



**UNIWERSYTET
MIKOŁAJA KOPERNIKA
W TORUNIU**

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

**„Wykorzystanie metod modelowania komputerowego
do poprawy właściwości katalitycznych enzymu
biotechnologicznego Hydrataza Nitrylowa”**

Julia Berdychowska

Praca doktorska

Promotor:

Prof. dr hab. Wiesław Nowak

Promotor pomocniczy:

Dr hab. Łukasz Pełowski, prof. UMK

Toruń 2024

Streszczenie

Kataliza enzymatyczna umożliwia otrzymywanie produktów stosowanych przy syntezie leków, tworzyw sztucznych czy produkcji żywności. Hydrataza nitrylowa (NHaza) jest ważnym enzymem używanym w przemyśle do produkcji akrylamidu z akrylonitrylu w skali tysięcy ton.

Celem pracy doktorskiej było modelowanie komputerowe zmian struktury kilku wariantów tego enzymu w niestandardowych warunkach w celu zrozumienia jego dynamiki i poprawy właściwości biotechnologicznych. Problemem jest to, że enzym ten traci swoją aktywność w wysokiej temperaturze oraz przy dużych (>50%) stężeniach produktu, czyli akrylamidu. Po wprowadzeniu opisującym znaczenie NHazy, dokonano szerokiego przeglądu badań z wykorzystaniem symulacji dynamiki molekularnej (MD) dotyczących enzymów, głównie biotechnologicznych, w rozpuszczalnikach niewodnych. W oparciu o oryginalne symulacje zbadano modyfikacje enzymu NHazy prowadzące do jej zwiększonej termostabilności. Te modyfikacje polegały na połączeniu podjednostek za pomocą peptydów. W innej NHazie, pochodzącej z bakterii o wysokiej termostabilności, ale niskiej aktywności, zaproponowano mutację punktową zwiększającą jej aktywność. Następnie, metodami MD zbadano możliwe przyczyny utraty aktywności przez białko w roztworach o wysokim stężeniu amidów. W skali 500 ns stosowanej w obliczeniach MD białko zachowuje swoją strukturę, ale zaobserwowano oznaki częściowej denaturacji. Najbardziej prawdopodobnym wytłumaczeniem utraty aktywności jest indukowana amidami zmiana struktury najbliższego sąsiedztwa centrum aktywnego oraz utrudniony transport amidów z kanału prowadzącego do centrum. W oparciu o obliczenia prezentowane w rozprawie zaproponowano szereg wariantów NHazy, które w badaniach eksperymentalnych wykazały przewidywaną zwiększoną stabilność. Przeprowadzone badania pozwalają lepiej poznać aktywność katalityczną białka stosowanego w biotechnologii.

NICOLAUS COPERNICUS UNIVERSITY IN TORUŃ
FACULTY OF PHYSICS, ASTRONOMY AND INFORMATICS

„Improving Catalytic Properties of Biotechnological Enzyme Nitrile Hydratase. Molecular Modeling Approach”

Julia Berdychowska

A Thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of PhD in physical sciences.

Abstract

Enzymatic catalysis plays a crucial role in producing compounds used in the synthesis of medicinal drugs, plastics, and food products. Nitrile hydratase (NHase) is a key industrial enzyme, widely employed in the large-scale production of acrylamide from acrylonitrile, with annual outputs reaching thousands of tons.

The primary aim of this doctoral thesis was to use computational modeling to investigate structural changes in NHase, examine its dynamic properties, and propose strategies to improve its biotechnological performance. One of the major challenges associated with NHase is its loss of activity under high temperatures and elevated concentrations (>50%) of its product, acrylamide. Following an introductory chapter outlining the industrial significance of NHase, the thesis includes a comprehensive review of molecular dynamics (MD) studies on enzymes, particularly those with biotechnological applications in non-aqueous solvents. Original simulations were conducted to explore modifications aimed at enhancing NHase thermostability, including connecting its two subunits with peptide linkers. Additionally, a different NHase variant, derived from thermophilic bacteria with naturally high thermostability but low activity, was studied. A specific point mutation was introduced to increase its activity. MD simulations were also employed to investigate potential causes of activity loss in solutions with high acrylamide concentrations. Over the course of 500 ns, the protein retained its overall structure; however, early signs of partial denaturation were observed. The most plausible explanation for the loss of activity is a structural alteration in the of the close vicinity of active site caused by amides, along with impaired transport of amides through the tunnel leading to the active center. Based on the computational findings presented in this thesis, NHase mutants with improved stability were designed and experimentally tested, demonstrating enhanced performance. This study provides valuable insights into the catalytic activity of NHase, contributing to the optimization of its industrial applications.

Podziękowania

Chciałabym podziękować prof. dr hab. Wiesławowi Nowakowi za wiedzę i doświadczenie, które przekazywał swoim doktorantom podczas trwania ich doktoratu, cenne uwagi i sugestie oraz wyrozumiałość względem niedociągnięć i pomyłek. Dziękuję dr hab. Łukaszowi Peplowskiemu, prof. UMK, który wpadł na pomysł symulowania zachowania NHazy w roztworze swojego własnego produktu i zasugerował liczne analizy wykonane w doktoracie, za jego wsparcie, a zwłaszcza wprowadzenie mnie do obsługi programu VMD oraz NAMD, dyskusje i odpowiadanie na moje liczne pytania. Pragnę wyrazić wdzięczność także innym współpracownikom z Katedry Biofizyki: dr hab. Karolinie Mikulskiej-Rumińskiej, prof. UMK, dr Beacie Niklas, mgr Thilibanowi Manivarmie, mgr Sylwii Czach, mgr Tuğçe Gökdemir i mgr inż. Julii Dudzie za dobrą atmosferę i wsparcie. Dziękuję także współpracownikom z University of Jiangnan w Wuxi, zwłaszcza Zongyiemu Chengowi za wykonanie zaprojektowanych przeze mnie mutantów enzymu hydratazy nitrylowej.

Dziękuję prof. dr. mgr. Jiří Damborskýemu, mgr. dr hab. Davidowi Bednářowi oraz MUDr. Janowi Mičanowi z Loschmidt Laboratories of Protein Engineering na Uniwersytecie Masaryka w Brnie za opiekę w czasie stażu w ich grupie sfinansowanego w ramach NAWA PROM. Chciałabym także podziękować mojemu chłopakowi, dr Kaushikowi Joarderowi za wiarę w mój sukces oraz wyrozumiałość dla pełnego wyzwania i pracy stylu życia doktorantki.

Jestem wdzięczna za finansowanie jakie otrzymywałam w ramach Szkoły Doktorskiej *Academia Scientiarum Thoruniensis* oraz IDUB (Inicjatywa Doskonałości – Uczelnia Badawcza) w ramach pola badawczego „Biofizyka w nanoskali” oraz stypendium naukowe na podwyższenie jakości rozprawy doktorskiej, finansowane w ramach tego programu. Część obliczeń wykonano w Interdyscyplinarnym Centrum Nowoczesnych Technologii UMK.

Spis treści

Spis skrótów i skrótowców	7
Spis nazw łacińskich	8
Rozdział 1. Wstęp.....	10
1.1 Znaczenie hydratazy nitrylowej. Motywacja.....	10
1.2 NHazy żelazowe	14
1.3 NHaza kobaltowa	16
1.4 Aktywatory NHaz.....	19
1.5 Mechanizm katalizy w NHazie.....	20
1.6 Aktywność NHazy w obecności produktu	25
1.7 Regioselektywność NHazy.....	27
1.8 Stereoselektywność NHazy	28
Rozdział 2. Cel prezentowanych badań. Układ pracy.	30
Rozdział 3. Metody modelowania i opis protokołów obliczeń.	32
3.1 Dynamika molekularna – opis metody	32
3.2 Programy i serwery wykorzystywane do analizy wyników	35
Rozdział 4. Przegląd wyników modelowania enzymów biotechnologicznych w rozpuszczalnikach niewodnych.	40
4.1 Klasyfikacja enzymów biotechnologicznych	41
4.2 Modelowanie enzymów biotechnologicznych w środowiskach niewodnych.....	41
4.2.1 Rozpuszczalniki o małej polarności	41
4.2.2 Rozpuszczalniki polarne	43
4.2.3 Ciecze jonowe	44
4.2.4 Mieszanki głęboko eutektyczne (<i>Deep Eutectic Solvents-DES</i>)	45
Rozdział 5. Analiza wyników symulacji dla Problemu A: poprawa aktywności.....	48
5.1 Wprowadzenie	48
5.2 Poszukiwanie nowego wariantu termostabilnej NHazy o zwiększonej aktywności .	48
Rozdział 6. Analiza wyników symulacji dla Problemu B: poprawa termostabilności.....	57
6.1 Wprowadzenie	57

6.2	Rozwiązanie Problemu B: Poprawa termostabilności NHazy poprzez zastosowanie linkerów	57
Rozdział 7. Analiza wyników symulacji: Badanie przyczyn Problemu C czyli spadku		
	aktywności przy rosnącym stężeniu amidów.	70
7.1	Stabilność tetrameru, dimeru, pojedynczych domen.....	70
7.2	Analiza RMSD dla tetrameru	71
7.3	Analiza RMSD dla dimerów z centrami aktywnymi AB i CD NHazy	73
7.4	Analiza RMSD dla pojedynczych domen A, B, C, D NHazy	76
7.5	Analiza fluktuacji położeń aminokwasów – parametry RMSF	80
7.6	Ocena dostępu molekuł rozpuszczalnika do białka – SASA.....	83
7.7	Odległości między środkami mas dimerów. Analiza RoG.....	88
7.8	Dynamika tetrameru NHazy. Mody normalne i macierze korelacji.....	90
7.9	Badanie rozkładu amidów w NHazie. Kontakty ligandów z białkiem.....	94
7.10	Analiza kanałów w NHazie	98
7.11	Rozkład kanałów transportowych w NHazie wyznaczony programem CAVER.	98
7.12	Analiza kanałów transportowych w NHazie	104
	programem MDpocket.....	104
7.13	Analiza klastrów hydrofobowych w NHazie.....	109
7.14	Ruchliwość ligandów w kanałach NHazy	110
7.15	Czy NHaza preferuje nityle?	115
	Publikacje mgr Juli Berdychowskiej	120
	DODATEK 1	121
	Bibliografia.....	125

Spis skrótów i skrótowców

ACA – akrylamid

ACN – akrylonitryl

ADN – adiponitryl

ANM – *Anisotropic Network Model*

CALB – *Candida antarctica lipase B*

CD – *Circular Dichroism*

5-CVAM – 5-cyjanowaleramid

DES – *Deep Eutectic Solvents*

DFT – *Density Functional Theory*

DLS – *dynamic light scattering*

EUCB – *Euclidean Computational Biology*

FT-ICR MS – *Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry*

HDX – *hydrogen deuterium exchange*

ICP-OES – *inductive coupled plasma optical emission spectroscopy*

IL – *Ionic Liquids*

LES – *Locally Enhanced Sampling*

NHaza – hydrataza nitrylowa

MAOS – *micro-aqueous organic solvent*

MD – dynamika molekularna

NR – *nicotinamide ribosinoside*

NMN – β -*nicotinamide mononucleotide*

PCA – *Principal Component Analysis*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

RMSD – *Root Mean Square Deviation*

RMSF – *Root Mean Square Fluctuations*

RoG – promień bezwładności (*Radius of Gyration*)

SASA – *Solvent Accessible Surface Area*

WT – *Wild Type*, białko natywne

Spis nazw łacińskich

Arthrobacter sp. J1

Agrobacterium

Aurantimonas manganoxydans ATCC BAA-1229

Bacillus sp.

Bacillus RAPc8

Brevibacterium R312

Candida antarctica

Candida rugosa

Carbonactinospora thermoautotrophicus

Ensifer meliloti

Escherichia coli

Moraxella

Pseudonocardia thermophila JCM3095

Pseudomonas chlororaphis B23

Pseudomonas putida NRRL-18668

Pyrococcus furiosus

Rhizopus chinensis

Rhodococcus sp. AJ270

Rhodococcus sp. N-771

Rhodococcus sp. YH3-3

Rhodococcus aetherivorans ZJB1208

Rhodococcus equi TG328-2

Rhodococcus erythropolis

Rhodococcus pyridinivorans NIT-36

Rhodococcus rhodochrous ATCC BAA-870

Rhodococcus rhodochrous J1

Streptomyces thermoautotrophicus

Serratia

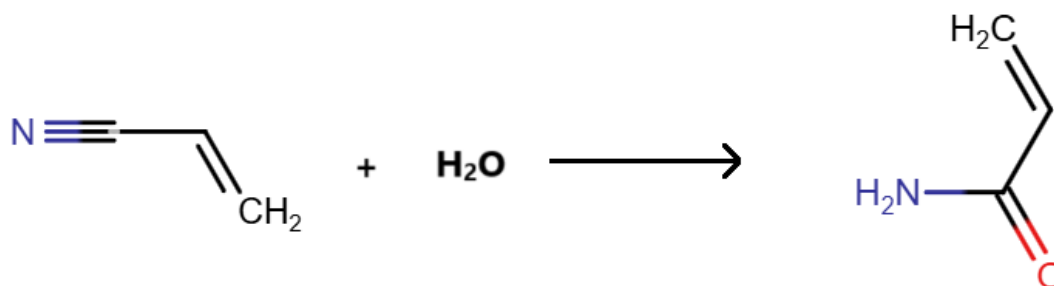
Rozdział 1. Wstęp

1.1 Znaczenie hydratazy nitrylowej. Motywacja

Rozwój cywilizacji opiera się na technologii. Technologia obejmuje sposoby wytwarzania, m.in., potrzebnych związków chemicznych. Można je wytwarzać drogo lub tanio. Obecnie dużym problemem są wydatki ponoszone w związku ze zużywaną energią i obciążaniem środowiska. Coraz większego znaczenia w przemyśle nabiera więc tańsze podejście noszące nazwę „zielonej chemii” („Green Chemistry”). Do niej w szerszym sensie należy biotechnologia. Procesy biologiczne zachodzą zwykle w łagodnych warunkach i mogą dać cenne produkty, na przykład antybiotyki. Dobór organizmu wytwarzającego takie substancje jest niezwykle istotny. Wielki wysiłek biotechnologów skierowany jest też na doskonalenie istniejących enzymów, to jest racjonalną poprawę ich właściwości [1]. Działania te wymagają głębokiej znajomości natury białek i mechanizmów katalitycznych. Wiedzę na ten temat można czerpać z badań biofizycznych białek. Niniejsza rozprawa doktorska poświęcona jest badaniu metodami obliczeniowymi jednego z ważniejszych enzymów biotechnologicznych – hydratazy nitrylowej. Białko znane jest od dawna, jednak wiele aspektów jego aktywności nie jest wyjaśnionych.

Enzym hydrataza nitrylowa został odkryty podczas badań degradacji bakteryjnej toksycznych związków zawierających grupę cyjanową, takich jak akrylonitryl i acetonitryl [2]. Nitryle zawierają resztę $-C\equiv N$. Są one syntetyzowane przez rośliny. Nitryle znajdują zastosowanie w przemyśle. Na przykład, acetonitryl jest używany jako rozpuszczalnik, adiponitryl stanowi prekursor nylonu, akrylonitryl to prekursor różnych tworzyw sztucznych. Dichlorobenil (2,6-dichlorobenzonitryl; nazwa handlowa, Casoron), ioksynil (3,5-diiodo-4-hydroksybenzonitryl; nazwa handlowa, Bentrol), są używane w rolnictwie do ochrony ryżu, pszenicy, jęczmienia, kukurydzy i różnych jagód przed szkodnikami. Nitryle są obecne w ściekach i odpadach rolniczych [3]. Niestety, nitryle są toksyczne, ponieważ występuje u nich grupa cyjanowa. Mimo to, niektóre mikroorganizmy mogą używać związków nitrylowych jako źródeł węgla oraz azotu. Degradują one nitryle do kwasów karboksylowych i amoniaku. Poszukując metod mikrobiologicznej degradacji poliakrylonitrylu Asano i in. odkryli u bakterii *Arthrobacter* sp. J1 (obecnie nazywaną *R. rhodochrous*) enzym, który przekształcał akrylonitryl do akrylamidu i nazwali go hydrataza nitrylowa (*nitrile hydratase*, NHase, EC 4.2.1.84) [4, 5], w rozprawie nazywana **NHaza**.

W XX wieku wytwarzano akrylamid, który potrzebny jest przy produkcji farb, polepszaczy gleby, tkanin, soczewk kontaktowych, implantów czy żeli poliakrylamidowych metodami typowej syntezy chemicznej, z dużym wydatkiem energii i obciążeniem środowiska. Akrylamid (C_3H_5NO , masa cząsteczkowa 71.08, CAS# 79-06-1) zwykle wytwarza się z akrylonitrylu na drodze hydratacji (Rys. 1.1).



Rysunek 1.1 Schemat reakcji katalizowanej przez NHazę.

Obecnie (XXI w.), najważniejsza metoda produkcji jest oparta na procesie biotechnologicznym. Katalizatorem reakcji hydratacji jest badane w pracy doktorskiej białko enzymatyczne NHaza. Zdecydowana większość scharekteryzowanych dotąd NHaz zawiera koordynowany przez łańcuch białkowy jon metalu – albo niehemowy, niskospinowy trójwartościowy jon żelaza, albo niekorynoidowy (*non-corrinoid*) niskospinowy, trójwartościowy jon kobaltu Co^{3+} [6].

Istnieje duże zapotrzebowanie na udoskonalenia tego białka. Modelowanie komputerowe NHazy mające na celu jej dogłębne poznanie, prowadzone w Toruniu, wspomagane było doświadczeniami przeprowadzanymi w grupie prof. Zhemina Zhou w Chinach (Jiangnan University w Wuxi), z którą prowadzona jest współpraca. Celem długofalowym tych wysiłków jest ulepszanie metod racjonalnego projektowania biokatalizatorów. Jednym z istotnych problemów, który pojawia się podczas przemysłowego wykorzystania NHazy jest jej niedostateczna stabilność.

Pierwsza publikacja na temat NHazy z grupy biofizycznej z Instytutu Fizyki UMK ukazała się w roku 2002 [7]. W roku 2007 dokonano dokowań substratu i produktu do centrum aktywnego enzymu [8] zbadano białko metodami wzmocnionego próbkowania LES (*Locally Enhanced Sampling*) [9] i opublikowano przegląd badań dotyczący NHazy [10]. W roku 2008 badano białka metodami DFT (*Density Functional Theory*) [11], sterowanej dynamiki molekularnej [12], a także symulacji dynamiki molekularnej [13]. Grupa

profesora Zhou w Chinach zajmowała się natomiast modyfikacjami posttranslacyjnymi enzymu [14]. W 2018 we współpracy polsko-chińskiej przeprowadzono badanie dotyczące regioselektywności NHazy [15], jej stereoselektywności [16] oraz dokonano polepszenia termostabilności i aktywności przez projektowanie semi-racjonalne i fuzję podjednostek [17]. W 2019 badano metalochaperony NHazy [18]. W 2020 zwiększono termostabilność enzymu z *Pseudonocardia thermophila* JCM3095 poprzez wprowadzenie mutacji punktowych [19]. W 2020 skonstruowano kolejne mutanty z linkerami [20]. Cheng i in. napisali także przegląd literatury na temat NHazy [6]. W 2021 dokonano zmian w tunelu w celu zoptymalizowania katalizy danych substratów [21]. W 2022 stworzono serię mutantów, z których każdy był dopasowany do syntezy innego amidu (białko z bakterii *Streptomyces thermoautotrophicus*) [22], a także poszerzono zakres substratów przez mutacje [23], ulepszono produkcję 3-cyjanopyridyny [24] i zbadano aktywatory NHazy [25]. W 2023 dokonano inżynierii białka z *Carbonactinospira thermoautotrophicus* w celu bardziej efektywnej syntezy izonikotynamidu [26]. W 2024 wyjaśniono mechanizm selektywności substratowej enzymu [27]. Zmodyfikowano też tunel i kieszeń wiążącą substrat dla efektywnej syntezy cinnamidu [28].

Jak wspomniano, enzymhydrataza nitrylowa został odkryty w grupie prof. Asano w Kyoto w roku 1980. W roku 1990 został użyty przez Japońską firmę Nitto Chemical Co. (Mitsubishi Rayon Co.), która opracowała sposób wytwarzania akrylamidu przy pomocy NHazy obecnej w bakteriiach *Rhodococcus* sp. N-771. W pierwszych zastosowaniach przemysłowych była to NHaza zawierająca jon Fe^{3+} w centrum aktywnym. Niestety, enzym tracił aktywność w ciemności. Produkcję prowadzono w szklanych naczyniach, przy sztucznym oświetleniu, co podnosiło koszty. Po dłuższych badaniach okazało się, że enzym blokowany jest przez endogenne tlenek azotu (NO), który wiąże się do katalitycznego jonu żelaza, ale szczęśliwie jest fotodysocjowany z tej pozycji przy pomocy fotonów z zakresu widzialnego. Stąd brała się konieczność stosowania światła przy produkcji. W roku 1991 opatentowano użycie zbliżonego enzymu z *Rhodococcus rhodochrous* J1 zawierającego zamiast żelaza jon kobaltu, odpornego na blokujący efekt NO [29]. W 2004 opatentowano zmodyfikowaną NHazę z *P. thermophila* JCM3095 [30]. Hipotetyczne mechanizmy reakcji katalitycznych zaproponowano w pracach [31, 32], głównie w oparciu o obliczenia kwantowochemiczne [2, 6, 32-45]. Będą one przedstawione w podrozdziale 1.5. Obecnie nie ma jeszcze pewności co do tego, który mechanizm działania NHazy jest właściwy.

Użycie immobilizowanych komórek zawierających NHazę do przemysłowej produkcji akrylamidu z akrylonitrylu zaczęło się w 1991, a produkcja wzrosła stopniowo do 30 000 ton na rok [3]. Obecnie działa wielu wytwórców zaangażowanych w enzymatyczną hydratację nitryli i produkcję akrylamidu. Mitsubishi Corporation (Japonia), z użyciem NHazy jako

katalizatora, jest w stanie wyprodukować powyżej 200 000 ton akrylamidu z akrylonitrylu na rok. BASF w Niemczech oraz Lonza w Szwajcarii konkurują, wytwarzając nikotynamid. Fabryki, ponad 10, wykorzystujące NHazę pracują również w Chinach. W Polsce nie stosuje się tej technologii [6]. NHazy są używane również jako przemysłowe biokatalizatory przy otrzymywaniu 5-cyjanowaleramidu, który może zostać wykorzystany do produkcji polimerów i substancji farmaceutycznych oraz używanych w rolnictwie [15, 46].

Akrylonitryl jest produkowany na drodze syntezy chemicznej w skali milionów ton, gdyż znajduje zastosowanie jako substrat do produkcji polimerów termoplastycznych. Znane wszystkim wytrzymałe mechanicznie tworzywo ABS (klocki Lego, walizki) to nic innego jak **akrylonitryl-butadien-styren**.

Warto zauważyć przy okazji, że akrylamid może pojawiać się w żywności poddanej działaniu wysokiej temperatury (powyżej 120 °C) [47], w chipsach, pączkach, frytkach czy kawie rozpuszczalnej, jednak nie jest to pożądanym składnikiem, ponieważ ma właściwości rakotwórcze. Normy europejskie dopuszczają zawartość do 40 µg/kg (350 ppb). Opakowania mające kontakt z żywnością nie mogą wcale zawierać akrylamidu.

Ostatnio zostały ujawnione potencjalne aplikacje NHaz do syntezy innych wartościowych amidów [48]. Odkryto, że NHaza z *Ensifer meliloti* może przeprowadzać biodegradację indolo-3-acetonitrylu do indolo-3-acetamidu, który jest istotnym prekursorem roślinnych hormonów należących do klasy auksyn. NHaza z *Rhodococcus pyridinivorans* NIT-36 produkuje z dużą aktywnością katalityczną laktamid, który jest przydatnym w przemyśle amidem kwasu mlekowego. Znajduje on szerokie zastosowanie przy wytwarzaniu kosmetyków. 2,6-Difluorobenzamid, ważny produkt pośredni przy produkcji pestycydów, może być syntetyzowany przez NHazę z *A. manganoxydans* ATCC BAA-1229 z końcowym stężeniem 314 g/L. Niacynamid jest postacią witaminy B3/PP którą dodaje się do żywności, paszy czy wykorzystuje w różnych kremach i kosmetykach. Ze związku tego jako substratu wytwarza się rybozyd nikotynamidu (NR, *nicotinamide ribosinoside*) oraz mononukleotyd β-nikotynamidu (NMN *β-nicotinamide mononucleotide*), związki ważne w regulacji metabolizmu energii w komórkach. Uważa się, że coraz popularniejsze będzie stosowanie nutraceutyków (nutraceuticals) [49]. Warto wspomnieć, że ze względu na niestabilność NHazy poza bakteriami, większość reakcji katalizy jest przeprowadzana z użyciem całych komórek [6].

Oczyszczone aktywne NHazy mają masę cząsteczkową w zakresie od 54 kDa do 530 kDa i są zwykle złożone z podjednostek α oraz β posiadających masę cząsteczkową w zakresie od 22 kDa do 29 kDa powtórzonych kilka razy. Podstawową jednostką funkcjonalną NHazy jest tetramer. NHaza z bakterii *P. thermophila* posiada podjednostki α 23 kDa i β 26.6 kDa. Optimum pH dla NHazy znajduje się pomiędzy 6.5 oraz 8.5. Po obniżeniu

pH zaobserwowano gwałtowną utratę funkcji. Większość NHaz jest termolabilna tzn. działają one tylko w zakresie temperatur od 20°C do 35°C. Niektóre NHazy, zwłaszcza po modyfikacjach, wykazują maksymalną aktywność w 40, 50 lub 60°C (*Bacillus RAPc8*, *P. thermophila* JCM 3095, *Rhodococcus* sp. YH3-3 jednak nie wszystkie mają odpowiednią aktywność dla procesów przemysłowych) [50]. Reakcja hydratacji nitryli do amidów przeprowadzana przez NHazy jest egzoenergetyczna. W trakcie biotechnologicznej produkcji wytwarza się ciepło i hydrataza nitrylowa traci w pewnym momencie swoje właściwości katalityczne. Zwiększanie termostabilności wysokowydajnych NHaz to istotny problem jaki został zbadany w ramach niniejszego doktoratu.

1.2 NHazy żelazowe

Już w roku 1996, Yamada oraz Kobayashi odnotowali, że żelazowa NHaza z *Pseudomonas chlororaphis* B23 jest bardzo niestabilna w roztworach, a do jej stabilizacji dochodzi, kiedy do roztworu doda się niskocząsteczkowe kwasy organiczne takie jak kwas n-butyrowy, n-walerianowy, kwas propionowy i kwas octowy [4]. Oznacza to, że enzym jest wrażliwy na charakter rozpuszczalnika. Pasma absorpcji z maksimum w 720 nm może być użyte do monitorowania centrum aktywnego. NHaza była pierwszym poznany niehemowym enzymem, który zawierał niskospinowe centrum aktywne Fe^{3+} . W tym rejonie dochodzi do katalizy reakcji enzymatycznej. NHaza oczyszczona z *Brevibacterium* R312 jest także enzymem żelazowym i wykazuje podobne właściwości spektralne do tej z *P. chlororaphis* B23. Zauważono, że NHaza z *Rhodococcus* sp. N-771 wykazuje podwyższoną aktywność przy ekspozycji na światło. Widma absorpcji i fluorescencji wykazały, że chromoforem zaangażowanym w fotoaktywację jest kompleks żelaza z NO [4].

Metodami krystalografii rentgenowskiej poznano struktury NHazy białka z *Rhodococcus* sp. R312 [35] oraz *Rhodococcus* sp. N-771 [51]. Okazało się, że podjednostki α oraz β tworzą ciasno zwinięty heterodimer z centrum aktywnym ulokowanym w zagłębieniu pomiędzy podjednostkami [3, 52] (Rysunek 1.2, jednak jest to NHaza kobaltowa).

