Find Its Target Binding Site? *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 9181–9183.
- Stepankova, V., Paterova, J., *et al.* (2013) Cation-Specific Effects on Enzymatic Catalysis Driven by Interactions at the Tunnel Mouth. *J. Phys. Chem. B*, **117**, 6394–6402.
- Stepankova, V., Khabiri, M., *et al.* (2013) Expansion of Access Tunnels and Active-Site Cavities Influence Activity of Haloalkane Dehalogenases in Organic Cosolvents. *ChemBioChem*, **14**, 890–897.
- Stourac, J. *et al.* (2019) Cover Web 1.0: Identification of Tunnels and Channels in Proteins and Analysis of Ligand Transport. *Nucleic Acids Res.*, **47**, W414–W422.
- Surpeta, B. *et al.* (2022) Common Dynamic Determinants Govern Quorum Quenching Activity in N-terminal Serine Hydrolases. *bioRxiv*, 2022.01.13.476167.
- Surpeta, B. *et al.* (2020) Dynamics, a Powerful Component of Current and Future in Silico Approaches for Protein Design and Engineering. *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 2713.
- Sykora, J. *et al.* (2014) Dynamics and Hydration Explain Failed Functional Transformation in Dehalogenase Design. *Nat. Chem. Biol.*, **10**, 428–430.
- Torrie, G.M. and Valleau, J.P. (1977) Nonphysical Sampling Distributions in Monte Carlo Free-Energy Estimation - Umbrella Sampling. *J. Comput. Phys.*, **23**, 187–199.
- Vanacek, P. *et al.* (2018) Exploration of Enzyme Diversity by Integrating Bioinformatics with Expression Analysis and Biochemical Characterization. *ACS Catal.*, **8**, 2402–2412.
- Vanden-Eijnden, E. and Venturoli, M. (2009) Markovian Milestoning with Voronoi Tessellations. *J. Chem. Phys.*, **130**, 194101.
- Vavra, O. *et al.* (2019) CaverDock: a Molecular Docking-Based Tool to Analyse Ligand Transport Through Protein Tunnels and Channels. *Bioinformatics*, **35**, 4986–4993.
- Votapka, L.W. *et al.* (2017) SEEKR: Simulation Enabled Estimation of Kinetic Rates, A Computational Tool to Estimate Molecular Kinetics and Its Application to Trypsin–Benzamidine Binding. *J. Phys. Chem. B*, **121**, 3597–3606.
- Winter, M.B. *et al.* (2011) Tunnels Modulate Ligand Flux in a Heme Nitric Oxide/Oxygen Binding (H-NOX) Domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **108**, E881–889.
- Wu, B. (2011) Substrate Inhibition Kinetics in Drug Metabolism Reactions. *Drug Metab. Rev.*, **43**, 440–456.

Xu,S. *et al.* (2012) Crystal Structure of 12-Lipoxygenase Catalytic-Domain-Inhibitor Complex Identifies a Substrate-Binding Channel for Catalysis. *Structure*, **20**, 1490–1497.

Zhu,L. *et al.* (2016) Elucidation of the Conformational Dynamics of Multi-Body Systems by Construction of Markov State Models. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 30228–30235.



(podpis wnioskodawcy)