

Autoreferat

1. Imię i nazwisko.

Łukasz Peplowski

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

- 2009 r. stopień doktora nauk fizycznych

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej;

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (UMK)

rozprawa doktorska „*Wykorzystanie metod dynamiki molekularnej i bioinformatyki do badania mechanizmów reakcji enzymatycznych, ze szczególnym uwzględnieniem hydratazy nitrylowej*”

promotor: prof. dr hab. Wiesław Nowak

- 2004 r. tytuł magistra fizyki, specjalność fizyka komputerowa,

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej, UMK

praca magisterska „*Komputerowe modelowanie aktywności enzymatycznej hydratazy nitrylowej – enzymu ważnego w biotechnologii*”

promotor: prof. dr hab. Wiesław Nowak

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych lub artystycznych.

- 2009-teraz: Adiunkt, Wydział Fizyki Astronomii i Informatyki Stosowanej,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

- II-III 2011: Researcher, Dział R&D, Adamed Sp. z o.o. z siedzibą w Pieńkowie.

- 2008-2009: Asystent, Wydział Fizyki Astronomii i Informatyki Stosowanej,

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu.

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.

Zastosowanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do ulepszania enzymów biotechnologicznych.

4.2. Cele badawcze, wyniki i opis opartych na nich publikacji, wpływ na przyszłe badania.

Osiągnięcie naukowe, które stanowi podstawę niniejszego wniosku polega na zastosowaniu metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do poprawiania wybranych właściwości enzymów biotechnologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem hydratazy nitrylowej (NHaza) [1], oraz enzymu fosforylaza sacharozy (SPaza) [2]. Oba te białka używane są na skalę masową w firmach biotechnologicznych, dzięki czemu tanio i ekologicznie uzyskuje się szereg pożądaných związków chemicznych. Zarówno świat naukowy jak i przemysł biotechnologiczny poszukują nowych narzędzi umożliwiających projektowanie ulepszonych wariantów enzymów. Inżynieria genetyczna pozwala wytworzyć białka wykazujące lepsze cechy w porównaniu do enzymów naturalnie występujących w organizmach żywych (w niniejszym autoreferacie często do oznaczenia białka naturalnie występującego, inaczej natywnego używany będzie skrót WT z angielskiego „*Wild Type*”). Ulepszone enzymy mają też duże znaczenie poznawcze. Ich badanie daje wgląd w molekularne mechanizmy rządzące materią ożywioną co skutkuje lepszym zrozumieniem otaczającego nas świata. W przypadku komercyjnego zastosowania udoskonalony enzym pozwala zaoszczędzić czas i energię potrzebną do wyprodukowania wielu komercyjnie ważnych związków. Obserwujemy silny trend stymulowany m.in. ekologią by stosować do produkcji procesy biotechnologiczne, które są niejednokrotnie dużo czystsze niż metody klasycznej chemicznej. Firma stosująca bardziej wydajne enzymy będzie miała wymierne korzyści finansowe. Potrzeba zaawansowanych badań naukowych enzymów, w tym badań biofizycznych jest zatem bardzo duża.

Jednym z możliwych podejść do ulepszania enzymów może być zastosowanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej, a dokładniej metod dynamiki molekularnej i dokowania molekularnego. Metody te, jak pokazują m.in. nasze publikacje, pozwalają przy wsparciu narzędzi bioinformatycznych oraz narzędzi biotechnologii eksperymentalnej stosunkowo tanio i w krótkim czasie zaprojektować nowe, ulepszone warianty enzymów. Ulepszenie może oznaczać m.in. zwiększoną aktywność katalityczną, większą termostabilnością lub dobrą selektywność względem wybranych substratów. Co więcej, przy pomocy narzędzi teoretycznej biofizyki obliczeniowej możemy wyjaśnić dlaczego ulepszone białka działają bardziej efektywnie.

4.2.1. Wstęp i motywacja badań.

Kilka lat temu ludzkość zauważyła nadmierną eksploatację naszej planety. Poprzez ciągle zwiększanie się populacji trzeba produkować coraz więcej zarówno żywności, jak i leków, środków ochrony roślin i wszelkiego rodzaju związków chemicznych. Od wielu setek lat wykorzystywane są tradycyjne metody zarówno uprawy roślin jak i hodowli zwierząt. Natomiast środki chemiczne tworzone są głównie za pomocą metod technologii chemicznej. Takie podejście zużywa jednak bardzo dużo zasobów naturalnych i energii, zatruwając przy tym środowisko. Kilkadziesiąt lat temu naukowcy zauważyli, że często taniej i bardziej ekologicznie można produkować wiele związków chemicznych za pomocą najwydajniejszych maszyn: enzymów. Wielu naukowców uważa, że technologię produkcji czeka w najbliższym czasie rewolucja, polegająca na zamianie tradycyjnego rolnictwa, na żywność tworzoną poprzez bakterie, mające w sobie wbudowane enzymy, które będą tworzyć żywność tanio a co najważniejsze bez zużycia nadmiernej ilości wody energii i bez emisji gazów cieplarnianych [3-6]. W związku z tym że istnieje ogromna wręcz potrzeba zarówno poznawania jak działają enzymy, ale ich ulepszania zainteresowałem się tym tematem ulepszania enzymów. Zdałem sobie sprawę z tego, że moja duża wiedza z fizyki i metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej w zakresie badania biomolekuł, w szczególności niestandardowych enzymów, może wesprzeć prace grup eksperymentalnych. Jak się okazało, teoretyczne i obliczeniowe wsparcie okazało się niezmiernie ważne w projektowaniu dwóch enzymów.

Mając wcześniejsze doświadczenie z enzymem hydratasa nitrylowa (dalej NHaza), która katalizuje hydratację toksycznych nitryli, które często są odpadami procesów chemicznych np. w produkcji lateksu, do użytecznych amidów, które mogą być stosowane jako polepszacze gleby, dodatki do paszy (witamina PP) lub półprodukty do tworzenia ubrań z poliakryloamidu [7], a której możliwe mechanizmy katalityczne badałem w trakcie prac nad doktoratem, postanowiłem nawiązać współpracę z grupą, która bada te enzymy eksperymentalnie. Ponieważ w Polsce nie ma takich grup owocną współpracę udało się nawiązać z zagraniczną grupą naukową ze School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi China, którą kieruje prof. Zhemin Zhou. Nasze wspólne podejście do semi-racjonalnego projektowania bardziej wydajnych wariantów enzymów zaowocowało w sumie 10 artykułami naukowymi, w większości opublikowanymi w wysoko punktowanych czasopismach. Dzięki

owocnej współpracy z prof. Zhou, kilku wizytom habilitanta w Chinach udało się rozszerzyć współpracę z Jiangnan University o grupę prof. Xianzhonga Chena. Stosując podobne podejście jak do NHazy, dzięki danym z obliczeń poprawiono właściwości enzymu fosforylaza sacharozy, Do chwili obecnej opublikowano dwie prace naukowe. Nasze innowacyjne podejście do semi-racjonalnego ulepszania enzymów biotechnologicznych za pomocą metod biofizyki teoretycznej oraz biotechnologii eksperymentalnej jest unikalne, ponieważ niewiele grup na świecie stosuje takie podejście w szczególności do enzymów niestandardowych jakim jest hydratasa nitrylowa. Zawiera ona posttranslacyjnie zmodyfikowane aminokwasy oraz jon metalu w centrum katalitycznym, sprawiając że niedoświadczeni naukowcy bez dogłębnej wiedzy nt. metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej nie są w stanie modelować i badać właściwości takich enzymów. Warto w tym miejscu wspomnieć, że uniwersytet z którym nawiązałem współpracę, tzn. Jiangnan University w rankingu Szanghajskim w 2022 roku uplasował się na pozycji 44 w dyscyplinie biotechnologia oraz na pierwszej w naukach o żywności i technologii żywności (ranking światowy).

Jedną z najczęściej stosowanych metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej jest klasyczna dynamika molekularna (z ang. *molecular dynamics*, MD) [8]. W wielkim skrócie, metoda MD polega na numerycznym całkowaniu równań ruchu Newtona (4.1) co pozwala na przeprowadzenie symulacji ewolucji w czasie w ujęciu klasycznym, modelu opisującego złożony układ fizyczny zbudowany np. z atomów o masach m_i i położeniach r_i :

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} \quad (4.1)$$

W przypadku modelowania układów biologicznych realizuje się to z uwzględnieniem licznych oddziaływań atom-atom, w celu uzyskania informacji o właściwościach materii ożywionej w środowisku jak najbardziej przypominającym naturalne otoczenie badanego układu, np. w środowisku wodnym. Wyżej wspomniane oddziaływania to m.in. wiązania kowalencyjne, oddziaływania elektrostatyczne, oddziaływania van der Waalsa czy wiązania wodorowe. Oddziaływania te powodują, że wszystkie atomy w badanym układzie oddziałują nawzajem z siłami wyznaczonymi za pomocą pewnej funkcji analitycznej opisującej energię potencjalną oraz zespołu parametrów tej funkcji. Funkcję tą nazywa się popularnie polem siłowym [9] (4.2).

$$\begin{aligned}
V(r) = & \sum K_b(b-b_0)^2 + \sum K_\theta(\theta-\theta_0)^2 + \sum K_{UB}(s-s_0)^2 + \\
& \sum K_\chi(1+\cos(n\chi-\delta)) + \sum K_{imp}(\varphi-\varphi_0)^2 + \\
& \sum \mathcal{E} \left[\left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{R_{\min_{ij}}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \sum \frac{q_i q_j}{\epsilon_\epsilon r_{ij}}.
\end{aligned} \tag{4.2}$$

Pole siłowe reprezentuje energię potencjalną statycznego układu oddziałujących na siebie atomów. Mając zdefiniowany potencjał dla badanego układu można wyznaczyć siły działające na poszczególne atomy (4.3):

$$\vec{F}_i = -\vec{\nabla}_{\vec{r}_i} V(\vec{r}_1, \dots, \vec{r}_N). \tag{4.3}$$

Mając tak wyznaczone siły działające na atomy modelu w konkretnej chwili czasu t , można wyznaczyć położenia atomów w następnym kroku, czyli czasie przyszłym (4.4):

$$\vec{r}(t + \Delta t) = \vec{r}(t) + \vec{v}(t)\Delta t + \frac{1}{2} \frac{\vec{F}(t)}{m} \Delta t^2. \tag{4.4}$$

Aby to zrobić potrzebna jest jeszcze informacja o prędkościach atomów. Początkowe prędkości N atomów generuje się zwykle losowo zgodnie z rozkładem Maxwella-Boltzmann'a i z zadaną temperaturą T układu, łącząc energię kinetyczną atomów z zasadą ekwipartycji energii (4.5):

$$\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N m_i \langle v_i^2 \rangle = \frac{3}{2} N k_B T, \tag{4.5}$$

gdzie k_B oznacza stałą Boltzmann'a.

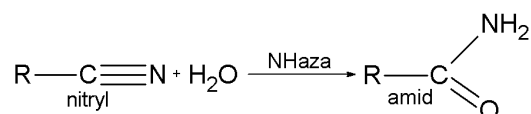
Prędkości v atomów w następnych krokach wyznacza zgodnie z równaniem (4.6):

$$\vec{v}(t + \Delta t) = \vec{v}(t) + \frac{\vec{F}(t) + \vec{F}(t + \Delta t)}{2m} \Delta t, \tag{4.6}$$

Równania (4.4) oraz (4.6) noszą nazwę prędkościowego algorytmu Verleta [10, 11]. We wszystkich pracach przedstawionych jako główne osiągnięcie habilitacyjne stosowane było konsekwentnie pole siłowe CHARMM 27 [9, 12]. Do opisu oddziaływań niestandardowego centrum katalitycznego hydratazy nitrylowej użyto parametrów i topologii zgodnych z polem siłowym CHARMM, opracowanych na podstawie obliczeń kwantowych przeprowadzonych w trakcie pracy doktorskiej habilitanta i użytych po raz pierwszy w publikacji dotyczącej transportu ligandów NHazy wewnątrz białka [13] (praca czysto teoretyczna).

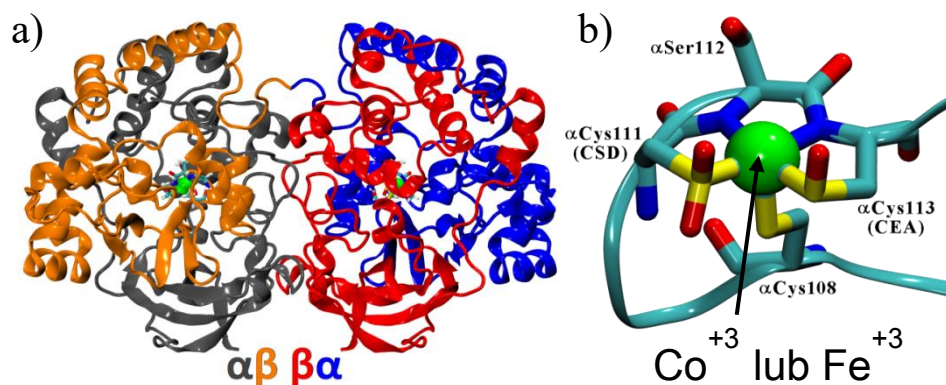
Metoda komputerowego dokowania małych ligandów do białek polega na algorytmicznym poszukiwaniu takiego wzajemnego ułożenia liganda i białka, aby funkcja energii potencjalnej np. w postaci (4.2) przyjmowała jak najmniejszą wartość [14, 15]. Ja stosowałem dokowanie za pomocą algorytmu genetycznego Lamarcka zaimplementowanego w programie AutoDock 4.2 [16]. Niestety żaden z wielu testowanych komercyjnych programów nie pozwalał dokować do NHazy zawierającej niestandardowe centrum z jonem kobaltu Co^{3+} . AutoDock był jedynym narzędziem pozwalającym dokować ligandy do NHazy. Modyfikując standardowe protokoły obliczeniowe oraz dzięki możliwości wprowadzenia własnych parametrów opisujących atomy AutoDock pozwolił przewidzieć realistyczne położenia ligandów wewnątrz białka, które opublikowałem jeszcze w trakcie pracy nad rozprawą doktorską [17], a następnie zostały potwierdzone doświadczalnie [18].

Metodami biofizyki obliczeniowej w połączeniu z narzędziami bioinformatycznymi badałem głównie enzym hydratyzujący nitrylowe (NHaza, EC 4.2.1.84) [1, 19]. Enzym ten katalizuje reakcję hydratacji toksycznych nitryli do bardzo użytecznych amidów (Rys. 1).



Rys. 1. Schemat reakcji przeprowadzanej przez hydratyzację nitrylową.

Najmniejsza aktywna podjednostka NHazy to heterotetramer $\alpha\beta\beta\alpha$ złożony z dwóch identycznych heterodimerów $\alpha\beta$ (Rys. 2a). W każdym dimerze znajduje się niestandardowe centrum katalityczne zawierające jon kobaltu (Co^{3+}) lub żelaza (Fe^{3+}), dwie posttranslacyjnie zmodyfikowane cysteiny (sulfincysteina (CSD) oraz sulfenocysteina (CEA)), a także standardową cysteinę oraz serynę (Rys. 2b).



Rys. 2. Heterotetramer hydratyzacji nitrylowej z wyszczególnionymi łańcuchami oraz zaznaczonym centrum katalitycznym a). Niestandardowe centrum katalityczne NHazy z zaznaczonym jonem metalu b). W panelu b) numeracja aminokwasów jest zgodna ze strukturą krystalograficzną 1IRE.

NH_{az} o różnej sekwencji aminokwasowej jest bardzo dużo. Według bazy danych RefSeq [20] na dzień 1.10.2022 było znanych 4823 sekwencji podjednostki alfa oraz 5432 sekwencji podjednostki beta. Często różnice w składzie aminokwasowym mogą być znaczne i ilość identycznych aminokwasów może być mniejsza niż 40% [21]. Hydrataza nitrylowa w zależności od organizmu z którego pochodzi może wykazywać różne aktywności katalityczne względem danych substratów np. NH_{az} z bakterii *Rhodococcus* Sp. N-774 wykazuje się aktywnością w tworzeniu akryloamidu rzędu 500 g/(g komórek) a *Rhodococcus rhodochrous* J1 rzędu 7000 g/(g komórek) [22, 23]. Zwiększanie wydajności katalitycznej tego enzymu jest ważne z punktu widzenia firm biotechnologicznych, ponieważ w tym samym czasie mogą wytworzyć znacznie więcej amidów.

Termostabilność NH_{az} też może być różna. NH_{az} z *Pseudomonas chlororaphis* B23 [24] oraz *Rhodococcus* sp. N-774 są stabilne w temperaturze poniżej 20°C [25], a NH_{az} z *Rhodococcus rhodochrous* J1 stabilna tylko pomiędzy 10°C a 30°C [26]. Wariant NH_{azy} pochodzący z termostabilnego organizmu *Pseudonocardia thermophila* JCM3095 jest stabilna nawet w 50°C chociaż już po ok 18 minutach wykazuje tylko połowę początkowej aktywności [H4]. Termostabilność jest jednym z kluczowych czynników przy praktycznym wykorzystaniu NH_{azy} w przemyśle. Reakcja hydratacji nitryli jest reakcją egzoenergetyczną [19]. W związku z tym bioreaktory w których przeprowadzana jest reakcja mocno się nagrzewają. Można je schładzać (co jest nieekonomiczne), bądź użyć enzymu bardziej stabilnego w wysokich temperaturach. Poza tym podwyższona temperatura bioreaktora zapobiega namnażaniu się niechcianych mikroorganizmów [27]. Dlatego od wielu lat albo poszukuje się nowy bardziej termostabilnych NH_{az}, lub projektuje się je.

Kolejnym kluczowym czynnikiem w przypadku enzymów jest ich selektywność [28, 29]. Wiele enzymów wykazuje się selektywnością względem tylko jednego substratu. Natomiast inne enzymy mogą katalizować całą grupę związków i przeprowadzać ten sam rodzaj reakcji wielu różnych substratów zawierających daną grupę funkcyjną. W racjonalnym projektowaniu selektywności enzymów najczęściej chcemy zmusić enzym, aby z mieszaniny podobnych związków przeprowadził on katalizę dla jednego, wybranego substratu, albo poszerzyć spektrum katalizowanych związków. Produkt katalizy może stać się albo skutecznym, czystym i tanim w produkcji lekiem albo jego półproduktem [30, 31]. Z reguły hydratazy nitrylowe wykazują szerokie spektrum katalityczne, chociaż znane są warianty NH_{az}

wykazujące się selektywnością względem jednego z izomerów optycznych [32-34]. Przeważnie jednak wydajne NHazy stosowane na masową skalę w przemyśle nie wykazują się szczególnie znaczącą selektywnością, a przemysł farmaceutyczny jak i chemiczny jest bardzo zainteresowany uzyskiwaniem różnych związków (np. leków lub ich półproduktów) pochodzących z czystej biosyntezy [19, 31].