W centrum aktywnym, wszystkie ligandy jonu metalu występują w obrębie podjednostki α białka. Te ligandy to trzy atomy siarki z cystein oraz dwa atomy azotu z łańcucha głównego, jeden z cysteiny oraz jeden z seryny. W podjednostce α *Rhodococcus* sp. R312, te pięć ligandów (Cys109 (S), Cys112 (S), Ser113 (N) Cys114 (S), i Cys114 (N)) jest ulokowanych na pięciu wierzchołkach ośmiościanu foremego, a szósta pozycja pozostaje wolna. Motyw CXXCSC zaangażowany w wiązanie jonów metali jest konserwatywny w zsekwencjonowanych NHazach. Analiza krystalograficzna α Cys112 potwierdziła, że reszta ta jest post-translacyjnie utlenowana do kwasu cysteino-sulfinowego

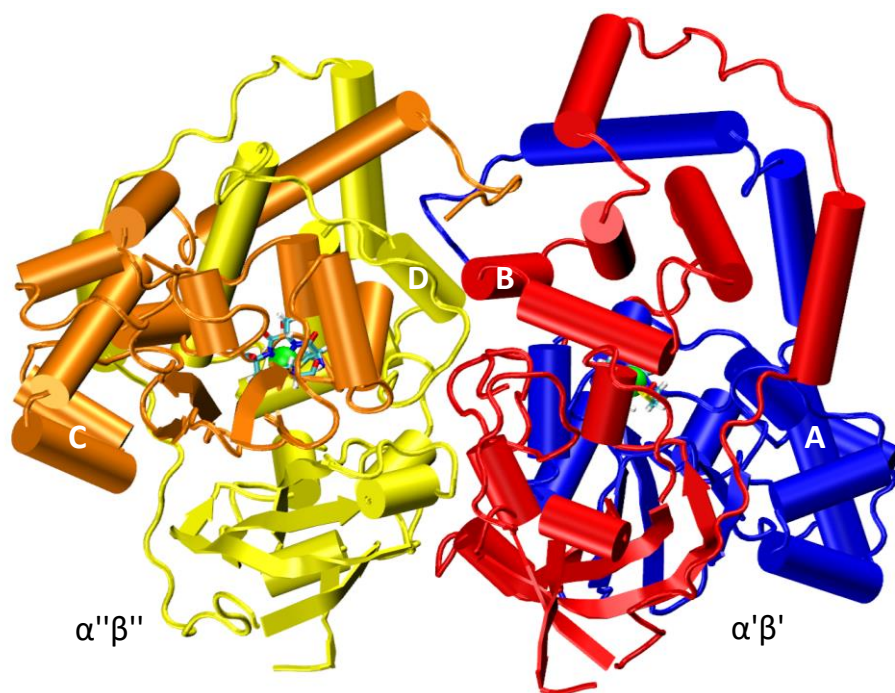
(Cys-SOOH) [3, 53]. Co więcej, α Cys114 w tej NHazie jest modyfikowana do kwasu cysteino-sulfenowego (Cys-SOH). Obserwacje te zostały potwierdzone z użyciem spektrometrii mas (FT-ICR MS, *Fourier-transform ion-cyclotron-resonance mass spectrometry*) [3].

Jak już wspomniano, omawiane enzymy oparte na żelazie ulegają inaktywacji pod wpływem obecnego w bakteriach NO. Badanie z zastosowaniem spektroskopii FT-IR wykazało, że w trakcie naświetlania wiązanie Fe-NO pęka [54]. Typowym organizmem, w którym można znaleźć NHazę typu żelazowego jest *Rhodococcus erythropolis*. Podobny enzym występuje także u *Pseudomonas putida*, *Bacillus* sp. [6, 39]. NHazy żelazowe preferują w aktywności małe nitryle alifatyczne [55]. Obecnie nie są szerzej stosowane komercyjnie.

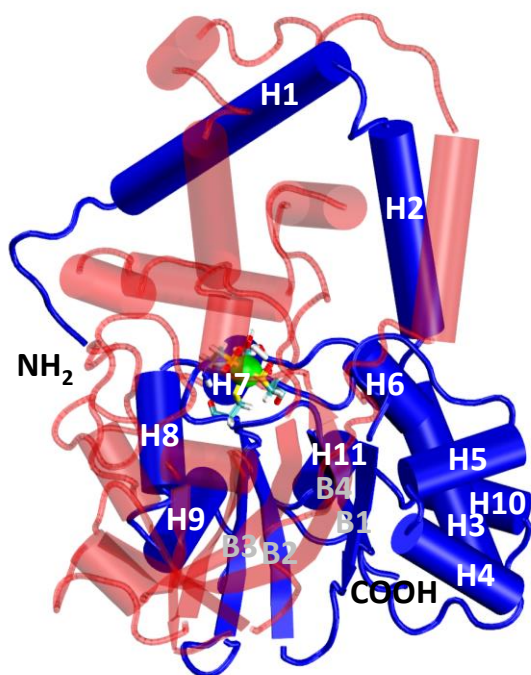
1.3 NHaza kobaltowa

NHazy kobaltowe (Rysunek 1.2) nie wykazują dezaktywacji poprzez wiązanie NO, a w szóstym miejscu koordynacyjnym wiąże się do jonu cząsteczka wody lub jon hydroksylowy [6]. Bakteria *R. rhodochrous* J1 zawiera w NHazie kobalt Co^{3+} i wytwarza dwa jej typy. Ich ekspresja jest regulowana poprzez suplementację specjalnym induktorem. Dodanie cykloheksanokarboksyamidu skutkuje indukcją NHazy o niskiej, 101 kDa, masie cząsteczkowej (L-NHazy), która wykazuje wyższą aktywność względem aromatycznych i heterocyklicznych nitryli, benzonitrylu, cyjanopirydyny i cyjanopiryzyny [4]. Mocznik indukuje NHazę o wysokiej, 505 kDa masie cząsteczkowej (H-NHazę) posiadającą większą specyficzność względem nitryli alifatycznych, a szczególnie akrylonitrylu [56]. Są one kodowane przez inne geny i mają różną liczbę dimerów $\alpha\beta$. Obie NHazy są indukowane poprzez hodowanie bakterii w obecności krotonamidu [4]. Induktor działa prawdopodobnie na poziomie transkrypcyjnym. Może on także regulować składanie podjednostek α oraz β , by uzyskać budowę oligomeryczną i wysoką aktywność enzymu [4, 50]. Zarówno H- oraz L-NHaza z *R. rhodochrous* J1 zawierają jon kobaltu jako kofaktor i wykazują maksimum absorpcji w 450 nm. H-NHaza charakteryzuje się wysoką termostabilnością, a także odpornością na akrylonitryl i akrylamid (nawet powyżej 50% v/v akrylamidu), jednak nie katalizuje ona efektywnie reakcji dla nitryli alifatycznych. Enzym ten może działać w 10-20°C [4]. Inne bakterie, takie jak *P. thermophila* oraz *P. putida* posiadają enzym o niskiej masie cząsteczkowej [6].

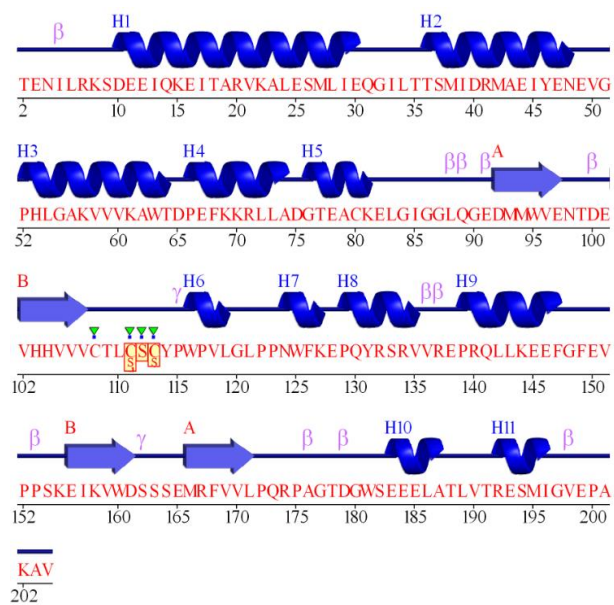
a)

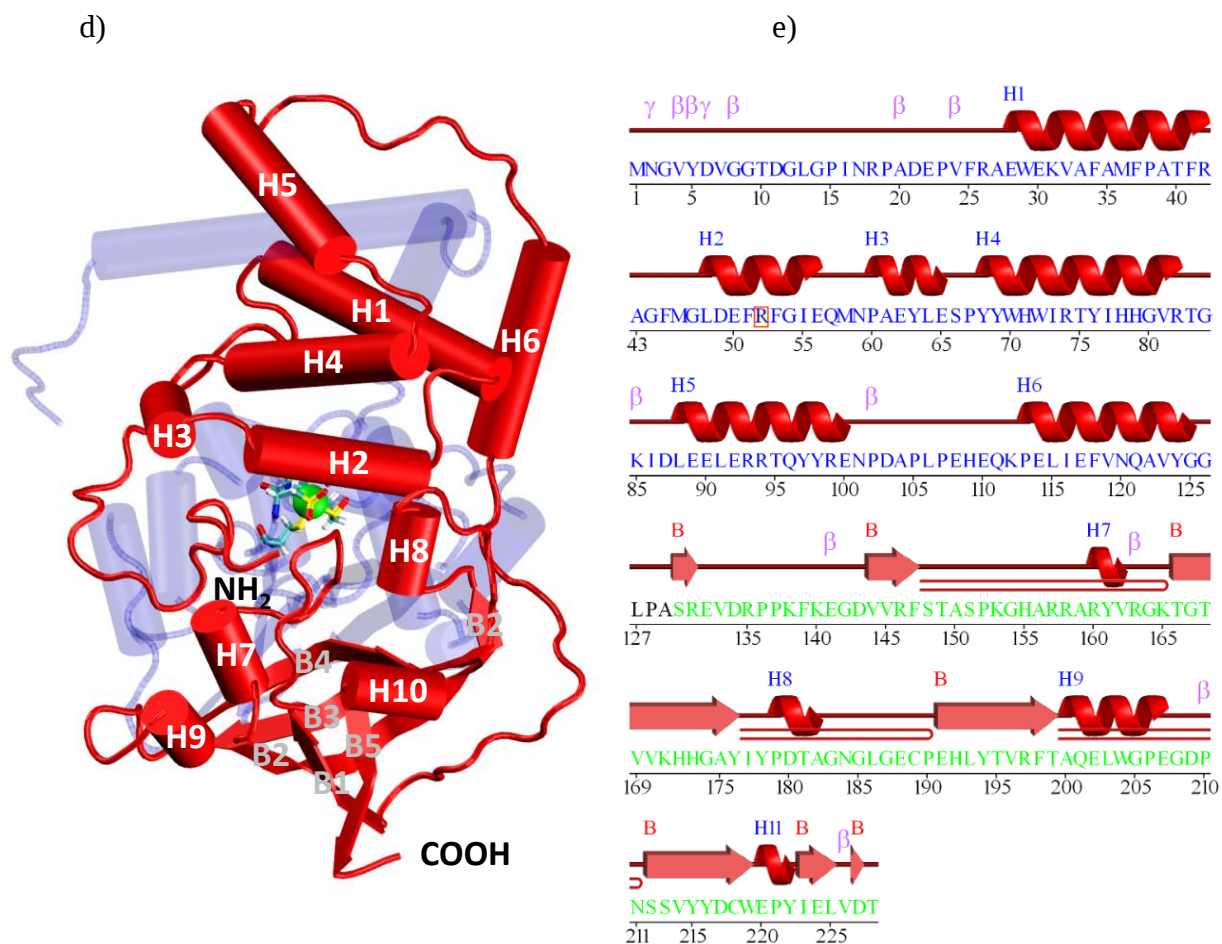


b)



c)

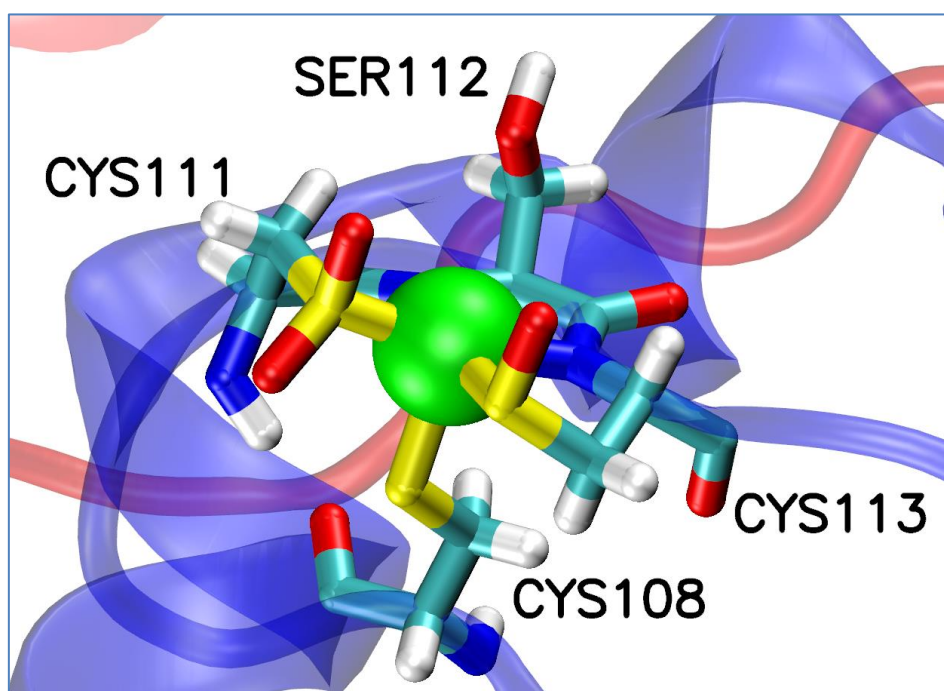




Rysunek 1.2 Struktura przestrzenna hydratazy nitrylowej, według struktury 1IRE a) tetramer - struktura trzeciorzędowa (b, c) struktura drugorzędowa i pierwszorzędowa dla podjednostki α , wraz ze stosowanymi w rozprawie oznaczeniami α helis i β kartek (d, e) struktura drugorzędowa i pierwszorzędowa dla podjednostki β formy kobaltowej (źródło: PDBsum [57], VMD [58], kod PDB 1IRE).

Miyanaga i in. w 2001 rozwiązali strukturę L-NHazy z *P. thermophila* JCM 3095 [59]. Ten enzym charakteryzuje się wysoką aktywnością, wysokim optimum temperaturowym oraz wysoką tolerancją na gromadzący się akrylamid. Enzym ma strukturę heterotetrameru ($\alpha\beta$)₂. Technika ICP-OES (*inductive coupled plasma optical emission spectroscopy*), wykazała, że na jeden taki heterodimer przypada jeden jon kobaltu, ulokowany w podjednostce α . W centrum aktywnym białka, ligandami dla kobaltu są atomy siarki cysteiny α Cys108, α Cys111, α Cys113 oraz atomy azotu α Ser112, α Cys113 i tlen z atomu wody. Dwa atomy siarki α Cys111, α Cys113 oraz dwa atomy azotu α Ser112, α Cys113 i jon kobaltu są rozmieszczone na jednej płaszczyźnie. Cysteiny 111 i 113, podobnie jak w Fe-NHazie, są posttranslacyjnie zmodyfikowane do kwasu cysteino-sulfinowego oraz cysteino-sulfenowego. Trzy atomy tlenu O δ 1 α Cys111-SO₂H, O δ 1 α Cys113-SOH oraz O γ α Ser112

biorą udział formowaniu kleszczy stabilizujących prawdopodobnie ligand. α Cys111-SO $_2^-$ oraz α Cys113-SO $^-$ tworzą wiązania wodorowe z β Arg 52 oraz β Arg157 [55, 59]. Centrum aktywne pokazano na Rysunek 1.3.



Rysunek 1.3 Centrum aktywne NHazy kobaltowej (1IRE), jon kobaltu Co^{3+} zaznaczono na zielono. Na rysunku prezentowane są tylko aminokwasy pierwszej sfery koordynacyjnej.

1.4 Aktywatory NHaz

NHaza ma bardzo złożoną budowę, zatem proces zwijania tego białka nie jest prosty. Podczas badań NHaz odkryto zestaw białek, które nazwano aktywatorami. Pomagają one NHazie w inkorporacji jonów metalu [6]. NHaza typu żelazowego z *Rhodococcus* sp. N-771, która ulegała ekspresji u *Escherichia coli*, była w stanie wstawiać jony kobaltu, lecz wykazywała bardzo niską aktywność. Aktywność ta wzrosła kiedy dodano czynnik utleniający [60]. Miyanaga i in. (2004) spróbowali umieścić żelazowe centrum aktywne w NHazie kobaltowej *P. thermophila*. Cysteiny w centrum aktywnym tego enzymu nie były utlenione. Charakteryzowała go wyjątkowo niska aktywność. Autorzy założyli, że taki wynik może być spowodowany brakiem aktywatorów charakterystycznych dla żelazowego centrum aktywnego [55]. Aktywatory mogą być odpowiedzialne za umiejscowienie jonu metalu w centrum aktywnym, a także utlenienie cystein. Wykazano, że aktywator L-NHazy z *R. rhodochrous* J1 jest zaangażowany w oksydację cystein miejsca aktywnego *in vitro*. Ponadto, elastyczna C-końcowa domena aktywatora kobaltowego, P14K z *P. putida* NRRL-18668 posiada ładunek dodatni i może pomóc apoNHazie pokonać bariery energetyczne związane z wprowadzeniem kobaltu [6].

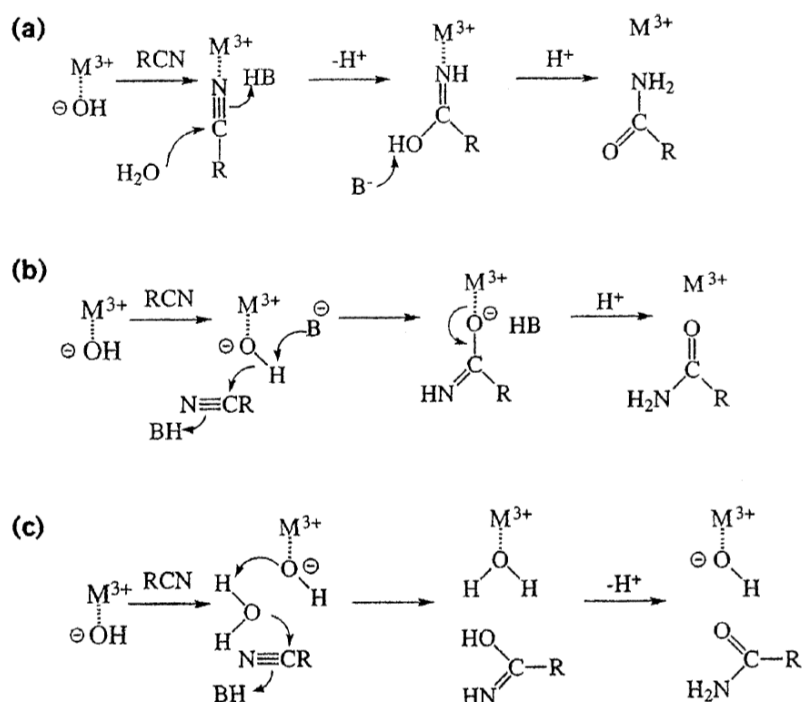
Problem mechanizmu włączania metalu do enzymu jest otwarty. Jedną z hipotez dotyczy pobierania kobaltu przez *R. rhodochrous* J1 [14]. Zbadano białko poprzez użycie DLS (*Dynamic Light Scattering*). Odkryto formowanie się wielkich kompleksów pośrednich. Podjednostka α z tego kompleksu zamieniała się prawdopodobnie z podjednostką wolną od kobaltu z apo-NHazy. Wymiana domen wydaje się być zależna od formowania się mostków solnych pomiędzy zachowanymi resztami argininy β Arg52 i β Arg157 oraz α Cys112 i α Cys114 [35, 51, 61]. Co więcej, aktywator ten posiada także funkcję redoks. Po włączeniu kobaltu w miejscu aktywnym dochodzi do utlenienia cystein [6].

Metalochaperony dostarczają jony metali do białek. Rola metalochaperonów NHazy żelazowej została wyjaśniona. Porównywanie sekwencji NHaz żelazowych wskazuje, że jest tam konserwowany bogaty w cysteinę motyw CXCC. Motyw ten działa jako miejsce wiążące jon metalu także w innych metalochaperonach [6, 62]. Białko aktywatorowe z bakterii *Rhodococcus equi* TG328-2 posiada motywy GTPazowe i wykazuje aktywność GTPazową. [6]. Dyskusja ta pokazuje, że dokładniejsze zbadanie NHaz ma duże znaczenie w zrozumieniu podstawowych procesów biologicznych prowadzących do wytwarzania katalizatorów enzymatycznych u bakterii. Aktywatory mogą być zaangażowane w oksydację cystein i inkorporację kobaltu do centrum aktywnego [6]. Metalochaperony NHazy kobaltowej mają mniejszą masę cząsteczkową niż żelazowej. Zostało zaproponowane, że w NHazie występuje mechanizm wymiany podjednostek, jednak mechanizm ten został podważony poprzez badanie, gdzie występowała NHaza z podjednostkami połączonymi linkerem. Zarówno NHaza WT jak i mutant był aktywowany przez aktywator [18].

1.5 Mechanizm katalizy w NHazie

NHaza to enzym, który katalizuje reakcję, w której z nitrylu powstaje amid. W niniejszym projekcie doktorskim próbowano znaleźć przyczyny utraty aktywności enzymu w miarę wzrostu stężenia produktu. Mechanizm katalityczny jest kluczowym czynnikiem warunkującym aktywność enzymu. Jak do tej pory zaproponowano kilka możliwych mechanizmów przebiegu reakcji. Mechanizmy te zostały opracowane na podstawie danych z krystalografii rentgenowskiej, danych kinetycznych, spektroskopowych, modelowania teoretycznego oraz modeli syntetycznych [63-67]. Niestety, naukowcy nie są zgodni, w jaki sposób przebiega katalizowana przez NHazę konwersja nitryli do amidów [6].

Początkowo zaproponowano następujące trzy mechanizmy działania NHazy (Rysunek 1.4):



Rysunek 1.4 Proponowane mechanizmy katalityczne NHazy, rysunek z [35]. a) Hydroliza nitrilu przez cząsteczkę wody (*inner sphere mechanism*); b) Atak grupy hydroksylowej na nityrl (*outer sphere mechanism*); c) Grupa hydroksylowa powoduje deprotonację wody i nowo powstała grupa OH⁻ atakuje nityrl (*second outer sphere mechanism*).

1) Mechanizm pierwszej powłoki koordynacyjnej (*inner sphere mechanism*). Grupa OH⁻ jest początkowo przyłączana do dodatnio naładowanego jonu metalu. Nityrl wypiera tę grupę. Powstaje związek pośredni iminol. Wiązanie potrójne C≡N zamienia się na podwójne i przyłącza się jeden wodór do azotu. Następnie związek przeorganizowuje się do amidu, który zostaje uwolniony. Mechanizm ten został zaproponowany przez Hopmann i in. [68] oraz zbadany przez Huanga i in. na podstawie spektroskopii paramagnetycznego rezonansu elektronowego i widm ramanowskich, wskazujących ulokowanie się inhibitorów i analogów substratu w pobliżu jonu żelaza [34, 35]. Jon metalu działa w tym mechanizmie jako kwas Lewisa i aktywuje substrat do ataku nukleofilowego przez wodę [36]. Silaghi-Dumitrescu także wymienia trzy możliwe mechanizmy działania NHazy [34, 39, 69, 70]. Pierwszy z nich zakłada, że nityrl wiąże się do metalu, co powoduje jego aktywację. Potem dochodzi do ataku nukleofilowego przez rozpuszczalnik [42, 71] (Rysunek 1.4 a)).

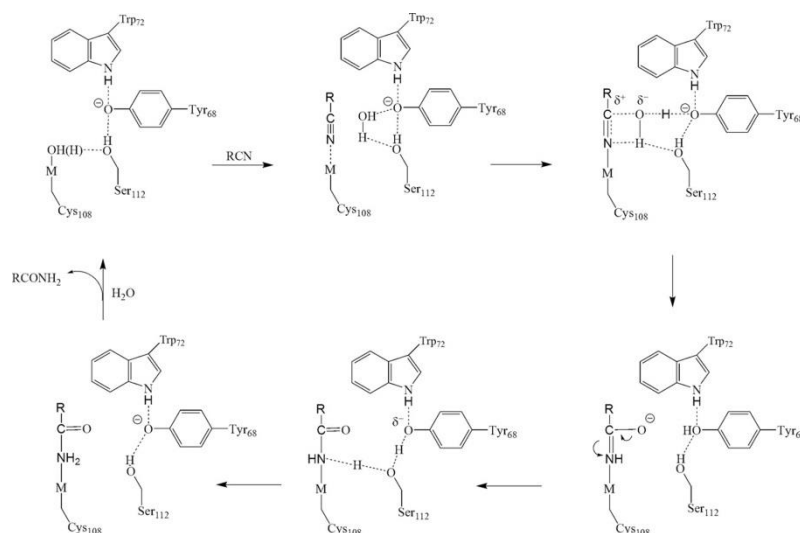
2) Mechanizm drugiej powłoki koordynacyjnej (*outer sphere mechanism*) zakłada atak nukleofilowy grupy OH⁻ (z ładunkiem ujemnym), skoordynowanej jako szósty ligand przez jon metalu, na nityrl zagnieżdżony w centrum aktywnym. Reakcja prowadzi do przejściowego powstania iminolanu, który jest połączony poprzez tlen z metalem, a następnie związek ten przeorganizowuje się do amidu. Zostało to zaproponowane przez Huanga

i in. na podstawie analogii do hydrolizy amin przez deaminazę cytydynową [34, 36, 45, 70]. W wariantcie alternatywnym nukleofilem jest $\alpha\text{Cys114-SO}^-$ [36]. Część cząsteczki solwenta przyłączona do metalu działa jako nukleofil (2A) lub zasada (2B) [42, 71] (Rysunek 1.4 b)).

3) Alternatywny mechanizm zewnętrznej sfery (*second outer sphere mechanism*). W trzecim postulowanym mechanizmie, grupa OH^- powoduje deprotonację swobodnej cząsteczki wody, która znajduje się w pobliżu centrum aktywnego. Grupa OH przyłącza się do węgla amidu i powoduje pęknięcie jednego wiązania pomiędzy węglem i azotem. Następnie wodór przechodzi z grupy OH do azotu [34, 70]. Mechanizm (3) wskazuje na atak nukleofilowy przez atom tlenu utlenionej cysteiny [42, 71] (Rysunek 1.4 c)).

Hopmann i in. (2007) badali mechanizm pierwszej powłoki koordynacyjnej. Substrat może być aktywowany przez koordynację przez żelazo w centrum aktywnym. W tym mechanizmie, żelazo jest kwasem Lewisa (odbiera ładunek ujemny) i aktywuje atom węgla nitylu (może zwiększyć jego elektrofilowość). Dochodzi do ataku nukleofilowego przez wodę. Jednakże wyniki obliczeń wskazują, że żelazo jest słabym kwasem Lewisa i mechanizm ten jest mało prawdopodobny [33].

Mitra i Holz zaproponowali, że dla reakcji istotna jest triada katalityczna aminokwasów, zaś zaangażowane są: αSer112 , βTrp72 , βTyr68 (zabiera protony) i αCys108 (numeracja jak w NHazie z Pt) [43]. Zaproponowany mechanizm jest przedstawiony na Rysunek 1.5:



Rysunek 1.5 Mechanizm działania NHazy zaproponowany przez Mitrę i Holtza w pracy [43].

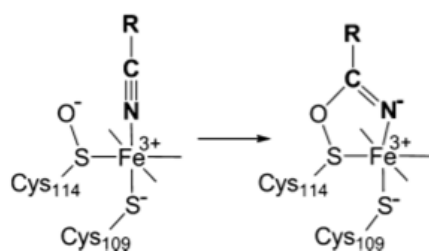
Azot z grupy nitylowej wypiera wodę ze sfery koordynacyjnej metalu M i wiąże się z nim właśnie. Do zajścia reakcji potrzeba jest obecność wody w centrum aktywnym i obecność zasady w pobliżu. W grę wchodzi aminokwas z silnie zachowanego motywu

YYE(H/K)(W/Y) (aminokwasy 68–72 według numeracji z PtNHazy). Autorzy postulują, że triadę tworzą: α Ser112, β Tyr68 oraz β Trp72 [43].

Hopmann i in. (2008) badali czy tyrozyna z drugiej powłoki może być zasadą katalityczną. Zastosowali do obliczeń DFT funkcjonal B3LYP zaimplementowany w programie Gaussian. W tym mechanizmie, substrat jest koordynowany do centrum aktywnego na szóstym miejscu koordynacyjnym. Na pierwszej powłoce koordynacyjnej występują α Ser112, α Cys113, α Cys108, α Cys111. Tyrozyna z drugiej powłoki może być zasadą katalityczną (β Tyr72 z *R. erythropolis* lub β Tyr68 z *P. thermophila*). Na drugiej powłoce są α Cys111-SO₂⁻ i α Cys113-SO⁻. W PtNHazie może być ona stabilizowana przez wiązania z β Trp72 i α Ser112. β Tyr68/ β Tyr72 może zabierać proton z nukleofilowej wody aktywując ją do ataku na substrat. Woda atakuje substrat i dochodzi do transferu protonu z wody na Tyr68/ β Tyr72 [37]. Dokonano mutacji β Tyr68Thr/ β Trp72Tyr. NHaza zachowała aktywność, jednak zmieniła się jej regioselektywność [15]. Wynik ten stawia pod znakiem zapytania istotność wspomnianych aminokwasów dla katalizy.

W następnej publikacji Hopmann i in. badali mechanizm drugiej powłoki koordynacyjnej. W tym mechanizmie na szóstym miejscu koordynacyjnym jest grupa hydroksylowa i to ona atakuje nityl, który nie zbliża się bezpośrednio do metalu. Woda może przekazywać proton na α Cys114-SO⁻, który działa jako zasada. Jon hydroksylowy atakuje nityl. Dochodzi do transferu protonu z α Cys-114SOH na azot nitylu. Dochodzi do przyłączenia się tlenu do węgla nitylu. Następnie produkt pośredni przekształca się w amid. W alternatywnej wersji nukleofilem jest α Cys114-SO⁻. Woda działa jako kwas, donor protonu dla nitylu. Bariery energetyczne obydwu procesów były bardzo podobne oraz na poziomie mechanizmu pierwszej powłoki [36]. Ligandy pierwszej sfery są konserwowane i wymagane do aktywności enzymu. Konserwowane są także dwie argininy, które tworzą z nimi wiązanie [36].

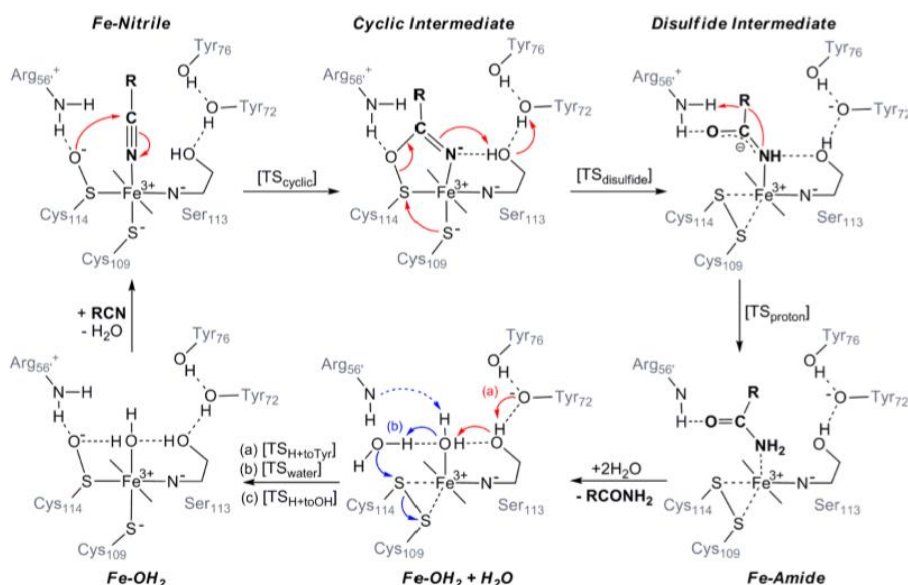
Hopmann i inni na podstawie metod obliczeniowych zaproponowali jeszcze inny mechanizm reakcji, gdzie powstaje cykliczny związek pośredni. α Cys109 tnie cykliczny związek pośredni (Rysunek 1.6). Tworzy się wiązanie dwusiarczkowe pomiędzy α Cys109 i α Cys114. Dochodzi do transferu protonu z β Tyr72 przez α Ser113 do substratu. Tlen z α Cys114 jest inkorporowany do produktu amidowego. Azot produktu zabiera proton z β Arg56. Następnie centrum aktywne jest regenerowane przez transfer protonu do α Tyr72, atak wody na wiązanie dwusiarczkowe i transfer protonu do β Arg56 [72].



Rysunek 1.6 Związek cykliczny dyskutowany w mechanizmie proponowanym przez Hopmann i in. w 2014 roku. Rysunek z [38].

Kayanuma i in. z użyciem metody DFT sprawdzili cztery ścieżki reakcji i ocenili, że najbardziej prawdopodobna z nich to ta, w której powstaje cykliczny związek pośredni. $\alpha\text{Cys114-SO}^-$ atakuje substrat. Produkt może z łatwością tautomeryzować do amidu [42].

Grupa Shigety badała wstępne kroki reakcji przeprowadzanej przez NHazę żelazową z zastosowaniem techniki QM/MM [44]. Zaproponowano prawdopodobny mechanizm, w którym dochodzi do bezpośredniego ataku na substrat przez $\alpha\text{Cys114-SO}^-$ [73]. Nowsze publikacje potwierdziły, że zmodyfikowane posttranslacyjnie reszty cystein działają jako nukleofil, który pierwszy atakuje nitryle [74]. Według autorów tworzy się cykliczny związek pośredni. Następuje pośredni atak cząsteczki wody na atom siarki αCys114 , który skutkuje powstaniem imidu [73]. Kayanuma i in. badali NHazę z użyciem metod QM/MM, dokładnie DFT B3LYP/Amber99. Zaproponowali, że reakcja przebiega poprzez formowanie się kwasu imidowego przez bezpośredni atak wody na siarkę αCys114 . Powstaje wiązanie pomiędzy αCys114 i αCys109 . Według autorów, dochodzi następnie do pęknięcia wiązania dwusiarczkowego pomiędzy αCys109 i αCys114 i utworzenia wiązania pomiędzy siarką a tlenem. Następnie dochodzi do izomeryzacji kwasu imidowego do amidu katalizowanej przez grupę sulfenową αCys114 . βTyr72 jest deprotonowana a $\alpha\text{Cys-114SO}^-$ protonowana i miały one zostać przywrócone do stanu wyjściowego poprzez transfer protonu na cząsteczkę wody, a dalej na αSer113 i βTyr72 . βArg56 odgrywała istotną rolę w formowaniu się disiarczkowego związku pośredniego [73].



Rysunek 1.7 Proponowany mechanizm reakcji hydratacji z powstaniem cyklicznego związku pośredniego, rys. z [72].

Jak wspomniano, aktualnie nie ma konsensusu co do mechanizmu katalitycznego, zob. np. prace Chenga i in. z 2020 roku [6].

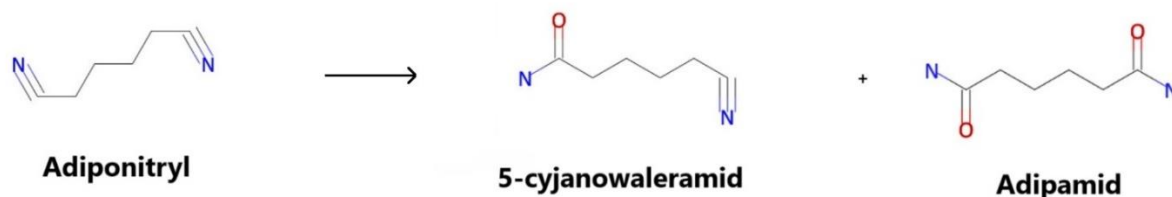
1.6 Aktywność NHazy w obecności produktu

Jednym z problemów, jakie badano w ramach doktoratu jest próba wyjaśnienia molekularnych podstaw spadku aktywności NHazy w roztworach o rosnącym stężeniu produktu - akrylamidu. Roztwory niewodne budzą coraz większe zainteresowanie biotechnologów, ich wpływ na białka badany jest metodami modelowania komputerowego coraz częściej [75]. Przegląd takich badań zawarty jest w Rozdziale 4. Obecnie metodami fizykochemicznymi bada się denaturację białek w roztworach zawierających substancje organiczne czy sole. Rozfałdowywanie (inaczej rozplatanie) i fałdowanie białka badano m.in. metodą HDX (wymiany H i D) sprzężoną ze spektrometrią mas. Stwierdzono, że zmiany strukturalne białka mogą zachodzić w sposób zdelokalizowany, w wielu miejscach [76]. Przykładowo, w publikacji [77] badacze sprawdzali profil denaturacji białka DLC8 metodą spektroskopii fluorescencyjnej oraz spektroskopii CD (*circular dichroism*). Okazało się, że ścieżki denaturacji danego białka w dwóch różnych rozpuszczalnikach, chlorowodoru guanidyny i moczniku, były odmienne. Efektywność rozplatania była też różna, co sugeruje, że rodzaj, rozmiar i rodzaj jonów rozpuszczalnika mają kluczowe znaczenie w procesie denaturacji. Analiza metodą CD sugerowała powstanie odmiennych stanów pośrednich podczas denaturacji. Według autorów tego artykułu, rozplatanie białka zaczyna się w konkretnym regionie, od zerwania wiązania pomiędzy dwoma aminokwasami. W takim miejscu wydatek energetyczny na rozfałdowanie jest najniższy. Prawdopodobnie są one także

najbardziej ruchliwe. Następnie dochodzi do utraty uporządkowanej struktury przez kolejne obszary. Współczynnik R_2 (*N transverse relaxation rates*) wskazuje różnice w ułożeniu konkretnej reszty aminokwasowej w białku. W cytowanym artykule, badacze donieśli o wykryciu regionu niestabilnego na C końcu pierwszej α -helisy białka. Fragmenty z aminokwasami o wysokich wartościach R_2 mogły być zidentyfikowane jako potencjalne punkty rozfałdowywania białka. Co zaskakujące, często aminokwasy charakteryzujące się dużą ruchliwością były położone w pobliżu fragmentów wyjątkowo stabilnych. Substancje denaturujące powodują prawdopodobnie stopniowe usuwanie kontaktów stabilizujących. Identyfikacja takich rejonów w NMRze pozwoliłaby na zaproponowanie nowych wariantów (mutacji) o zwiększonej termostabilności. W przytoczonym artykule [77] badacze obliczyli także parametr SASA, czyli *solvent accessible surface area*, opisujący jak mocno powierzchnia białka jest ekspozycja do rozpuszczalnika oraz inne indeksy, które wskazują, czy helisy są hydrofilowe i dostępne dla cząsteczek substancji denaturujących czy też hydrofobowe. Badanie identyfikowało pojawienia się nawet niewielkich odstępstw od stanu natywnego białka i rozluźnienie helisy [77]. Niestety tego typu eksperymenty są czasochłonne i kosztowne. Symulacje metodą dynamiki molekularnej wykorzystywane w niniejszej rozprawie umożliwiają obserwowanie zmian strukturalnych w białku wywołanych obecnością substancji denaturujących albo prostych molekuł organicznych. Jest to metoda tania i nie wymagająca fizycznego wyizolowania biocząsteczek. W ramach modelowania można też określać rejonu białka najbardziej podatne na rozfałdowanie.

1.7 Regioselektywność NHazy

Regioselektywność polega na tym, że w reakcji powstaje tylko jeden z możliwych do wytworzenia izomerów strukturalnych. Przykładem korzystnej regioselektywności NHazy jest produkcja 5-cyjanowaleramidu (5-CVAM) z adiponitrylu (ADN) (Rysunek 1.8). Adiponitryl posiada dwie grupy nitrylowe.

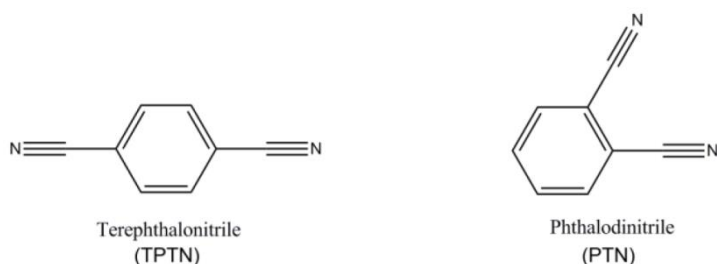


Rysunek 1.8 Reakcja katalizowana przez NHazę z [78].

Enzym produkowany przez *P. chlororaphis* B23 w większości przypadków konwertuje tylko jedną z tych grup. W konsekwencji dochodzi do powstania 5-CVAM, a ilość powstałych produktów ubocznych jest mała [46]. Dodatkowo wiadomo, że NHaza z *Rhodococcus aetherivorans* ZJB1208 ma zdolność do regioselektywnej biotransformacji 1-cyjanoheksano-acetonitrylu do 1-cyjanoheksanoacetamidu w ilości 204.2 (g produktu/g katalizatora). Produkt tej reakcji to użyteczny prekursor do produkcji gabapentyny [79].

Początkowo nie było wiedzy na temat mechanizmu, który pozwala NHazie na selektywne przekształcanie jednej grupy nitrylowej w grupę amidową. Zhou i in. (w tym dr LP) odkryli różne wskazówki prowadzące do rozwiązania tej zagadki. Dzięki porównywaniu sekwencji zauważono, że β Phe37, reszta występująca w tunelu, przez który przedostaje się substrat do centrum katalitycznego, może być kluczowym regulatorem regioselektywności. Jednak mutacje tego aminokwasu nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Zamiast tego zmutowano β Leu48, β Phe51, β Tyr68, i β Trp72. Poprzez mutagenezę ukierunkowaną dokonano odwrócenia regioselektywności enzymu w kierunku różnych α,ω -dinitryli. NHaza typu dzikiego (WT) produkowała odpowiednio głównie adipamid (ADAM) oraz malonamid (MAAM), należące do grupy diamidów, z adiponitrylu (ADAM). Mutant natomiast wytwarzał, odpowiednio 5-cyjanowaleramid (5-CVAM) oraz cyjanoacetamid (CAAM), z jedną grupą amidową i jedną grupą nitrylową. W przypadku nitryli aromatycznych, enzym WT katalizował reakcję powstania tereftalamidu z tereftalonitrylu (TPTN) i ftalamidu z ftalonitrylu (PTN), natomiast mutant, powodował

pojawienie się, odpowiednio, 4-cyjanobenzamidu (4-CBAM) i 2-cyjanobenzamidu (2-CBAM) [15]. Część teoretyczna badania została przeprowadzona przez zespół z Katedry Biofizyki WFAiIS UMK. Wyniki zgodne z doświadczeniami stanowią potwierdzenie tego, że symulacje komputerowe mogą przewidzieć faktyczny wpływ struktury przestrzennej katalizatora (enzymu) na reakcję. Modelowanie wpływu aminokwasów na zachowanie substratu w centrum aktywnym enzymu jest niezwykle istotne.



Rysunek 1.9 Tereftalonitryl i ftalonitryl.

Podjęty projekt doktorski może wesprzeć biotechnologów w poszukiwaniu „maszyn molekularnych” wykorzystywanych do produkcji związków potrzebnych w przemyśle i medycynie [35]. Przedstawione odkrycia wskazują, że reszty formujące kanał transportujący substrat regulują regioselektywność NHazy w kierunku substratów dinitrylowych. Badania te, wciąż dość wstępne, mogą rzucić światło na przyszłe modyfikacje regioselektywności NHazy w kierunku substratów z liczbą grup nitrylowych większą niż dwa [6].

1.8 Stereoselektywność NHazy

Jedną z najbardziej widocznych cech biotransformacji jest stereoselektywność. Reakcja stereoselektywna to taka reakcja, podczas której z substratu powstaje jeden z dwóch produktów będących stereoizomerami. Izomery optyczne (np. R i S) to związki, które stanowią swoje nienakładalne odbicia lustrzane. NHazy działają jako katalizatory enancjoselektywne względem niektórych związków [6]. Kilka NHaz stereoselektywnych zostało wyizolowanych z *Agrobacterium*, *Moraxella*, *Serratia*, *Rhodococcus*, oraz *Pseudomonas* [80]. Pawar i Yadav (2014) dokonali usieciowania NHazy z *R. rhodochrous* ATCC BAA-870. Imobilizowana NHaza wykazywała 81% nadmiaru enancjomerycznego w kierunku R-mandelonitrylu [44]. Pomimo występowania stereoselektywnych NHaz w naturze, sztucznie konstruowane NHazy z wyższą stereoselektywnością są pożądane, ale trudne do zaprojektowania i otrzymania. Molekularny mechanizm stereoselektywności NHazy nie jest do końca wyjaśniony.

Dane z krystalografii rentgenowskiej oraz MD wykazały, że niektóre aminokwasy formujące kanał mogą wpływać na stereoselektywność NHazy. Ostatnio, Cheng i in. doniesli o nowym semi-racjonalnym podejściu do stereoselektywności NHaz z zastosowaniem

do przekształcania racemicznego mandelonitrylu [16]. Przez połączenie dokowania molekularnego, obliczeń zachowania substratu w tunelu w enzymie oraz symulacji SMD autorzy zidentyfikowali resztę β Phe37 z bakterii *R. rhodochrous* J1 jako ważną w tym procesie. Białko Phe37His po mutagenezie ukierunkowanej wykazywało 96% nadmiaru enancjomerycznego w kierunku S-mandelamidu. Mechanizm S-selektywności został uzasadniony przez modelowanie [16].

Dotychczasowe dane z modelowania wskazują, że wielkie i sztywne substraty stanowiące barierę steryczną są trudne do umieszczenia w centrum aktywnym enzymu lub w kanale do niego prowadzącym. Także, elektrofilowość nitryli może zwalniać tempo reakcji [81]. Wyniki te wskazują na dużą wagę i potrzebę obliczenia profili energii swobodnej dla substratów konieczną do zrozumienia selektywności enzymów. Poprzez odpowiednie podejście semi-racjonalne można uzyskać warianty NHazy ze świetną regio- oraz stereo-selektywnością [15, 16].

Podczas badania NHazy z *Rhodococcus* sp. AJ270 zauważono, że przy braku przeszkody sterycznej pomiędzy substratem i enzymem wiązanie substratów nitrylowych do miejsca aktywnego jest łatwe i szybkie. Skutkuje to wydajną reakcją z niską selektywnością izomerów optycznych. Dlatego najbardziej „sterycznie dopasowane” nitryle poddawane są utlenianiu w formie obydwu enancjomerów. Przykładowo, trans-2-arylcyklopropankar-bonitryle mogą dopasować się komfortowo do rozległego miejsca aktywnego NHazy. Budowa nitryli wielopierścieniowych, które są zbyt duże w porównaniu do rozmiaru centrum aktywnego NHazy może powodować, że konwertowany jest tylko jeden enancjomer. Przykładowo, dodatkowa grupa cis-arylowa, która stanowi ogromną przeszkodę steryczną w niektórych związkach nie może być swobodnie wiązana przez NHazę. Ze względu na to, katalizowana reakcja jest powolna, ale za to niezwykle selektywna [82].

Rozdział 2. Cel prezentowanych badań. Układ pracy.

Celem niniejszej rozprawy było lepsze poznanie struktury i dynamiki hydratazy nitrylowej przy pomocy metod komputerowego modelowania dynamiki. Metody komputerowe mają ustabilizowaną pozycję w biofizyce. Dzięki realistycznym potencjałom klasycznym można skutecznie poznawać rejony białek odznaczające się dużą ruchliwością oraz te, które są stosunkowo stabilne. Krajobraz konformacyjny białek jest złożony i pełne poznanie szczegółów wymaga symulacji o czasach znacznie przekraczających moce dostępne dla typowej grupy badawczej. Jednak nawet ograniczone czasowe modelowanie, przeprowadzone w kontrolowanych warunkach, pozwala wychwycić te cechy białka, w tym przypadku NHazy, które mogą mieć dużą wartość przy projektowaniu nowych wariantów o lepszych cechach. W tej rozprawie badano trzy problemy:

- A. Jak podnieść aktywność katalityczną NHazy? (Rozdział 5)
- B. Co decyduje o termostabilności NHazy? Jak ją poprawić? (Rozdział 6)
- C. Dlaczego NHaza stosowana w procesach przemysłowych traci swoją aktywność, gdy rośnie stężenie produktów (czyli amidów) w roztworze? (Rozdział 7).

Poszukiwanie odpowiedzi na te problemy wyniknęły z praktyki biotechnologicznej. Nasi partnerzy naukowcy w Chinach prowadzą badania doświadczalne nad NHazą w ścisłej kooperacji z firmami produkcyjnymi.

W ramach analizy Problemu A badano dynamikę NHazy w różnych wariantach obejmujących wybrane mutacje punktowe (Rozdział 5).

W celu poznania termostabilności NHazy (Problem B) przeprowadzano klasyczne symulacje dla mutantów białka z linkerami w różnych temperaturach (Rozdział 6).

W ramach analizy Problemu C wykonano obszerne symulacje dynamiki NHazy w szeregu roztworów imitujących zmienne środowisko reakcji katalitycznej – w roztworach zmiennym stężeniu nitryli i amidów (Rozdział 7). Testowano szereg hipotez strukturalnych, które mogłyby wyjaśnić obserwacje doświadczalne. Śledzono dynamikę kanałów w NHazie, głównie przy pomocy programu CAVER [83]. Rozważano 4 hipotezy fizykochemiczne:

- (a) Przyczyną zaniku aktywności jest osiągnięcie stanu równowagi reakcji katalitycznej (prawo działania mas).
- (b) Przyczyną jest zmiana struktury centrum aktywnego indukowana roztworem.
- (c) Rosnące stężenie akrylamidu powoduje „zatkanie” kanałów transportowych i/lub centrum katalitycznego.
- (d) Akrylamid indukuje denaturację NHazy.

Autorka doskonale zdaje sobie sprawę z tego, że i liczba przeprowadzonych symulacji (kilkadziesiąt) i ich skala (100-500 ns) dają wciąż bardzo małą statystykę, jednak podjęcie tego typu pilotowych i w pewnym stopniu pionierskich badań jest niezbędne, by dać wskazówki do bardziej ukierunkowanych symulacji, angażujących już poważniejsze moce obliczeniowe.

Metody i protokoły stosowane w obliczeniach są dobrze znane i standardowe. Przedstawiono je zwięźle w Rozdziale 3.

Dodatkowym celem projektu była próba systematycznego zebrania wiedzy literaturowej na temat modelowania zachowania białek o znaczeniu biotechnologicznym w rozpuszczalnikach niewodnych (złożonych z mieszanin cieczy). Esej na ten temat zawiera Rozdział 4.

Rozdział 3. Metody modelowania i opis protokołów obliczeń.

Rozdział 3 zawiera rudymentarny opis metod obliczeniowych stosowanych w rozprawie, opis protokołów użytych w badaniu poszczególnych problemów oraz sekcję wyjaśniającą źródła pakietów/serwerów, które były przydatne w analizie trajektorii i wyników modelowania.

3.1 Dynamika molekularna – opis metody

Białka są stosunkowo prostymi biopolimerami. Składają się z ok. 20 typów standardowych aminokwasów połączonych wiązaniami peptydowymi. Aminokwasy zawierają atomy zaledwie kilku pierwiastków. Oddziaływania międzyatomowe (czy ogólnie związane z występowaniem białek w systemach) powinny być według reguł fizyki opisywane przy pomocy metod mechaniki kwantowej. Niestety, liczba atomów (i elektronów), zwykle sięgająca kilku tysięcy w typowym białku, uniemożliwia rozwiązywanie równania Schrödingera i poszukiwania funkcji falowej w efektywny sposób. Stąd pojawił się pomysł, rozwinięty szczególnie przez Lenora Lifsona w latach 70. ubiegłego wieku, by białka opisywać przy pomocy mechaniki klasycznej, badając ich konformacje i ruch przy pomocy modeli atomistycznych lub gruboziarnistych.

Aminokwasy modeluje się jako zbiór sztywnych obiektów (sfery lub punkty materialne). Oddziaływania opisywane są wówczas przy pomocy potencjałów klasycznych, wyrażonych odpowiednimi funkcjami analitycznymi współrzędnych (kartezjańskich lub wewnętrznych). Elektronów w klasycznym modelowaniu nie uwzględnia się jawnie. Oczywiście białka pełniąc swoje funkcje w organizmach przyjmują różne stany konformacyjne. Te stany wynikają z interakcji z wodą, jonami, oraz innymi białkami i makromolekułami środowiska. Struktury statyczne dają nam tylko część informacji o konkretnym procesie czy układzie biologicznym [84]. Konieczne jest modelowanie ruchu, czyli badanie dynamiki molekularnej białek (metoda MD).

Ruch modeli atomów (tutaj punktów materialnych) w metodzie MD jest opisywany zbiorem równań Newtona – równanie (3.1) (lub Langevina - równanie 3.2) – jest ich tyle ile atomów zawiera model białka plus rozpuszczalnika.

$$\mathbf{F} = m\mathbf{a} = m \frac{d^2\mathbf{r}}{dt^2} \quad (3.1)$$

Gdzie:

$\mathbf{F}$ – oznacza siłę działającą na atom i , $\mathbf{a}$ – przyspieszenie $\mathbf{r}$ – wektor położenia atomu, t – czas.

$$m \frac{d^2 x}{dt^2} = -\frac{\partial V}{\partial X} - \gamma \frac{dx}{dt} \quad (3.2)$$

m – masa, x – położenie, t – czas, v – prędkość, Γ – współczynnik tarcia

Siłę F_i łatwo oblicza się z relacji 3.3:

$$F = -\nabla U(R) \quad (3.3)$$

U – potencjał (energia potencjalna)

Ogólny wzór na klasyczne pole siłowe stosowane w metodach typu mechanika molekularna (problemy statyczne) czy w metodzie dynamiki molekularnej, przedstawiono na Rysunek 3.1:

$$\begin{aligned}
 U(R) = & \sum_{bonds} k_r (r - r_{eq})^2 & \text{bond} & \quad \text{[diagram: two spheres connected by a spring]} \\
 & + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_{eq})^2 & \text{angle} & \quad \text{[diagram: three spheres with an angle between bonds]} \\
 & + \sum_{dihedrals} k_\phi (1 + \cos[n\phi - \gamma]) & \text{dihedral} & \quad \text{[diagram: four spheres in a chain with a dihedral angle]} \\
 & + \sum_{impropers} k_\omega (\omega - \omega_{eq})^2 & \text{improper} & \quad \text{[diagram: four spheres forming a triangle with a central atom]} \\
 & + \sum_{i < j}^{atoms} \mathcal{E}_{ij} \left[\left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_m}{r_{ij}} \right)^6 \right] & \text{van der Waals} & \quad \text{[diagram: two spheres with a double-headed arrow]} \\
 & + \sum_{i < j}^{atoms} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} & \text{electrostatic} & \quad \text{[diagram: two spheres with opposite charges and a double-headed arrow]}
 \end{aligned}$$

Rysunek 3.1 Ogólny wzór opisujący energię potencjalną białka $U(R)$ w zależności od konformacji R . Poszczególne addytywne wyrazy opisują oddziaływania wiążące i niewiążące (van der Waals, elektrostatyczne). Pochodne z $U(R)$ pozwalają wyznaczyć siły działające na poszczególne atomy. Symbole: r – długość wiązania, Θ – kąt między wiązaniami, ϕ – kąt torsyjny, ω – kąt niewłaściwy, k_θ , k_ϕ , and k_ω oznaczają odpowiednie stałe siłowe [85].

Metoda dynamiki molekularnej polega zatem na rozwiązywaniu równań ruchu dla układu atomów. Posiadając informacje o masie oraz siłach działających w układzie można uzyskać przyspieszenia poszczególnych atomów. Symulacje mogą dostarczyć informacji o ruchu atomów w funkcji czasu. Mogą być one użyte do próbkowania przestrzeni

konformacyjnej, do oceny systemu w stanie równowagi, w tym właściwości strukturalnych i dynamicznych a nawet do sprawdzenia wartości parametrów termodynamicznych [86]. Struktura 3-D biocząsteczki, o ile jest dostępna, służy tylko jako punkt początkowy do całkowania równań ruchu. Metod całkowania jest wiele, w rozprawie stosowano wyłącznie algorytm Verleta [87], podany w równaniach (3.4-3.7):

$$r(t + \Delta t) = r(t) + v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 + O(\Delta t^3) \quad (3.4)$$

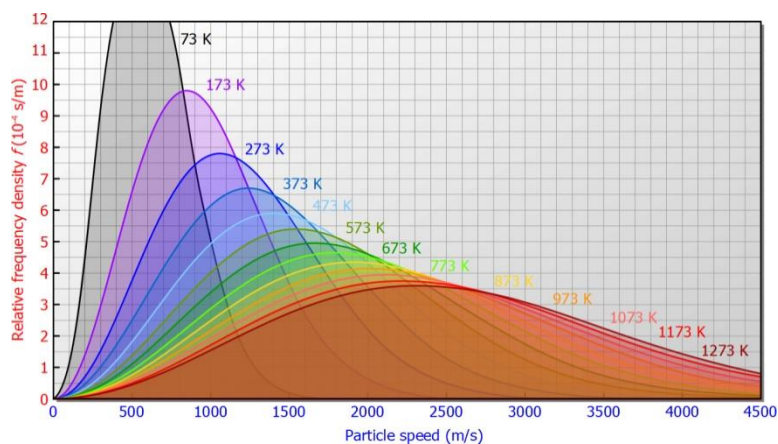
$$r(t - \Delta t) = r(t) - v(t)\Delta t + \frac{1}{2}a(t)\Delta t^2 - O(\Delta t^3) \quad (3.5)$$

$$r(t + \Delta t) + r(t - \Delta t) = 2r(t) + a(t)\Delta t^2 \quad (3.6)$$

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r(t - \Delta t) + a(t)\Delta t^2 \quad (3.7)$$

Z równania 3.6 widzimy, że podstawie znajomości położenia (t) i przyspieszenia $a(t)$ w chwili t możemy otrzymać przyszłe położenie w chwili $t + \Delta t$.