O sukcesiehydratazy nitrylowej w biotechnologicznym przetwarzaniu nitryli do amidów świadczy skala jej zastosowania. W publikacjach są można znaleźć doniesienia, że rocznie produkuje się więcej niż 600.000 ton akryloamidu przy użyciu NHazy [35]. Dane te (pochodzące z 2015 roku) są mocno niedoszacowane. Na skutek współpracy grupy prof. Zhou z dwoma, z co najmniej jedenastu firm znajdujących się w Chinach, (dokładniej Jiangsu Changjiu Agrochemical Co., Ltd oraz Xinyong Biochemical) wiem, że pod koniec roku 2019 produkowały one po co najmniej 50.000 ton akryloamidu rocznie. Oprócz wspomnianych powyżej chińskich firm biotechnologicznych akryloamid, nikotynoamid (witamina PP), 5-cyjanowaleramid (półprodukt herbicydów i leków na epilepsję), z wykorzystaniem NHazy produkuje się też w Japonii, Korei, Niemczech, Francji czy Stanach Zjednoczonych [19, 24, 36].

4.2.2. Wyniki badań i opis opartych na nich publikacji.

W celu zaprojektowania NHaz o polepszonych wyżej wymienionych właściwościach (tj. aktywność katalityczną, termostabilność oraz selektywność) oraz wyjaśnienia przyczyn ulepszenia wyżej wymienionych właściwości przedstawiono jako główny dorobek naukowy habilitanta. Wydaje się, że zadanie to jest problemem biochemicznym, czy biotechnologicznym, jednak porządne modelowania wymaga zaawansowanych metod teoretycznej biofizyki molekularnej. Dopiero podejście interdyscyplinarne, z silnym udziałem metod fizycznych, dało istotne osiągnięcia w projektowaniu enzymów o bardzo ulepszonych parametrach.

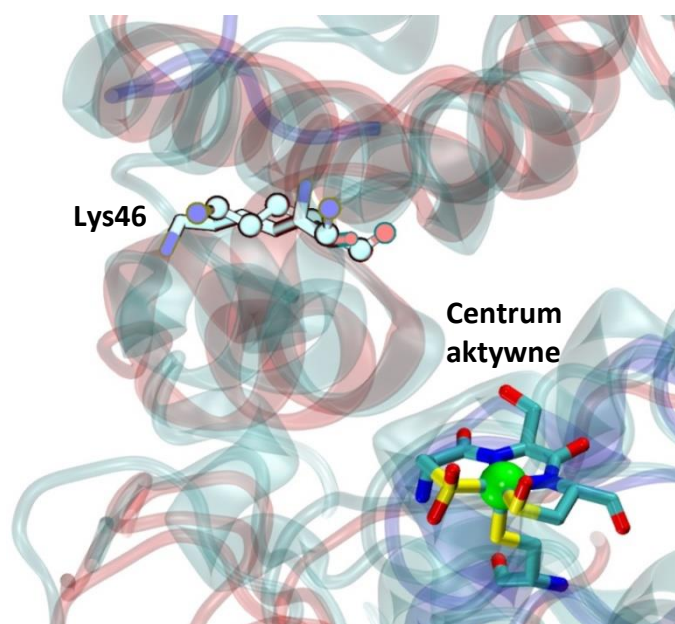
W publikacjach naukowych [H1], [H2], skupiłem się na wyjaśnieniu przyczyn zwiększonej aktywności NHaz. W pracach [H3] i [H4] też raportowano tworzenie enzymów o zwiększonej aktywności jednak główny nacisk położono w nich na to jak za pomocą narzędzi biofizyki teoretycznej i bioinformatyki zaprojektować bardziej termostabilny wariant enzymu i na dokładnym wyjaśnieniu przyczyn zwiększonej termostabilności. W pracy [H5] wyjaśniłem stosując techniki modelowania molekularnego czemu pewne warianty NHaz z dodatkowymi fragmentami białkowymi (tzw. linkerami) wykazują się większą termostabilnością niż białka

natywne. Aby pokazać, że za pomocą narzędzi teoretycznej biofizyki można zwiększać termostabilność innych enzymów biotechnologicznych w pracy [H6] zastosowano prawie identyczne podejście jak w pracy [H4] ale do enzymu fosforylaza sacharozy (SPaza). W publikacjach [H7] oraz [H8] pokazano jak za pomocą modelowania molekularnego pierw zaprojektować warianty enzymów wykazujące się stereoselektywnością lub katalizujące tylko jedną grupę nitrylową w symetrycznych dinitrilach, a następnie wyjaśnić ich nowe właściwości katalityczne.

Badania nad zwiększaniem aktywności katalitycznej enzymów.

Jak wspomniano wcześniej najmniejsza jednostka NHazy wykazująca się aktywnością katalityczną jest tetramer $\alpha\beta\beta\alpha$. Fizycy stosując modele często próbują uprościć je tak, aby pomimo prostszego opisu w dalszym ciągu można było wiarygodne dane badawcze. Jeszcze kilka lat temu dostęp do mocy obliczeniowej był na tyle ograniczony, że czasy symulacji MD układów biologicznych wynosiły pojedyncze dziesiątki nanosekund. W przypadku białek złożonych z kilku identycznych podjednostek stosowane było podejście polegające na badaniu pojedynczego fragmentu i ekstrapolowaniu wyników na większy układ. Podobne podejście stosowano dla hydratazy nitrylowej, gdzie w początkowo badano za pomocą technik biofizyki teoretycznej jedynie pojedynczy dimer $\alpha\beta$. W istocie wszystkie struktury NHaz dostępne w Protein Data Bank [37] (PDB, bank danych struktur przestrzennych biomolekuł) są właśnie dimerami, a tetramery otrzymuje się jedynie poprzez odpowiednie transformacje symetrii. W znanych mi zespołach badawczych i publikacjach nikt poza mną nie stosuje pełnego modelu tetrameru NHazy w badaniach teoretycznych. Powszechnie jest stosowanie uproszczonego modelu dimeru. Nikt poza mną nie stosuje też pełnego i realistycznego modelu centrum katalitycznego w symulacjach MD. Pozostałe grupy stosują w badaniach apoenzym bez jonu kobaltu (żelaza) oraz bez postranslacyjnych modyfikacji [38-41], w związku z tym nie uwzględniają w swoich modelach wszystkich oddziaływań. Przyczyną tego stanu rzeczy jest brak możliwości stworzenia w generatorach parametrów i topologii [42, 43] całego centrum katalitycznego wbudowanego w białko. Opracowane przeze mnie parametry i topologie zgodne z polem siłowych CHARMM 27 na podstawie obliczeń kwantowochemicznych realizowanych w ramach rozprawy doktorskiej pozwalają na stworzenie dokładniejszego, a co za tym idzie bardziej realistycznego modelu fizycznego.

Symulacje dynamiki molekularnej z powodzeniem mogą być stosowane do wyjaśniania przyczyn zwiększonej aktywności enzymów. Dobrym przykładem mogą być badania NHazy pochodzącej z termofilnej bakterii *Pseudonocardia Thermophila* JCM 3095 (*PtNHaza*). Znana jest ona od wielu lat [44], a w 2001 roku rozwiązano jej strukturę krystalograficzną i umieszczono w Protein Data Bank (kod 1IRE) [45]. Enzym ten, pomimo pochodzenia z organizmu termofilnego i stosowania w biotechnologicznym przetwarzaniu nitryli do amidów, ma jedną dużą wadę – niską aktywność w szczególności względem nitryli aromatycznych np. nikotynonitrylu czy benzonitrylu. Badania nad wariantem wykazującym poprawioną aktywnością katalityczną rozpocząłem wspólnie z grupą chińską już w 2018 roku. Wtedy to badaliśmy wariant β M46K *PtNHazy*, który wykazywał się 3,8 krotnie zwiększoną aktywnością katalityczną względem benzonitrylu (176 U/mg w białku natywnym, 668 U/mg w wariantcie β M46K). Symulacje MD pokazały, że zmieniając aminokwas hydrofobowy (metionina) na hydrofilowy (lizyna) zmienia się mocno jego ułożenie. Grupa boczna hydrofilowego aminokwasu będąca na początku wewnątrz białka we wszystkich przeprowadzonych symulacjach zmieniała położenie wychodząc do rozpuszczalnika. W przypadku symulacji białek jest to woda (model TIP3P). Powodowało to powiększenie kieszeni ulokowanej nad centrum katalitycznym. Późniejsza struktura krystalograficzna potwierdziła przewidywania symulacji MD (Rys. 3).



Rys. 3. Struktura krystalograficzna NHazy β M46K (kolor cyjanowy) z zaznaczoną lizyną 46 (reprezentacja „balls and sticks”) i nałożona na to struktura otrzymana po 20 ns symulacji dynamiki molekularnej (kolor czerwony) z zaznaczoną Lizyną 46 (reprezentacja „sticks”).

Dane te (poza pracą magisterską pani Lan Jao ze School of Biotechnology, Jiangnan University, Chiny) nigdy nie zostały opublikowane.

Analiza tuneli natywnej struktury IIRE, której dokonałem za pomocą narzędzia CAVER [46] pokazała, że β Met46 razem z aminokwasami β Phe41, β Gly47, β Leu48, β Leu127, β Pro128, β Ala129, β Arg131, β Ile177 oraz β Glu188 tworzy początek kanału prowadzącego do centrum katalitycznego. Analiza tego enzymu za pomocą serwera ConSurf [47] pokazała, że wszystkie aminokwasy budujące wejście do kanału poza β Phe41, β Met46, β Leu127, β Pro128 oraz β Ala129 są silnie konserwowane i nie powinno się ich modyfikować. Strona chińska wykonała badania metodą mutagenyzy nasyconej (z ang. *saturated mutagenesis*) niekonserwowanych aminokwasów. Analiza wszystkich 100 wariantów pokazała, że dwa mutanty β M46R oraz β A129R *PtNHazy* wykazują szczególnie dużą aktywność katalityczną względem wielu nitryli. W związku z tym postanowiliśmy zbadać przyczyny tej korzystnej aktywności katalitycznej, porównując dane z białkiem natywnym. Wyniki badań opublikowaliśmy w pracy [H1].

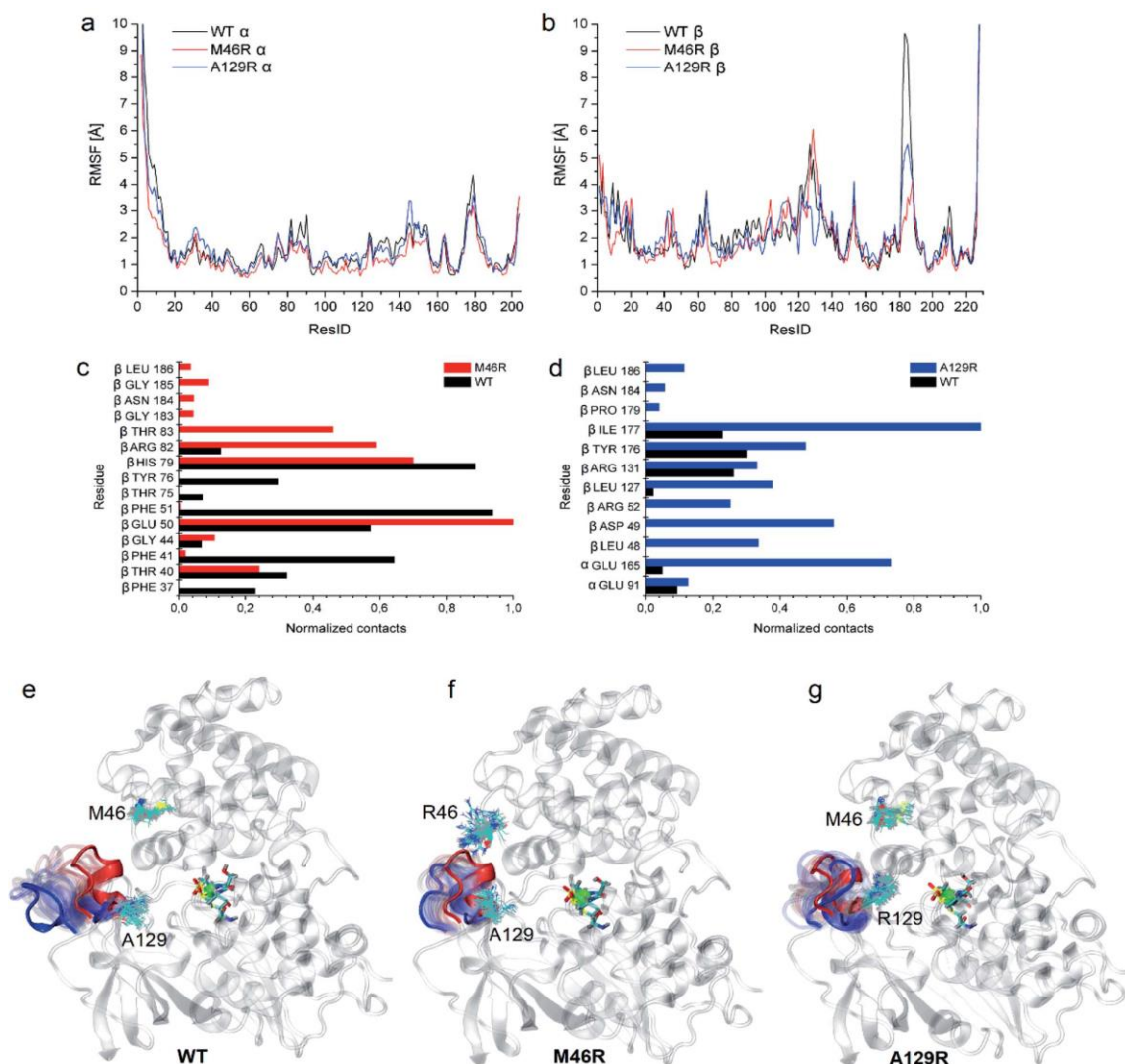
W Tabeli 1 przedstawiono aktywności katalityczne natywnej hydratazy oraz dwóch najwydajniejszych wariantów β M46R jak i β A129R (w publikacji przedstawiono też aktywności innych wariantów). Co ciekawe w przypadku bardzo dużego nitrylu tyocamycyny wariant natywny pierwotnie nie wykazywał żadnej aktywności, natomiast oba warianty mutacyjne były w stanie przeprowadzać hydratację tego nitrylu dając sangiwamycynę – analog nukleozydu będący antybiotykiem, środkiem przeciwwirusowym oraz przeciwnowotworowym [48, 49].

Tabela 1. Aktywność natywnej *PtNHazy* i jej wariantów mutacyjnych względem wybranych nitryli. Źródło [H1].

Substrate	Specific activity (U mg ⁻¹)				
	WT	M46R	Fold	A129R	Fold
Acrylonitrile	2463 ± 153.8	3056 ± 251.3	1.2	2542 ± 236.8	1
Isobutyronitrile	666.2 ± 80.8	3720.5 ± 77.3	5.6	1498.9 ± 89.6	2.3
Pentanenitrile	14.4 ± 0.9	118.4 ± 3.7	8.2	60.5 ± 15.3	4.2
Hexanenitrile	1982.4 ± 83.8	5613.3 ± 112.9	2.8	1503.6 ± 154.8	0.8
2-Cyanopyrazine	203.2 ± 8.1	851.2 ± 8.1	4.2	660.4 ± 4.0	3.3
3-Cyanopyridine	66.7 ± 1.0	396.4 ± 8.3	5.9	661.8 ± 69.0	9.9
Benzonitrile	176.5 ± 8.1	1704.7 ± 11.2	9.7	1211.9 ± 17.6	6.9
Cinnamonitrile	45.8 ± 1.0	282.9 ± 12.3	6.2	379.1 ± 5.2	8.3
1-Naphthonitrile	13.1 ± 1.7	84.3 ± 4.2	6.4	20.6 ± 1.8	1.6
Thiacloprid	5.4 ± 0.3	42.2 ± 1.0	7.8	78.9 ± 2.3	14.6
Toyocamycin	0	12.6 ± 1.2 ^a	—	4.2 ± 1.2 ^a	—

Przyczyna polepszonej aktywności leży zapewne w zmienionej strukturze mutantów w stosunku do WT. By poznać ten mechanizm lepszej katalizy uzyskano wspólnie ze stroną chińską kryształy tych białek i rozwiązano strukturę przestrzenną obu wariantów. Struktury krystalograficzne zdeponowane zostały w bazie Protein Data Bank pod kodami 7W8L – wariant β M46R oraz 7W8M – wariant β A129R. Moim zadaniem w tym przypadku była walidacja danych krystalograficznych (np. wykrycie braków w dopasowaniu aminokwasów, a w szczególności modyfikacji posttranslacyjnych i poprawnej budowy centrum katalitycznego) oraz porównanie nowych struktur do struktury natywnej IIRE. Analiza przyniosła ciekawe wyniki. Zauważyłem, że podobnie jak w przypadku *PtNHazy* β M46K, w wariacie β M46R arginina zorientowana jest na zewnątrz, do rozpuszczalnika, zmieniając ułożenie aminokwasów budujących kieszeń katalityczną. Arginina w łańcuchu β na pozycji 129 tworzy natomiast mostek solny z β Asp49, przez co łańcuch boczny argininy częściowo zorientowany był w kierunku rozpuszczalnika. Nativna *PtNHaza* hydrofobową grupę boczną alaniny miała skierowaną do wewnątrz białka (z ang. *buried*). Niestety statyczne struktury nie dały pełnej odpowiedzi dlaczego nowe warianty enzymów wykazują się lepszą aktywnością katalityczną niż WT. Analiza struktur krystalograficznych za pomocą narzędzia CAVER pokazała, że wejście do centrum katalitycznego jest nieco większe w zmodyfikowanych białkach, ale tuż za tym obszarem jest wąski przesmyk – przejście bardzo podobne we wszystkich przypadkach (Rys. 4. w publikacji [H1]). Pełniejszy obraz przyczyn efektywniejszej katalizy w wariantach *PtNHazy* uzyskałem dzięki symulacjom MD. Dla każdego wariantu obliczyłem 200 ns trajektorie w temperaturze 300K.