Temperatura modelowanego układu, ważna a tym projekcie, związana jest z rozkładem prędkości poszczególnych atomów. W symulacjach stosowano zespół statystyczny NVT, dla utrzymania temperatury stosowano termostat Langevina. Dbano o to, by w modelach ruch atomów (prędkości) spełniał rozkład Maxwella-Boltzmanna (Rysunek 3.2).



Rysunek 3.2 Dystrybucja Maxwella-Boltzmanna prędkości cząsteczek w różnych temperaturach [88].

Jak widać, zmiana rozkładu od 300 K do np. 330 K jest niewielka, jednak tylko ten efekt powoduje, że po tym niewielkim wzroście temperatury NH₂ traci swoją aktywność. Temperaturę w symulacjach MD oblicza się zwykle w oparciu o wartości średnie

prędkości atomów, posilując się zależnością (3.7) wynikającą z założenia spełniania twierdzenia o ekwipartycji energii [89]:

$$\frac{1}{2} \sum m \langle v^2 \rangle = \frac{3}{2} NkT \quad (3.8)$$

Postęp w XXI w. dziedzinie rozwoju metod MD jest ogromny. Dzięki osiągnięciom, m.in., trzech noblistów, M. Lewitta, A. Warshela i M. Karplusa, jesteśmy w stanie modelować „rzeczywistość białkową” w komputerze i dokonać symulacji ruchu (dynamiki) całych biocząsteczek poprzez rozwiązywanie tych właśnie klasycznych równań Newtona (czy Langevina). Początki metod modelowania dynamiki sięgają lat 1940-1950 kiedy badano najprostsze atomy, np. argon. W latach 70-90 stworzono pola siłowe dla aminokwasów, czyli wyrażenia analityczne opisujące jak energia cząsteczki zależy od położenia jej atomów. Obecnie znanych jest kilkadziesiąt typów pól siłowych dla białek, najpopularniejsze to CHARMM [90], AMBER [91], GROMOS [92]. Powstały też akademickie (otwartoźródłowe) i komercyjne programy, które umożliwiły przewidywanie energii makrocząsteczek i interpretację wyników doświadczalnego badania ich struktury [39]. W rozprawie stosowane były głównie programy NAMD [40] i GROMACS [41], oraz oprogramowanie komercyjne firmy Schrödinger Inc. [42] (głównie pakiety MAESTRO, GLIDE). Głównym polem siłowym dla NHazy było odpowiednio zmodyfikowane pole CHARMM27 [43]. Symulacje MD zapewniają połączenie pomiędzy mechaniką statystyczną a termodynamiką [93]. Wykorzystanie komputerowej „chemii” umożliwiło obliczanie różnic w energii swobodnej, entropii, entalpii w sytuacji zmiany ligandu czy mutacji w miejscu aktywnym [39].

Obliczenia były realizowane na lokalnych klastrach linuxowych (Centum Optyki Kwantowej IF UMK, Interdyscyplinarne Centrum Nowoczesnych Technologii UMK). Ogromny wzrost mocy obliczeniowej komputerów oraz powstanie programów takich jak NAMD umożliwiło dokładną, co do atomistycznych detali symulację ogromnych białek i kompleksów białkowych, interakcji DNA z innymi obiektami, membran, receptorów i kanałów jonowych. Czas symulacji MD zwiększył się z kilku pikosekund (małe cząsteczki) do około jednej mikrosekundy dla 200 milionów atomów na mocno równoległym superkomputerze [39].

3.2 Programy i serwery wykorzystywane do analizy wyników

CAVER [94] - wykorzystuje algorytm Woronoja [95]. Jest to teselacja, która dzieli przestrzeń na zestaw komórek zawierających wszystkie punkty, które są bliżej do tego „ziarna” niż do jakiegokolwiek innego. Caver przedstawia atomy jako zestaw kulek o jednakowych promieniach. Triangulacja Delaunaya zostaje użyta aby stworzyć wierzchołki i krawędzie diagramu Woronoja [96]. Jest to sposób połączenia zestawu punktów tak, żeby

utworzyć trójkąty takie, których okręgi opisane nie zawierają żadnych punktów. Wierzchołki trójkątów odpowiadają generatorom Woronoja. Każdy atom jest generatorem do stworzenia diagramu Voronoia. Program dzieli przestrzeń na rejony bliskie do danego atomu. Ścieżka prowadzi przez krawędzie oraz wierzchołki Woronoja. Następnie na ścieżce ustawiane są okręgi w ten sposób, żeby nie kolidowały z atomami. Diagram umożliwia identyfikację regionów w przestrzeni które nie są zajmowane przez żadne atomy. Te regiony to potencjalne tunele. CAVER analizuje ciągłość tych tuneli. Trójkąt Delaunaya reprezentuje drogę łączącą atomy. CAVER może znaleźć tunele przez identyfikację ścieżek, które nie przecinają żadnych atomów. Kanałem nazywana jest w CAVERZE przestrzeń, która ma dwa wyjścia. Tunelem jest nazywana ścieżka łącząca powierzchnię z wewnętrzną wnęką [94, 97]. MDPocket także używa tego algorytmu [98].

Bio3D jest w stanie odczytywać, zapisywać i przetwarzać biomolekularne struktury, sekwencje i dynamiczne dane o trajektorii. Jest napisany w języku R. Umożliwia wybieranie atomów, alignment i superpozycję. Może identyfikować sztywne rdzenie, analizować dynamiczne domeny i wykonywać klasteryzację konformacyjną. Może także dokonywać analizy kątów torsyjnych, macierzy odległości i *principal component analysis* [99-101].

Eucb (*Euclidean computational biology*) to program do analizowania trajektorii. Może on oceniać kąty pomiędzy atomami, odległości pomiędzy centroidami, kąty torsyjne, znajdować rdzenie hydrofobowe, mostki solne, wiązania wodorowe, oddziaływania łańcuchów bocznych, układy π - π [102].

Analiza NMA *Normal Mode Analysis* została zaimplementowana w ProDy [103]. Energia jest modelowana jako suma potencjałów harmoniczych. Powstaje macierz Kirchhoffa z informacjami o atomach. Program tworzy macierz Hessian z drugimi pochodnymi potencjałów harmoniczych dla całej topologii i macierzy kowariancji zawierającej korelacje między fluktuacjami (wielowymiarowy rozkład normalny) [103, 104].

RMSD *root mean square deviation* to odchylenie (odległość) wszystkich atomów białka od struktury referencyjnej (na przykład początkowej) w trakcie symulacji

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N ||v_i - w_i||^2} \quad (3.9)$$

N – liczba atomów, v, x - punkty

RMSF *root mean square fluctuations* to odchylenie konkretnego atomu (lub aminokwasu, jak się wstawi odpowiednie sumy) białka od struktury referencyjnej (np. początkowej lub średniej) w całej symulacji

(3.10)

$$RMSF = \sqrt{\sum \frac{|r(t) - r|^2}{T}}$$

T - czas

SASA – *solvent accessible surface area* – powierzchnia dostępna dla molekuł badana za pomocą wirtualnej „sfery” o promieniu 1.4 Å. Sfera ta „porusza się” po białku badając, jaka jego część jest dostępna dla rozpuszczalnika.

3.3 Protokół do badania aktywności (Problem A)

1. Użyta została NHaza pochodząca z bakterii *Streptomyces thermoautotrophicus*, bakterii termofilnej (kod GenBank: KWX07716.1 dla podjednostki α, KWX07717.1 dla podjednostki β). W czasie badań nie było dostępnej struktury krystalicznej tego enzymu. Stworzono modele homologiczne z użyciem programu SwissModel [105, 106] (jako szablon zostały użyte struktury 3HHT, 3VYH i 2DPP). Sprawdzono różne parametry oceny jakości modeli (QSQE *quaternary structure quality estimate*, GMQE – *global model quality estimate*, QMean – *quality estimates*, QmeanDisCo – *quality estimates with distance constraints* [107]). Brano też pod uwagę dostępność tetrameru. Odrzucono modele ocenione jako niepoprawne. Najlepszy model został utworzony na podstawie białka 3VYH (GMQE 9.1). Jakość modeli została oceniona za pomocą serwera Saves v6.0 (zawiera między innymi Verify3D [108] Errat [109]). Wybrany model został oceniony przez ERRAT (*Overall Quality Factor* 92.87) i przeszedł ocenę Verify3D (81.89% reszt ze średnim wynikiem 3D–1D ≥ 0.2).

2. Stany protonacji odpowiednich aminokwasów (Arg, Lys, Glu, Asp, His) zostały ustalone za pomocą PROPKA, narzędzia zaimplementowanego w PDB2PQR [110]. Wygenerowano plik psf za pomocą programu psfgen wchodzącego w skład pakietu NAMD [111, 112]. Przeprowadzono nałożenie (*alignment*) białka do wzorca. Woda „krystalograficzna” i jony pochodziły z wzorca.

3. Został użyty program NAMD 2.14 [111, 112] i pole siłowe CHARMM27 [113, 114]. Mutacje zostały wprowadzone za pomocą programu *psfgen mutate* wchodzącego w skład pakietu NAMD [111, 112]. Do struktur zostały dodane otoczki wodne o rozmiarze co najmniej 10 Å w każdą stronę, ze stężeniem NaCl 0.15 mol/L oraz opcją neutralizacji. Przeprowadzono 1 ns zrównoważenie wody, 1000 kroków minimalizacji energii i stopniowe podgrzewanie do 300 K.

4. Obliczono po 200 ns trajektorii dynamiką Langevina w 300 K z 2 fs krokiem czasowym w ciśnieniu atmosferycznym. Długozasięgowe oddziaływania elektrostatyczne zostały obliczone za pomocą metody sumowania Ewalda (*Particle Ewald Mesh summation*, PME) [115]. Parametry niestandardowego centrum aktywnego z kobaltem oraz post-translacyjnie utlenionymi cysteinami zostały otrzymane w oparciu o obliczenia kwantowochemiczne DFT/B3YLP/6-31G(d,p) oraz HF/6-31G* opublikowane w pracy doktorskiej dr hab. Ł. Peplowskiego, prof. UMK [116]. Analiza została przeprowadzona za pomocą pakietu VMD 1.9.3 [117] i własnoręcznie napisanych skryptów (PYTHON).

3.4 Protokół do badania termostabilności (Problem B)

1. Do symulacji została użyta struktura PDB 3QXE z bakterii *P. putida* (tetramer $\alpha\beta\beta\alpha$). Linkery A8, B8 C8 zostały utworzone z użyciem programu I-Tasser [118-120]. Przeprowadzono dokowanie linkerów do białka 3QXE z użyciem ClusPro 2.0 [121]. Pętle pomiędzy NHazą, a linkerem zostały dodane za pomocą programu Prime z pakietu Schrödinger 12.2.12 MMshare Version 4.8.012, Release 2019-4 [122].

2. Przeprowadzono symulacje MD dla NHazy typu dzikiego oraz NHazy A8. Protonacja została ustalona za pomocą PROPKA zaimplementowanego w serwerze PDB2PQR [110]. Do wszystkich struktur zostały dodane otoczki wodne z co najmniej 10 Å w każdym kierunku. Jony NaCl w stężeniu 0.15 mol/L zostały dodane z opcją neutralizacji. Dla każdego wariantu przeprowadzono po dwie symulacje MD po 100 ns każda z 1 fs krokiem czasowym, jedną w temperaturze 300 K i jedną w 335 K. Zostało użyte ciśnienie atmosferyczne. Długodystansowe oddziaływania cząsteczek (*long range particle interactions*) zostały obliczone z użyciem metody PME [115]. Przed symulacją zostało przeprowadzone 1 ns zrównoważenie wody i jonów, 1000 kroków minimalizacji i stopniowe ogrzewanie do zadanej temperatury. Został użyty program NAMD 2.12 [111, 112] i pole siłowe CHARMM27 [113, 114]. Parametry dla niestandardowego centrum aktywnego z kobaltem i post translacyjnie utlenionych cystein zostały otrzymane w oparciu o obliczenia kwantowe DFT/B3LYP/6-31G(d, p) oraz HF/6-31G* (opisane w pracy doktorskiej dr hab. Łukasza Peplowskiego, prof. UMK) [116].

3. Analizę przeprowadzono za pomocą VMD 1.9.3 [117], własnoręcznie napisanych skryptów oraz Eucb [102].

3.5 Protokół do badania wpływu roztworów na NHazę (Problem C)

1. Jako struktura wyjściowa został użyty tetramer $\alpha\beta\beta\alpha$ hydratazy nitrylowej z *P. thermophila* (kod PDB 1IRE) [59]. Za pomocą programu PACKMOL [123] utworzono otoczki zawierające 20% i 50% roztworu akrylamidu w wodzie oraz otoczki zawierające

poniżej 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu oraz 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu (procenty wagowe). Obliczono, ile cząsteczek znajduje się w 100 g roztworu. Na tej podstawie znaleziono współczynnik ACA/WAT (akrylamid/woda) i ACN/WAT (akrylonitryl/woda). Za pomocą programu PACKMOL tak dobrano liczbę amidów żeby osiągnąć odpowiedni współczynnik w otocze. Przed symulacją, stany protonacyjne (aminokwasów naładowanych) dla pH=7 zostały ustalone za pomocą serwera PDB2PQR [110] zawierającego narzędzie PROPKA [124, 125]. Do struktur zostały dodane otoczki wodne tak, żeby uzyskać określony współczynnik liczby cząsteczek rozpuszczalnika/wody i zostały dodane jony NaCl (0.15 mol/L) z opcją neutralizacji. Sprawdzono czy białko we wszystkich wymiarach zachowuje odległość co najmniej 15 Å od brzegu skrzynki do symulacji.

2. Zrównoważenie wody i jonów trwało 1 ns, przy „unieruchomionym” białku, następnie zostało przeprowadzonych 1000 kroków minimalizacji i stopniowe podgrzewanie do 300 K. Wygenerowano po dwie trajektorie po 500 ns z 2 fs krokiem czasowym i pod ciśnieniem atmosferycznym dla każdego systemu. Długozasięgowe oddziaływania zostały obliczone przy użyciu metody PME [115]. Do obliczeń MD użyto NAMD 2.13 i pola siłowego CHARMM27 [111-114]. Parametry dla niestandardowego centrum aktywnego zawierającego kobalt i post-translacyjnie modyfikowane cysteiny zostały otrzymane w oparciu o DFT/B3LYP/6-31G(d,p) and HF/6-31G* z doktoratu dr hab. Ł. Peplowskiego, prof. UMK użyte pierwszy raz w 2008 [12, 116].

3. Analiza została przeprowadzona z użyciem VMD1.9.3 i własnych skryptów. Analiza składowych głównych (*Principal component analysis*, PCA) została przeprowadzona za pomocą pakietu Bio3D w języku R [100]. Ponadto wykorzystano programy Eucb [102] a także, do analizy tuneli, CAVER [97] i MDPocket [98].

Rozdział 4. Przegląd wyników modelowania enzymów

biotechnologicznych w rozpuszczalnikach niewodnych.

Naturalnym środowiskiem działania enzymów jest woda [126], [127]. W komórce występują również inne białka i jony, np. sodowe, chlorkowe, potasowe itp. Zauważono, że niektóre organiczne substancje, np. mocznik, powodują denaturację białek [128], ale przynajmniej od lat 80-tych wiadomo, że białka zachowują często swoją funkcję i aktywność również w roztworach mieszanych czy cieczach innych niż woda [129]. Zmiana otoczenia może w przypadku enzymów zmienić radykalnie ich zdolności katalityczne [130], a nawet sprawić, że reakcje chemiczne będą inne, wręcz lepsze [131]. Niekiedy jednak reakcje biegną wolniej [132]. Modelowanie komputerowe enzymów w takich niestandardowych środowiskach może dać cenne informacje o naturze zmian strukturalnych indukowanych rozpuszczalnikiem. Jest ono trudne, gdyż wymaga wprowadzenia parametryzacji dla niestandardowych składników roztworu, takich jak rozmaite cząsteczki organiczne, ciecze jonowe, mieszaniny głęboko eutektyczne. Ponieważ celem rozprawy jest, m.in., zbadanie zachowania NHazy w roztworach zawierających rosnące stężenie akrylamidu, w tym rozdziale przedstawiono zwięzły przegląd publikacji poświęconych modelowaniu enzymów, zwłaszcza o znaczeniu biotechnologicznym [133], w rozpuszczalnikach (roztworach) niewodnych. Nazwa ta jest niezbyt precyzyjna, ale ma odzwierciedlać fakt, że otoczenie oprócz wody zawiera istotne ilości innych molekuł, lub jest całkowicie „bezwodne”. Przeprowadzanie biokatalizy w fazie niewodnej umożliwia zmianę regioselektywności i preferencje w kierunku wybranych enancjomerów, zmianę równowagi termodynamicznej, uniknięcie reakcji towarzyszących związanych z wodą, redukcję zanieczyszczeń bakteryjnych. Najczęściej wykorzystywane są rozpuszczalniki organiczne. Współczynnik podziału oktanol/woda czyli $\log P$ jest parametrem, który dyskutuje się w kontekście aktywności enzymatycznej, ma on na nią wielki wpływ. Ważne są również rodzaje grup funkcyjnych obecnych w rozpuszczalnikach organicznych. Trzeba podkreślić, że w enzymy ułożone w środowiskach niewodnych zachowują jednak zwykle cząsteczki wody na powierzchni, w krytycznych miejscach, co pozwala na utrzymanie struktury i funkcji katalitycznych [134]. Problem zachowania białek w roztworach niewodnych był przedmiotem licznych badań doświadczalnych, które opisano np. w pracy przeglądowej Wanga i in. z roku 2016 [135], czy w artykule [136]. W tym rozdziale skupiamy uwagę na przykładach obliczeniowego modelowania enzymów o znaczeniu biotechnologicznym w takich środowiskach.

4.1 Klasyfikacja enzymów biotechnologicznych

W przemyśle biotechnologicznym stosowane są enzymy w zasadzie z każdej z sześciu klas opartych na rodzaju katalizowanej reakcji [137]: hydrolazy (katalizują reakcje hydrolizy), oksyreduktazy (katalizują reakcje utlenienia), transferazy (katalizują przenoszenie grup funkcyjnych zawierających węgiel, azot lub fosfor), liazy – (katalizują reakcje rozpadu wiązań C-C), izomerazy (katalizują izomeryzację), ligazy (katalizują reakcje tworzenia wiązań pomiędzy C a O, S i N), zob. np. [138], [139] czy [140]. Ocenia się, że największe zastosowania w przemyśle mają hydrolazy (75%) [141]. Na przykład, szczególnym rodzajem hydrolaz są proteazy (3.4) znajdujące zastosowanie w produkcji detergentów, skrobi, ubrań, żywności dla zwierząt i produktów mlecznych. Cellulazy (3.2.1.4) i amylazy, takie jak α -amylaza (3.2.1.1) są używane do produkcji skrobi, ubrań i przemyśle piekarniczym. Z kolei np. oksyreduktazy obecne w *Basidiomycetes* wykorzystuje się do rozkładu biomasy. Inne przykłady, opisane np. w publikacji Amatto i in. [142], dotyczą wykorzystania oksydazy AAO, EC 1.1.3.7 w biorafineriach, wybielaniu, biosyntezie substancji zapachowych, utlenianiu furfurali. Inne użyteczne oksydazy to oksydaza alkoholu wanilinowego VAO EC 1.1.3.38 oraz oksydaza eugenolowa (EC 1.17.99.1). Produkuje się przy ich udziale ok. 40 000 ton 1-naftolu rocznie, który jest stosuje się w produkcji herbicydów, insektycydów, prekursorów barwników itd. Badana w tym projekcie hydratasa nitrylowa (EC 4.2.1.84) należy do rodziny ligaz.

4.2 Modelowanie enzymów biotechnologicznych w środowiskach niewodnych

Najprościej będzie podzielić badania teoretyczne nad enzymami o znaczeniu biotechnologicznym ze względu na rodzaj roztworu użytego do modelowania, omówimy kolejno (1) rozpuszczalniki o niskiej polarności, (2) rozpuszczalniki polarne, (3) ciecze jonowe, (4) rozpuszczalniki głęboko eutektyczne - DES. Świadomie pominięto publikacje związane z badaniem enzymów w cieczach nadkrytycznych. Ich znaczenie w biotechnologii przemysłowej wciąż nie jest takie duże. W przeszłości opublikowano kilka publikacji na temat modelowania enzymów w roztworach niewodnych, głównie z grupy Soaresa [143], [75], [144], [145], czy innych [146], jednak nie ma pracy przeglądowej zorientowanej na enzymy o znaczeniu przemysłowym.

4.2.1 Rozpuszczalniki o małej polarności

Im wyższy jest parametr log P tym bardziej jest hydrofobowy rozpuszczalnik. W hydrofobowych rozpuszczalnikach białka stają się bardziej sztywne [135]. Wiąże się to m.in. z tym, że hydrofilowe aminokwasy mają tendencję chowania się w głąb białka, zaś hydrofobowe zwiększają powierzchnię kontaktu z rozpuszczalnikiem. Jeśli w układzie

są resztki wody (zwykle są) to na powierzchni białka może powstawać cienka warstwa hydratacyjna [145].

Jedną z pierwszych prac poświęconych badaniom tych problemów metodami MD jest praca Soaresa i in. z roku 2003 [143]. Autorzy ci badali kutynazę (rodzaj proteazy serynowej) i ubikwitynę w heksanie stosując program GROMOS96. Zauważono, że heksan może wnikać do centrum aktywnego kutynazy, i że w nowym środowisku liczba wewnętrznych wiązań wodorowych rośnie w stosunku do środowiska wodnego. Białko ma bardziej otwartą konformację. Molekuły wody tworzą przy niskich stężeniach klastry hydratujące białka [143]. Ta sama grupa opublikowała w roku 2007 wyniki badań metodą MD (GROMACS) kutinazy w heksanie, eterze diizopropylowym i 3-pentanonie. Badano zachowanie się niewielkich ilości molekuł wody w rozpuszczalnikach o zmieniającym się logP. Okazuje się, że im wyższa polarność rozpuszczalnika tym więcej molekuł wody by uzyskać ten sam poziom hydratacji białka [75].

Z kolei Trodler i in. (2008) zbadali lipazę B (*Candida antarctica* lipase B, CALB) w izopentanie, toluenie i cykloheksanie stosując AMBER 7. Tutaj zauważono również, że w rozpuszczalnikach organicznych białko staje się sztywniejsze (mniejsze fluktuacje). W szczególności odnotowano spadek ruchliwości aminokwasów hydrofilowych w obszarze wejścia do kanału białkowego. Okazało się, że izopentan i cykloheksan mogą wizytować centrum aktywne CALB [147]. Później ten sam enzym był badany wielokrotnie. Li i in. w roku 2010 modelowali lipazę (*Candida antarctica* lipase B) w chloroformie, cyklopentanie i heksanie [148]. Białko w tych rozpuszczalnikach zachowało ok. 80% struktury α -helikalnej. Dobrze zachowane były struktury β , wzrosła dostępność aminokwasów hydrofobowych, a niektóre hydrofilowe reszty przemieściły się do wnętrza białka. Tunel prowadzący do wnętrza białka uległ deformacji w rozpuszczalnikach organicznych o czym świadczy wzrost RMSD. Johnson i in. (2012) zbadali lipazę w cykloheksanie przy pomocy programów AMBER 10 and NAMD 2.7 [149]. Co ciekawe, zastosowano program HOLE do oceny rozmiarów kanału prowadzącego do centrum katalitycznego. Stwierdzono, że heksan poszerza wejście do kanału. Również te dane potwierdziły, że w heksanie enzym staje się mniej ruchliwy (sztywniejszy) [149]. Lipazę badano również w aromatycznym niepolarnym rozpuszczalniku organicznym jakim jest toluen [150]. Yenenler i in. (2018) używali program NAMD i pola siłowego CHARMM 36. Tutaj także lipaza była mniej ruchliwa niż w wodzie, zaś enzym przybierał łatwiej otwartą konformację [150].

Wykonuje się też symulacje w rozpuszczalnikach mieszanych – organiczno-wodnych. Wang i in. w roku 2021 badali metodami MD lipazy z *Candida Antarctica*, *Candida rugosa* oraz *Rhizopus chinensis* umieszczone w środowiskach zwanych MAOS (*micro-aqueous organic solvent*) [146]. Wyniki wskazały, że lipazy w takich otoczeniach wykazują inne

konformacje, niespotykane w rozpuszczalnikach czysto organicznych. Przyczyną jest selektywna agregacja molekuł wody na powierzchni białek. Woda ta zmienia rozkład aminokwasów polarnych i niepolarnych. Badanie funkcji radialnych rozkładu wskazuje na występowanie dwóch warstw hydratacyjnych.

4.2.2 Rozpuszczalniki polarne

Rozpuszczalniki polarne mieszają się z wodą, ale mogą z nią konkurować w miejscach hydratacji w białkach tworząc odpowiednie wiązania wodorowe. Mogą też modyfikować dynamikę przeciwjonów neutralizujących ładunek białek [145]. Szczególna jest tutaj rola alkoholi z grupą funkcyjną -OH. W publikacji [75] z 2007 r. Soares i in. modelowali proces solwatacji enzymu przez alkohol etylowy i acetonitryl w obecności wody. Polarne molekuły występowały na powierzchni białka w innych miejscach niż w rozpuszczalnikach niepolarnych. Co ciekawe, stopień hydratacji białka wodą był inny w acetonitrylu niż w etanolu. W tych roztworach obserwowano tworzenie się klastrów wody ale dynamika tego procesu była wolniejsza niż w rozpuszczalnikach niepolarnych [75].

Trodler i in. już w 2008 badali lipazę w mieszaninie chloroformu i metanolu. Przestrzeń konformacyjna próbkowana przez białko w takim roztworze jest większa niż w rozpuszczalnikach niepolarnych. Zauważono, że i metanol i chloroform mogą wchodzić do miejsca aktywnego [147]. Tong i in. zbadali dokładniej inaktywację lipazy przez metanol w roku 2019 [151]. W ostatnich latach lipazy były nadal popularnym obiektem badań symulacyjnych [152]. Ich przegląd można znaleźć w niedawnych (2023-2024) publikacjach [153] i [154].

W 2010 roku wykazano (Liu i in.), że można zmienić specyficzność substratową enzymu nie tylko poprzez inżynierię genetyczną, ale i przez dobór rozpuszczalnika [155]. Park i in. podali sposób stabilizacji lipazy z *Candida Antarctica* w rozpuszczalnikach polarnych poprzez mutacje aminokwasów powierzchniowych [156]. Z kolei Lousa i in. zbadali (2012) dwa enzymy: pseudolizynę oraz termolizynę [144] stosując GROMACS 4.0. Zauważono, że metanol otaczający enzymy lokuje się w pobliżu powierzchni białek nie tylko dzięki wiązaniom wodorowym, ale też oddziaływaniom van der Waalsa poprzez część alkilową. Izopropanol, też badany w tej publikacji, wnika do kieszeni hydrofobowych [144].

W 2013 roku Meng i in. zbadali efekty rozpuszczalnikowe (woda, acetonitryl i heksan) na wiązanie sześćiopeptydu do trypsyny. Symulacje MD pokazały, że enzym jest bardziej zwarty i zmieniony w heksanie niż w mediach polarnych. Substrat stabilizował białko w wodzie i acetonitrylu, ale nie było tego efektu w niepolarnym heksanie. Kształt miejsca wiązania w rozpuszczalnikach polarnych był podobny, ale w heksanie odmienny.

Zauważono, że siła wiązania liganda do białka jest znacznie większa w heksanie, ponieważ rozpuszczalniki polarne osłabiają oddziaływania elektrostatyczne.

Cruz i in. jako jedni z pierwszych badali metodami MD w 2009 roku proteazę serynową zwaną subtylizyną *Carlsberg* w roztworach wodnych i niewodnych, konkretnie w acetonitrylu [157]. Stwierdzono, że przy braku wody pojawiają się liczne oddziaływania acetonitryl-białko prowadzące do zmian strukturalnych głównie w pętlach powierzchniowych enzymu. W organicznym rozpuszczalniku otwierała się ścieżka (kanał) do wnętrza białka. Chymotrypsyna też należy do proteaz serynowych. W acetonitrylu wykazuje spadek aktywności katalitycznej. W roku 2012 Zhu i inni opublikowali wyniki 80 ns symulacji MD γ -chymotrypsyny w tym rozpuszczalniku [158] z zachowaniem 140 wód krystalicznych. Okazało się, że struktura enzymu się zmienia dość wyraźnie – RMSD rośnie, ale RMSF maleje, zwłaszcza w centrum aktywnym. Maleje też SASA. Gu i in. [159] w 2019 roku badali zachowanie proteazy w metanolu stosując GROMACS 5.1.4. Zauważono szereg efektów: wzrosła ruchliwość białka i promień bezwładności R_g , α -helisy miały tendencje do rozplatania, wzrósł parametr SASA. W trakcie symulacji rozpuszczalnik wchodził do wnętrza białka i zmieniał oddziaływania hydrofobowe niszcząc strukturę trzeciorzędową [159].