Analiza wykresów RMSD (z ang. *Root Mean Square Distance*; Rys. S7 w [H1]) pokazała, że globalnie wszystkie warianty *PtNHazy* w trakcie symulacji zachowują się poprawnie (stabilnie) oraz podobnie do symulacji przeprowadzonych dla innych NHaz. Analiza fluktuacji (inaczej RMSF, z ang. *Root Mean Square Fluctuations*, Rys. 4a i 4b) uwidoczniała duże różnice w łańcuchu β w obszarze aminokwasów 181-187 (Rys. 4b). W białku natywnym zauważyłem dużo większą ruchliwość aminokwasów w tym obszarze niż w obu wariantach mutacyjnych. Analiza kontaktów aminokwasów (za kontakt w tym przypadku uważa się sytuację, w której dowolne atomy z dwóch aminokwasów zbliżają się na odległość mniejszą niż 4 Å) na pozycjach 46 i 129 w łańcuchu β pokazała, że natywne aminokwasy oddziałują w inny sposób niż te zmutowane (Rys. 4c i 4d). W przypadku aminokwasu β Arg46 zanikają całkowicie

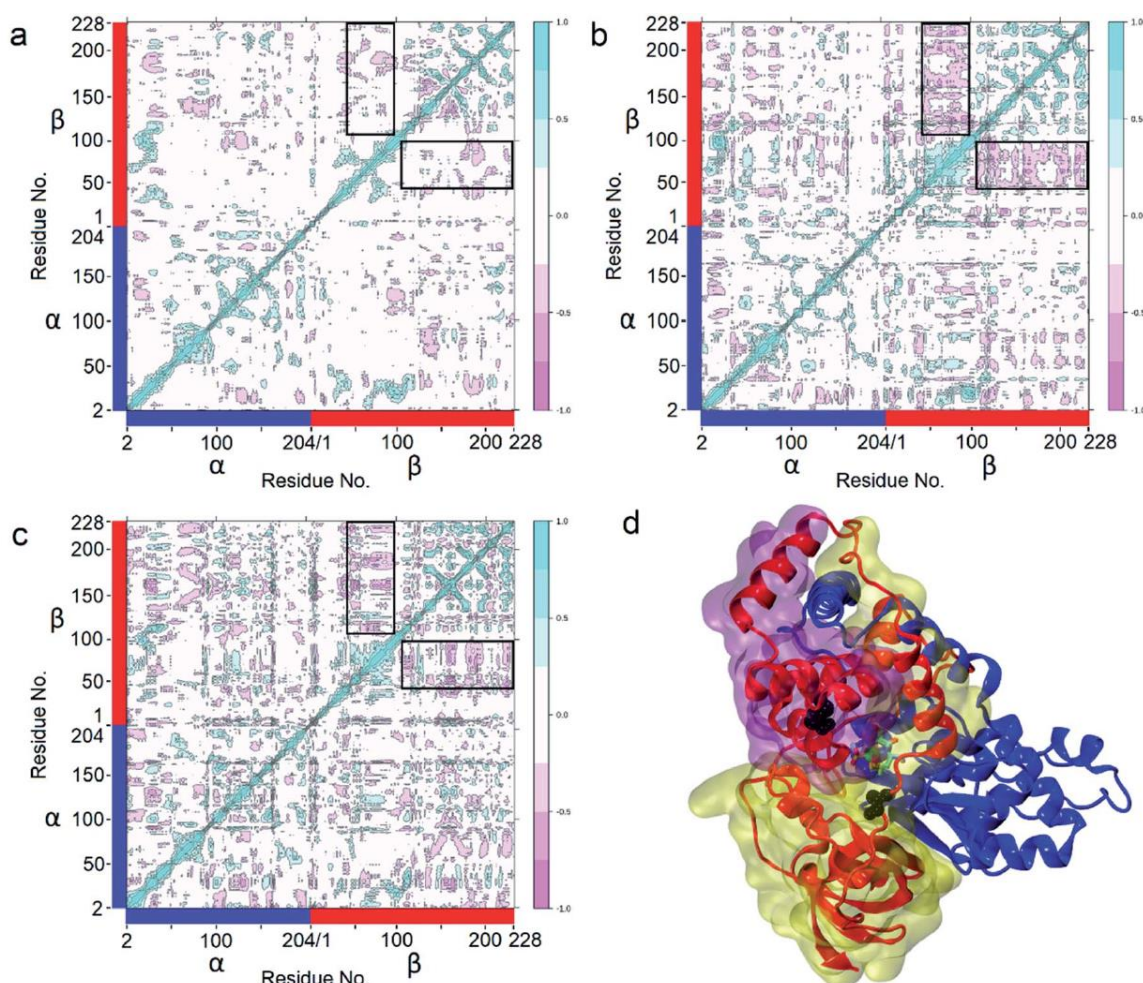


Rys. 4. Analiza trajektorii symulacji dynamiki molekularnej. Na panelach a i b umieszczono wykresy fluktuacji łańcuchów α i β . Na panelach c i d porównano kontakty aminokwasów na pozycjach 46 oraz 129. Na panelach e, f oraz g pokazano wpływ mutacji na aminokwasy β 181-189. Źródło [H1].

kontakty z aminokwasami tworzącymi ściany kieszeni katalitycznej (np. z β Phe51, β Phe41, β Tyr76) a pojawiają się nowe oddziaływania (np. z β Thr83, β Arg82). W przypadku pozycji 129 alanina w WT ma niewielką ilość kontaktów z aminokwasami β Arg131, β Tyr176, β Ile177 (Rys. 4c). Wprowadzenie mutacji i zamiana tego aminokwasu na argininę powoduje zwiększenie liczby kontaktów z powyższymi aminokwasami, a dodatkowo pojawiają się nowe kontakty np. z α Glu165, β Asp49 (mostek solny), β Arg52, β Leu127 oraz w nieznacznym stopniu z aminokwasami 179-186 (Rys. 4d). Nowopowstałe oddziaływania stabilizują aminokwasy 181-187 z łańcucha β (Rys. 4e, 4f, 4g). Obszar ten znajduje się blisko wejścia do centrum katalitycznego, dodatkowo dzięki mutagenie wprowadzono nowe oddziaływania z ważnymi dla katalizy aminokwasami (β Arg52) [50], stabilizując poprawną strukturę centrum katalitycznego.

Obie mutacje powodują powiększenie kieszeni nad centrum katalitycznym. Przeprowadzona przeze mnie analiza wyników symulacji MD za pomocą programu CAVER pokazała, że w białku natywnym kieszeń miała objętość $178,2 \pm 55,0 \text{ \AA}^3$, natomiast w enzymach zmodyfikowanych wynoszą one odpowiednio $193,7 \pm 40,4 \text{ \AA}^3$ oraz $206,9 \pm 61,3 \text{ \AA}^3$, co powoduje, że do jonu metalu mogą zbliżyć się większe substraty np. tyocamycyna i mogą one ulec hydratacji.

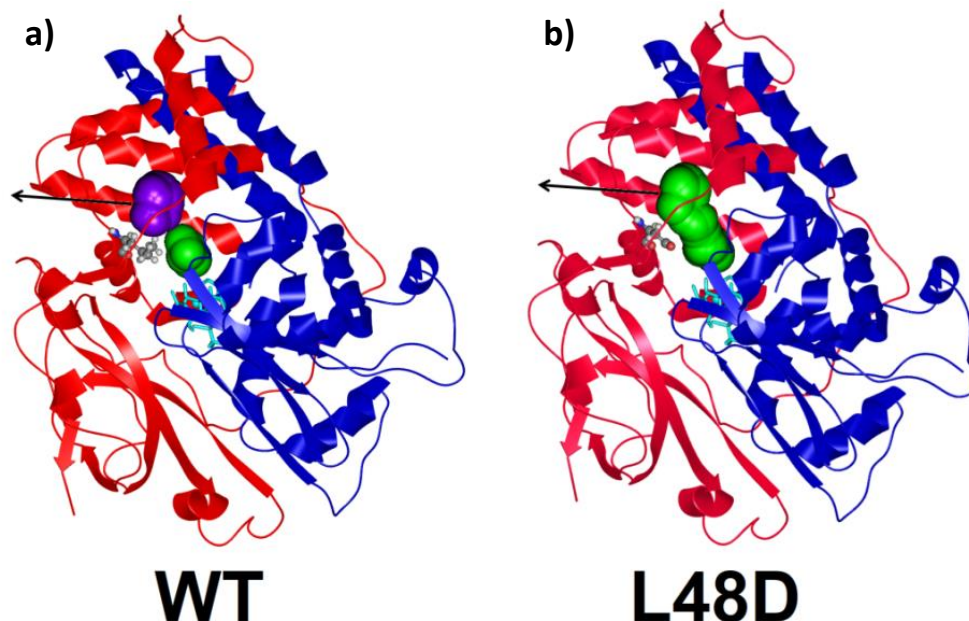
Kolejnym czynnikiem zwiększającym aktywność katalityczną względem dużych aminokwasów jest zmiana w korelacji wzajemnej ruchów dużych fragmentów podjednostki β , tj. aminokwasów od 37 do 97 z aminokwasami z zakresu 107-227. W białku natywnym ruch jest słabo skorelowany, wprowadzenie mutacji powoduje anty-skorelowany ruch co sprawia, że podjednostka β wykonuje drgania oddychające o niskiej częstotliwości (tzw. *breathing mode*), a w konsekwencji daje to częstsze otwieranie kanału prowadzącego do/z centrum katalitycznego (Rys. 5), a co za tym idzie zwiększoną aktywność katalityczną.



Rys. 5. Macierze korelacji wzajemnej obliczone na podstawie symulacji MD dla białka natywnego a), *PtNHazy* M46R b), oraz *PtNHazy* A129R c). Na panelu d) oznaczono obszary łańcucha β , wykazujące się antykorelacją wzajemną ruchów o niskiej częstotliwości. Na fioletowo zaznaczono aminokwasy β 37-97 a na żółto β 107-229. Źródło [H1].

Następnym zagadnieniem związanym z wyjaśnieniem zwiększonej aktywności katalitycznej były badania termostabilnej hydratazy nitrylowej pochodzącej z bakterii *Streptomyces thermoautotrophicus* (StNHaza) [H2]. Dużym problemem w tym przypadku był brak struktury krystalograficznej StNHazy. Początkowe położenia atomów są niezbędne do realizacji symulacji MD, w związku z tym doktorantka mgr. Julia Berdychowska, (jestem jej promotorem pomocniczym) opracowała pod moim nadzorem model homologiczny tetrameru za pomocą narzędzia SwissModel [51] (Rys. S5 w suplemencie [H2]). Model ten według ocen programów sprawdzających struktury 3D [52-54] jest bardzo dobrej jakości. Dodatkowo potwierdzone to zostało w podstawowej analizie symulacji MD, w których wartości RMSD (Rys. S6 w suplemencie [H2]) oraz RMSF (Rys. S7 w suplemencie [H2]) były bardzo podobne do tych, z symulacji wcześniej przeprowadzonych przez nas oraz przez inne grupy badawcze [H1], [H4], [H5], [41]. Podobnie jak w przypadku [H1] w tym problemie też zastosowałem narzędzie CAVER [46] do identyfikacji aminokwasów tworzących wejście do centrum katalitycznego. Były to aminokwasy β Leu37, β Phe41, β Tyr46, β Leu48 oraz β Phe51. Wszystkie powyższe aminokwasy zostały zmutowane przez współpracowników z Wuxi kolejno na prolinę, lizynę kwas asparginowy, alaninę, fenyloalaninę oraz argininę. Eksperymenty pokazały, że wariantem wykazującym się najlepszą aktywnością katalityczną był mutant β L48D, którego aktywność katalityczna (*specific activity*) względem picolinonitrylu wzrosła 3,7 krotnie (z 65,44 U/mg do 242,75 U/mg) a względem ważnego w przemyśle chemicznym nikotynonitrylu aż 7,7 krotnie (z 73,8 U/mg do 566,18 U/mg) w stosunku do WT. Zarówno wariant natywny jak i mutant przebadaliśmy wspólnie z w/w doktorantką metodami teoretycznej biofizyki obliczeniowej.

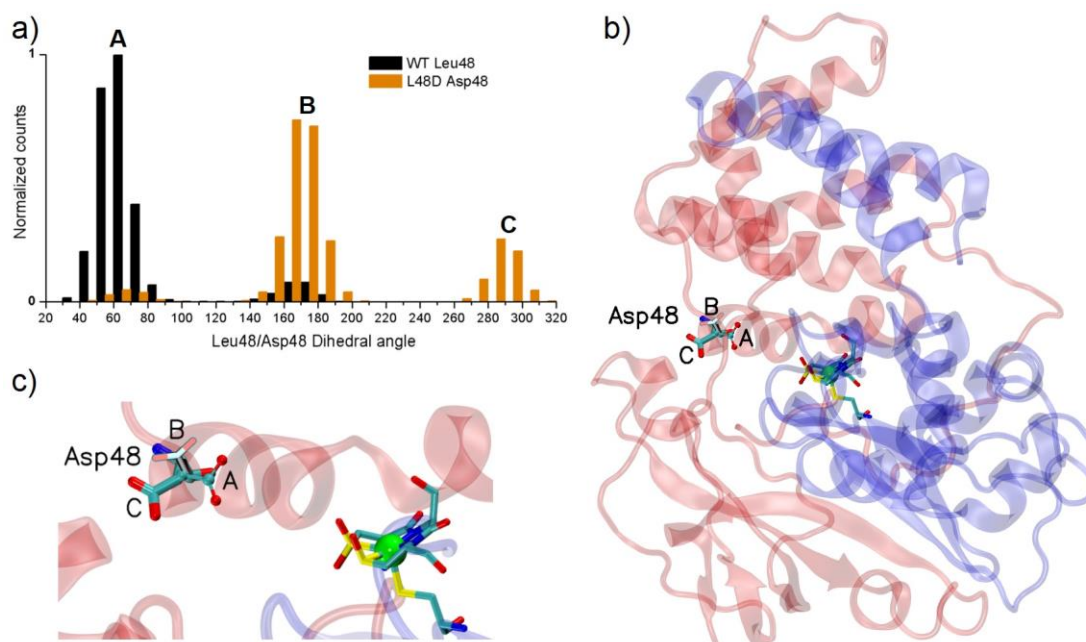
Przygotowaliśmy 200 ns trajektorie w temperaturze 300K. Wspólnie przeanalizowaliśmy wyniki, które pokazały, że pomimo stosowania modelu homologicznego, wartości RMSD oraz RMSF (Rys. S6 i S7 z suplementu [H2]) są analogiczne do tych uzyskanych w innych pracach, co oznacza, że globalnie model zachowuje się podobnie jak zbliżona struktura krystalograficzna. Dokładnie przebadaliśmy zachowanie aminokwasu nr 48 (Phe/Arg) z łańcucha β w białku natywnym oraz wariacie mutacyjnym. Okazało się, że duża i hydrofobowa leucyna powoduje podział kanału prowadzącego do centrum katalitycznego (Rys. 6a) na dwie części, natomiast hydrofilowy i dużo mniejszy kwas asparginowy nie dzieli kanału (Rys. 6b). Oszacowałem objętości obu kanałów. Ten w białku natywnym jest dużo



Rys. 6. Kanały prowadzące do centrum katalitycznego *StNHazy* w wariantie natywnym oznaczone kolorem fioletowym i zielonym a) oraz w wariantie L48D oznaczone kolorem zielonym b). Kanał wyznaczono analizując po 11 klatek symulacji uzyskanych co 20 ns, łącząc informacje z obu dimerów. Źródło [H2].

mniejszy, objętość wynosi $143,5 \pm 52,7 \text{ \AA}^3$, natomiast ten w wariantie L48D ma objętość wynoszącą aż $285,1 \pm 133,4 \text{ \AA}^3$. Fakt ten wyjaśnia dlaczego duże substraty mogą łatwiej wejść do centrum katalitycznego w mutancie.

Dokładna analiza trajektorii MD leucyny/kwasu asparginowego pokazała, że leucyna przyjmuje głównie jedną pozycję, w której kąt dwuścienny pomiędzy atomami C-C α -C β -C γ wynosi ok 60° i rzadko przyjmuje kąt ok 170° (Rys. 7a, kąty C-C α -C β -C γ wynoszące 60° nazwałem konformacją A, natomiast te przyjmujące wartość 170° konformacją B). Przyjęcie przez atomy C-C α -C β -C γ leucyny kąta ok 170° pozwala na utworzenie dużego przejścia między dwoma częściami kanału. Kwas asparginowy, który woli oddziaływać z rozpuszczalnikiem bardzo rzadko przyjmuje konformację A (z Rys. 7), natomiast bardzo często odwraca się w kierunku rozpuszczalnika będąc w konformacji B lub C (pokazane na Rys. 7). Powoduje to po pierwsze powiększenie kanału prowadzącego do centrum katalitycznego (konformacja B) lub wręcz jego otwarcie (konformacja C) tworząc według terminologii programu CAVER kieszeń (czyli kanał z bezpośrednim dostępem do rozpuszczalnika). Analiza programem CAVER pokazała, że w ok. 30% analizowanych strukturach otrzymanych z symulacji wariantu L48D tunel jest otwarty, podczas gdy w białku natywnym kanał prowadzący do centrum katalitycznego nigdy w pełni nie otwierał się.



Rys. 7. Dynamika leucyny 48 w natywnej *St*NHazy oraz kwasu asparaginowego w wariancie L48D *St*NHazy. Na panelu a) pokazano histogramy wartości kąta dwuściennego między atomami C-C α -C β -C γ dla obu wariantów NHazy. Na panelach a) i b) Pokazano ułożenia kwasu asparaginowego reprezentujące poszczególne maksima odczytane z histogramu. Źródło [H2].

Zauważyłem też, że kwas asparaginowy w konformacji C stabilizuje bardzo istotną dla katalitycznej aktywności Arg52 [50], co też najprawdopodobniej ma wpływ na zwiększoną aktywność katalityczną NHazy.

Powyższe dwa przykłady badań metodami teoretycznej biofizyki obliczeniowej pokazują, że metoda dynamiki molekularnej, w której stosujemy klasyczne podejście do wyznaczania trajektorii w czasie dużej liczby (rzędu 75.000) oddziałujących ze sobą atomów może wychwycić wpływ zmiany tylko kilku atomów na zachowanie tak dużego układu biomolekularnego. Stosując metody MD w połączeniu z analizą bioinformatyczną, a następnie metodami biotechnologii eksperymentalnej można zaprojektować bardziej wydajne enzymy i, co równie ważne, wyjaśnić dlaczego one lepiej działają. Bez użycia metod biofizyki teoretycznej samo projektowanie wydajniejszych enzymów trwa zazwyczaj znacznie dłużej i często przypomina ruletkę, gdzie w sposób przypadkowy otrzymuje się lepsze warianty, natomiast racjonalne wyjaśnienie dlaczego dany enzym działa lepiej przy obecnym stanie metod eksperymentalnych jest praktycznie niemożliwe.

Poprawianie termostabilności enzymów biotechnologicznych.

Innym istotnym czynnikiem w projektowaniu lepszych enzymów jest zwiększanie ich termostabilności. Powodów do tego jest kilka. Zazwyczaj reakcje chemiczne

w wyższych temperaturach zachodzą szybciej. Dodatkowo zwiększona temperatura bioreaktora powoduje, że znacznie wolniej namnażają się niechciane drobnoustroje takie jak grzyby i bakterie mające negatywny wpływ np. na czystość uzyskiwanych związków [55-57]. W przypadku hydratazy nitrylowej istotne jest to, że przeprowadzana reakcja hydratacji nitryli jest egzoenergetyczna. Powoduje to znaczny wzrost temperatury bioreaktora i w związku z tym musi być on schładzany co podnosi koszty produkcji [19, 58]. W związku z powyższym wiele badań poświęca się zwiększaniu termostabilności enzymów.

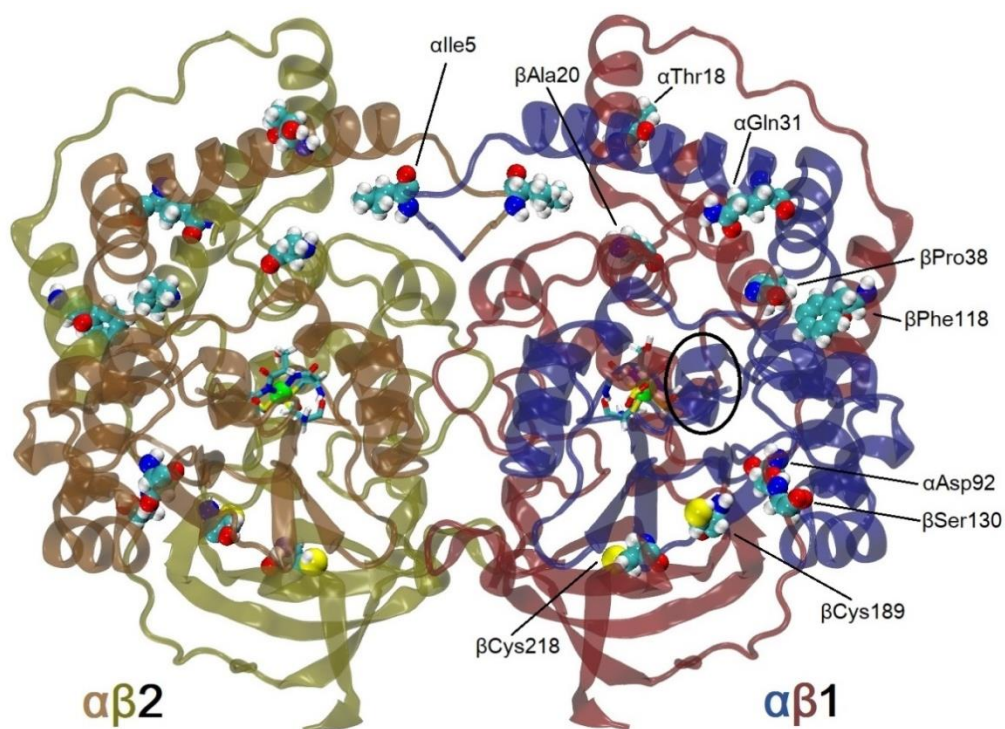
W niniejszym osiągnięciu włączone są trzy publikacje ([H3], [H4], [H5]) przedstawiające w jaki sposób można poprawić termostabilność różnych hydrataz nitrylowych. Aby pokazać, że stosowane metody są uniwersalne w artykule [H6] udowodniliśmy, że działają one również dla całkiem innej klasy enzymów: fosforylasy sacharozy, której produkty stosowane są w przemyśle spożywczym i kosmetycznym.

Moim pierwszym artykułem dotyczącym zwiększania termostabilności hydratazy nitrylowej była praca [H3]. Badano w nim możliwości zwiększania termostabilności NHazy pochodzącej z bakterii *Pseudomonas putida* NRRL-18668 (*PpNHaza*). *PpNHaza* jest wysokowydajnym enzymem charakteryzującym się zbyt niską termostabilnością, aby móc używać jej w przemysłowym produkowaniu amidów. Wcześniejsze badania bez mojego udziału wykazały, że samo połączenie dwóch podjednostek $\alpha\beta$ za pomocą krótkiego łącznika (Pro-Gly, którą nazywać będę za publikacją [H3] Fus-NHaza) zwiększa termostabilność tego enzymu [59]. Połowę aktywności początkowej enzym uzyskuje w czasie 2,8 raza dłuższym niż wariant natywny (ok. 30 min), co i tak jest niewystarczające dla przemysłu. Do polepszenia termostabilności zastosowałem semi-racjonalne projektowanie z wykorzystaniem dwóch narzędzi biofizyki obliczeniowej. Pierwszym był program ROSETTA 3.4 [60] służący między innymi do projektowania bardziej stabilnych wariantów enzymów. Drugim narzędziem były symulacje MD enzymu. Ponieważ program ROSETTA wymaga struktury przestrzennej białka zbudowałem model homologiczny Fus-NHazy, jako wzór stosując strukturę krystalograficzną *PpNHazy* o kodzie 3QXE [61]. Za pomocą minimalizacji energii potencjalnej przewidziałem strukturę 3D pętli łączącej dwie podjednostki (Rys. 2b w [H3]). ROSETTA wskazała łącznie aż 234 pojedyncze mutacje mogące mieć wpływ na termostabilność. Aby móc w racjonalnym czasie

i o racjonalnym koszcie zaprojektować bardziej termostabilną Fus-NHazę, zastosowałem metodę MD do wyznaczenia najmniej stabilnych przestrzennie regionów NHazy, w których to wprowadzane były mutacje zaproponowane przez ROSETTE.

Analiza wyników MD Fus-NHazy (przeprowadzonych dla odpowiednika dimeru $\alpha\beta$, czyli dla jednego połączonego łańcucha), a w szczególności fluktuacji (Rys. 3a w [H3]) pokazała dużą labilność białka w zakresie odpowiadającym aminokwasom z łańcucha β od numeru 100 do numeru 219. Zespół prof. Zhou zbadał doświadczalnie wszystkie zaproponowane przeze mnie (za pomocą programu ROSETTA) mutacje w tym obszarze. Było ich 17, z czego 10 wykazywało zwiększoną o co najmniej 10% termostabilność a cztery warianty dodatkowo wykazywały zwiększoną aktywność względem nikotynonitrylu (Tabela 1 w [H3]). Trzy najlepsze warianty β M150C, β T173Y oraz β S189E wykazujące z aktywnością zwiększoną o 3,5%, 49% oraz 22% i termostabilnością liczoną jako czas, w którym enzym wykazuje się połową początkowej aktywności w 50°C zwiększoną z 26 min odpowiednio do 40 min, 32 min oraz 60 min przebadalem za pomocą symulacji MD. Obliczenia pokazały, że wszystkie warianty mutacyjne wykazywały się lepszą stabilnością, co widać na wykresach RMSD oraz RMSF (Rys. 5 w [H3]). Dokładniejsza analiza trajektorii MD pokazała, że we wszystkich wariantach dzięki dobrym mutacjom udało się zwiększyć ilość wiązań wodorowych, w szczególności tych trwających przez większość czasu trwania symulacji, co ustabilizowało całe białko. Warto zauważyć, że białka bardziej stabilne termicznie często wykazują też zwiększoną aktywność katalityczną [55, 57] (jednak nie jest to reguła).

Nieco bardziej zaawansowanym podejściem do poprawiania termostabilności enzymów posłużono się w badaniach opublikowanych w artykule [H4]. Serwer FireProt [62] analizując *PtNHazę* (kod PDB 1IRE, z pracy [H1]) wyznaczył 10 mutacji, których wprowadzenie miało zwiększyć termostabilność enzymu: α I5P, α T18Y, α Q31L, α D92H, β A20P, β P38L, β F118W, β S130Y, β C189N oraz β C218V (Rys. 8). Wariant zawierający wszystkie powyższe mutacje zgodnie z [H4] nazwano M10. Początkowo aby sprawdzić skuteczność przewidywania serwera FireProt przeprowadzono serię krótkich 30 ns symulacji dimerów $\alpha\beta$ białka natywnego i M10 (dane nieopublikowane). Obiecujące wyniki skłoniły moich współpracowników z Chin do wykonania badań eksperymentalnych. Okazało się, że termostabilność



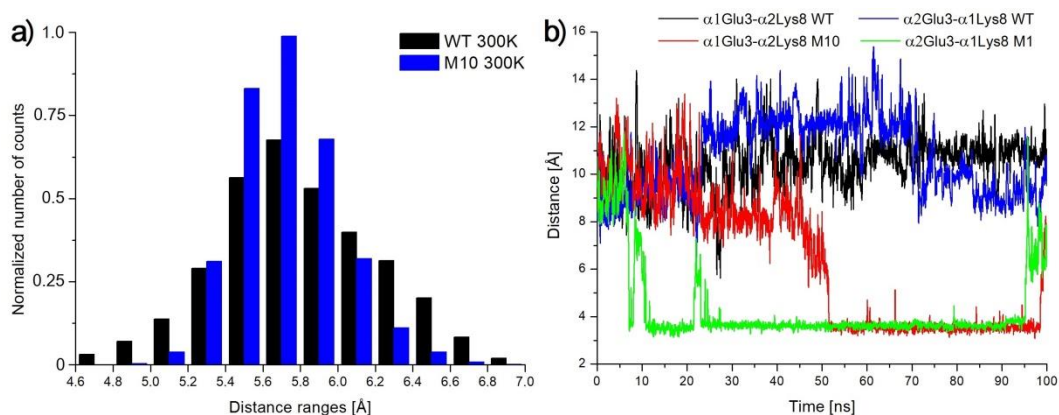
Rys. 8. Tetramer natywnej *PtNHazy* użyty w dynamice molekularnej z zaznaczonymi miejscami mutacji. Źródło [H4].

mocno wzrosła, wariant natywny w 50°C wykazywał połowę początkowej aktywności katalitycznej już po 18 min, podczas gdy wariant M10 50% swojej początkowej aktywności uzyskiwał dopiero po 120 min (Rys. 3 w [H4]). Co więcej początkowa aktywność względem nikotynonitrylu wariantu M10 była ponad dwukrotnie większa niż białka natywnego (odpowiednio 168.8 ± 5.3 U/mg oraz 81.1 ± 2.8 U/mg).

Próbując wyjaśnić przyczynę zwiększonej termostabilności wykonałem symulacje MD dimerów w dwóch różnych temperaturach: standardowej 300K oraz zwiększonej do 335K. Historycznie były to pierwsze tak długie symulacje MD *NHazy*. Niestety, zazwyczaj po ok 50 ns białko zaczynało się rozwijać. Chcąc poprawić stabilność układu po raz pierwszy utworzyłem model tetrameru na podstawie „*Biological Assembly*” – dodatkowych danych o strukturze 3D zdeponowanych w Protein Data Bank razem ze strukturą 1IRE *PtNHazy*. Okazało się, że modele tetrameru $\alpha\beta\alpha$ w symulacjach pozostają dużej stabilne niż dimery $\alpha\beta$ (dane nieopublikowane, obecne przeprowadzamy symulacje rzędu 500 ns i nie mamy problemu ze stabilnością badanych modeli; pomiędzy dimerami $\alpha\beta$ występują głównie tzw. „oddziaływania hydrofobowe”). publikacja [H4] była pierwszą w literaturze światowej pracą, w której przedstawiono wyniki symulacji MD tetrameru *NHazy*.

Dzięki symulacjom MD wyjaśniłem globalny wpływ wprowadzonych mutacji na dynamikę enzymu. Za pomocą analizy głównych składowych (z ang. *Principal Component Analysis*, PCA) wskazałem te fragmenty białka, które ulegają największej stabilizacji po wprowadzeniu mutacji (Rys. 7-8 w [H4]). Dzięki stabilizacji całego białka w wariantcie M10 struktura centrum aktywnego i otaczających go istotnych dla procesów katalitycznych Arg52 oraz Arg157 była dużo lepiej zachowywana (Rys. 9 w [H4]). Dzięki analizie promieni bezwładności enzymów (z ang. *radius of gyration*) pokazałem, że zmodyfikowany enzym staje się bardziej zwarty, co sprzyja zwiększaniu termostabilności białek [63].

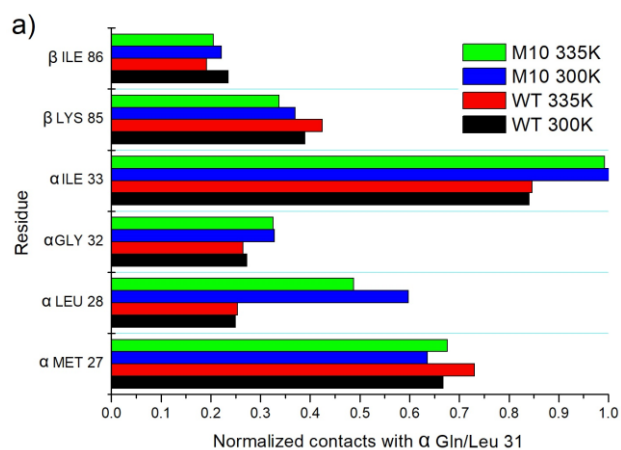
Dzięki wykonanym symulacjom MD pokazałem na poziomie molekularnym w jaki sposób każda z 10 mutacji wpływa na zwiększanie termostabilności białka. Na przykład zmiana izoleucyny w pozycji 5 na prolinę w łańcuchu α (α I5P) powoduje usztywnienie pętli od pozycji 4 do 7 w łańcuchu α , a to w następstwie powoduje, że wytwarzany jest mostek solny pomiędzy α Glu3 oraz α Lys8 (Rys. 9). Podobne usztywnienie pętli powoduje mutacja β A20P.



Rys. 9. Wpływ mutacji α I5P na *PrNHase*. Histogram odległości pomiędzy atomami Ca α Asn4 oraz α Arg7, pokazujący usztywnienie pętli a), oraz wpływ usztywnienia pętli na tworzenie mostka solnego α Glu3- α Lys8 (odległości między grupami tworzącymi mostek) b). Źródło [H4].

Mutacje α Q31L, α D92H, β P38L, β F118W, β S130Y oraz β C218V powodowały tworzenie hydrofobowych rdzeni (Rys. 10), czyli bliskiego oddziaływania kilku aminokwasów hydrofobowych. Wcześniej udowodniono, że usuwanie wody z wnętrza białka, przez tworzenie takich właśnie hydrofobowych rdzeni stosowane jest w drodze ewolucji przez bakterie termofilne do zwiększania termostabilności białek [64-66].

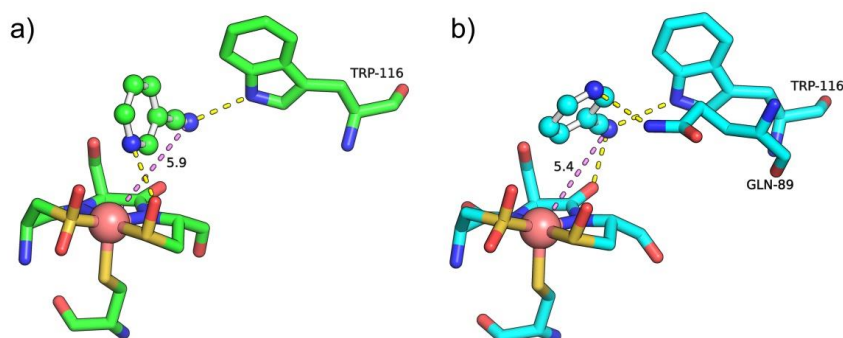
Mutacje α T18Y oraz β C189N powodują powstawanie nowych wiązań wodorowych, co ma wpływ podobny do mutacji zaproponowanych w pracy [H3].



Rys. 10. Wykres pokazujący zwiększenie oddziaływań hydrofobowych aminokwasu nr 31 z łańcucha α . Wariant M10 wyraźnie zwiększa oddziaływania hydrofobowe z α Leu28 oraz α Ile33. Źródło [H4].

Wprowadzenie wszystkich powyższych mutacji spowodowało, że białko wykazywało się znacznie większą termostabilnością.

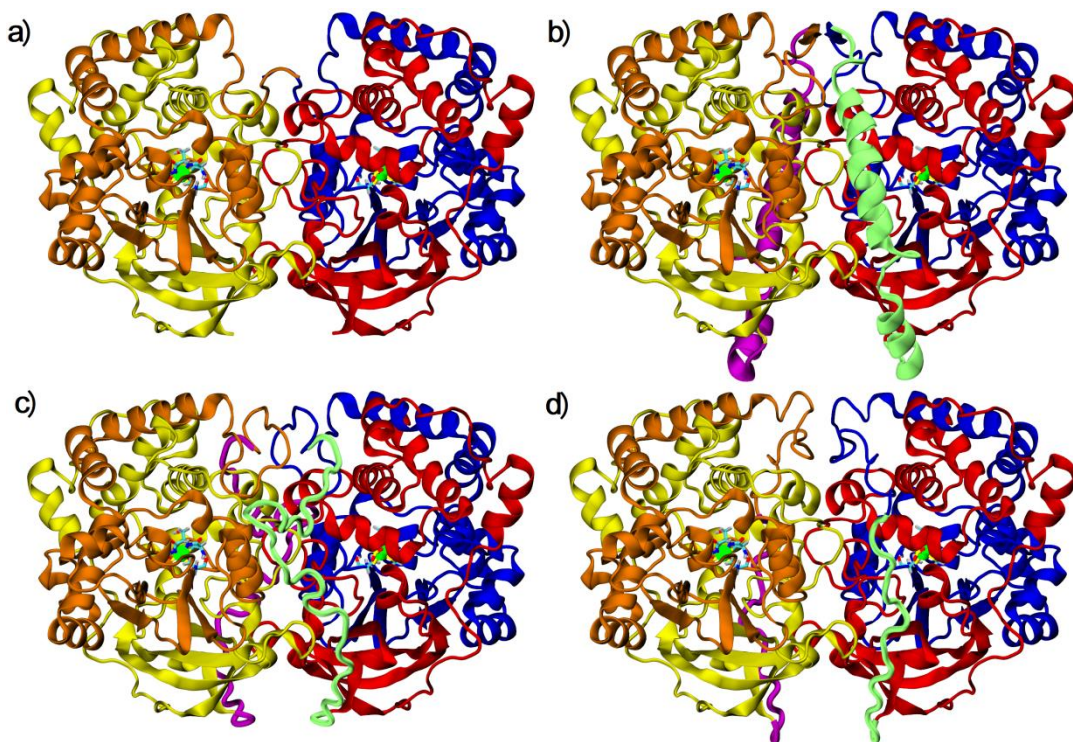
W pracy wyjaśniłem przyczyny zwiększonej aktywności katalitycznej wariantu M10. Zadokowałem substrat tj. nikotynonitryl do obu wariantów *PtNHazy*. Dokowanie przeprowadzono do zrównoważonej struktury otrzymanej po 20 ns symulacji w 300K. Użycie takich struktur spowodowało, że wszystkie aminokwasy zdążyły dostosować swoje położenie do zmian wprowadzonych przez mutacje. Okazało się, że na zwiększoną aktywność katalityczną wariantu M10 *PtNHazy* poza poprawioną stabilnością enzymu może mieć lepsze ułożenie substratu (nikotynonitrylu) względem jonu kobaltu. Odległość kobalt-azot (z katalizowanego nitrylu) wynosiła w przypadku białka natywnego 5,9 Å, a w wariantcie M10 5,4 Å (zobacz Rys. 11) co spowodowało łatwiejszą aktywację reakcji enzymatycznej. Inne ułożenie aminokwasu β Trp118 oraz α Gln89, powoduje też, że energia oddziaływania substratu z białkiem w wariantcie M10 jest nieco większa niż w białku natywnym (-4,98 kcal/mol względem -4,18 kcal/mol).