Stosunkowo dużo badań obliczeniowych wykonano nad mechanizmem rozplatania lizozymu indukowanego DMSO. Na przykład Roy i in. przy pomocy modelowania tego układu GROMACSem zauważyli, że już w 15 % roztworze struktura jest silnie zmieniona przez ten rozpuszczalnik, a w 20 % rozpoczyna się rozplatanie [160].

4.2.3 Ciecze jonowe

Ciecze jonowe (*ionic liquids*, IL) są to sole mające temperaturę topnienia poniżej 100°C. Ich właściwości fizykochemiczne (lepkość, temperatura topnienia, polarność, pH) mogą być regulowane w dużym zakresie poprzez dobór składu [135]. Dobry przegląd zachowania się enzymów w cieczach jonowych można znaleźć w publikacji Kragla i in. [161], zaś doskonały przegląd zastosowań cieczy jonowych do usprawniania katalizy w pracy przeglądowej Itoha [162]. Lipazy w cieczach jonowych (IL) służą do produkcji biodiesla i estrów cukrów. Omawiane w tym artykule są też oksydazy, lakazy, peroksydazy, reakcje cytochromów, proteazy, asymetryczna redukcja ketonów, glikozylacja, hydroliza polisacharydów itd. Ciecze jonowe mogą mieć wpływ stabilizujący jak i destabilizujący (Singh i in. 2020) [163] na enzymy przemysłowe. Metody MD wnoszą cenne dane na temat oddziaływań cieczy jonowych z enzymami przemysłowymi [152, 164-167]. Pojawiły się nawet publikacje (2019, Pramanik) pokazujące jak w oparciu o obliczenia projektować nowe rozpuszczalniki na bazie cieczy jonowych [168].

4.2.4 Mieszaniny głęboko eutektyczne (*Deep Eutectic Solvents-DES*)

Mieszaniny głęboko eutektyczne (DES) są związane z cieczami jonowymi, jednak traktowane są jako odrębna klasa "zielonych" rozpuszczalników. Są to substancje stałe, które po zmieszaniu w odpowiednich proporcjach stechiometrycznych wykazują nową obniżoną temperaturę topnienia tak, że w danych warunkach są w stanie ciekłym. Ważne jest by pamiętać, że DES to nie są jakieś nowe indywidua chemiczne – jest to po prostu fizyczna mieszanina dwóch substancji. Przyczyną niskiej temperatury topnienia jest szczególny układ donorów wiązań wodorowych (HBD) i akceptorów wiązań wodorowych (HBA). Po raz pierwszy zaobserwowano taki efekt dla kombinacji 1:2 (mol:mol) chlorku choliney [temperatura topnienia $T_m = 302\text{ }^{\circ}\text{C}$] z mocznikiem [$T_m = 133\text{ }^{\circ}\text{C}$]. Taka mieszanina wykazuje $T_m = 12^{\circ}\text{C}$. DES mają zalety: wysoką stabilność termiczną, niską lotność, niskie ciśnienie pary nasyconej, łatwość kontrolowania polarności [169]. Niedawno ukazał się dość obszerny przegląd badań teoretycznych (głównie metodami MD), chociaż liczba tych publikacji nie przekracza 30, w ostatnich latach ukazuje się około 5 artykułów rocznie [170]. W przytoczonym przeglądzie warto zwrócić uwagę na Tabelę 1, gdzie podano zarówno opis badanych enzymów jak i dane na temat odpowiednio zmodyfikowanych pól siłowych (CHARMM, GROMOS, AMBER, OPLS). W DES zachodzi konieczność skalowania oddziaływań elektrostatycznych, gdyż stosowane pola nie są polaryzowalne.

Jak wynika z literatury, doświadczalnie badano w DES keto-reduktazy, dehydrogenazę alkoholową, enzymy zawierające grupę hemową, laktazy czy katalazy [169]. Jedną z pierwszych publikacji obliczeniowych była praca Monhemi i in. z 2014 roku [171] na temat zachowania lipazy (*Candida antarctica* lipaza B, CALB) w popularnym DES zwanym „reline” (jest to mieszanina chlorku choliney z mocznikiem). Wykonano 50 ns symulacje programem GROMACS 4.5.4 z polem siłowym GROMOS 43a1. Do modelu dodawano wysokie stężenie, do 66% czynnika denaturującego jakim jest mocznik. Zauważono, że enzym jest stabilny nawet w wysokich temperaturach (373 K). W wodzie ulega denaturacji już przy 12% stężeniu mocznika. Przyczyną wzrostu stabilności była selektywna solwatacja powierzchni białka poprzez cholinę i jony chlorkowe – mocznik nie mógł swobodnie dyfundować do wnętrza białka by zerwać wiązania wodorowe tam się znajdujące. Jako ciekawostkę można podać, że jedna w publikacji tej irańskiej grupy [172], w której po raz pierwszy zaproponowano sposób uzyskiwania ligniny z biomasy drzewnej przy pomocy pewnych DES zyskała wielką popularność, czyli blisko 200 cytowań.

Lipazy (*triglycerol acylhydrolases* EC 3.1.1.3), podobnie jak NHaza, należą do hydrolaz (EC3) zatem podamy kilka innych publikacji związanych z lipazami w DES. Nian i in. [173, 174] badali metodami MD mechanizm procesu aktywacji enzymu CALB w „naturalnych” DES (tutaj chlorek choliney – gliceryna; oraz betaina-ksylitol). Okazało

się, że rozpuszczalnik nie modyfikuje rozmiaru wnęki katalitycznej, efekt aktywacji przypisano silnym zmianom w sieci wiązań wodorowych indukowanym rozpuszczalnikiem. Lipazami zajmowali się również Sezeman i in. [175] wykorzystując NAMD 2.13, CHARMM36 do modelowania w skali 300 ns. W przytoczonej publikacji można znaleźć wiele danych na temat szczegółów oddziaływania enzymu z poszczególnymi składnikami reliny i z mocznikiem. Ważna jest stosunkowo nowa publikacja Qiao i in. gdzie dyskutowane są wyniki modelowania lipazy w dwóch DES ale posiadających cząsteczki stabilizujące (cholina : glicerol (1 : 2)) i destabilizujące (cholina : mocznik (1 : 2)) białko [176]. Rodzaj DES ma wpływ na strukturę i aktywność lipazy.

Inne enzymy też były badane. Na przykład, w roku 2000 Kumari i in. w oparciu o symulacje NAMD/CHARMM36 opublikowali wyniki modelowania lizozymu – enzymu antybakteryjnego [177]. W DES – relinie – maleje liczba struktur drugorzędowych – α -helis i β -kartek. Rośnie RoG i SASA. Dominuje solwatacja białek poprzez kationy z DES. Huang i in. użyli metody MD (GROMACS 2018.6, OPLS-DES i OPLS-AA/M, 100 ns), aby wyjaśnić zachowanie enzymu dehydrogenaza alkoholowa w roztworach gliceryny z malejącą ilością wody [178]. W lepkich roztworach fluktuacje silnie maleją. RMSD w czystej wodzie było 3 razy większe niż w mieszaninach wody z glicerolem. Niedawno Bittner i in. zbadali teoretycznie wpływ DES na dehydrogenazę alkoholową [179]. Ważną obserwacją dokonaną już wcześniej jest spostrzeżenie, że w układzie musi być minimum 10% wody, by ten enzym był aktywny [180].

Z kolei w publikacji na temat lakazy, używanej do utleniania cząsteczek organicznych, wykorzystano zarówno doświadczenia jak i dokowanie molekuł DES do enzymu by pokazać, że w DES aktywność enzymu może wzrastać nawet do 200% w stosunku do wody [178]. Większość składników DES tworzy wiązania wodorowe z lakazą – im mocniejsze są oddziaływania tym większa aktywność enzymu. Jedną z ostatnich publikacji analizujących metodami MD termostabilność i aktywność enzymu α -chymotrypsyna w różnych DES jest praca Gajadaro-Parra z 2024 roku [181]. Badania doświadczalne i obliczenia pokazały, że dodanie chlorku choliny i sorbitolu poprawiło stabilność termiczną o 18°, przyczyną była selektywna lokalizacja sorbitolu na powierzchni enzymu potwierdzona symulacjami [181].

Podsumowując ten obszerny, ale niekompletny przegląd można stwierdzić, że metody biofizycznego modelowania enzymów przemysłowych stają się coraz popularniejszym narzędziem badawczym do oceny na poziomie atomowym wpływu rozpuszczalników niewodnych na aktywność katalityczną tych ważnych białek. Obliczenia nie są jeszcze powszechne ze względu na trudności z realistyczną parametryzacją molekuł tworzących rozpuszczalniki niewodne. Są obawy, że niepewność w opisie molekuł rozpuszczalnika może wprowadzać artefakty w zachowanie badanych enzymów. W Rozdziale 7 przedstawione

są wyniki analizy wielu 500 ns trajektorii NHazy w rozworach niewodnych, zawierających 20 i 50% akrylonitrylu.

Rozdział 5. Analiza wyników symulacji dla Problemu A: poprawa aktywności.

5.1 Wprowadzenie

W trakcie reakcji przemiany nitryli w amidy wydzielają się dużo energii i mieszanina technologiczna rozgrzewa się (tzw. reakcja egzoenergetyczna). Typowe warianty NHazy w takich podwyższonych temperaturach tracą swoją aktywność. Powstało praktyczne pytanie: czy nie można znaleźć takiego wariantu NHazy, który byłby jednocześnie odporny na wysoką temperaturę oraz miał wysoką aktywność katalityczną. Jest to istota problemu A badanego w rozprawie („Jak podnieść aktywność katalityczną NHazy?”). Badania w tym kierunku prowadził zespół doświadczalny prof. Zhou, z udziałem biofizyków z UMK czyli dr hab. Ł. Peplowskiego, prof. UMK (LP - główny wkład) i Autorki doktoratu (JB). Wyniki badań opublikowano w pracy [22], na której w przeważającej mierze oparty jest Rozdział 5.

5.2 Poszukiwanie nowego wariantu termostabilnej NHazy o zwiększonej aktywności

Bakteria *S. thermoautotrophicus* jest bakterią termofilną. W laboratorium prof. Zhou w Wuxi (ChRL) przeprowadzono ekspresję białka w bakteriach *Escherichia coli* oraz jego charakteryzację. Uzyskana NHaza (StNHaza) charakteryzowała się wysoką termostabilnością, po inkubacji w 60°C przez 265 min. (ok. 5 godz.) i w 65 przez 252 min. zachowywała 50% początkowej aktywności. Enzym charakteryzował się też dobrą tolerancją na wysokie stężenie produktu (do 1 mol/L 3-cyjanopirydyny i nikotynamidu). NHaza ta miała dobrą stabilność termiczną, jednak niską aktywność, 73.80 U/mg⁻¹. Powstał problem jak zmodyfikować ten wariant NHazy by zwiększyć aktywność enzymu.

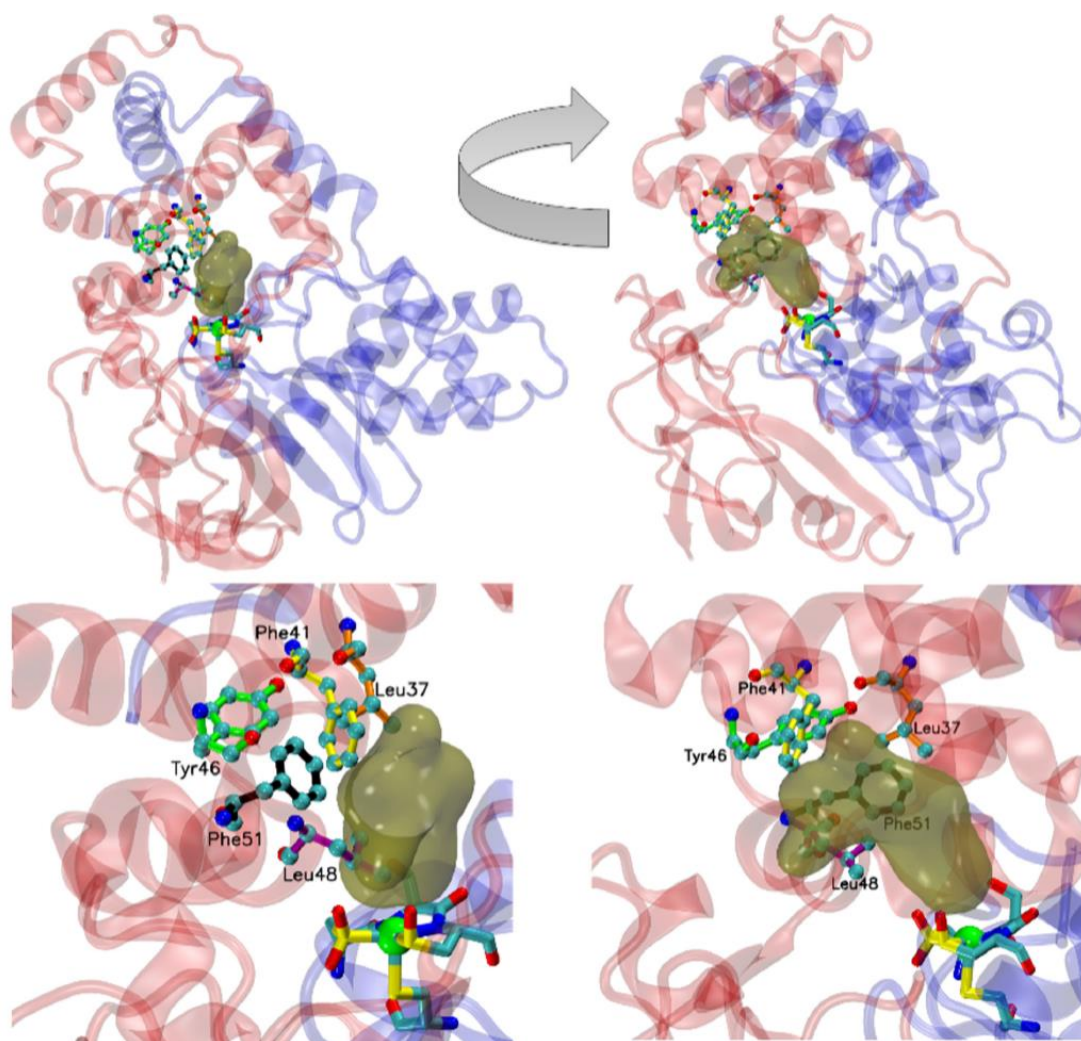
Do polepszenia aktywności zastosowano metodę projektowania „semi-racjonalnego”. Jest to metoda, w której w oparciu o sekwencję, strukturę i funkcję białka wyznacza się aminokwasy, które są najlepszymi kandydatami do mutacji zmieniającej właściwości białka oraz unika tych, które zaburzyłyby centrum aktywne [182]. Model homologiczny został stworzony przez JB. Dokładny opis znajduje się w opisie metod. Użyta została NHaza pochodząca z bakterii *Streptomyces thermoautotrophicus* (StNHaza), bakterii termofilnej. Stworzono modele homologiczne z użyciem programu SwissModel [105, 106] (jako szablon zostały użyte struktury 3HHT, 3VYH i 2DPP, Tab 5.1). Aby ocenić stworzone modele sprawdzono różne parametry oceny jakości modeli (QSQE *quaternary structure quality estimate*, GMQE – *global model quality estimate*, QMean – *quality estimates*, QmeanDisCo –

quality estimates with distance constraints [107]). Najlepszy model został utworzony na podstawie białka 3VYH (GMQE 9.1). Jakość modeli została oceniona za pomocą serwera Saves v6.0 (zawiera między innymi Verify3D [108] Errat [109]). Wybrany model został oceniony przez ERRAT (*Overall Quality Factor* 92.87) i przeszedł ocenę Verify3D (81.89% reszt ze średnim wynikiem 3D–1D ≥ 0.2).

Tabela 5.1 Parametry pochodzące ze SwissModel [105, 106] dla różnych modeli

Model	Wzorzec	Stan oligomeryczny	GMQE	QMEANDisCo Global	QSQE	Podobieństwo sekwencji	Pokrycie
#01	3hht	hetero-2-2-mer	0.86	0.75 ± 0.05	0.73	0.47	0.97
#02	3vyh	hetero-2-2-mer	0.91	0.81 ± 0.05	0.73	0.50	0.97
#03	2dpp	hetero-2-2-mer	0.85	0.76 ± 0.05	0.66	0.47	0.96

NHaza charakteryzowała się dobrą termostabilnością, ale niską aktywnością. W celu jej poprawy na podstawie analiz teoretycznych (LP i JB) modelu homologicznego dokonano mutacji aminokwasów β Leu37, β Phe41, β Tyr46, β Leu48, i β Phe51 do Pro, Lys, Asp, Ala, Phe. Były to aminokwasy tworzące tunel prowadzący do centrum aktywnego (Rysunek 5.1). Zbadano aktywności uzyskanych wariantów. Do badań zastosowano program CAVER z promieniem sondy próbnej 2 Å. Dokonano także mutagenezy saturacyjnej pozycji Leu48. Mutacja Leu48Asp okazała się najlepsza.



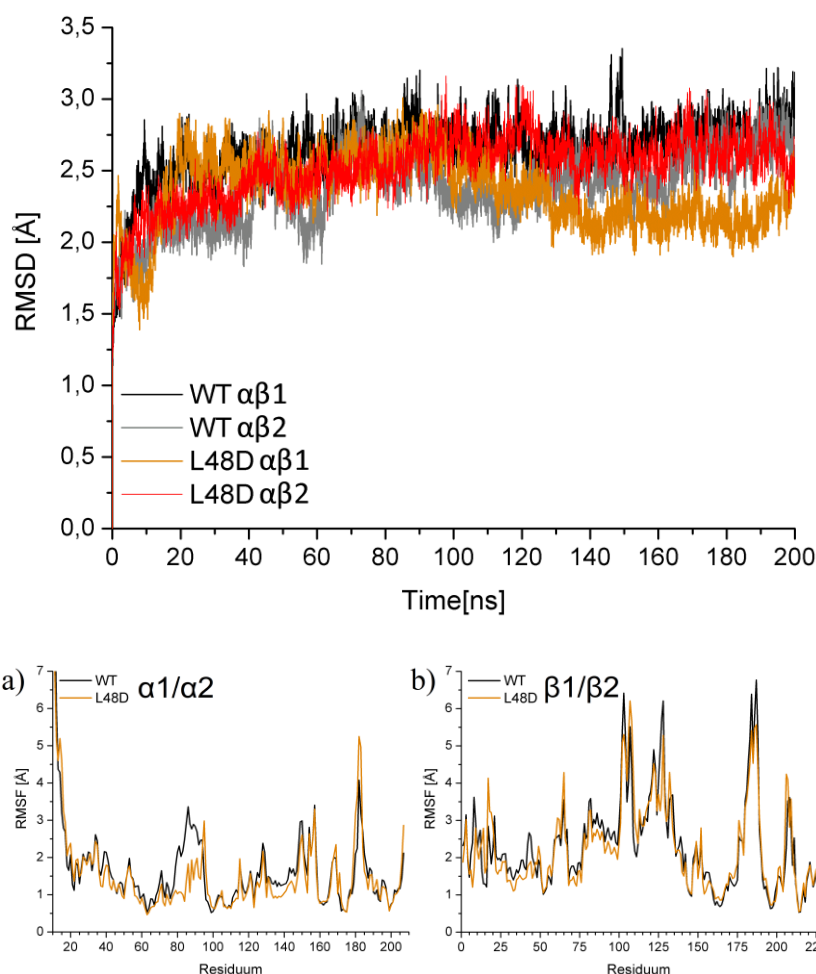
Rysunek 5.1 Wizualizacja modelu homologicznego i kanału prowadzącego do centrum aktywnego, z [22].

Tabela 5.2. Aktywność specyficzna NHazy względem różnych nitryli (z pracy [22])

Wariant	Aktywność specyficzna (U·mg ⁻¹)						
	3-Cyanopyridine	Acrylonitrile	2-Cyanopyridine	Isobutyronitrile	Benzonitrile	Valeronitrile	Cyanopyrazine
WT	73.80±5.76	550.84±14.71	65.44±2.63	521.49±62.78	93.87±11.44	43.82±0.24	16.50±1.77
βL37P	101.95±4.49	655.14±27.88	145.36±3.52	414.19±56.42	80.15±0.64	19.37±6.01	55.37±0.73
βL37K	84.62±5.46	310.33±4.82	29.16±3.04	443.49±66.33	71.19±4.47	19.99±1.66	2.18±0.42
βL37D	135.42±4.80	1066.17±22.20	122.10±7.13	446.00±54.64	60.01±2.98	19.37±1.90	22.82±0.55
βL37A	88.73±13.51	639.98±3.93	54.82±2.28	356.51±60.74	36.06±1.51	24.58±1.03	56.46±5.35
βL37F	265.68±0.13	766.27±19.62	30.49±4.58	215.61±59.73	53.94±8.48	47.96±8.62	1.50±1.61
βF41P	150.19±4.40	1004.49±45.35	91.12±1.23	490.75±79.81	54.76±8.50	50.64±5.30	50.40±0.39
βF41K	178.60±0.37	1050.65±38.49	75.24±4.25	693.47±1.52	65.14±2.13	75.76±10.28	8.88±1.45
βF41D	161.44±2.84	794.84±45.91	64.06±1.34	421.02±54.90	78.18±2.79	44.60±9.41	14.42±0.18
βF41A	119.42±12.38	740.70±72.24	55.70±3.98	360.10±40.92	43.53±5.57	51.82±6.33	6.90±0.76
βY46P	117.70±2.52	599.21±38.87	126.03±4.87	411.14±70.40	60.63±2.25	61.61±6.25	31.62±2.35
βY46K	187.11±2.01	1053.44±7.11	139.06±2.27	666.52±22.87	81.59±2.61	209.34±15.98	78.63±4.13
βY46D	89.54±0.40	119.72±33.02	77.10±4.65	525.08±36.85	87.58±9.68	58.31±18.67	19.90±1.79
βY46A	85.01±7.75	594.74±4.69	60.50±2.01	339.25±46.51	67.11±9.31	44.88±7.12	128.55±9.22
βY46F	67.71±1.85	311.72±19.48	28.98±2.98	198.90±50.32	35.35±3.59	39.34±13.21	9.57±1.64
βL48P	368.29±0.96	641.77±2.91	238.87±2.47	954.42±35.58	176.70±0.05	21.56±5.14	43.97±0.98
βL48K	346.30±16.53	742.03±3.12	180.26±3.22	139.41±32.28	285.88±3.49	20.83±0.32	0.52±0.12
βL48D	566.18±18.86	994.78±22.47	242.75±8.01	796.63±90.48	204.97±3.42	33.19±8.31	15.19±0.94
βL48A	441.12±17.28	1019.06±18.54	214.55±5.59	649.08±3.81	163.36±7.77	62.78±1.58	27.02±0.25
βL48F	209.28±0.82	1322.05±14.74	119.99±0.33	576.12±36.85	122.62±6.26	68.49±5.70	7.07±0.97
βF51P	177.59±0.36	507.42±2.23	121.99±6.09	7.32±2.54	66.87±6.33	24.02±0.40	40.24±0.48
βF51K	106.44±1.05	385.06±0.62	43.26±0.60	278.69±65.06	62.36±4.06	85.83±9.18	20.43±0.09
βF51D	95.23±1.42	555.66±8.74	27.90±1.66	8.74±2.29	13.84±0.83	2.76±1.34	54.23±4.52
βF51A	78.66±11.25	604.92±29.85	22.95±1.84	7.57±2.03	78.34±0.32	10.26±4.83	82.88±8.48

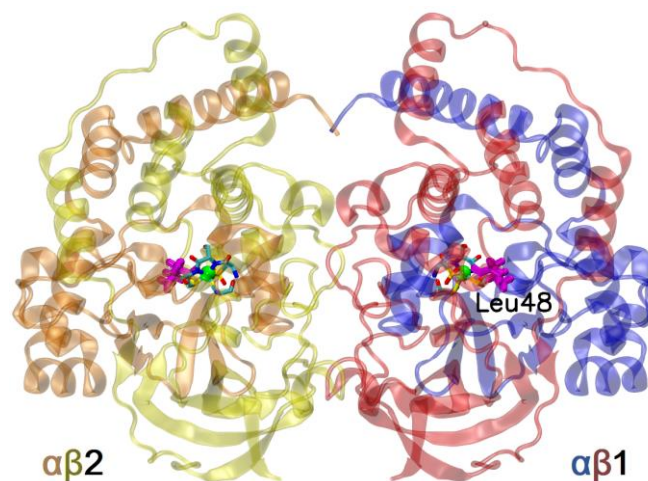
Mutant β Leu48Asp zachował powyżej 80% początkowej aktywności w 60°C przez 2 godziny. Termostabilność była mniejsza niż w WT, jednak ciągle wysoka. Zwykle w przypadku enzymów osiągany jest kompromis pomiędzy stabilnością, a aktywnością, ponieważ zwiększenie jednego parametru może negatywnie wpływać na drugi. Mutant charakteryzował się 7.7 razy większą aktywnością względem 3-cyjanopirydyny niż enzym typu dzikiego (Tab 5.2), a 80% początkowej aktywności to dalej znacznie większa aktywność po 2 godzinach w 60°C w stosunku do WT.

Wykonano 200 ns symulacje dynamiki molekularnej dla mutantu L48D. RMSD było podobne dla obu białek (Rysunek 5.2). Nie przekraczało ono 3.25 Å. Świadczy to o właściwej stabilności symulacji. Średnia dla podjednostki α wynosiła 1.61 ± 0.98 Å i 1.47 ± 0.95 odpowiednio dla WT i mutantu. Średnie dla podjednostki β były podobne. Glutamina α Gln93 jest kluczowa dla aktywności enzymu. Aminokwas ten w NHazie L48D charakteryzował się niższymi fluktuacjami niż w białku typu dzikiego. Wskazuje to na wpływ stabilizujący mutacji. RMSF wskazywało, że obydwa białka były stabilne. Średnie wartości RMSF dla łańcucha β wynosiły 2.32 ± 1.21 Å i 2.25 ± 1.14 Å dla WT i mutantu. Zbadano tunel za pomocą programu CAVER. Mutacje zostały wprowadzone wewnątrz kanału dla substratu. Żeby wyjaśnić zwiększenie aktywności, zanalizowano ich wpływ na jego strukturę.

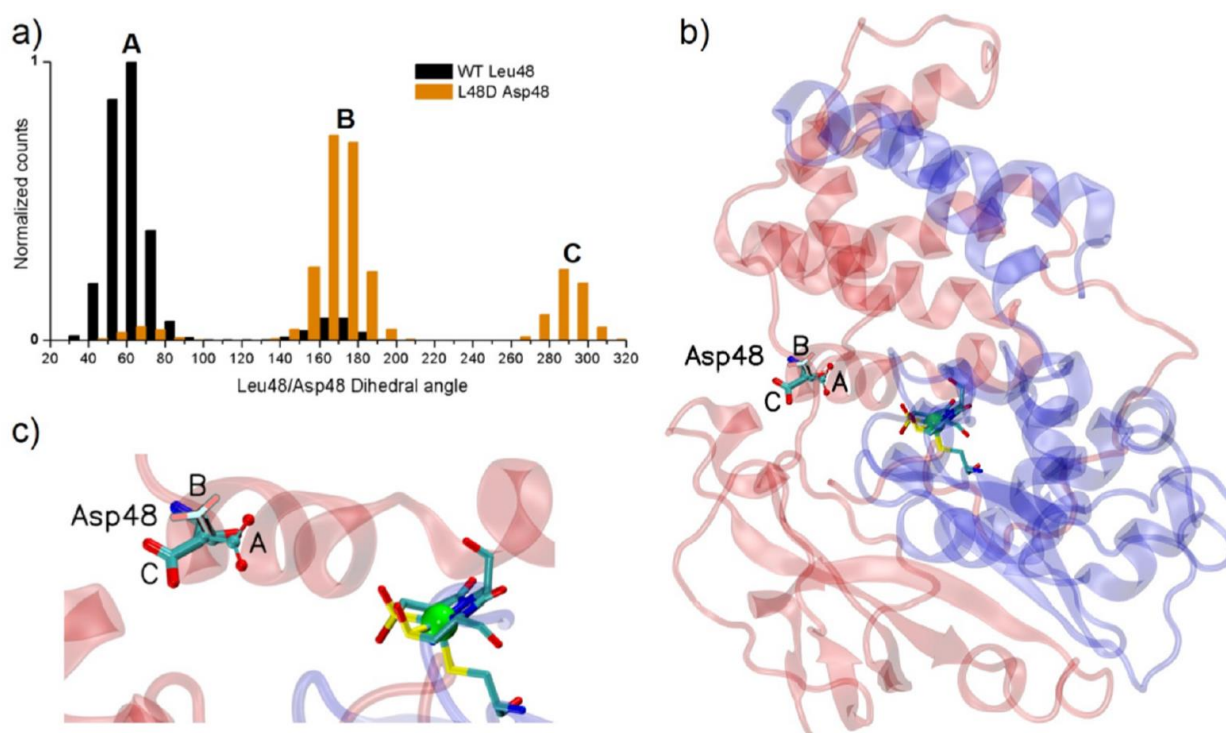


Rysunek 5.2 RMSD i RMSF NHazy natywnej i mutantu β L48D dla α a) oraz β b), rys. z [22].