Rys. 11. Wynik dokowania nikotynonitrylu do *PtNHazy* w wersji natywnej a) oraz M10 b).

Źródło [H4].

Kolejną metodą zwiększania termostabilności białek jest wprowadzanie linkerów białkowych, tzn. dodatkowych fragmentów białkowych. Ma to na celu np. zwiększenie powierzchni oddziaływania dwóch podjednostek, wprowadzenie nowych wiązań wodorowych, mostków solnych czy rdzeni hydrofobowych. Takie podejście zastosowano w kolejnych badaniach, w których połączono łańcuchy α i β , podobnie jak to było w publikacji [59]. W tym przypadku zastosowano jednak kilka rodzajów długich linkerów białkowych charakteryzujących się różnymi rozmiarami, elastycznościami i tworzeniem struktur drugorzędowych. W Chinach eksperymentalnie przebadano termostabilność i aktywność katalityczną wpływu trzech rodzajów linkerów o różnych długościach na *PpNHazę* (kod pdb 3QXE). Wprowadzono 1, 4 lub 8 powtórzeń: sekwencji EAAAK (linker helikalny, enzymy z tymi linkerami nazwano w pracy odpowiednio A1, A4 oraz A8), sekwencji GGSG (linker elastyczny, NHazy nazwane w pracy odpowiednio B1, B4, B8), sekwencji PA (linker sztywny, nazwane w pracy odpowiednio C1, C4 oraz C8), a wyniki poprawiania termostabilności opublikowano w pracy [H5]. Okazało się, że wszystkie warianty białek charakteryzują się nieznacznie zwiększoną aktywnością katalityczną. Aktywności oraz termostabilności zostały zebrane w Tabeli 1 w [H5]. Zauważono, że wraz z ilością powtórzeń sekwencji linkera termostabilność rośnie, niezależnie od rodzaju linkera. Najbardziej stabilnym wariantem okazała się *PpNHaza* z ośmioma powtórzeniami sekwencji EAAAK (A8). W celu zbadania przyczyny zwiększonej termostabilności wariantów A8, B8 i C8 na podstawie struktury krystalograficznej 3QXE przygotowano modele dimerów (odpowiadają one tetramerom $\alpha\beta\beta\alpha$, ponieważ łańcuchy β i α (dokładnie w takiej kolejności) połączono za pomocą linkerów, tworząc jeden długi łańcuch białkowy). Nie było to trywialne zadanie, ponieważ żadne narzędzie do modelowania homologicznego nie było w stanie przewidzieć struktury linkerów. W związku z tym do sekwencji linkerów dodano sekwencje końcowego i początkowego fragmentu łańcuchów β i α (od/do pierwszego aminokwasu o zdefiniowanej strukturze drugorzędowej) i przewidziano ich struktury za pomocą narzędzia QUARK (tzw. *de novo* Folding) [67]. Wszystkie wygenerowane modele linkerów z fragmentami NHazy zadokowano do tetrameru 1IRE za pomocy serwera ClusPro 2.0 (dokowanie białko-białko) [68], a brakujące fragmenty białka dodano za pomocą narzędzia PRIME z pakietu Schrödinger. W ten sposób otrzymałem modele do analizy struktur statycznych. Natywną *PpNHazę* (3QXE) oraz wygenerowane modele pokazano na rysunku 12.



Rys. 12. Modele *PpNHazy*: natywnej (3QXE) a), wariantu A8 b), wariantu B8 c) oraz C8 d).

Źródło [H5].

Analiza modeli pokazała, że wpływ na zwiększenie termostabilności miało wprowadzenie do układu nowych wiązań wodorowych, zwiększenie powierzchni oddziaływania dimerów, a w przypadku wariantu A8 utworzenie aż 8 nowych mostków solnych.

W celu dokładnego przebadania najlepszego wariantu A8, dla niego oraz dla białka natywnego wykonałem symulacje dynamiki molekularnej w dwóch różnych temperaturach 300K oraz 335K. Analiza otrzymanych trajektorii pokazała przyczyny zwiększonej termostabilności. Po pierwsze, w białku natywnym widać było w symulacjach o podwyższonej temperaturze początki denaturacji łańcucha α (Rys. S1 w suplemencie [H5]), co od razu zauważyć można na wartościach wykresów RMSD (Rys. 6 w [H5]). Uzyskano stabilizację całego białka, co pokazała analiza wykresów RMSF (Rys. 7 w [H5]). Podobnie jak w przypadku badań opublikowanych w pracy [H4], tutaj też zaobserwowałem stabilizację struktury centrum katalitycznego i dwóch oddziałujących z nim arginin (Rys. 8 w [H5]). Ponadto zaobserwowałem znaczne zwiększenie powierzchni oddziaływania dwóch podjednostek *PpNHazy* (Rys. S2 w suplemencie [H5]), zwiększenie ilości wiązań wodorowych w białku (Rys. S3 w suplemencie [H5]) oraz pomiędzy dwoma podjednostkami (Rys. S4 w suplemencie

[H5]). Podobnie jak w przypadku struktury statycznej, w dynamicznej strukturze zwiększona była liczba mostków solnych (Tabela S4 w suplemencie [H5]). Wszystkie te czynniki mają pozytywny wpływ na termostabilność wariantu A8 PpNHazy.

Powyżej przedstawiono przykłady kilku różnych sposobów zwiększania termostabilności NHazy. Następnie, chcąc wykazać ogólność i uniwersalność mojego podejścia obliczeniowego, podjąłem udaną próbę poprawienia enzymu fosforylaza sacharozy (SPaza, EC 2.4.1.7). Enzym ten katalizuje rozkład sacharozy do D-fruktozy oraz 1-fosforanu- α -D-glukozy [2]. D-fruktoza używana jest w przemyśle spożywczym, natomiast 1-fosforan- α -D-glukozy stosowany jest w przemyśle kosmetycznym jako emolient – substancja działająca zmiękczająco, nawilżająco, natłuszczająco oraz regeneracyjnie.

Także w tym przypadku przemysłowe zastosowanie SPazy ogranicza jej niska termostabilność. Wprawdzie sama reakcja nie jest egzoenergetyczna, jednak ze względu na obecność cukrów w reakcji bioreaktory szybko zanieczyszczane są drobnoustrojami [27]. Do badań nad zwiększaniem termostabilności użyto wysokowydajną SPazę pochodzącą z organizmu *L. mesenteroides* ATCC 12,291 (*LmSPaza*), a wyniki opublikowano w artykule [H6].

LmSPaza nie została do tej pory skryształizowana, w związku z tym istniała potrzeba wygenerowania modelu homologicznego tego białka. Na początku, z powodu małego podobieństwa sekwencji do skryształizowanych SPaz, do przewidzenia struktury przestrzennej *LmSPazy* użyto narzędzia I-TASSER [69]. Model ten posłużył mi jako dane wejściowe do serwera FireProt [62]. Oznacza to, że zastosowano podobne podejście do przewidywań bardziej termostabilnych enzymów jak w przypadku badań opublikowanych w pracy [H4]. W tym przypadku serwer FireProt wygenerował dosyć dużą liczbę pojedynczych mutacji i aby ograniczyć nakład pracy doświadczalnej postanowiłem ograniczyć liczbę wprowadzanych zmian zgodnie z podejściem stosowanym w artykule [H3]. Na podstawie wyników symulacji dynamiki molekularnej wybrane zostały tylko te miejsca, które charakteryzują się najmniejszą stabilnością. Ponieważ w międzyczasie upubliczniono strukturę krystalograficzną SPazy podobnej do *LmSPazy*, postanowiłem opracować dokładniejszy model za pomocą serwera SwissModel [51]. Lepszą jakość modelu potwierdziłem za pomocą narzędzia Verify3D [53]. Na podstawie przewidywań serwera FireProt oraz z analizy obliczonych wartości RMSF modelu homologicznego natywnej *LmSPazy* (Rys. 1

w [H6]) wybrano 10 potencjalnych wariantów: I31F, T152G, N158C, T219L, A232M, N249A, G252L, T263L, S360A oraz Q453G, które zostały sprawdzone doświadczalnie. Okazało się, że cztery z nich I31F, T219L, T263L oraz S360A wykazują się zwiększoną termostabilnością i/lub aktywnością (ale żaden z nich nie miał gorszej termostabilności). W laboratorium w Chinach sprawdzono też wariant mający wszystkie cztery mutacje. Nazwano go Mut4. Niestety okazał się nieznacznie gorszy niż najlepszy wariant T219L.

Przyczyny zwiększonej stabilności dla wariantów WT, T219L oraz Mut4 zbadałem w oparciu o symulacje MD w temperaturze 300K oraz 335K. Analiza trajektorii pokazała, że białko natywne w temperaturze 335K znacznie gorzej zachowuje swoją strukturę początkową (duże wartości RMSD, Rys. 4 w [H6]). Pozostałe warianty niezależnie od temperatury ustawionej w symulacji utrzymywały lepiej (lub podobnie) strukturę przestrzenną jak wariant natywny (Rys. 4 w [H6]). Mniej ruchliwe stały się obszary białka w zakresach aminokwasów 128-133, 307-327, 227-357 oraz 328-399, co pokazała analiza RMSF (Rys. 5 w [H6]).

Analiza kontaktów wykazała, że zmiana tyrozyny na leucynę w pozycji 219 powoduje powstanie rdzenia hydrofobowego w pobliżu centrum katalitycznego, czyli aminokwasów Asp196 oraz Glu237, i stabilizuje ten obszar (zobacz Rys. S3a oraz S3b w suplemencie [H6]) Podobnie bywa w enzymach ekstermofilnych organizmów [70]. Tworzenie rdzenia hydrofobowego można było zaobserwować zarówno w wariacie T219L jak i Mut4. Analiza kontaktów pozostałych modyfikowanych aminokwasów w wariacie Mut4 pokazała, że nie zmieniają one aż tak znacząco swoich oddziaływań z otaczającymi aminokwasami (Rys. S3c-e w suplemencie [H6]) i przez to wprowadzenie dodatkowych trzech mutacji, nieco dalej od centrum katalitycznego niż pozycja 219 nie powoduje dodatkowe poprawy termostabilności.

Powyższe cztery przykłady badań nad zwiększaniem termostabilności enzymów pokazują, że metody teoretycznej biofizyki obliczeniowej mogą istotnie przyczynić się do projektowania enzymów bardziej termostabilnych, co jest bardzo potrzebne w nowoczesnej biotechnologii. W badaniach wykorzystałem kilka różnych podejść, takich jak łączenie dwóch łańcuchów aminokwasowych enzymów i wprowadzanie punktowych mutacji [H3], używanie narzędzi bioinformatycznych w [H4] oraz [H6], czy wstawianie dodatkowych aminokwasów w celu zwiększenia powierzchni oddziaływania podjednostek enzymów [H5]. W przypadku badań opublikowanych

w [H4] oraz [H6] symulacje dynamiki molekularnej posłużyły do ograniczenia liczby wprowadzanych mutacji, więc miały one istotny wpływ w projektowaniu nowych, ulepszonych wariantów enzymów biotechnologicznych. We wszystkich tych pracach ([H3][H4][H5][H6]) symulacje MD pozwoliły wyjaśnić przyczyny zwiększenia termostabilności enzymów. Wszystko to prowadzi do lepszego zrozumienia mechanizmów zwiększania termostabilności i z pewnością podobne podejście użyte będzie w innych enzymach.

Projektowanie selektywności enzymów biotechnologicznych.

Tworzenie konkretnych związków chemicznych w procesach technologii chemicznej niejednokrotnie nie jest możliwe, pomimo ogromnych postępów w tym zakresie, na co wskazuje nagroda Nobla z chemii przyznana w 2022 roku, którą otrzymali Carolyn R. Bertozzi, Morten P. Meldal oraz K. Barry Sharpless za tzw. „click chemistry”. Często niemal niemożliwe jest otrzymanie zadanych związków, w szczególności tych prostszych. Doskonałym przykładem może być selektywne tworzenie tylko jednego izomeru optycznego, bądź przeprowadzenie reakcji tylko jednej grupy funkcyjnej w związku zawierającym dwie lub więcej identycznych grup funkcyjnych. Z problemem tym na drodze ewolucji poradziły sobie organizmy żywe, które „nauczyły się” katalizować wybrane izomery optyczne w roztworze racemicznym substratu.

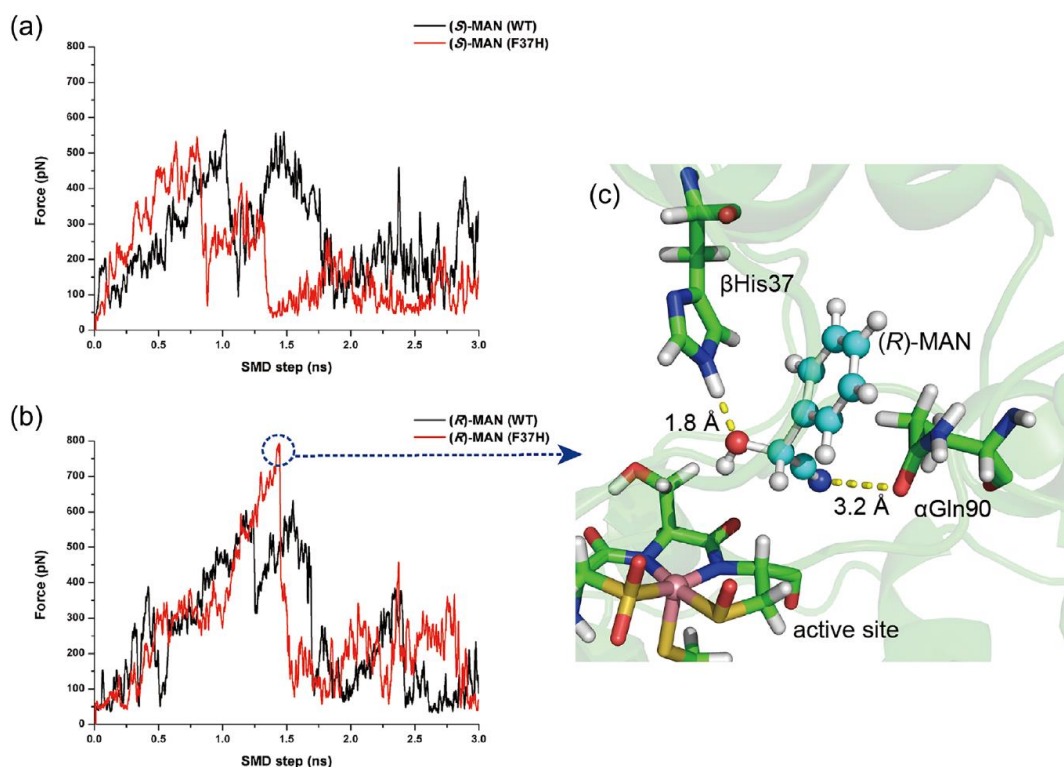
W dwóch badaniach przedstawionych poniżej oraz publikacjach [H7] oraz [H8] prezentujących wyniki tych badań, pokazaliśmy, że można skutecznie tak zmodyfikować naturalnie występujący enzym, aby przeprowadzał on reakcje tylko dla wybranych związków lub grup funkcyjnych.

Mając dwa enancjomery w racemacie trudno jest przeprowadzić reakcję katalityczną tylko jednego z nich, przy zastosowaniu technologii chemicznej. Podobnie jest z enancjomerami nitryli. Mimo, że znane są NHazy katalizujące wybrane izomery optyczne nitryli (czyli charakteryzują się tzw. stereoselektywnością) [34, 71], nie można było znaleźć NHazy katalizującej hydratację konkretnego izomeru z racematu chemicznie ważnego związku – mandelonitrylu, gdzie amid o określonej chiralności następnie stałby się półproduktem w tworzeniu ważnych leków [72, 73].