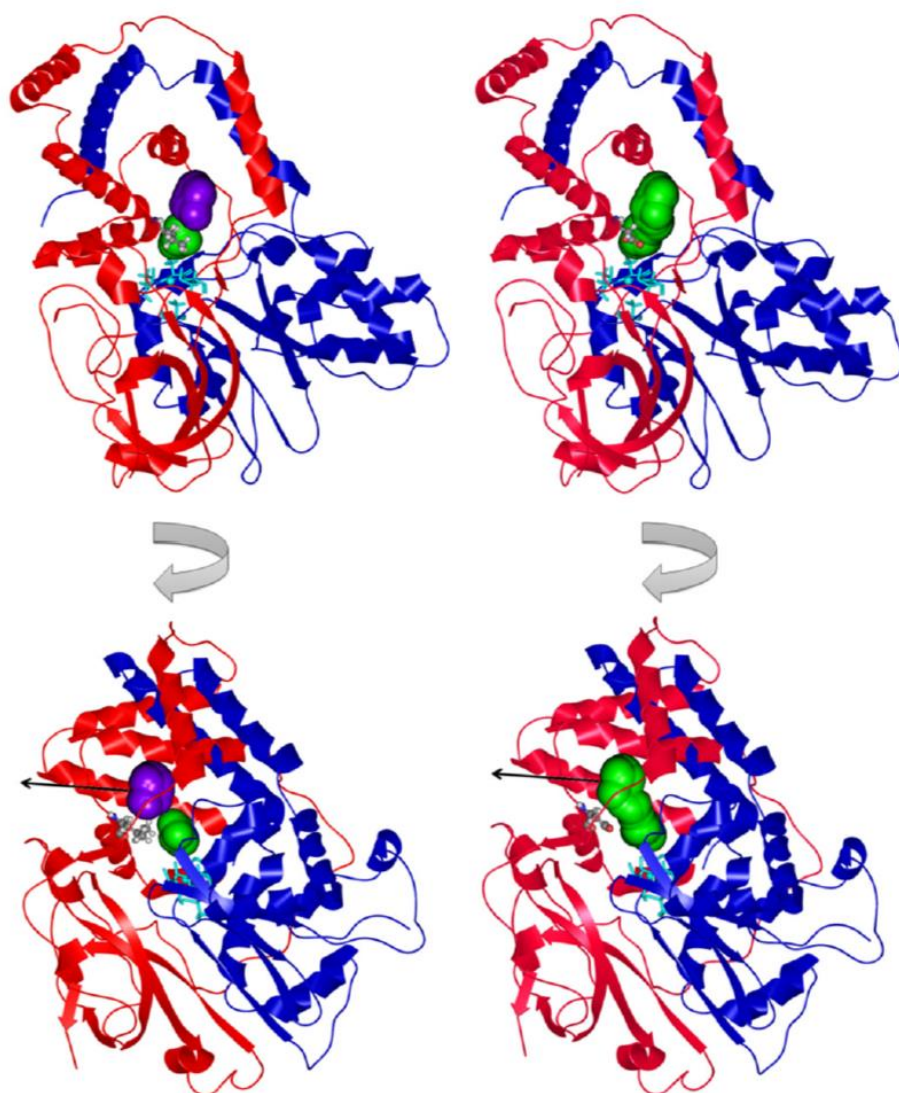
Leu48 jest dużym, hydrofobowym aminokwasem położonym na wejściu do centrum katalitycznego enzymu (Rysunek 5.3). Ustanawia ona wejście do centrum aktywnego i rozdziela przestrzeń na dwie wnęki. Analiza kąta $C-C\alpha-C\beta-C\gamma$ pokazuje, że leucyna jest zwykle w stanie A (kąt $50-70^\circ$). Czasem przechodzi ona do stanu B ($160-180^\circ$, Rysunek 5.4). W tym stanie dwie wnęki zlewają się i tworzą jedną (Rysunek 5.5). Reszta Asp48 jest bardzo rzadko w stanie A, bo jest bardzo hydrofilowa i preferuje ułożenie zorientowane w stronę substratu. W ok. 20% symulacji Asp48 znajduje się w stanie C (Leu 48 nie przyjmuje tego stanu wcale, Rysunek 5.4). W tym stanie Asp48 podobnie jak w stanie B nie dzieli kanału na dwie części oraz jest stabilizowany przez wiązanie wodorowe poprzez cząsteczkę wody z Arg52, która jest silnie konserwowana i ważna dla aktywności katalitycznej (Rysunek 5.6), [183]. Co ciekawe Asp48 jest bardzo rzadko w stanie A, bo jest hydrofilowy i preferuje orientację w stronę rozpuszczalnika.



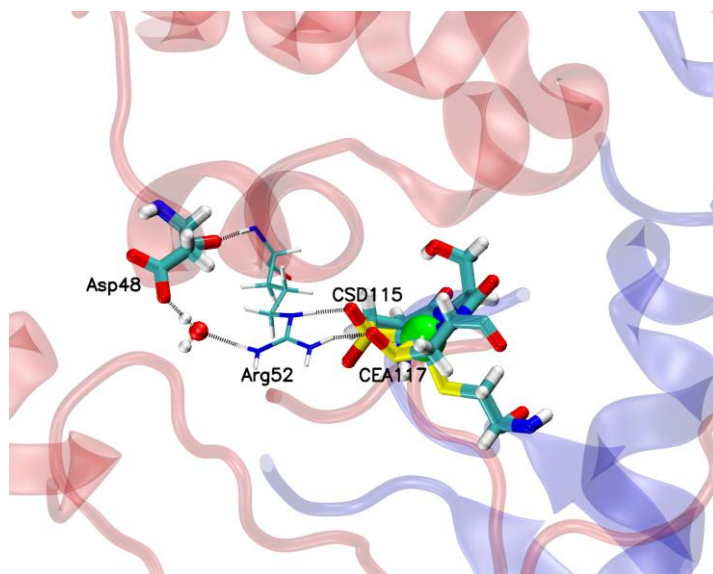
Rysunek 5.3 Model NHazy z zaznaczonym centrum aktywnym i β L48, według [22].



Rysunek 5.4 Porównanie NHazy a) histogramy kątów dwuściennych Leu/Asp ($C-C\alpha-C\beta-C\gamma$), pokazujące Leu48 w dwóch stanach (A i B) i Asp48 w trzech stanach (A, B, C) b) Ułożenie Asp48 i c) widok przybliżony, rys. z [22].



Rysunek 5.5 Wnęki centrum aktywnego policzone przez program CAVER. Po lewej stronie wariant WT, po prawej stronie β L48D. Wyjścia z białka zaznaczone strzałkami. Centra aktywne zaznaczone na kolor niebieski. Dolne panele obrócone są względem pionowej osi o 90° w stosunku do górnych paneli. Miejsce mutacji zaznaczone jako kulki i pręty [22].



Rysunek 5.6 Asp48 w stanie C, ustabilizowany przez pośredniczone przez wodę wiązanie z Arg52, rys. z [22].

Przestrzeń centrum katalitycznego dla białka WT miała około $143.5 \pm 52.7 \text{ \AA}^3$, natomiast dla mutantu $285.1 \pm 133.4 \text{ \AA}^3$. Wynikało to z połączenia dwóch wnęk. W 30% przypadków, wnęka została określona jako kieszeń (czyli wnęka, która ma bezpośrednie połączenie z roztworem - solwentem). Sprawdzono to za pomocą programu CAVER. Zwiększenie objętości przestrzeni nad centrum aktywnym może polepszyć aktywność katalityczną enzymu dla dużych substratów. Okazało się, że mutant, który katalizował konwersję 3-cyjanopirydyny 7.7 razy skuteczniej niż typ dziki. Kieszeń może zostać zdefiniowana w odniesieniu do promieni sferycznych prób (większej i mniejszej). Kieszeń to przestrzeń, gdzie może wejść mała sfera ale nie może wejść duża sfera i mała sfera nie może wejść z nią w kolizję [184].

Bakterie termofilne posiadają białka przystosowane do pracy w wysokich temperaturach. Często występuje kompromis pomiędzy aktywnością białka a jego termostabilnością. *PtNHaza* nie charakteryzowała się najlepszą aktywnością. Udało się zmodyfikować enzym i poprawić jego aktywność bez utraty termostabilności. Co ciekawe, jedna mutacja nie była najlepsza dla wszystkich substratów. Każdy substrat miał inną mutację, przy której parametry reakcji były optymalne. Za pomocą MD został wyjaśniony mechanizm poprawy aktywności u mutantu Leu48Asp.

Głównym wnioskiem z tej części badań jest spostrzeżenie, że można w oparciu o symulacje MD zaprojektować wariant enzymu o polepszonych właściwościach fizykochemicznych.

Rozdział 6. Analiza wyników symulacji dla Problemu B: poprawa termostabilności

6.1 Wprowadzenie

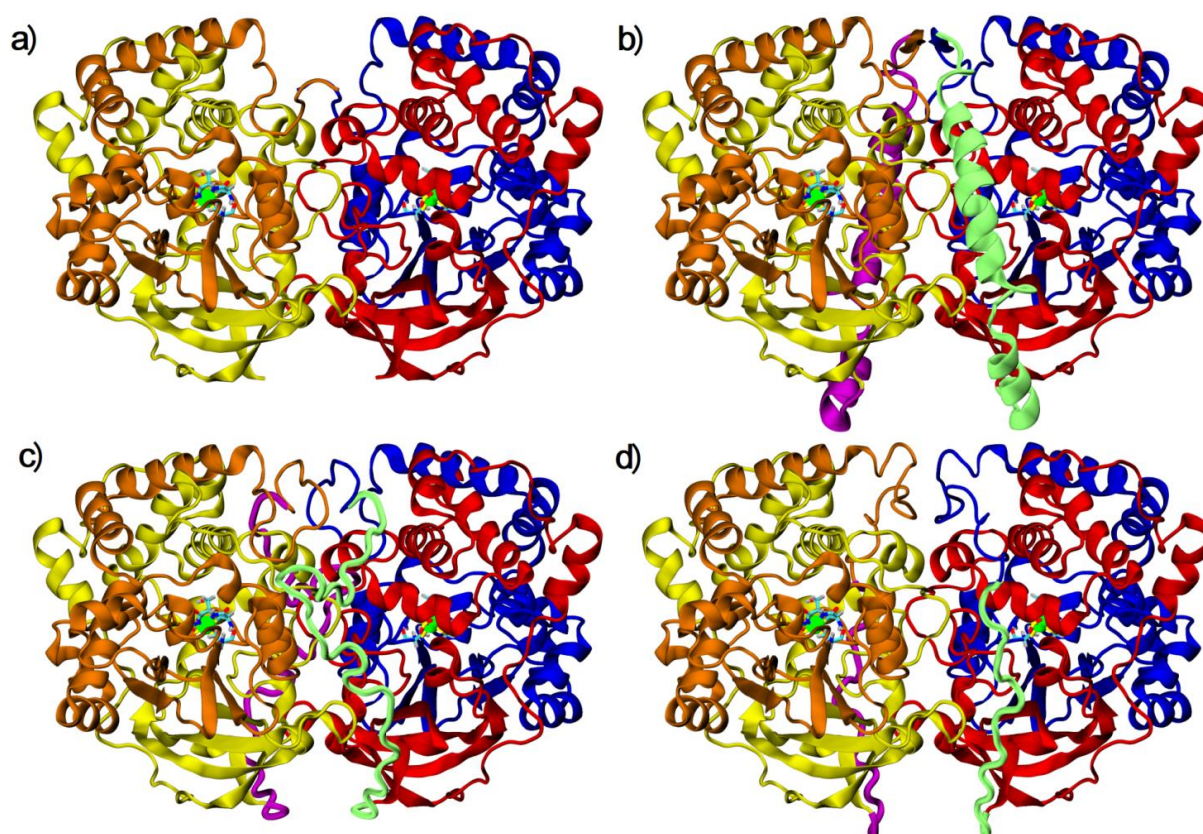
W rozdziale tym opisane są próby uzyskania zwiększonej termostabilności NHazy poprzez dodanie metodami inżynierii białek fragmentów nieobecnych w natywnych białkach. Ponieważ NHaza, aby być aktywna, musi być w formie tetramerycznej, postanowiono połączyć wybrane podjednostki za pomocą fragmentów peptydowych zwanych dalej linkerami. Badania doświadczalne, inspirowane m.in. sugestiami opartymi na obliczeniach przeprowadzonych w głównej mierze przez dr hab. Łukasza Peplowskiego, z pomocą Autorki (JB), zrealizowano w Chinach, w grupie prof. Zhou. Wyniki opublikowano w artykule [20], na którym opiera się ten rozdział.

6.2 Rozwiązanie Problemu B: Poprawa termostabilności NHazy poprzez zastosowanie linkerów

Aktywny wariant NHazy, do poprawnej pracy musi mieć strukturę tetrameryczną $\alpha\beta\beta\alpha$ [59]. NHaza rozpada się pod wpływem odpowiednio wysokiej temperatury. W zależności od organizmu z jakiego pochodzi temperatura ta może wynosić od 20°C do 60°C [50]. Często rozplatanie białka zaczyna się od N-końca lub C-końca. Można przypuszczać, że bezpośrednie połączenie podjednostek $\alpha\beta$ lub za pomocą pewnej struktury peptydowej (linkera) może sprawić, że NHaza stanie się bardziej termostabilna. Wcześniej dokonano połączenia podjednostek NHazy z *P. putida* za pomocą linkerów [17, 185]. Żeby sprawdzić jakie linkery okażą się najlepsze, przetestowano trzy podstawowe typy i długości linkerów. Długość oznacza ilość powtórzeń określonych aminokwasów w linkerze. Typ A był linkerem helikalnym EAAAK (litery odpowiadają oznaczeniom aminokwasów, GluAlaAlaAlaLys), typ B, linkerem elastycznym GGSG (GlyGlySerGly) i typ C, sztywnym, PA (ProAla). Każdy z linkerów został powtórzony określoną liczbą razy (1, 4, 8, 16). Aktywność katalityczna NHazy z dodanymi linkerami była nieznacznie większa od białka natywnego. W przypadku linkerów A oraz C spadała wraz z ilością powtórzeń pojedynczego motywu (patrz Tabela 6.1) w przypadku linkera B1 aktywność wzrosła po wydłużeniu linkera z 1 powtórzeń ale już w przypadku 4 i 8 powtórzeń pozostała bardzo podobna. Dane doświadczalne pokazały że wydłużenie linkera do 16 powtórzeń w każdym przypadku powodowało wytrącanie się nierozpuszczalnych frakcji w bakteriach i ograniczało to ekspresję NHazy [20]. Termostabilność zawsze rosła wraz z długością linkera, ale w związku z problemami

z ekspresją dla linkerów z 16 powtórzeniami dla tego wariantu aktywność i termostabilność nie była badana. Największą stabilnością termiczną wykazywała się NHaza z linkerem A8. W temperaturze 50°C, wykazywała ona połowę swojej początkowej aktywności po 139 minutach, podczas gdy WT połowę aktywności w tej temperaturze miał po 18 min.

Zbadano NHazę z linkerami A8 B8 i C8 (zbudowane modele zaprezentowano na Rysunek 6.1). Dokonano analizy eksperymentalnej i komputerowej analizy strukturalnej. K_{cat} była 2.2, 2.6, 2.4-krotnie wyższa niż WT. Stałe Michaelisa (K_M) były wyższe u mutantów. Stała Michaelisa to stężenie substratu, przy którym szybkość reakcji jest równa połowie szybkości maksymalnej (im jest niższa, tym wyższe jest powinowactwo substratu do enzymu). Aktywność względna wynosiła 89%, 90% i 86% po traktowaniu 0.5 M 3-cyjanopirydyną, podczas gdy aktywność WT wynosiła 30%. Po potraktowaniu 0.5 M nikotynamidem aktywność względna wariantów A8, B8, i C8 wynosiła 80%, 94%, 86% a WT charakteryzował się aktywnością 77%.



Rysunek 6.1 a) struktura białka natywnego b) z linkerem A8 c) z linkerem B8 d) z linkerem C8. Linkery oznaczono kolorem zielonym oraz fioletowym, rys. z [20].

Tabela 6.1. Aktywność specyficzna i termostabilność NHazy WT i mutantów z linkerami [20]

Enzym	$V_{\max}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{s}^{-1}\cdot\text{mM}^{-1}$)
WT	2.6±0.2	35.2±8.9	407.5±56.2	11.6
0	6.6±0.7	103.8±29.0	1047.5±68.4	10.1
A8	5.2±0.5	57.8±15.9	886.3±38.8	15.3
B8	6.3±0.8	96.6±21.3	1041.3±115.4	10.8
C8	6.0±0.3	75.4±10.3	976.8±45.2	13.0

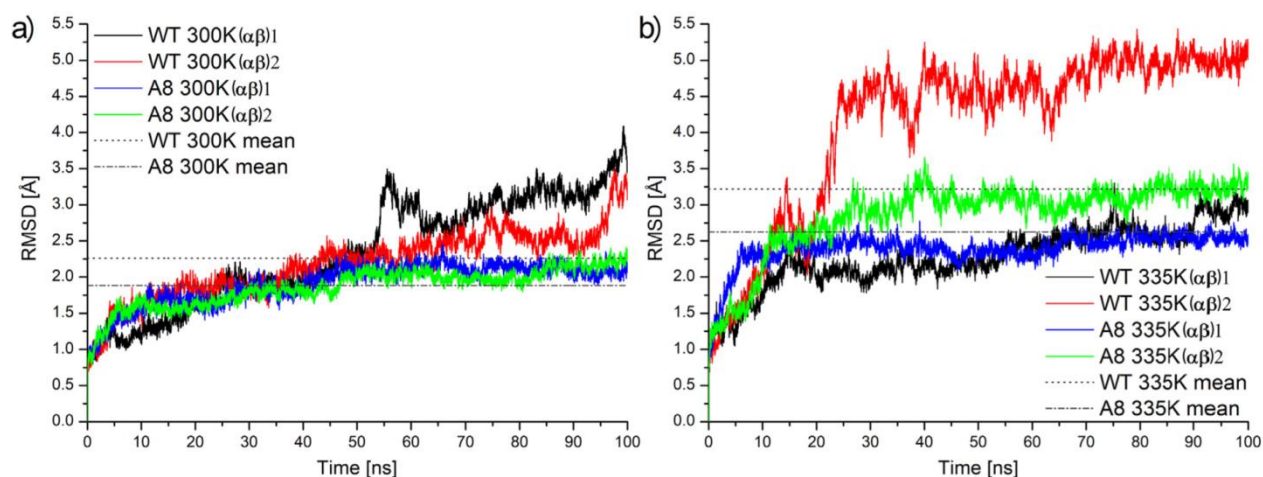
Struktury zaprezentowane na Rysunek 6.1 zostały otrzymane za pomocą programu ClusPro i Schrödinger Prime. U mutantu A8 znaleziono 8 mostków solnych, podczas gdy u pozostałych mutantów nie znaleziono tych mostków. Mutant B8 miał najwięcej wiązań wodorowych (Tab. 6.2). Liczba kontaktów niewiążących wynosiła 301 u WT. U C8 liczba ta spadła. U A8 i B 8 zaobserwowano jej wzrost. Pole interfejsu wzrosło u wszystkich mutantów w porównaniu do WT. Najniższa była u C8 a potem wyższa kolejno u B8 i A8. Pole powierzchni zawierające aminokwasy polarne wykazywało podobną tendencję. Pole powierzchni zawierające aminokwasy niepolarne wzrastało w podobny sposób.

Tabela 6.2. Oddziaływania linkera z białkiem [20], SB – salt bridges czyli mostki solne

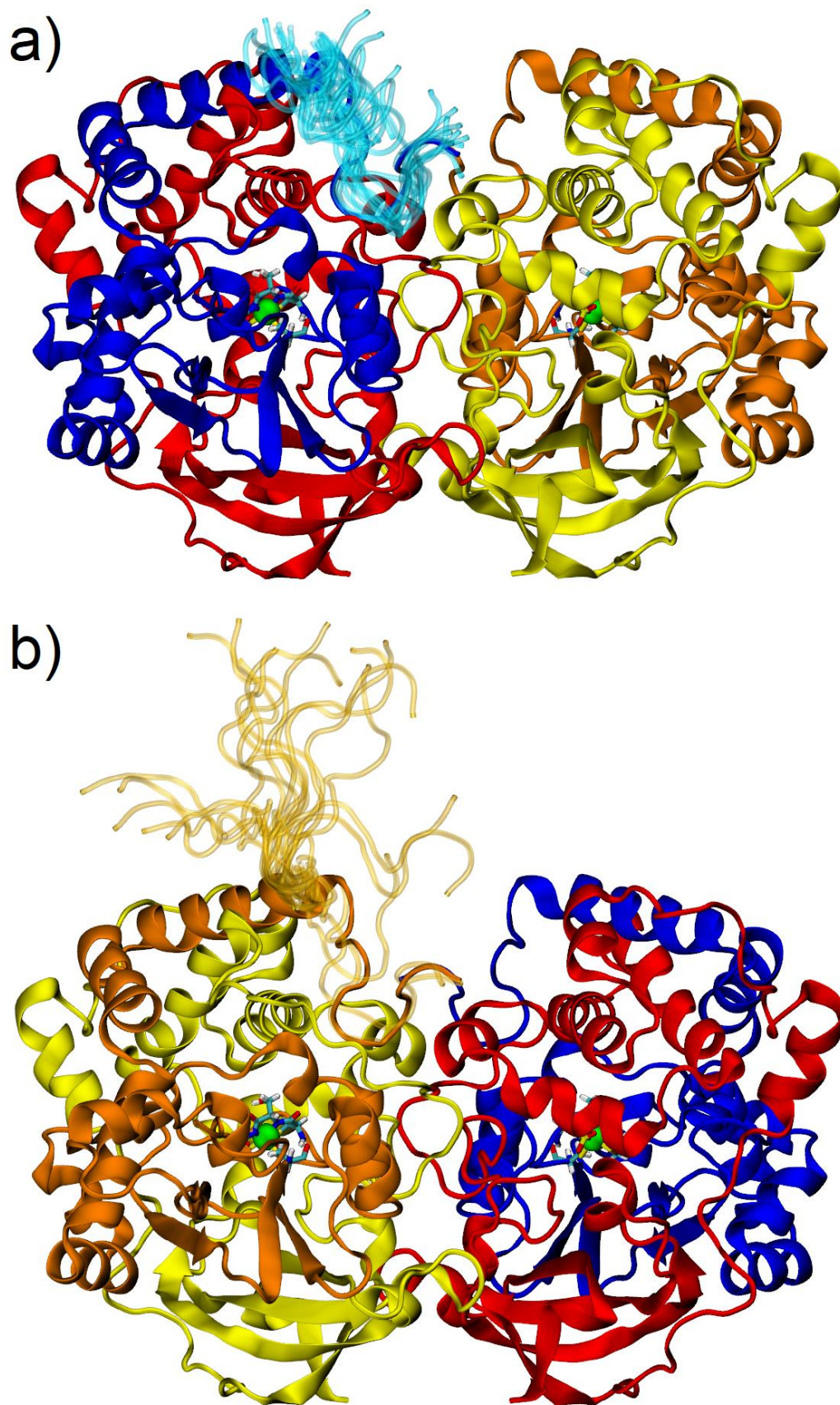
Linker	Liczba SB**	Liczba HB**	Liczba kontaktów niewiążących h **	Pole interfejsu [$\text{\AA}^2$]***	Pole interfejsu polarnego [$\text{\AA}^2$]***	Pole interfejsu nie polarnego [$\text{\AA}^2$]***
0	1	22	301	1596	1002	594
A8	8	17	435	2643	1799	844
B8	0	25	390	2148	1273	875
C8	0	14	291	1635	1117	518

Ponieważ linker w wariantcie A8 charakteryzował się największą termostabilnością symulacje MD wykonano tylko dla niego oraz w celu porównania danych dla wariantu

dzikiego (WT) Symulacje MD wykonano w temperaturze 300 K i podwyższonej 335 K. RMSD dla NHazy z linkerem A8 było niższe niż dla enzymu WT w 300 K (Rysunek 6.2). Po 54 ns RMSD wzrosło, co było spowodowane częściowym rozplataniem N-końcowej pętli w podjednostce α . W temperaturze 335 K można zauważyć znaczący skok RMSD dla NHazy WT dla $\alpha\beta 2$ przez rozwijanie N-końca podjednostki α , który dla mutantu nie występuje. Średnie RMSD było niższe dla mutantu. Rozplatanie N-końcowych pętli w wariantie WT pokazano na Rysunek 6.3.

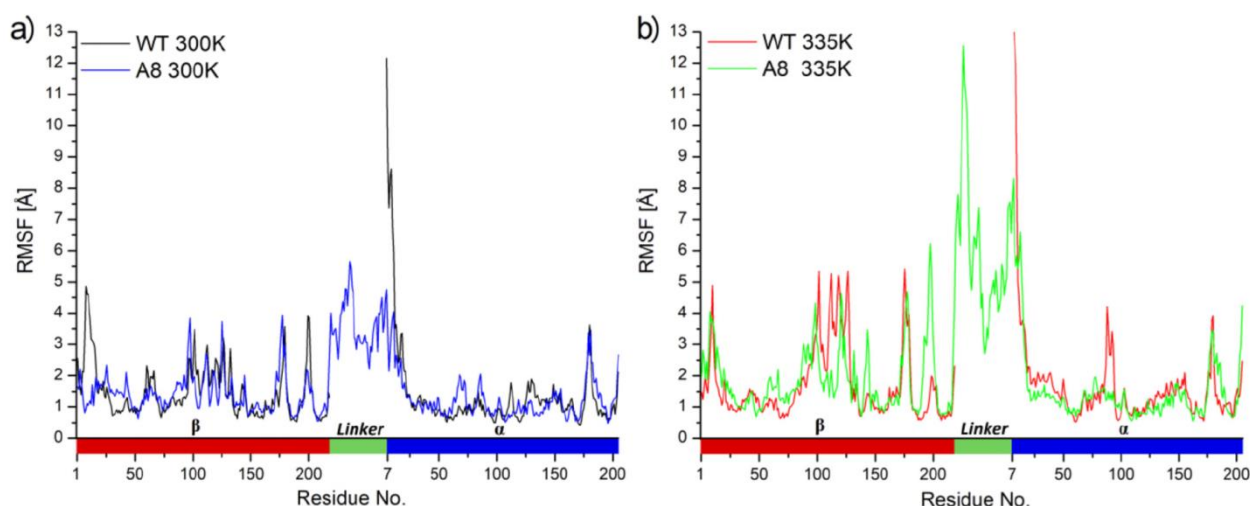


Rysunek 6.2 RMSD NHazy natywnej (WT) i mutantu a) w 300 K (27°C) b) w 335 K (62°C), z [20].



Rysunek 6.3 Zmiany pętli N-końcowej z łańcucha α a) w 300 K b) w 335 K. „Ramki” generowane co 5 ns.

Wartości RMSF były podobne dla mutantu i białka typu dzikiego, z wyjątkiem β Ala200 oraz β Ser201 (Rysunek 6.4). Te reszty aminokwasowe są usytuowane na pętli i wyeksponowane do roztworu, jednakże w wariantcie A8 β Ala200 tworzyła interakcje hydrofobowe z dwiema alaninami z linkera (L Ala13 i L Ala14, w celu wskazanie, że aminokwas pochodzi z linkera stosować będziemy przed nim literę L) i dlatego w NHazy A8 fluktuacje były niższe. W 335 K cały region mutantu od β Val193 do β Ser201 charakteryzował się wyższymi fluktuacjami niż białko typu dzikiego. Wyższe fluktuacje wskazują na zmianę strukturalną zachodzącą w białku. Aminokwasy (reszty β Leu195, β Trp196, β Ala200, L Ala 234, L Ala237, L Ala 238) przesunęły się bliżej do linkera z podjednostek CD ($\alpha\beta$)2 i utworzyły z nim rdzeń hydrofobowy.