W celu zaprojektowania NHazy charakteryzującej się aktywnością katalityczną względem jednego enancjomeru mandelonitrylu wybrano NHazę z organizmu *Rhodococcus rhodochrous* J1 (zgodnie z publikacją [H7] L-NHaza). Ponieważ

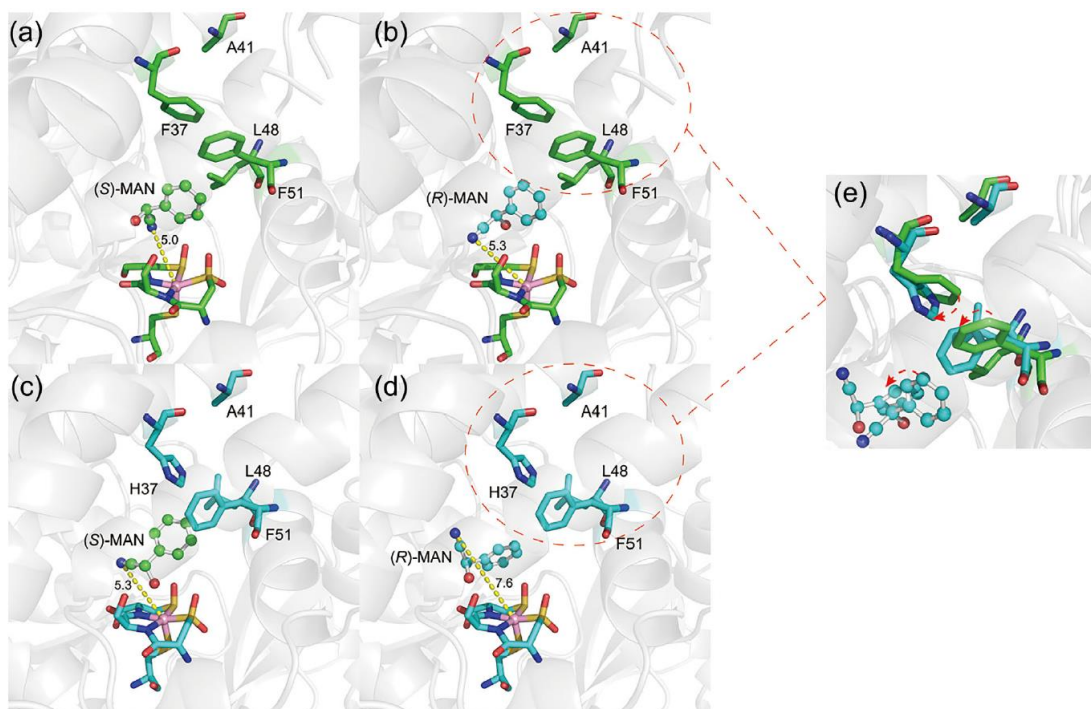
L-NHazy nie została skryształizowana do zbudowania jej modelu przestrzennego użyłem narzędzia SwissModel [51]. Aby wyznaczyć aminokwasy, które należy zmutować wstępnie zadokowałem do L-NHazy S-mandelonitryl oraz R-mandelonitryl. Ponieważ punktem wyjścia był model homologiczny L-NHazy dokowałem ligandy do NHazy po 5 ns symulacji MD. Podobnie jak w innych przypadkach przeprowadziłem analizę kanałów programem CAVER [46] oraz za pomocą sterowanej dynamiki molekularnej (z ang. *steered molecular dynamics*, SMD) wyciągnąłem oba enancjomery z wnętrza białka wzdłuż wyznaczonego kanału. Analiza trajektorii SMD wskazała największe zawady steryczne w trakcie wyciągania ligandów, oraz pozwoliła wyznaczyć aminokwasy odpowiedzialne za tworzenie wiązań wodorowych z mandelonitrylem (Rys. S3 oraz tabele S2 i S3 w suplemencie [H7]). Zastosowanie tego podejścia pozwoliło wyznaczyć cztery istotne aminokwasy mające wpływ na katalizowanie mandelonitrylu. Były to: β Phe37, β Ala41, β Leu48, and β Phe51. Inne aminokwasy pominięto w badaniach mutacyjnych, aby uniknąć modyfikowania istotnych dla aktywności katalitycznej miejsc. Analiza aktywności katalitycznej wszystkich możliwych wariantów mutacyjnych w tych czterech pozycjach (mutageneza nasycona) pozwoliła wybrać wariant charakteryzujący się najlepszą stereoselektywnością tj. β F37H (Tabela 1 w [H7]). Okazało się w eksperymentach, że wariant ten w procesie tworzenia S-mandeloamidu charakteryzuje się 96,8% nadmiarem enancjomerycznym, co oznacza że katalizowany jest głównie S-mandelonitryl. Dodatkowo wariant β F37H charakteryzuje się podobną wydajnością co wariant natywny. Aby wyjaśnić czemu wariant β F37H wykazuje się tak znaczącą stereoselektywnością względem S-mandelonitrylu zadokowałem oba substraty także do wariantu β F37H (też po 5 ns zrównoważania układu za pomocą MD) oraz przeprowadziłem obliczenia symulacji SMD wyciągania obu enancjomerów z β F37H L-NHazy.

Analiza trajektorii SMD pokazała, że do „wyciągnięcia” R-mandelonitrylu z β F37H L-NHazy potrzebna jest większa siła niż w przypadku białka natywnego lub S-mandelonitrylu z obu wariantów L-NHazy. Główny wpływ ma na to obecność na raz dwóch wiązań wodorowych R-mandelonitrylu: z β His37 oraz α Gln90 (Rys. 13).



Rys. 13. Wykresy siły przyłożonej do liganda w trakcie symulacji SMD L-NHazy w wersji natywnej oraz β F37H. Na panelu a) wykreślono siły w trakcie wyciągania S-mandelonitrylu, na panelu b) R-mandelonitrylu. Na panelu c) pokazano główną przyczynę powstawania dużych sił przy wyciąganiu R-mandelonitrylu. Źródło [H7].

Przy pomocy dokowania sprawdziłem jaki wpływ mutacja β F37H ma na ułożenie obu enancjomerów względem centrum katalicznego (Rys. 14a, 14b, 14c oraz 14d). Okazało się, że zamiana fenyloalaniny na histydynę powoduje nieznaczną zmianę orientacji grupy bocznej modyfikowanego aminokwasu, a co za tym idzie obrót sąsiedniej fenyloalaniny 51 z łańcucha β . W białku natywnym orientacja obu tych aminokwasów powoduje, że zarówno S-mandelonitryl jak i R-mandelonitryl dokują się w taki sposób, że grupa nitrylowa substratu znajduje się blisko centrum katalicznego, tzn. w odległości od jonu kobaltu odpowiednio 5,0 Å (Rys. 14a) oraz 5,4 Å (Rys. 14b). Zmiana położenia obu aminokwasów pod wpływem mutacji powoduje, inną orientację R-mandelonitrylu względem centrum katalicznego odsuwając grupę nitrylową na odległość 7,6 Å (Rys. 14d), uniemożliwiając tym samym przeprowadzenie reakcji chemicznej S-mandelonitryl może natomiast tak ułożyć się w pobliżu centrum katalicznego, że możliwe jest przeprowadzenie reakcji katalicznej. Odległość azot-kobalt w tym przypadku wynosi 5,3 Å (Rys. 14c). Zmianę położenia aminokwasów Phe/His37 oraz Phe51 oraz wpływ na ułożenie R-mandelonitrylu pokazano na Rysunku 14e.



Rys. 14. Wyniki dokowania S-mandelonitrylu (a) oraz R-mandelonitrylu (b) do natywnej L-NHazy. Dokowanie S-mandelonitrylu oraz R-mandelonitrylu do β 37H L-NHazy pokazano odpowiednio na panelu (c) oraz (d). Na panelu (e) pokazano porównanie w ułożeniu Phe/Leu37 oraz Phe51 i wpływ tej zmiany na ułożenie zadokowanego R-mandelonitrylu. Źródło [H7].

Równie trudne jak przeprowadzenie reakcji dla wybranego enancjomeru jest przeprowadzenie reakcji tylko jednej grupy funkcyjnej w związkach zawierających dwie identyczne grupy funkcyjne. Przeprowadzenie takiej reakcji jest jednak możliwe w enzymach, co pokazaliśmy w badaniach nad stereoselektywnością L-NHazy (tej samej co w publikacji [H7]) względem czterech dinitryli: adiponitrylu i malonitrylu (dinitryle alifatyczne, skróty wprowadzone to odpowiednio ADN i MAN) oraz tereftalonitrylu i ftalonitrylu (dinitryle aromatyczne, skróty wprowadzone to odpowiednio TPTN oraz PTN) (zobacz Schemat 1 w [H8]). Wyniki badań nad regioselektywnością opublikowano w artykule [H8].

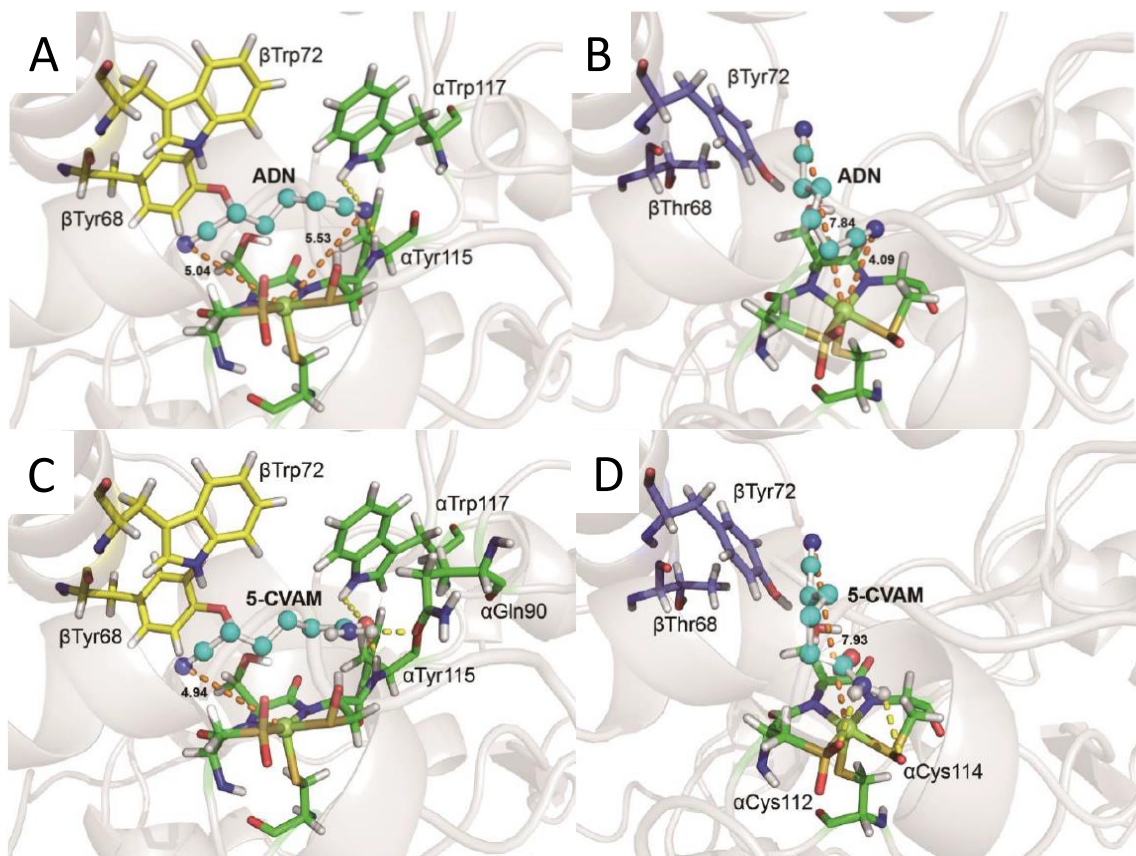
W przypadku przeprowadzenia reakcji za pomocą klasycznej technologii chemicznej z dinitryli uzyskano by wyłącznie diamidy. Dla przemysłu chemicznego i farmaceutycznego duże znaczenie mają jednak nitryloamidy, czyli pochodne w których tylko jedna grupa funkcyjna uległa hydratacji. Dobrym przykładem jest tutaj 5-cyjanowaleramid (5-CVAM), który powstaje w wyniku hydratacji tylko jednej grupy nitrylowej z ADN. Związek ten jest ważnym półproduktem przy produkcji herbicydów [74] i leków [19].

Poniżej przedstawię główne wyniki badań nad regioselektywnością L-NHazy tylko względem ADN. Identyczną metodologię zastosowano dla pozostałych trzech dinitryli.

Model L-NHazy użyty w tych badaniach był analogiczny jak w publikacji [H7]. Listę aminokwasów mających wpływ na orientację substratu uzyskałem poprzez dokowanie wszystkie ligandów do struktury przestrzennej białka poddanego 5 ns symulacji MD. W oparciu o te wyniki zaproponowałem następujące aminokwasy do mutacji potencjalnie zmieniających regioselektywność: β Leu48, β Phe51, β Tyr68 oraz β Trp72. Grupa prof. Zhou wykonała za pomocą mutagenazy nasyconej wszystkie możliwe warianty NHazy w wyznaczonych pozycjach i zbadała ich aktywność katalityczną względem ADN. Okazało się, że dwa warianty L-NHazy, β Y68T oraz β W72Y katalizują ADN głównie do 5-CVAM i w niewielkim stopniu (ok 2-3%) do adipamid (diamid, nazwany skrótem ADAM, Tabela 2). W celu sprawdzenia czy można uzyskać lepszą regioselektywność, dla wariantów β Y68T oraz β W72Y przeprowadzono kolejną turę tworzenia wszystkich możliwych wariantów w pozycjach odpowiednio 72 oraz 68. Okazało się, że podwójny mutant β Y68T/ β W72Y w ogóle nie daje diamidu, jedynie 5-CVAM. Aby wyjaśnić tą regioselektywność zadokowałem do L-NHazy β Y68T/ β W72Y zarówno ADN jak i 5-CVAM. Ten ostatni związek zadokowałem też do wariantu natywnego L-NHazy (Rys. 15; zawsze dokując do struktury enzymu uzyskanej po 5 ns symulacji MD danego wariantu identycznego jak w pracy [H7]).

Tabela 2. Regioselektywność L-NHazy względem ADN, wyrażona jako % uzyskanego produktu po przeprowadzeniu reakcji enzymatycznej racematu ADN. Źródło [H8].

Wariant enzymu	5-CVAM	ADAM
WT	0	100
Y68T	97,6	2,4
W72Y	96,8	3,2
Y68T/W72Y	100	0



Rys. 15. Wyniki dokowania ADN do natywnej L-NHazy panel a) oraz wariantu $\beta Y68T/\beta W72Y$ L-NHazy b). Na panelach c) oraz d) znajdują się odpowiednio wyniki dokowania 5-CVAM do enzymu natywnego oraz wariantu $\beta Y68T/\beta W72Y$. Źródło [H8].

Dopiero dokowanie pozwoliło mi wyjaśnić przyczyny zwiększonej selektywności mutantów. ADN zadokowany do wariantu natywnego L-NHazy ma obie grupy nitrylowe blisko jonu kobaltu (odpowiednio 5,04 Å oraz 5,53 Å, Rys. 15a). Dokowanie ADN do wariantu $\beta Y68T/\beta W72Y$, pokazuje, że jedna z grup nitrylowych może ulec hydratacji (4,09 Å, Rys. 15b). W ten sposób może powstać 5-CVAM. Aby mogła zajść reakcja hydratacji 5-CVAM musi on obrócić się w centrum katalitycznym, bądź wyjść z enzymu i ponownie zbliżyć się do jonu kobaltu (co jest bardziej prawdopodobne). W przypadku białka WT grupa amidowa tworzy wiązania wodorowe z $\alpha Trp117$ oraz $\alpha Gln90$, a grupa nitrylowa orientowana jest w kierunku jonu kobaltu (4,94 Å, Rys. 15b). Wprowadzenie dwóch mutacji $\beta Y68T$ oraz $\beta W72Y$ powoduje zmianę orientacji aminokwasów w pobliżu centrum katalitycznego w taki sposób, że grupa amidowa zaczyna tworzyć wiązania wodorowe ze zmodyfikowanymi posttranslacyjnie cysteinami, powodując że grupa nitrylowa zawsze znajduje się daleko od centrum katalitycznego. (7,93 Å, Rys. 15d). Sprawia to, że reakcja hydratacji 5-CVAM nie może zajść i nie jest produkowany ADAM (diamid).

Dzięki odpowiedniemu wykorzystaniu narzędzi teoretycznej biofizyki molekularnej zaprojektowałem enzymy, które wykazują stereoselektywność bądź regioselektywność. Dzięki nowym białkom, nieznanym wcześniej można tanio i w przyjazny dla środowiska sposób otrzymywać półprodukty leków czy herbicydów. Schematy analiz, jakie przeprowadziłem, korzystając z metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej okazały się przydatne nie tylko do wyjaśnienia przyczyn zwiększonej selektywności, ale też w procesie projektowania ulepszonych wariantów enzymów, pozwalając wyznaczyć wąską grupę aminokwasów do modyfikowania, oszczędzając tym samym czas pracy oraz środki finansowe grupy eksperymentalnej.

Podsumowanie

W badaniach, których efektem były publikacje składające się na osiągnięcie habilitacyjne pokazano, że wykorzystanie podstawowych metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej, opartych na dobrze znanych zasadach dynamiki Newtonowskiej, termodynamiki czy elektrostatyki, pozwala ulepszać pożyteczne enzymy. Podejście to jest ze swojej istoty wysoce interdyscyplinarne, włącza do dociekań biofizycznych pojęcia podstawowe takich dyscyplin jak chemia, biotechnologia i informatyka.

W publikacjach [H1], [H2] ale też w [H4] pokazano, że stosując biotechnologię eksperymentalną w kooperacji z biofizyką obliczeniową można zaprojektować i wyizolować bardziej aktywny enzym oraz, co istotne, wyjaśnić na poziomie molekularnym dlaczego poprawa właściwości ma miejsce. Wysiłki obliczeniowe, w połączeniu z dogłębną analizą strukturalną, pozwoliły podnieść na bardziej racjonalny i uzasadniony fizyką poziom problem doskonalenia enzymów. W pracach [H3], [H4], [H5] oraz [H6] pokazano, że dzięki narzędziom teoretycznej biofizyki można zaprojektować enzymy bardziej termostabilne, co ma ogromne znaczenie praktyczne dla przemysłu. Ostatnie dwie prace, [H7] oraz [H8] pokazały, że synergia biofizyki obliczeniowej i biotechnologii doświadczalnej pozwala modyfikować enzymy w taki sposób, aby katalizowały one tylko takie reakcje jakie wskaże chce badacz. Bez wkładu obliczeniowego byłoby to bardzo trudne, a może nawet niemożliwe.

W powyższych badaniach skupiono się głównie na niestandardowym enzymie hydratazie nitrylowej. Warto zauważyć, że jest to innowacyjne podejście, gdyż z reguły narzędzia modelowania molekularnego nie pozwalają badać niestandardowych białek (tj. posiadających posttranslacyjnie zmodyfikowane

aminokwasy lub koenzymy). Dopiero biegła znajomość zasad działania programów do dynamiki molekularnej, dogłębna wiedza o prawach fizyki użytych w metodzie obliczeniowej, o jej ograniczeniach, umiejętność programowania, a także podstawowa wiedza biologiczna i chemiczna dają szansę na efektywne badanie tego typu białek i ich ulepszanie. Jestem przekonany, że zbadanie tajników aktywności katalitycznej, termostabilności i selektywności niestandardowych enzymów wymaga specjalizowanych protokołów, nieustannej eksperckiej kontroli uzyskiwanych wyników, czyli niezbędna jest zaawansowana wiedza. Naukowców posiadających taką wiedzę w Polsce jest niewielu, a z informacji posiadanych przeze mnie nikt nie stosuje jej do enzymów biotechnologicznych. Podobnie jest na świecie – dobrze znane metody dokowania i dynamiki molekularnej używane są głównie do enzymów standardowych. Jednak z powodu bardzo dużej trudności używania metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do enzymów niestandardowych bardzo rzadko stosowana jest w tych przypadkach. Moje badania prowadzone w ścisłej współpracy z dwoma chińskimi zespołami naukowymi pokazują, że wykorzystanie metod teoretycznej biofizyki obliczeniowej do enzymów niestandardowych jest to możliwe. Rozwinięte i opublikowane sposoby analizy mogą być stosowane do podobnych problemów przez wszystkie zainteresowane zespoły na świecie. Nasze prace i doświadczenie plus coraz wydajniejsze komputery, otwierają zatem nowe możliwości badawcze.

4.2.3. Inne wątki oraz przyszłe badania

Oprócz przedstawionych powyżej metod ulepszania enzymów biotechnologicznych w trakcie swojej kariery naukowej podejmowałem się też innych badań. Skupiały się one głównie na wykorzystaniu metod dynamiki molekularnej do poznawania właściwości biomolekuł.

Pierwszym przykładem mogą być studia nad nanomechaniką białek zawierających węzły cysteinowe. Wspólnie z prof. Markiem Cieplakiem, dzięki zastosowaniu niestandardowej metody dynamiki molekularnej, czyli sterowanej dynamiki molekularnej (SMD), wyjaśniliśmy dlaczego w białkach posiadających takie węzły możemy wyróżnić biomolekuły, które wymagają bardzo dużej siły do rozwinięcia białka, oraz takie w których ta siła jest znacznie mniejsza. Wyniki porównaliśmy do klasycznych białek, nie zawierających węzłów cysteinowych. Rezultaty badań opublikowano w pracy [P1]. Tę samą metodę SMD zastosowano w pracy [P2], w której wyjaśniono mechanizm rozplatania białek modularnych zawierających tzw.

domeny Ig (*Immunoglobulin like domain*). Metodę SMD użyto też do modelowania molekuly DNA, co pozwoliło wyjaśnić obecność nieznanego wcześniej plateau (obszaru „płynięcia” biopolimeru przy stałej sile) w niektórych eksperymentach rozciągania DNA za pomocą mikroskopu sił atomowych. Naszym zdaniem praca ta jest jeszcze niedoceniana, rzadko cytowana, a zawiera pierwszą na świecie obserwację nietypowego zachowania DNA przy bardzo dużych naprężeniach. Po prostu eksperymenty w tym reżimie sił są bardzo trudne i niewiele grup potrafi uzyskać takie dane pomiarowe z AFM.

Kolejnym przykładem efektywnego zastosowania metod teoretycznej biofizyki molekularnej jest badanie aktywatorów hydratazy nitrylowej. Białka te niezbędne są do wprowadzenia jonu kobaltu do centrum aktywnego NHazy oraz prawdopodobnie do wprowadzenia posttranslacyjnych modyfikacji. Określiłem budowę przestrzenną tych aktywatorów oraz wyjaśniłem różnice w ich aktywności. Przy okazji pokazaliśmy, że aktywatory NHazy mają właściwości ATPazy (Prace [P5] oraz [P10]).

Całkiem inne metody teoretyczne stosowałem w publikacjach [P3] oraz [P7]. Przeprowadzone obliczenia kwantowe serii molekuł pozwoliły w przypadku pracy [P3] na opracowanie statystycznej metody analizy widm w podczerwieni. Natomiast w pracy [P7] scharakteryzowano dokładnie, we współpracy z grupami doświadczalnymi widma szeregu barwników zawierających motyw azobenzenu.

W przyszłości planuję w dalszym ciągu stosować metody teoretycznej biofizyki obliczeniowej nie tylko do enzymów biotechnologicznych, ale też dla biosensorów. Wspólnie z grupą prof. Zhemina Zhou planujemy tak zmodyfikować naturalnie występujący kompleks molekularny wykrywający acetamid, tak, aby był on w stanie wykrywać konkretne amidy, za pomocą białek fluorescencyjnych i tzw. antyterminatorów. Na razie udało się opracować taki układ wykrywający kilka amidów [75], Celem głównym jest jednak modyfikacja tego enzymu poprzez wprowadzenie kilku wariantów detektorów białkowych wykrywających różne amidy. W efekcie można by wykrywać różne amidy nawet gołym okiem, w efekcie wykrywać różne produkty NHazy (dzięki białkom fluorescencyjnym świecącym na różne kolory). W podobny sposób wspólnie z grupą prof. Zhemina Zhou, chcemy zmodyfikować receptor wykrywający GABA. Niedawno z moją magistrantką Magdaleną Włodkowską tak zmodyfikowaliśmy receptor GABA, że zaczął on wykrywać kwas β -masłowy zamiast GABA (dane niepublikowane). W przyszłości

chcemy z grupą chińską zaprojektować nowe warianty wykrywające inne aminokwasy proste.

Innym nurtem badań będzie poprawianie enzymów produkujących składniki żywności. Obecnie wspólnie z grupą prof. Xianzhonga Chena zaprojektowaliśmy bardziej wydajny wariant enzymu HpaB produkujący naturalny przeciwutleniacz hydroksytyrozol (składnik oliwy z oliwek). Planujemy rozpocząć badania nad efektywnym, enzymatycznym tworzeniem polioli, które są naturalnymi słodzikami stosowanymi w przemyśle spożywczym. Poliole są bardzo cenne dla osób chorujących na nadwagę i cukrzycę, ponieważ nie są one wchłaniane z układu pokarmowego, a są słodkie.

W najbliższej przyszłości planuję również rozpocząć współpracę z dr Shangyuanem Sangiem z Ningbo University, Ningbo, Chiny, która na celu będzie miała poszukiwanie detektorów nieświeżej żywności pochodzenia morskiego (np. ryb).

4.2.4. Literatura

- H1. Dong Ma†, Zhongyi Cheng†, Łukasz Peplowski†, Laichuang Han, Yuanyuan Xia, Xiaodong Hou, Junling Guo, Dejing Yin, Yijian Rao*, Zhemin Zhou*; *Insight into the broadened substrate scope of nitrile hydratase by static and dynamic structure analysis*. Chemical Science **13**(28) 8417-8428 (2022);
- H2. Junling Guo, Julia Berdychowska, Qianpeng Lai, Yiwei Meng, Zhongyi Cheng*, Łukasz Peplowski*, Zhemin Zhou*; *"Toolbox" construction of an extremophilic nitrile hydratase from Streptomyces thermoautotrophicus for the promising industrial production of various amides*. International Journal of Biological Macromolecules **221** 1103-1111 (2022);
- H3. Yuanyuan Xia, Łukasz Peplowski, Zhongyi Cheng, Tianyi Wang, Zhongmei Liu, Wenjing Cui, Michihiko Kobayashi*, Zhemin Zhou*; *Improving the thermostability and catalytic efficiency of the subunit-fused nitrile hydratase by semi-rational engineering*. ChemCatChem **10**(6) 1370-1375 (2018);
- H4. Zhongyi Cheng, Yao Lan, Junling Guo, Dong Ma, Shijin Jiang, Qianpeng Lai, Zhemin Zhou*, Łukasz Peplowski*; *Computational design of nitrile hydratase from Pseudonocardia thermophila JCM3095 for improved thermostability*. Molecules **25**(20) 1-18 (2020);
- H5. Junling Guo, Zhongyi Cheng, Julia Berdychowska, Xiaonan Zhu, Lingling Wang, Łukasz Peplowski*, Zhemin Zhou*; *Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase*. International Journal of Biological Macromolecules 181 444-451 (2021);
- H6. Yuanyuan Xia, Xiaoyu Li, Linli Yang, Xiaozhou Luo, Wei Shen, Yu Cao, Łukasz Peplowski*, Xianzhong Chen*; *Development of thermostable sucrose phosphorylase by semi-rational design for efficient biosynthesis of alpha-D-glucosylglycerol*. Applied Microbiology and Biotechnology **105**(19) 7309-7319 (2021);

- H7. Zhongyi Cheng, Łukasz Peplowski, Wenjing Cui, Yuanyuan Xia, Zhongmei Liu, Jialei Zhang, Michihiko Kobayashi, Zhemin Zhou*; *Identification of key residues modulating the stereoselectivity of nitrile hydratase toward rac-mandelonitrile by semi-rational engineering*. *Biotechnology and Bioengineering* **115**(3) 524-535 (2018);
- H8. Zhongyi Cheng, Wenjing Cui, Yuanyuan Xia, Łukasz Peplowski, Michihiko Kobayashi*, Zhemin Zhou*; *Modulation of nitrile hydratase regioselectivity towards dinitriles by tailoring the substrate binding pocket residues*. *ChemCatChem* **10**(2) 449-458 (2018);
1. Nagasawa, T., K. Ryuno, and H. Yamada, *Nitrile hydratase of Brevibacterium R312-- purification and characterization*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1986. **139**(3): p. 1305-12.
 2. Goedl, C., et al., *Sucrose phosphorylase: a powerful transglucosylation catalyst for synthesis of α -D-glucosides as industrial fine chemicals*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2010. **28**(1): p. 10-21.
 3. Sheldon, R.A. and D. Brady, *Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future*. *ChemSusChem*, 2022. **15**(9): p. e202102628.
 4. Cabrera-Barjas, G., et al., *Chapter 39 - Food biotechnology: Innovations and challenges*, in *Future Foods*, R. Bhat, Editor. 2022, Academic Press. p. 697-719.
 5. Hauer, B., *Embracing Nature's Catalysts: A Viewpoint on the Future of Biocatalysis*. *ACS Catalysis*, 2020. **10**(15): p. 8418-8427.
 6. Steinwand, M.A. and P.C. Ronald, *Crop biotechnology and the future of food*. *Nature Food*, 2020. **1**(5): p. 273-283.
 7. Chen, J., et al., *Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2009. **113**: p. 33-77.
 8. Becker, O.M., et al., *Computational Biochemistry and Biophysics*. 2001: Taylor & Francis.
 9. MacKerell Jr., A.D., et al., *All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics Studies of proteins*. *J Phys Chem B*, 1998. **102**: p. 3586-3616.
 10. Verlet, L., *Computer "experiments" on classical fluids. Thermodynamical properties of Lenard-Jones molecules*. *Phys. Rev.*, 1967. **159**: p. 98-104.
 11. Swope, W.C., et al., *A computer simulation method for the calculation of equilibrium constants for the formation of physical clusters of molecules: Application to small water clusters*. *J. Chem. Phys.*, 1982. **76**: p. 637-649.
 12. Mackerell, A.D., Jr., M. Feig, and C.L. Brooks, 3rd, *Extending the treatment of backbone energetics in protein force fields: limitations of gas-phase quantum mechanics in reproducing protein conformational distributions in molecular dynamics simulations*. *J Comput Chem*, 2004. **25**(11): p. 1400-15.
 13. Peplowski, L., K. Kubiak, and W. Nowak, *Mechanical aspects of nitrile hydratase enzymatic activity. Steered molecular dynamics simulations of Pseudonocardia thermophila JCM 3095*. *Chemical Physics Letters*, 2008. **467**(1): p. 144-149.
 14. Sousa, S.F., P.A. Fernandes, and M.J. Ramos, *Protein-ligand docking: current status and future challenges*. *Proteins*, 2006. **65**(1): p. 15-26.
 15. Khan, F.I., et al., *Current updates on computer aided protein modeling and designing*. *Int J Biol Macromol*, 2016. **85**: p. 48-62.
 16. Morris, G.M., et al., *Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function*. *Journal of Computational Chemistry*, 1998. **19**(14): p. 1639-1662.
 17. Peplowski, L., K. Kubiak, and W. Nowak, *Insights into catalytic activity of industrial enzyme Co-nitrile hydratase. Docking studies of nitriles and amides*. *J Mol Model*, 2007. **13**(6-7): p. 725-30.
 18. Song, L., et al., *High resolution X-ray molecular structure of the nitrile hydratase from Rhodococcus erythropolis AJ270 reveals posttranslational oxidation of two cysteines into sulfinic acids and a novel biocatalytic nitrile hydration mechanism*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007. **362**(2): p. 319-24.

19. Cheng, Z., Y. Xia, and Z. Zhou, *Recent Advances and Promises in Nitrile Hydratase: From Mechanism to Industrial Applications*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020. **8**(352).
20. O'Leary, N.A., et al., *Reference sequence (RefSeq) database at NCBI: current status, taxonomic expansion, and functional annotation*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(D1): p. D733-45.
21. Huang, W., et al., *Crystal structure of nitrile hydratase reveals a novel iron centre in a novel fold*. *Structure*, 1997. **5**(5): p. 691-9.
22. Kobayashi, M. and S. Shimizu, *Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology*. *Nat Biotechnol*, 1998. **16**(8): p. 733-6.
23. Kobayashi, M., T. Nagasawa, and H. Yamada, *Enzymatic synthesis of acrylamide: a success story not yet over*. *Trends Biotechnol*, 1992. **10**(11): p. 402-8.
24. Hann, E.C., et al., *5-Cyanovaleramide production using immobilized Pseudomonas chlororaphis B23*. *Bioorg Med Chem*, 1999. **7**(10): p. 2239-45.
25. Ryuno, K. and T. Nakamura, *Biocatalyst process: Enzymatic transformation of nitrile compounds and the application*. *Journal of Synthetic Organic Chemistry Japan*, 2003. **61**(5): p. 517-522.
26. Wieser, M., et al., *Low-molecular-mass nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous J1: purification, substrate specificity and comparison with the analogous high-molecular-mass enzyme*. *Fems Microbiol. Lett.*, 1998. **169**(1): p. 17-22.
27. Haki, G.D. and S.K. Rakshit, *Developments in industrially important thermostable enzymes: a review*. *Bioresour Technol*, 2003. **89**(1): p. 17-34.
28. Zeymer, C. and D. Hilvert, *Directed Evolution of Protein Catalysts*. *Annu Rev Biochem*, 2018. **87**: p. 131-157.
29. Qu, G., et al., *The Crucial Role of Methodology Development in Directed Evolution of Selective Enzymes*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020. **59**(32): p. 13204-13231.
30. Jiang, W. and B. Fang, *Synthesizing Chiral Drug Intermediates by Biocatalysis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2020. **192**(1): p. 146-179.
31. Patel, R.N., *Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals*. *Bioorg Med Chem*, 2018. **26**(7): p. 1252-1274.
32. Snajdrova, R., et al., *Nitrile biotransformation by Aspergillus niger*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic*, 2004. **29**(1-6): p. 227-232.
33. Martinkova, L. and V. Kren, *Nitrile- and amide-converting microbial enzymes: Stereo-, regio- and chemoselectivity*. *Biocatalysis and Biotransformation*, 2002. **20**(2): p. 73-93.
34. Prepechalova, I., et al., *Purification and characterization of the enantioselective nitrile hydratase from Rhodococcus equi A4*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001. **55**(2): p. 150-6.
35. Robert, K., *Biocatalysis in Organic Synthesis. Science of Synthesis, Vol. 1-3. Edited by Kurt Faber, Wolf-Dieter Fessner and Nicholas J. Turner*. *Angewandte Chemie International Edition*, 2015. **54**(43): p. 12547-12547.
36. Thomas, S.M., R. DiCosimo, and A. Nagarajan, *Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry*. *Trends in Biotechnology*, 2002. **20**(6): p. 238-242.
37. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. *Nucleic Acids Res*, 2000. **28**(1): p. 235-42.
38. Shen, J.D., et al., *Structural insights into the thermostability mechanism of a nitrile hydratase from Caldalkalibacillus thermarum by comparative molecular dynamics simulation*. *Proteins*, 2021.
39. Liu, J., H. Yu, and Z. Shen, *Insights into thermal stability of thermophilic nitrile hydratases by molecular dynamics simulation*. *J Mol Graph Model*, 2008. **27**(4): p. 529-35.
40. Chen, J., et al., *Improving stability of nitrile hydratase by bridging the salt-bridges in specific thermal-sensitive regions*. *J Biotechnol*, 2012. **164**(2): p. 354-62.
41. Pei, X., et al., *Evidence for the participation of an extra alpha-helix at beta-subunit surface in the thermal stability of Co-type nitrile hydratase*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2018. **102**(18): p. 7891-7900.
42. Zoete, V., et al., *SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules*. *J Comput Chem*, 2011. **32**(11): p. 2359-68.

43. Yu, W., et al., *Extension of the CHARMM General Force Field to sulfonyl-containing compounds and its utility in biomolecular simulations*. J Comput Chem, 2012. **33**(31): p. 2451-68.
44. Yamaki, T., et al., *Cloning and sequencing of a nitrile hydratase gene from Pseudonocardia thermophila JCM3095*. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1997. **83**(5): p. 474-477.
45. Miyanaga, A., et al., *Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(5): p. 1169-74.
46. Jurcik, A., et al., *CAVER Analyst 2.0: analysis and visualization of channels and tunnels in protein structures and molecular dynamics trajectories*. Bioinformatics, 2018. **34**(20): p. 3586-3588.
47. Ashkenazy, H., et al., *ConSurf 2016: an improved methodology to estimate and visualize evolutionary conservation in macromolecules*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(W1): p. W344-50.
48. Bennett, R.P., et al., *A Novel Ebola Virus VP40 Matrix Protein-Based Screening for Identification of Novel Candidate Medical Countermeasures*. Viruses, 2020. **13**(1).
49. Bastea, L.I., et al., *Sangivamycin and its derivatives inhibit Haspin-Histone H3-survivin signaling and induce pancreatic cancer cell death*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 16588.
50. Piersma, S.R., et al., *Arginine 56 mutation in the beta subunit of nitrile hydratase: importance of hydrogen bonding to the non-heme iron center*. J Inorg Biochem, 2000. **80**(3-4): p. 283-8.
51. Waterhouse, A., et al., *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(W1): p. W296-w303.
52. Colovos, C. and T.O. Yeates, *Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions*. Protein Sci, 1993. **2**(9): p. 1511-9.
53. Eisenberg, D., R. Lüthy, and J.U. Bowie, *VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Methods Enzymol, 1997. **277**: p. 396-404.
54. Luthy, R., J.U. Bowie, and D. Eisenberg, *Assessment of protein models with three-dimensional profiles*. Nature, 1992. **356**(6364): p. 83-5.
55. Sharma, S., et al., *Chapter 17 - Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology*, in *Advances in Enzyme Technology*, R.S. Singh, et al., Editors. 2019, Elsevier. p. 469-495.
56. Ward, O.P. and M. Moo-Young, *Thermostable enzymes*. Biotechnol Adv, 1988. **6**(1): p. 39-69.
57. Rigoldi, F., et al., *Review: Engineering of thermostable enzymes for industrial applications*. APL Bioeng, 2018. **2**(1): p. 011501.
58. Prasad, S. and T.C. Bhalla, *Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry*. Biotechnol Adv, 2010. **28**(6): p. 725-41.
59. Xia, Y., et al., *Construction of a subunit-fusion nitrile hydratase and discovery of an innovative metal ion transfer pattern*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 19183.
60. Leaver-Fay, A., et al., *ROSETTA3: an object-oriented software suite for the simulation and design of macromolecules*. Methods Enzymol, 2011. **487**: p. 545-74.
61. Brodtkin, H.R., et al., *Evidence of the participation of remote residues in the catalytic activity of Co-type nitrile hydratase from Pseudomonas putida*. Biochemistry, 2011. **50**(22): p. 4923-35.
62. Musil, M., et al., *FireProt: web server for automated design of thermostable proteins*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(W1): p. W393-w399.
63. Tavernelli, I., S. Cotesta, and E.E. Di Iorio, *Protein Dynamics, Thermal Stability, and Free-Energy Landscapes: A Molecular Dynamics Investigation*. Biophysical Journal, 2003. **85**(4): p. 2641-2649.
64. Panja, A.S., B. Bandopadhyay, and S. Maiti, *Protein Thermostability Is Owing to Their Preferences to Non-Polar Smaller Volume Amino Acids, Variations in Residual Physico-Chemical Properties and More Salt-Bridges*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0131495.
65. Saelensminde, G., Ø. Halskau, Jr., and I. Jonassen, *Amino acid contacts in proteins adapted to different temperatures: hydrophobic interactions and surface charges play a key role*. Extremophiles, 2009. **13**(1): p. 11-20.
66. Kumar, S., C.J. Tsai, and R. Nussinov, *Factors enhancing protein thermostability*. Protein Eng, 2000. **13**(3): p. 179-91.