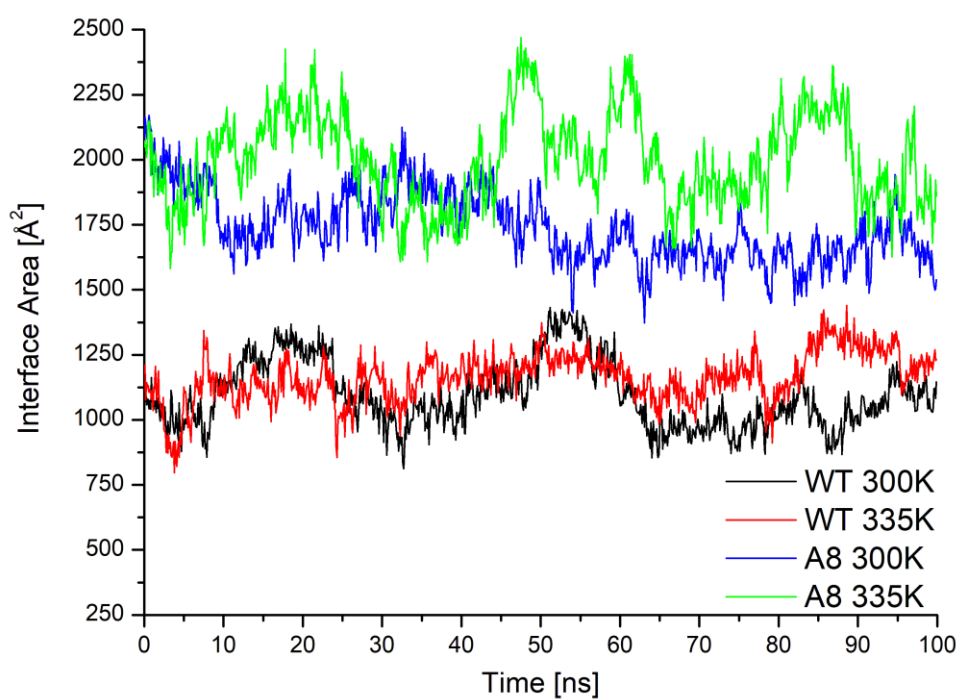
Rysunek 6.4 RMSF dla NHazy typu dzikiego i mutantu a) w 300 K i b) w 335 K [20].

Region od α Phe89 do α Glu95 w białku A8 charakteryzował się niższymi fluktuacjami. Wszystkie te aminokwasy są na pętli i α Gln93 (89 w 1IRE) są bardzo istotne dla aktywności katalitycznej enzymu. Obniżenie fluktuacji może być spowodowane zwiększoną liczbą wiązań wodorowych, która wzrosła o 45% w porównaniu do symulacji WT w 335 K. Lepsza stabilizacja tego regionu może prowadzić do zwiększonej aktywności katalitycznej. Wysoka wartość RMSF dla linkera wskazuje na jego dużą ruchliwość lub elastyczność [20].

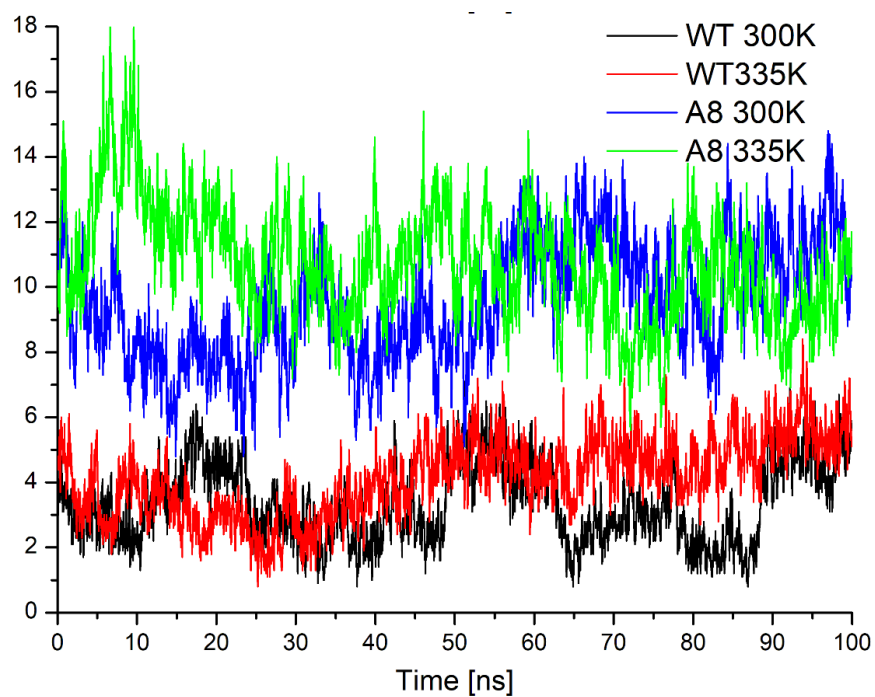
Linker charakteryzował się wysokimi fluktuacjami. Może to świadczyć o dopasowywaniu linkera do NHazy. W 335 K doszło nawet do jego częściowego rozfałdowania zwłaszcza w części położonej blisko C-końca łańcucha β . Nie wpłynęło to na podjednostkę β ale spowodowało utworzenie rdzenia hydrofobowego β Leu195, β Trp196, β Ala200 i utworzeniu mostka solnego β Lys142– L Glu12 mostka solnego [186].

Także interfejs pomiędzy podjednostkami $\alpha\beta\alpha$ zwiększył się w NHazie A8. Dla WT średnie wartości wynosiły $1093 \pm 128 \text{ \AA}^2$ i $1163 \pm 96 \text{ \AA}^2$ podczas symulacji w 300 K i 335 K a dla A8 $1741 \pm 136 \text{ \AA}^2$ i $2001 \pm 177 \text{ \AA}^2$ (Rysunek 6.5). Liczba wiązań wodorowych pomiędzy podjednostkami wzrosła z 3.4 do 9.5 w 300 K i z 4.11 do 10.7 w 335 K (Rysunek 6.6). Znaleziono także więcej mostków solnych pomiędzy podjednostkami. Największą stabilnością charakteryzowały się mostki Llys36- β Glu65, α Arg138- α Glu194 i α Arg152- β Asp6. W sumie znaleziono 10 mostków solnych pomiędzy dwoma dimerami, podczas gdy u WT ich liczba rzadko dochodzi do trzech. Prowadziło to do zwiększenia siły oddziaływania pomiędzy dimerami i w konsekwencji podwyższenia termostabilności.

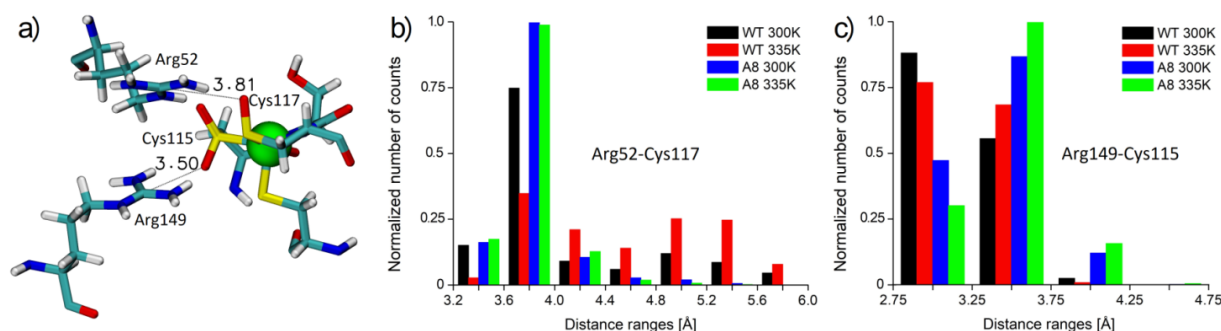
Zmierzono odległość pomiędzy istotnymi katalitycznie resztami aminokwasowymi (β Arg52 - β Arg149, oraz α Cys117 - α Cys115). β Arg52 i β Arg149 koordynują utlenione cysteiny centrum aktywnego, α Cys117, α Cys115 i wykazano wcześniej ich istotny wpływ na reakcję enzymatyczną [183]. Według struktury krystalicznej WT odległości β Arg52 - α Cys115 powinna wynosić $3.81 \text{ \AA}$ a β Arg149 - α Cys117 $3.5 \text{ \AA}$ (Rysunek 6.7 a). Widać że w temperaturze 300K w WT najczęściej występuje ta odległość, (Rysunek 6.7 b) jednak ze wzrostem temperatury występowanie tej odległości zanika i w większości przypadków jest znacznie większa. W wariancie z linkerem A8 w obu temperaturach widzimy najczęściej odległość tą zbliżoną do tej w kryształach (Rysunek 6.7 b). Podobnie w przypadku odległości pomiędzy aminokwasami β Arg149 - α Cys117 w WT widzimy, że wariant z linkerami najczęściej zachowuje odległości podobne do kryształu, i to w obu temperaturach (Rysunek 6.7 c) natomiast WT ma tendencję do skracania odległości między tymi dwoma aminokwasami. Sugeruje to że linker pozytywnie wpływa na stabilizację kluczowych dla katalizy arginin w pobliżu centrum katalitycznego [20].



Rysunek 6.5 Pole kontaktu pomiędzy dwoma dimerami w WT i A8 w 300 K i 335 K [20].



Rysunek 6.6 Liczba wiązań wodorowych w WT i A8 w 300 K i 335 K podczas symulacji MD pomiędzy dwoma dimerami.

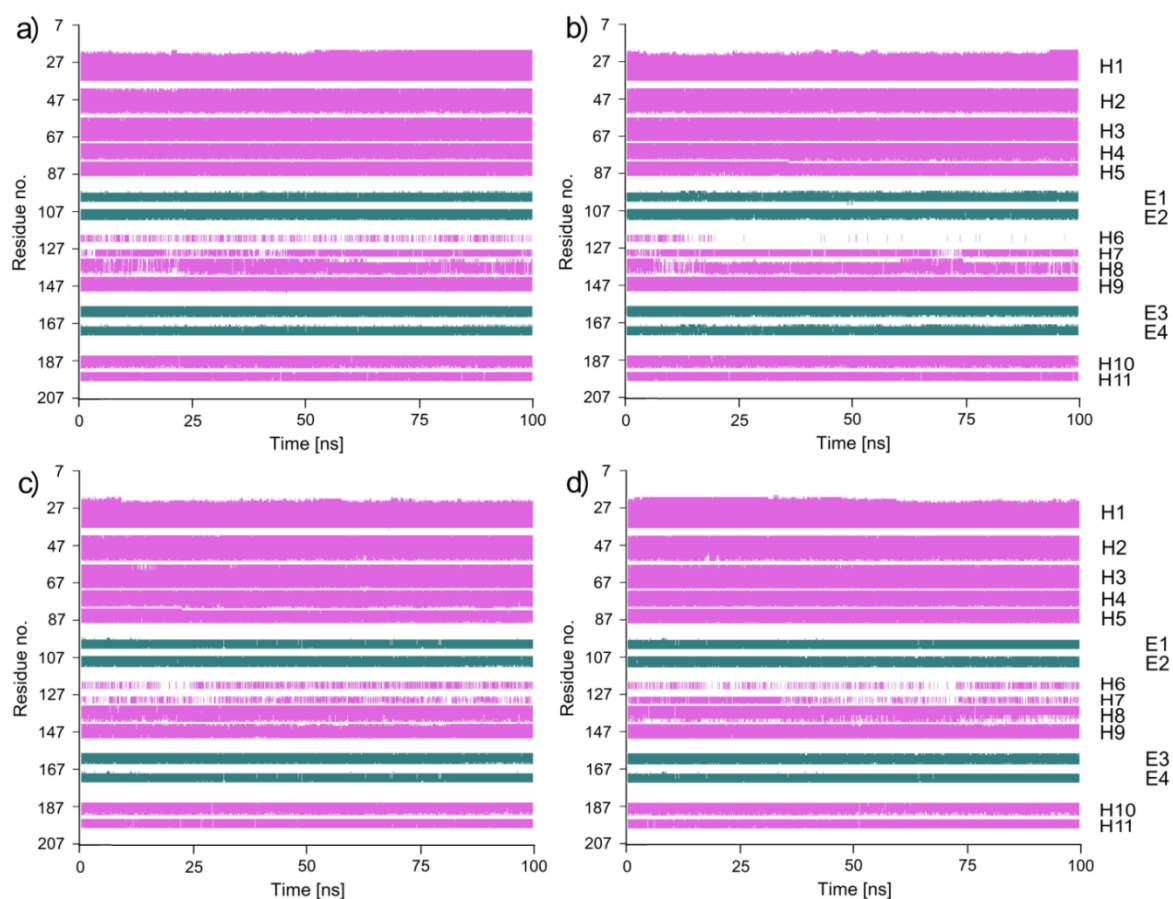


Rysunek 6.7 Analiza struktury centrum aktywnego u WT i mutantu A8 a) Centrum aktywne z β Arg52, β Arg149, i zaznaczonymi α Cys117, α Cys115, struktura krystalograficzna b) histogram odległości C γ β Arg52 i O δ Cys117 c) histogram odległości C γ β Arg149 i O δ Cys115, rys. z [20].

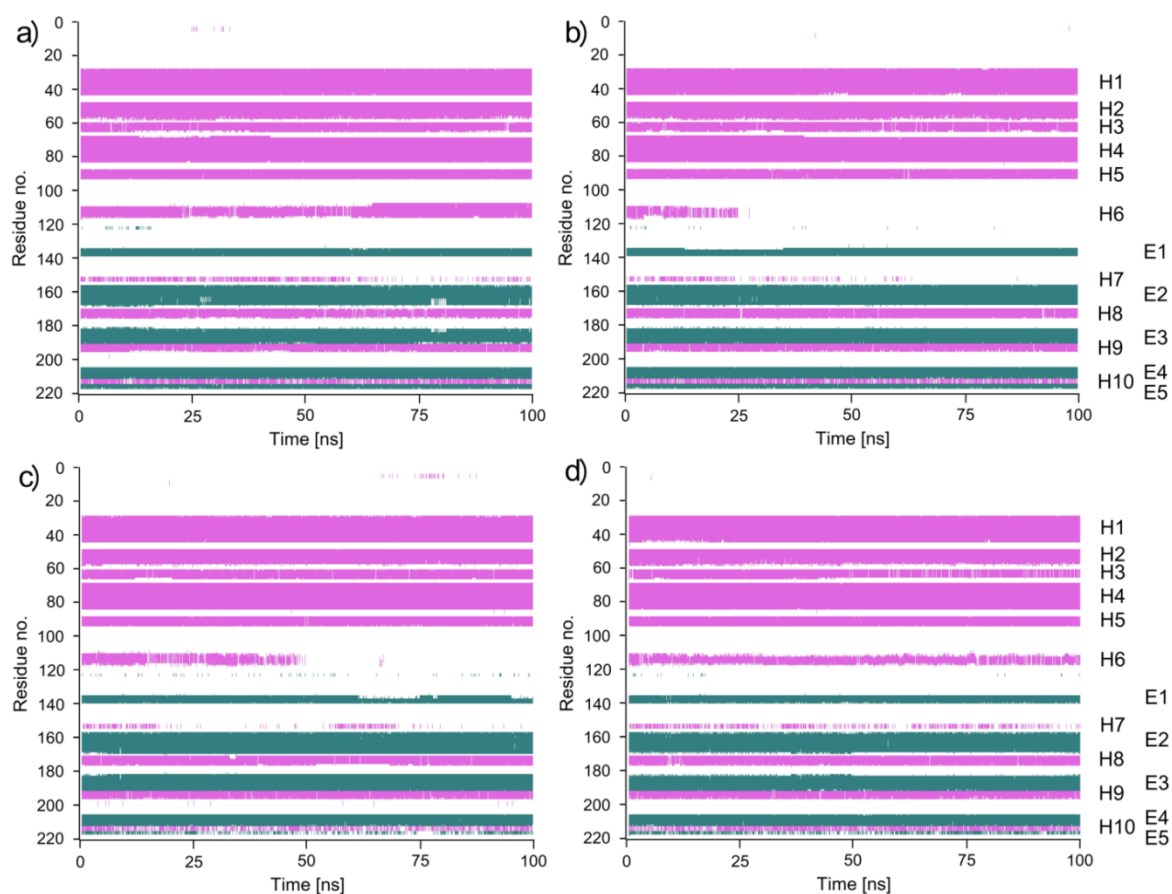
Zbadano także strukturę drugorzędową białka (ta część analizy nie została finalnie umieszczona w publikacji [20]). Wyniki wskazują, że struktura jest bardziej zachowywana w enzymie A8 niż WT. Struktura drugorzędowa łańcuchów α była bardzo podobna podczas symulacji w 300 K (Rysunek 6.8-Rysunek 6.11) prezentują ewolucję struktur drugorzędowych dla *PpNHazy* i mutantu A8. Różnice mogą zostać znalezione w przypadku krótkiej helisy H6 (aminokwasy 120-124). Ta helisa jest bardzo niestabilna we wszystkich symulacjach, a w łańcuchu $\alpha 2$ nawet znika całkowicie. U mutantu A8 w przypadku łańcucha $\alpha 2$ tworzy się nowa helisa (reszty 181-185) pomiędzy β -nicią 4 i helisą H10. Jest obecna przez ok 50 ns. β -kartki są stabilne przez całe symulacje. Łańcuch α jest dyskutowany jako bardziej stabilny [19, 187-189]. Może to być zauważone na wykresach RMSF.

Więcej różnic występuje w przypadku łańcucha β . Helisa H6 (reszty 108-117) wydaje się być wrażliwa na temperaturę. U WT znika po 25 ns i w jednej podjednostce w A8 po 50 ns. Co ciekawe, jest ona obecna we wszystkich symulacjach w 335 K u WT i A8. Helisa H6 jest połączona z resztą białka przez długie pętle. Te pętle w wyższej temperaturze stają się bardziej elastyczne, a helisa 6 nie jest rozciągliwa. Niestabilność tej części może być zauważona na Rysunek 6.2 z RMSF, gdzie wartości RMSF są znacząco podwyższone względem reszty podjednostki β , szczególnie w 335 K. Pei i in zamienili tę helisę na helisę z enzymu z *Aurantimonas manganoxydans* ATCC BAA-1229 i zwiększyli termostabilność [190]. To odkrycie pokazuje, że nasze modele są porównywalne z innymi symulacjami MD. Helisa H6 jest zbyt oddalona od linkera A8 żeby została ustabilizowana. Innym przypadkiem różnic w zachowaniu jest helisa H8 (reszty 171-176). Jest obecna cały czas w symulacjach 300 K dla WT i NHazy A8, ale w przypadku symulacji 335K znika lub jest bardzo niestabilna u WT ale u A8 jest obecna cały czas. Ta helisa jest blisko wejścia do centrum aktywnego i dwóch ważnych arginin β Arg52 i β Arg149. W poprzednim badaniu NHazy z *P. thermophila*

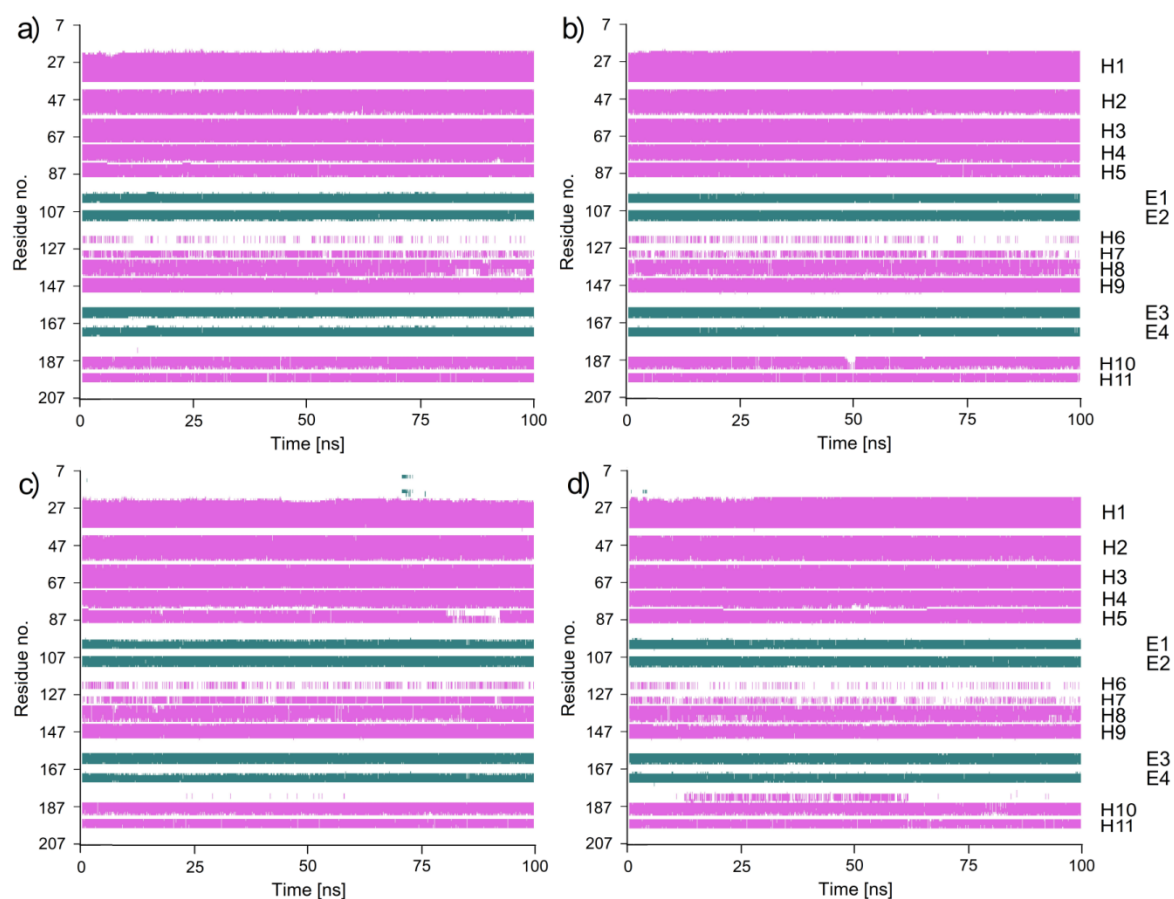
JCM3095 analogiczna helisa rozplatała się w 335 K ale po wprowadzeniu 10 mutacji, z których 2 stabilizowały helisę, termostabilność NHazy zwiększyła się [19]. Inne helisy z łańcucha β zachowują się podobnie we wszystkich symulacjach tak samo jak β -nici. Wyjątkiem jest nić B5 (reszty 216-219). Amino kwas 219 jest bezpośrednio połączony z linkerem i z powodu rozciągania przez linker ta β -nić jest obecna rzadziej.



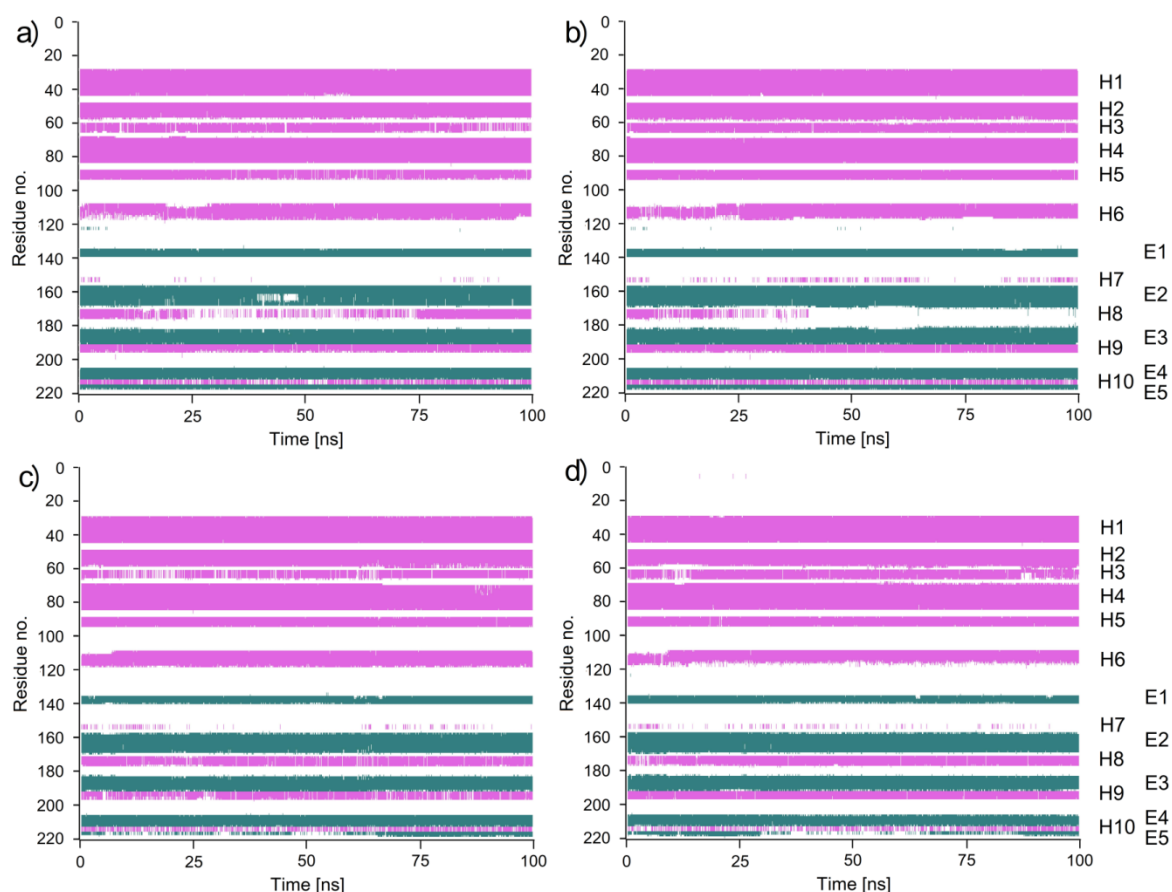
Rysunek 6.8 Ewolucja struktury drugorzędowej w symulacji 300 K a) dla $\alpha 1$ WT b) $\alpha 2$ WT c) $\alpha 1$ A8 d) $\alpha 2$ A8.



Rysunek 6.9 Ewolucja struktury drugorzędowej w symulacji 300 K a) dla β 1 WT b) β 2 WT c) β 1 A8 d) β 2 A8.



Rysunek 6.10 Ewolucja struktury drugorzędowej w symulacji 335 K a) dla $\alpha 1$ WT b) $\alpha 2$ WT c) $\alpha 1$ A8 d) $\alpha 2$ A8.



Rysunek 6.11 Ewolucja struktury drugorzędowej w symulacji 335 K a) dla β 1 WT b) β 2 WT c) β 1 A8 d) β 2 A8.

Efektom przeprowadzonych doświadczeń i obliczeń był optymistyczny wniosek: możliwe jest zaprojektowanie enzymu oparte na przesłankach strukturalnych tak, by był on bardziej dopasowany do wymagań procesu przemysłowego. Istotnymi czynnikami wpływającymi na stabilność NHazy jest struktura dimerów, a także stabilność całego tetrameru [20]. Linkery zapobiegają rozfałdowywaniu N-końcowej części (do pierwszej α -helisy) podjednostki α . Zapobiegają też rozfałdowaniu helisy i pośrednio ją stabilizują. Skutkuje to lepszym zachowaniem struktury drugorzędowej i trzeciorzędowej. Cały dimer jest ustabilizowany. Kolejnym powodem może być stabilizacja tetrameru. N-końcowy fragment wspomnianej podjednostki wchodzi w interakcje z drugim dimerem (CD). Rozplatanie tego regionu może powodować osłabienie spójności tetrameru. Wstawienie linkerów przyczynia się do zwiększenia powierzchni interfejsu oraz stworzenia nowych mostków solnych i wiązań wodorowych. NHaza może być bardziej stabilna w formie tetrameru niż dimeru [19].

Rozdział 7. Analiza wyników symulacji: Badanie przyczyn Problemu C czyli spadku aktywności przy rosnącym stężeniu amidów.

Produkcja akrylamidu w instalacjach biotechnologicznych mogłaby być wydajniejsza, a tym samym tańsza, gdyby nie jeden problem: gdy stężenie produktu (akrylamidu) osiąga wartość 50%, wówczas aktywność wysokowydajnych NHaz spada niemal do zera [4].

Celem badań obliczeniowych, których wyniki prezentowane są w tym rozdziale, była próba odpowiedzi na pytanie: Co dzieje się z NHazą, że w wysokich stężeniach produktu enzym ten przestaje działać? Analizując literaturę można dojść do wniosku, że niektóre warianty NHazy przestają już pracować w stężeniach ok 18-20% produktu. Niektóre, nawet te natywne NHazy są bardzo odporne na dosyć wysokie stężenia [4]. Wiemy, że PtNHaza w wariancie dzikim działa w 20% stężeniu akrylamidu i na pewno przestaje działać w stężeniu 50% akrylamidu [191]. Dlaczego? Przyczyn tej sytuacji może być kilka, najbardziej prawdopodobne hipotezy przedstawiono w Rozdziale 2, przypominamy je poniżej:

- (a) Przyczyną zaniku aktywności jest osiągnięcie stanu równowagi reakcji katalitycznej (prawo działania mas)
- (b) Przyczyną jest zmiana struktury centrum aktywnego indukowana roztworem.
- (c) Rosnące stężenie akrylamidu powoduje „zatkanie” kanałów transportowych i/lub centrum katalitycznego
- (d) Akrylamid indukuje denaturację NHazy.