67. Xu, D. and Y. Zhang, *Ab initio protein structure assembly using continuous structure fragments and optimized knowledge-based force field*. Proteins, 2012. **80**(7): p. 1715-35.
68. Kozakov, D., et al., *The ClusPro web server for protein-protein docking*. Nat Protoc, 2017. **12**(2): p. 255-278.
69. Yang, J., et al., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. Nat Methods, 2015. **12**(1): p. 7-8.
70. Hait, S., et al., *Finding the generalized molecular principles of protein thermal stability*. Proteins, 2020. **88**(6): p. 788-808.
71. Vejvoda, V., et al., *Biotransformation of heterocyclic dinitriles by Rhodococcus erythropolis and fungal nitrilases*. Biotechnol Lett, 2007. **29**(7): p. 1119-24.
72. Zheng, R.-c., Y.-g. Zheng, and Y.-c. Shen, *Amidase catalyzed kinetic resolution of racemic mandelamide to (R)-mandelate by Delftia tsuruhatensis ZJB-05174*. Journal of Biotechnology, 2008. **136**: p. S368.
73. Lohse, O. and C. Spondlin, *Efficient preparation of (R)- and (S)-2-amino-1-phenylethanol*. ORGANIC PROCESS RESEARCH & DEVELOPMENT, 1997. **1**(3): p. 247-249.
74. Weitz, H.-M., R. Fischer, and F.J. Broecker, *Manufacture of 6-aminocaproamide*. 1978, Google Patents.
75. Yan, Q., et al., *Development of an auto-inducible expression system by nitrogen sources switching based on the nitrogen catabolite repression regulation*. Microb Cell Fact, 2022. **21**(1): p. 73.

5. Informacja o wykazywaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.

- W 2011 roku odbyłem 2 miesięczny staż w dziale badawczo rozwojowym firmy Adamed Sp. z o.o. z siedzibą w Pieńkowie. W trakcie stażu poszukiwałem nowych drobnocząsteczkowych dualnych inhibitorów oddziaływań mdm2-p53 oraz mdm4-p53, wykazujących aktywność przeciwnowotworową w mięsakach, chłoniakach oraz białaczkach. Z powodu komercyjnego zastosowania tych inhibitorów uzyskane wyniki są poufne.
- Od 2016 roku współpracuję ściśle z grupą prof. Zhemina Zhou ze School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, China. Od 2018, dzięki mojej inicjatywie jest to oficjalna współpraca pomiędzy uniwersytetami (Uchwała nr 36 Senatu UMK z dnia 27.02.2018). W ramach współpracy z grupą prof. Zhou odbyłem 4 krótkoterminowe wizyty w Jiangnan University (łącznie ok 3 miesięcy). W trakcie wizyt wygłosiłem 4 zaproszone referaty dla pracowników i doktorantów School of Biotechnology, Jiangnan University oraz prowadziłem 3 workshopy z modelowania molekularnego dla doktorantów tego wydziału. W maju 2019 roku trzech naukowców z Jiangnan University odwiedziło UMK. W ramach współpracy powstało 10 publikacji związanych z badaniem i modelowaniem właściwości

biotechnologicznego enzymu hydratazy nitrylowej katalizującego toksyczne nitryle do użytecznych amidów. W jednej z tych publikacji posiadam podwójną afiliację (UMK i Jiangnan University). Od 2019 roku współpracuję też z grupą prof. Xianzhonga Chena ze School of Biotechnology, Jiangnan University modelując bardziej termostabilne wersje enzymu fosforylasy sacharozy, która rozkłada cukry złożone do prostszych, które następnie mogą być wykorzystane w przemyśle spożywczym i kosmetycznym. W ramach tej współpracy powstały 2 publikacje naukowe. Niedawno rozpocząłem z prof. Chenem prace mające przyspieszyć działanie enzymu (HpaB), który produkuje cenny składnik w przemyśle spożywczym hydroksytyrozol.

- Lista naukowców (lub liderów grup) spoza UMK, z którymi współpracuję (lub współpracowałem):
 - Prof. Zhemin Zhou, Jiangnan University, Wuxi, China;
 - Prof. Xianzhong Chen, Jiangnan University, Wuxi, China;
 - Prof. Michihiko Kobayashi, University of Tsukuba, Tsukuba, Japonia;
 - Prof. Marek Cieplak, Instytut Fizyki PAN, Warszawa, Polska;

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.

6.1. Osiągnięcia dydaktyczne

Prowadzę zajęcia dla studentów I i II stopnia, a także dla doktorantów.

Zajęcia po uzyskaniu stopnia doktora, których jestem koordynatorem i które opracowałem od podstaw (w nawiasach podano liczbę godzin realizowanych przeze mnie; liczba przeprowadzonych godzin dotyczy stanu na dzień 30 września 2022 roku. Nie uwzględniono zajęć rozpoczętych w roku akademickim 2022/2023):

- Komputerowe modelowanie leków (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 270h)
- Biologiczne i medyczne bazy danych (wykład 15h + laboratorium 15h; zrealizowano łącznie: wykład 90h, laboratorium 90h)
- Teoria niezawodności (konwersatorium 15h; zrealizowano łącznie 120h)
- Bio-nanomateriały (wielu prowadzących; wykład 20h; zrealizowano łącznie 20h)
- Fizyka w symulacji komputerowej i modelowaniu komputerowym (wielu prowadzących, wykład 15h, ćwiczenia 15h; zrealizowano łącznie: wykład 45h ćwiczenia 135h)

Zajęcia po uzyskaniu stopnia doktora, których nie jestem/byłem koordynatorem (w nawiasach podano liczbę godzin realizowanych przeze mnie):

- Fizyka dla informatyków cz.1 (ćwiczenia 30h; zrealizowano łącznie 150h)
- Fizyka dla informatyków cz.2 (ćwiczenia 30h; zrealizowano łącznie 30h)
- Programowanie proceduralne (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 330h)
- Języki programowania (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 60h)
- Pracownia problemów numerycznych (wielu prowadzących; laboratorium 8h; zrealizowano łącznie 48h)
- Dynamika molekularna (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 30h)
- Usługi internetowe i cloud computing (ćwiczenia 15h; zrealizowano łącznie 15h)
- Elementy fizyki cz.2 (ćwiczenia 30h; zrealizowano łącznie 60h)
- Elementy fizyki cz. 1(ćwiczenia 30h; zrealizowano łącznie 120h)
- Wstęp do systemu UNIX (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 60h)
- Elementy fizyki (ćwiczenia 30h + laboratorium 45h; zrealizowano łącznie ćwiczenia 330h, laboratorium 90h)
- Fizyka elementarna (ćwiczenia 36h; zrealizowano łącznie 180h)
- Programowanie i metody numeryczne (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 30h)
- Pracownia komputerowa II - programowanie i metody numeryczne (laboratorium 30h; zrealizowano łącznie 120h)
- Metody dynamiki molekularnej - Komputerowe modelowanie biocząsteczek (wielu prowadzących; laboratorium 10h; zrealizowano łącznie 10h)
- Wstęp do bioinformatyki (wielu prowadzących; ćwiczenia 10h + laboratorium 15h; zrealizowano łącznie ćwiczenia 10h + laboratorium 15h)
- Pracownia Fizyczna I (laboratorium 45h; zrealizowano łącznie 45h)
- Wybrane zastosowania informatyki (wielu prowadzących; laboratorium 15h; zrealizowano łącznie 15h)
- System opieki indywidualnej (konwersatorium 15h; zrealizowano łącznie 60h)

Przygotowałem materiały dydaktyczne do zajęć:

- Komputerowe modelowanie leków. Materiały podzieliłem na dwie części. Pierwsza część to prezentacja z podstaw teoretycznych (wstęp biologiczny, wstęp do chemii leków omówienie algorytmów) druga to dokładne instrukcje obsługi zaawansowanego oprogramowania do modelowania molekularnego.
- Materiały dydaktyczne dla studentów dostępne online do zajęć Fizyka w symulacji komputerowej i modelowaniu komputerowym (do części prowadzonej przeze

mnie). Materiały są przygotowane zarówno do wykładu (prezentacja) jak i ćwiczeń (projekty z modelowania i sposób ich rozwiązania).

- Biologiczne i medyczne bazy danych w formie prezentacji.
- Konwersatorium Teoria niezawodności w formie prezentacji.
- Bio-nanomateriały (prezentacja).
- Usługi internetowe i cloud computing (prezentacja oraz instrukcja obsługi maszyn wirtualnych).
- Materiały do zajęć Pracownia problemów numerycznych (do części prowadzonej przeze mnie) polegające na napisaniu od podstaw programu do dynamiki molekularnej, uwzględniający takie wielkości fizyczne jak: zmiana położenia atomów (prędkościowy algorytm Verleta), wyznaczanie prędkości w zależności od temperatury i masy atomów, wyznaczanie przyspieszeń atomów na podstawie działającej siły wyznaczonej z oddziaływań van der Waalsa oraz oddziaływań elektrostatycznych.

Przygotowałem materiały i poprowadziłem zajęcia dla doktorantów zagranicznych w ramach szkoły letniej „Spotkajmy się na UMK! – Międzynarodowe letnie i zimowe intensywne spotkania edukacyjne na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu” zorganizowanej przez UMK, finansowanej z programu SINAKER/NAWA. Dla dwóch grup doktorantów prowadziłem 5 godzinne zajęcia pt. „How to find an inhibitor. Docking of ligands to proteins”. Zajęcia w języku angielskim.

Współpracuję ze studentami na wszystkich etapach studiów. Opiekuję/opiekowałem się pracami:

- doktorskimi na UMK (promotor pomocniczy):
 - Dr Rafała Jakubowskiego (obrona doktoratu w 2016 roku, doktorat z nauk fizycznych)
 - Mgr Julii Berdychowskiej (rozpoczęcie studiów doktoranckich w 2019 roku, studia doktoranckie w Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Przyrodniczych, nauki fizyczne)
 - Mgr Angeliki Klimek (rozpoczęcie studiów doktoranckich w 2018 roku, Interdyscyplinarna Szkoła Doktorska Academia Copernicana, nauki biologiczne)
- magisterskimi na UMK:
 - Pana Patryka Muzalewskiego (Praca magisterska rozpoczęta w 2022 roku)
 - Pani Magdaleny Włodkowskiej (Uzyskany tytuł „Najlepszej pracy magisterskiej na kierunku Fizyka Techniczna w 2020 r.”)
 - Pani Natalii Dymowskiej
 - Pana Mariusza Misia
 - Pana Patryka Kosiorka
 - Pana Krzysztofa Wierzchowskiego

- Pana Rafała Jakubowskiego
- inżynierskimi na UMK:
 - Pana Rafała Burzyńskiego
 - Pana Mateusza Wojciechowskiego
 - Pana Jakuba Bordewicza
 - Pana Dominika Siecińskiego
- licencjackimi na UMK:
 - Pana Piotra Skrzyniarza
- Pomagałem w realizacji pracy magisterskiej Pani Lan Yao z Jiangnan University, Wuxi, China.
- Ponadto recenzowałem 1 pracę magisterską, 12 prac inżynierskich i 2 licencjackie na WFAiIS UMK
- W 2018 roku byłem opiekunem w programie TAPS (The Toruń Astrophysics / Physics Summer program), w którym studenci spoza UMK (także zagraniczni) odbywali 4 tygodniowe staże naukowe. Każdy student wykonywał projekt pod kierunkiem swojego opiekuna. Ja prowadziłem projekt pod tytułem: *“Investigation of thermal stability of Nitrile Hydratase enzyme using molecular dynamics simulations”*.

6.2. Osiągnięcia organizacyjne

- W 2019 pozyskałem dla UMK udział w programie PROM - Międzynarodowej wymiany stypendialnej doktorantów i kadry akademickiej (finansowanie NAWA). Jestem koordynatorem tego programu na UMK. Program ma za zadanie finansowanie wymiany akademickiej głównie dla doktorantów. Zaplanowane jest sfinansowanie 100 przyjazdów/wyjazdów zagranicznych na/z UMK (staże badawcze, konferencje i szkoły letnie). Budżet programu to 1 175 680 PLN. Z powodu pandemii koronawirusa program zakończy się w marcu 2023 r.
- Od 2006 roku jestem członkiem komitetu organizacyjnego corocznej, międzynarodowej konferencji BIT BioInformatics in Toruń organizowanej przez WFAiIS UMK oraz Polskie Towarzystwo Bioinformatyczne. Konferencja odbywa się co roku w Toruniu (łącznie 17 konferencji). W 2014 roku konferencja była stowarzyszona ze zjazdem członków SocBiN (Society for Bioinformatics in Northern Europe). Od 2015 roku jestem przewodniczącym komitetu organizacyjnego. W roku 2022 byłem dodatkowo członkiem komitetu programowego tej konferencji. Co roku mamy od 50 do 120 uczestników, z czego ok 30% uczestników zagranicznych.
- W latach 2010/2011, 2011/2012, 2012/2013, 2013/2014, 2014/2015, 2015/2016 byłem członkiem Uczelnianej Komisji Rekrutacyjnej na UMK. W latach 2016/2017 oraz 2017/2018 byłem sekretarzem Uczelnianej Komisji Rekrutacyjnej na UMK.
- Od 2012 roku jestem kierownikiem Pracowni Stacji Graficznych w ramach Pracowni Modelowania Komputerowego.

- W 2011 roku projektowałem wyposażenie pracowni komputerowych, w tym Pracowni Modelowania Komputerowego w ramach tworzenia Centrum Optyki Kwantowej na WFAiIS, UMK.
- Od 2011 roku jestem administratorem „Zrobotyzowanej Biblioteki Cyfrowej” w ramach Narodowego Laboratorium Technologii Kwantowych. Biblioteka ma za zadanie archiwizację danych na taśmach magnetycznych.
- W 2013 roku współprojektowałem Pracownię Terminali Graficznych oraz klastr obliczeniowy w ramach tworzenia Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii (ICNT) na UMK.
- Od 2013 jestem jedynym administratorem klastra obliczeniowego oraz Pracowni Terminali Graficznych w ICNT, UMK.
- Od 2004 roku jestem administratorem serwerów, klastrów obliczeniowych i komputerów Zespołu Teoretycznej Biofizyki Molekularnej, WFAiIS, UMK.

6.3. Osiągnięcia popularyzujące naukę

- Udział w Toruńskim Festiwalu Nauki i Sztuki w 2019 roku. Zaproszony zostałem do udziału w plenerowym panelu dyskusyjnym (impreza główna) pt. „Człowiek nie jedno ma imię”, w trakcie którego przedstawiano człowieka z punktu widzenia socjologa, teologa, fizyka, psychologa, artysty, filozofa, chemika oraz matematyka.
- W latach 2016-2019 przeprowadziłem serię pogaderek na temat teoretycznej biofizyki molekularnej dla małych grup uczniów gimnazjów i liceów odwiedzających Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej w ramach programów: „Zawsze na fali”, „Pokazy i warsztaty w IF UMK”, „Dziewczyny do ścisłych”, „Prymus Pomorza i Kujaw”. Łącznie przeprowadziłem zajęcia dla co najmniej 477 uczniów.
- Uczestnictwo w dwudniowym pikniku naukowym (1-2 czerwca 2016) organizowanym przez „Centrum nowoczesności” Młyn Wiedzy. Zorganizowałem serię pokazów nt. wirtualnego mikroskopu sił atomowych.
- Uczestnictwo w projekcie „Region Nauk Ścisłych” w 2014 i 2015 roku. Celem głównym projektu było wyrównanie szans u uczniów gimnazjalnych z obszarów wiejskich poprzez rozszerzenie oferty edukacyjnej o zajęcia pozalekcyjne z zakresu nauk matematyczno-przyrodniczych. Prowadziłem serię 50 godzin (25 x 2h) wykładów i pokazów na temat roli teoretycznej biofizyki molekularnej w medycynie dla najzdolniejszych uczniów z obszarów wiejskich województwa kujawsko-pomorskiego z 50 gimnazjów.
- W 2013 i 2014 roku prowadziłem warsztaty w ramach programu „Regionalne koła fizyczne, matematyczne, informatyczne i astronomiczne”. Prowadziłem warsztaty dla grup uczniów z 12 szkół z regionu województwa kujawsko-pomorskiego.
- Prowadzenie pogaderek na temat teoretycznej biofizyki molekularnej w ramach konkursu FAST (“Fizyczne i Astronomiczne Stypendia w Toruniu) w latach 2011-2018.

7. Oprócz kwestii wymienionych w pkt. 1-6, wnioskodawca może podać inne informacje, ważne z jego punktu widzenia, dotyczące jego kariery zawodowej.

- Od maja 2019 członek Rady Dyscypliny Nauk Fizycznych UMK.
- Opublikowałem artykuł pt. „Polsko-Chińskie Poprawianie Natury” w czasopiśmie „Głos Uczelni” 1(383), styczeń 2018, wydawanym przez UMK, mającym pełnić misję kulturoopiniotwórczą, prezentując życie intelektualne, naukowe, kulturalne i sportowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu.

.....
(podpis wnioskodawcy)