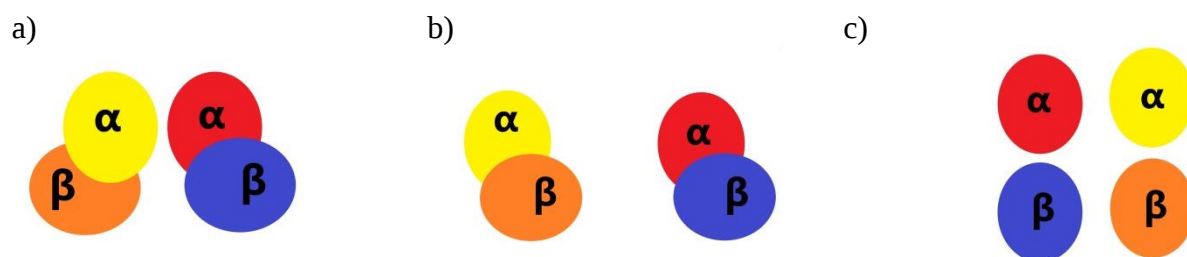
W tym rozdziale prezentowane są nieopublikowane wyniki kilku serii 500 ns symulacji dynamiki NHazy kolejno (1) w wodzie (2) roztworze 4%/10% nitrylu/amidu ACA10 ACN4 (3) roztworze 4%/20% nitrylu/amidu ACA20 ACN4 (4) 20% amidu – ACA20 oraz (5) 50% amidu – ACA50.

Celem obliczeń była próba wychwycenia zmian strukturalnych lub zmian w dynamice enzymu, w warunkach imitujących proces przemysłowy. Ponieważ nie mamy danych technologicznych na temat tego w jakiej temperaturze biosyntezy są prowadzone, założono w symulacjach temperaturę stałą 300K. Według naszej najlepszej wiedzy, poniżej prezentowane są to pierwsze na świecie tak obszerne wyniki symulacji NHazy w rozpuszczalnikach niewodnych. Zhang i in. w roku 2023 opublikowali ocenę wpływu ACA na NHazę w stężonych roztworach, sprawdzając zwiększoną stabilność mutantu α L6T w takim środowisku [191]. Niemal we wszystkich opublikowanych wcześniej badaniach NHazy [6, 8-28] otoczenie składało się wyłącznie z samej wody i odpowiednich przeciwjonów.

7.1 Stabilność tetrameru, dimeru, pojedynczych domen

Modele NHazy oparte na strukturze o kodzie PDB 1IRE z *P. thermophila* zbudowano według procedury opisanej w Rozdziale 4 (Metody). Ocena wpływu rosnącego stężenia produktu na białko była dokonywana w oparciu o szereg parametrów strukturalnych charakteryzujących dynamikę enzymu: RMSD, RMSF, SASA, RoG, wybrane odległości itd. Celem wydobywania tych charakterystyk było porównanie dynamiki białka w czystej wodzie

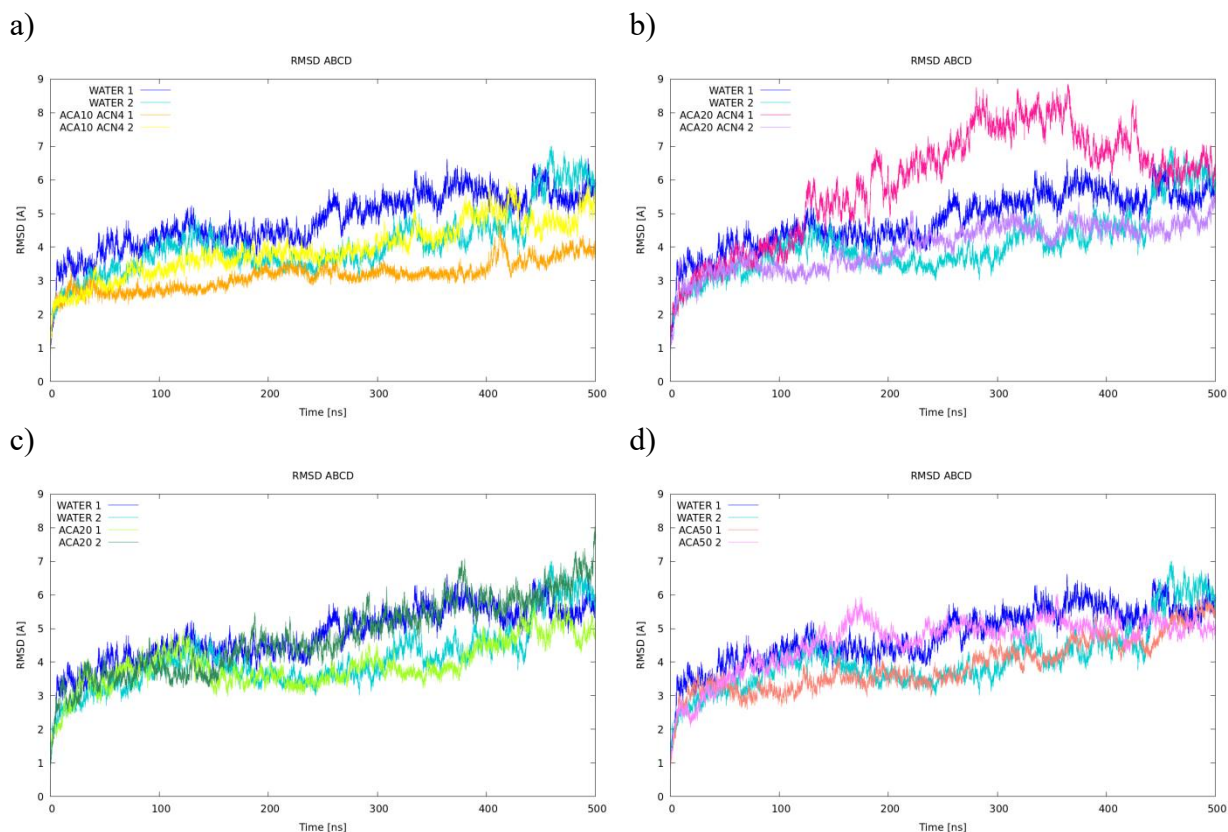
(oznaczanej dalej WAT), w roztworze 4 % ACN + 10% ACA, w roztworze 4 % ACN + 20% ACA, w roztworze 20% ACA oraz w roztworze 50% ACA. Symulacje MD wykonywano zawsze (zobacz protokoły z Rozdziału 4) dla tetrametu $\alpha\beta\alpha$ białka. W tym rozdziale, dla ułatwienia prezentacji i dyskusji wyników wprowadzamy oznaczenia podjednostek literami łacińskimi, odpowiednio A, B, C, D (A, C – są to podjednostki α , zaś B, D – β). Analizy parametrów strukturalnych przeprowadzano jednak różnie: dla tetrameru (całości), dimerów, a w końcu dla pojedynczych domen. Celem tego zabiegu było wyizolowanie efektów „wewnątrzdomenowych” od efektów wzajemnego ruchu domen NHazy. Dla ułatwienia śledzenia dyskusji przedstawiono na Rysunek 7.1 jakościowy schemat tych układów, dla których obliczano poszczególne charakterystyki:



Rysunek 7.1 Ogólna budowa układów NHazy poddawanych analizie: a) tetramer ABCD, b) dwa dimery AB (czerwony/niebieski) i CD (żółty/pomarańczowy), c) cztery monomery A, B, C, D.

7.2 Analiza RMSD dla tetrameru

Model białka IIRE ma 13630 atomów, otoczonych 64425 tysiącami molekuł wody. Wykresy RMSD mierzonego po położeniach atomów szkieletu białkowego tetrametu $\alpha\beta\alpha$, czyli ABCD, dla dwóch trajektorii, dla każdego z 5 badanych roztworów przedstawiono na Rysunku 7.2. Widzimy, że nie wszystkie symulacje są w pełni zbieżne, tzn. w założonym przedziale 500 ns zachodzą procesy reorganizacji struktury. W stosunku do struktury startowej szczególnie duże odchylenia zaobserwowano dla trajektorii WAT1 (faza plateau ok. 5-6 Å, Rysunek 7.2 a)), zaś najmniejsze odchylenia odnotowano dla roztworu ACA20 (faza plateau ok. 4-5 Å, RMSD – Rysunek 7.2 d)).



Rysunek 7.2 Wykresy odległości RMSD (w Å) w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu tetrameru NHazy. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz obie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

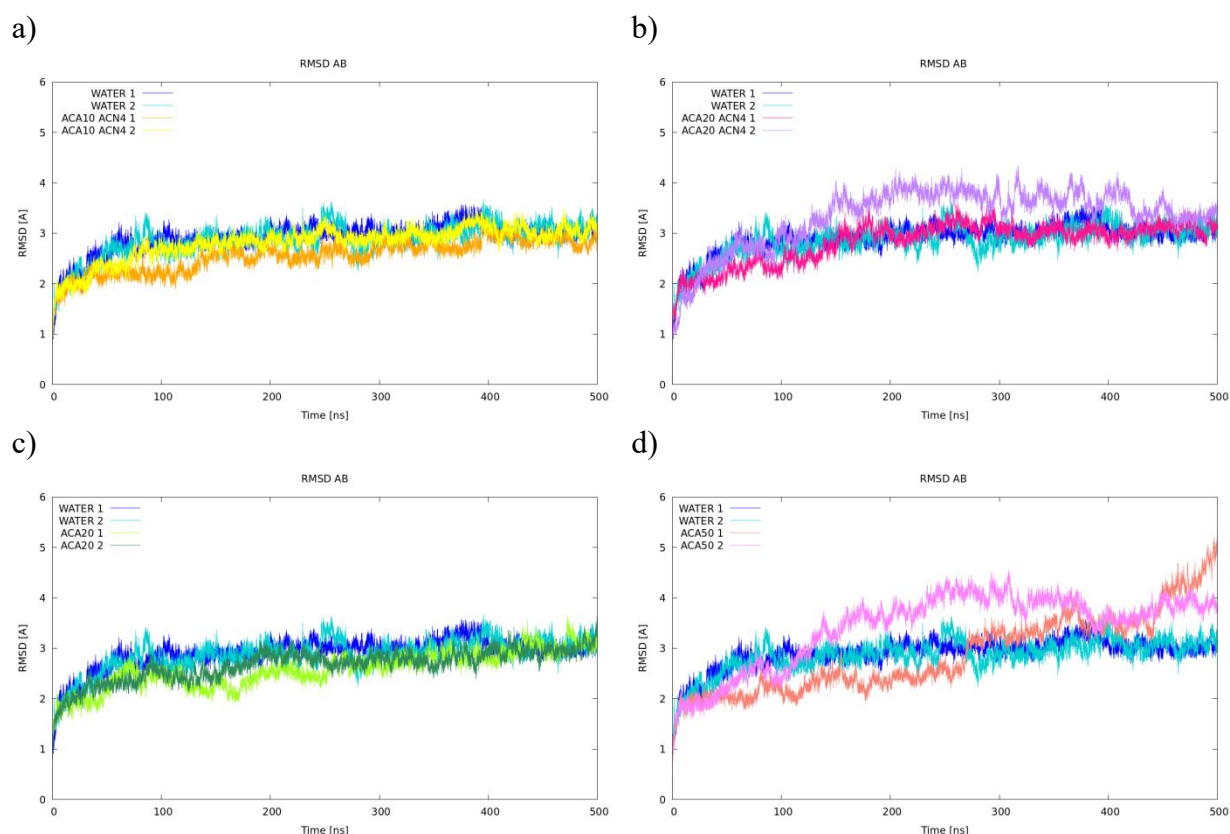
Ten wynik jest zaskakujący, gdyż spodziewalibyśmy się denaturacji w silnie zaburzonym w stosunku do wody roztworze ACA50, a widać, że rosnące stężenie akrylamidu działa wręcz stabilizująco. Może zmienia się lepkość roztworu, ale to wymagałoby odrębnego badania doświadczalnego. Różnice pomiędzy poszczególnymi powtórzeniami symulacji też są na ogół duże, co nie jest zaskoczeniem zważywszy na dość luźną strukturę tetrameru. Szczególny jest przypadek trajektorii 1 dla roztworu 20ACA 4ACN gdzie RMSD osiąga wartość 8 Å (Rysunek 7.2 b)). Wskazuje to na początek szybkiej denaturacji albo istotną zmianę struktury czwartorzędowej tetrameru.

Wiemy, że NHaza wykazuje aktywność katalityczną tylko w formie tetrameru [59] lub oligomerów o wyższej masie cząsteczkowej [50]. Wygenerowane z MD dane świadczą o tym, że nawet w czystej wodzie modelowa NHaza może być niestabilna w takiej formie. Dane z wykresów z Rysunek 7.2. wskazują, że obecność amidu o rosnącym stężeniu nie wpływa dramatycznie na strukturę czwartorzędową (tetrameryczna) NHazy. Oznacza to, że przynajmniej w krótkiej skali czasowej dostępnej tym symulacjom pełna denaturacja NHazy nie zachodzi, co osłabia bardzo mocno hipotezę d). Więcej danych na temat wzajemnych

ruchów domen oraz przyczyn stosunkowo dużego RMSD w tych symulacjach daje analiza dimerów i pojedynczych podjednostek przedstawiona poniżej.

7.3 Analiza RMSD dla dimerów z centrami aktywnymi AB i CD NHazy

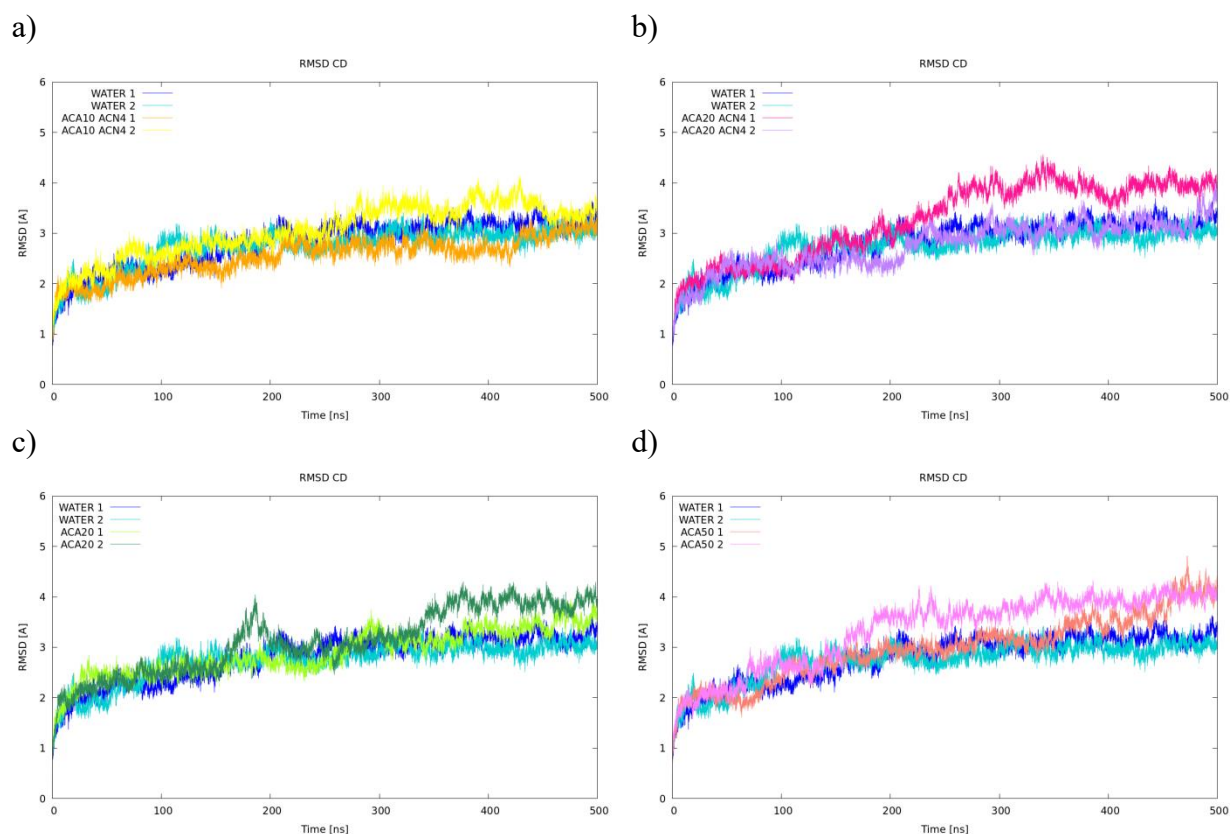
Fakt, że RMSD w symulacjach tetrameru rośnie nie oznacza jeszcze denaturacji enzymu. Może to wynikać z wzajemnego ruchu dimerów, czy nawet poszczególnych domen monomerycznych. By sprawdzić, co się dzieje w badanym białku obliczono odległości RMSD stosując sukcesywnie nakładanie dimerów osobno AB i osobno CD. Wyniki przedstawiono na Rysunku 7.3.



Rysunek 7.3 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla dimerów AB w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu NHazy. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz obie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

Jak widać z Rysunku 7.3 dimery NHazy w wodzie zachowują się całkiem poprawnie. Standardowo RMSD początkowo rośnie, do akceptowalnych wartości ok. 3 Å w każdym przypadku. Wykresy szybko się stabilizują, i można stwierdzić, że w samej wodzie poszczególne dimery są stabilne i nie rozplatają się. Oznacza to, że efekt rosnącego RMSD dla tetrameru, diskutowany w poprzedniej sekcji, bierze się z ruchu dimerów względem siebie. Na wykresach dla AB zarówno WAT1 jak i WAT2 widać pewną tendencję do

przyjmowania dwóch grup konformacji, jednak przejścia pomiędzy podstanami są łatwe i stosunkowo szybkie. Efekt ten nie był dalej dogłębnie badany. Podobnie zachowują się dimery CD – zobacz Rysunek 7.4 – wykresy są „płaskie” tak jak oczekujemy od zbieżnych trajektorii, zaś RMSD stabilizuje się na rozsądnym poziomie 3 Å.



Rysunek 7.4 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla dimerów CD w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu NHazy. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz dwie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

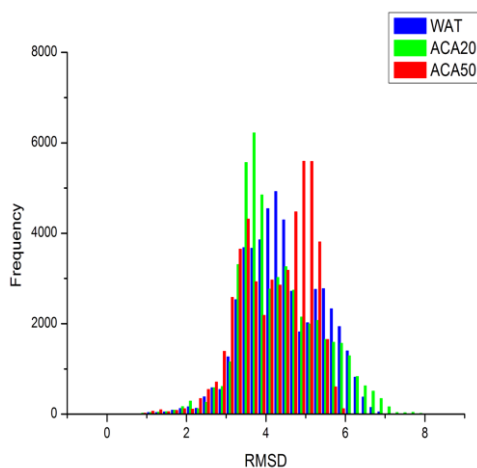
Na panelach a) z Rysunku 7.3 i Rysunek 7.4, obok wody, przedstawiono ewolucję strukturalną dimerów NHazy w roztworze odpowiadającym początkowej fazie produkcji, zawierającym 10% amidu i 4% nitrilu. Dane RMSD nie różnią się od tych uzyskanych dla wody, zatem wnioskujemy, że na tym poziomie stężeń ani nitryle, ani amidy nie mają wpływu denaturującego.

W odróżnieniu od tego, na panelach b) z Rysunku 7.3 i Rysunek 7.4, gdzie stężenie amidu jest większe (20%) co najmniej jedna trajektoria ma znacznie wyższą wartość RMSD (okolicie 4 Å) i wyraźny trend wzrostowy, co może oznaczać tendencję do rozplątania już na 500 ns skali czasowej. Efekt taki występuje zarówno dla dimeru AB (Rysunek 7.3 b)) jak i CD (Rysunek 7.4 b)).

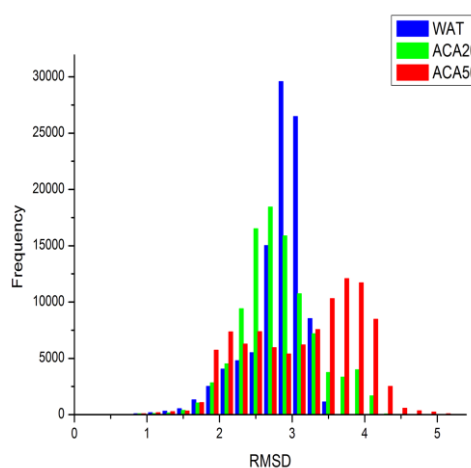
Do interesujących wniosków prowadzi analiza paneli c) z obu omawianych zestawów wyników (Rysunek 7.3 i Rysunek 7.4). W przypadku roztworu ACA20 tylko w dimerze CD obserwujemy częściowe zmiany konformacyjne, dla AB stabilność dimeru jest identyczna jak w czystej wodzie. Zauważmy, że w przypadku danych z panelu b) występuje ok. 25% obcych molekuł i efekty strukturalne były silnie zaznaczone, tutaj jest 20% i efekty są nieco słabsze. Z kolei na panelach d) z danymi dla roztworu ACA50 o największym stężeniu amidów, w odróżnieniu od środowiska wodnego, wszędzie widzimy wyraźną, stałą tendencję wzrostową. Dotyczy to zwłaszcza dimeru CD. W przypadku skrajnym ACA50 widzimy, że wartość RMSD nie oscyluje w okolicach 3 Å, jak to było wcześniej, a dochodzi do 5 Å.

O sporym efekcie strukturalnym roztworów amidów o dużym stężeniu, np. ACA50, świadczy dobitnie porównanie histogramów rozkładów wartości RMSD prezentowanych wcześniej na Rysunku 7.3 (ABCD) i Rysunek 7.4 (AB i CD). Zgodnie z oczekiwaniami rozkłady dla kompletnego tetramerycznego enzymu są stosunkowo szerokie (Rysunek 7.5 panel a)) maksima rozkładów dla wody i ACA20 są położone w pobliżu, zaś maksimum dla ACA50 jest przy wartości RMSD o ok. 1 Å większej 5-6 Å vs 3-4 Å. Kiedy patrzymy na panel b) prezentujący rozkłady dla dimerów, dla wody widzimy wyraźne maksimum w okolicy 3 Å. Histogram maksimum dla ACA20 jest znacznie szerszy, ale najciekawsze jest silne przesunięcie i wypłaszczenie histogramu dla danych z roztworu ACA50. Maksimum w tym przypadku lokuje się w okolicach 4 Å, zatem coś się z dimerami dzieje, gdy amidu jest dużo.

a)



b)



Rysunek 7.5 Histogramy odległości RMSD (w Å) obliczone dla a) tetrameru ABCD i b) dimerów (AB i CD) - dane zagregowane.

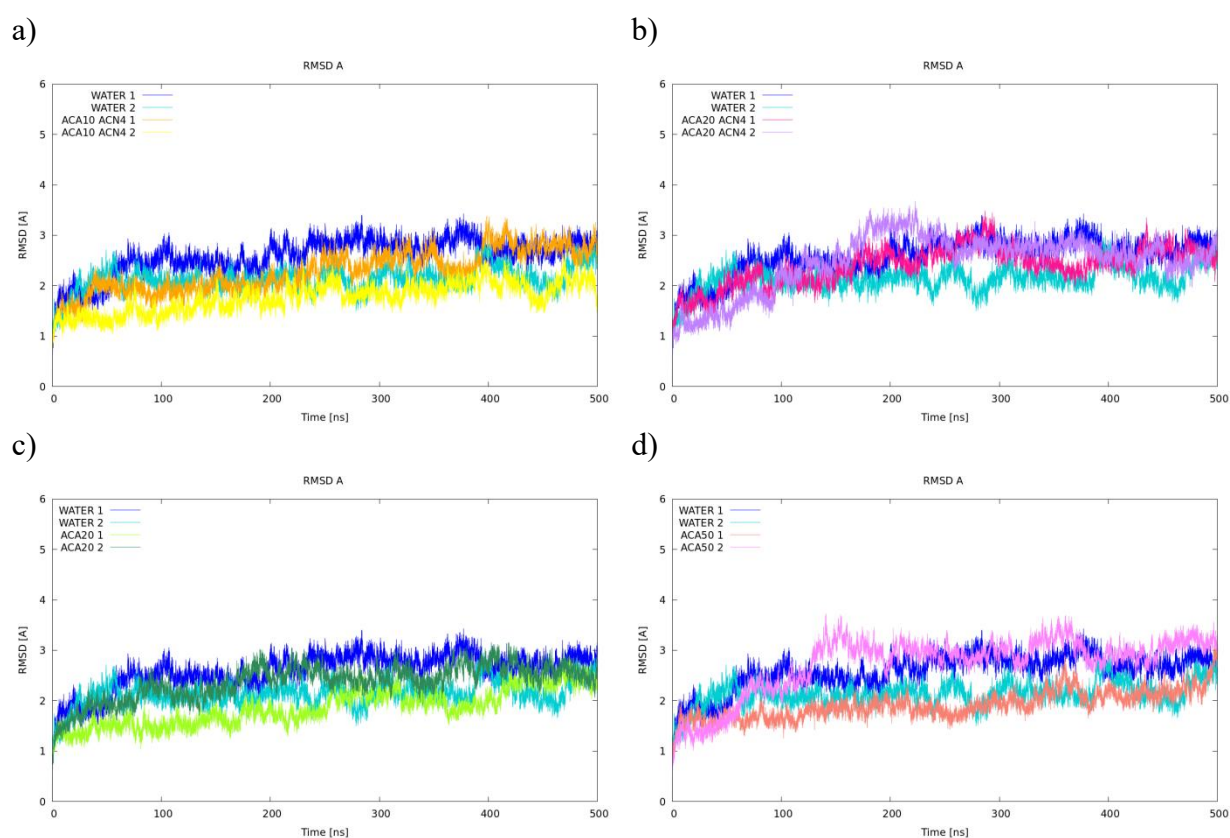
Wyniki systematycznych analiz wykresów RMSD, na których jednak nie można opierać zbyt daleko idących wniosków, świadczą o tym, że w skali czasowej dostępnej w tym projekcie (500 ns), już przy przekroczeniu 20% stężenia amidów struktury AB i CD podlegają długookresowym zmianom konformacyjnym. Denaturacja enzymu w badanych środowiskach, w tej skali czasowej nie zachodzi. W roztworach o dużych stężeniach amidów

dimery podlegają zmianom konformacyjnym, co można nazwać co najwyżej częściową albo lokalną denaturacją.

7.4 Analiza RMSD dla pojedynczych domen A, B, C, D NHazy

Porównanie wykresów RMSD dla poszczególnych domen α (A, C) i β (B, D) może potencjalnie przynieść najwięcej informacji o możliwym wpływie denaturującym dużych stężeń amidów. Dlatego na wykresach z danymi (Rysunki 7.6 - 7.9) wszędzie zamieszczono wykresy właściwe dla czystej wody (WATER1, WATER2).

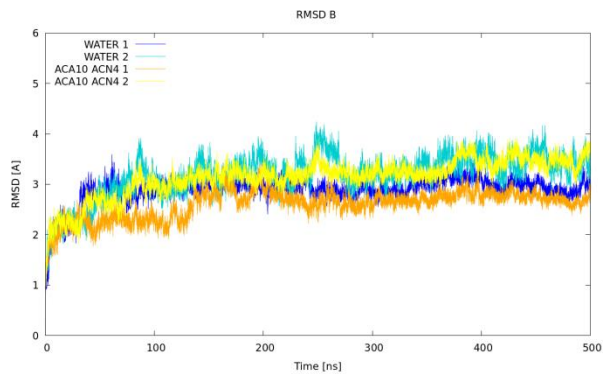
Domena A:



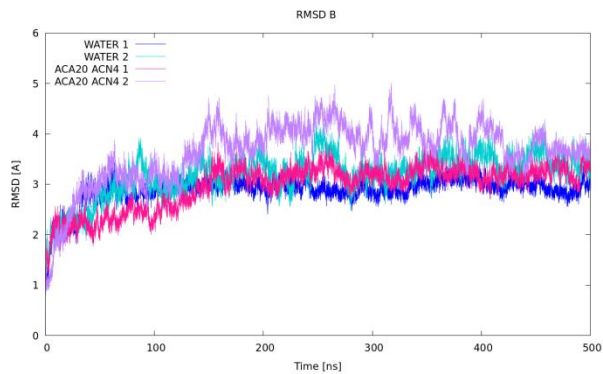
Rysunek 7.6 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla podjednostki A NHazy w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz dwie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4 % akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4 % akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

Domena B:

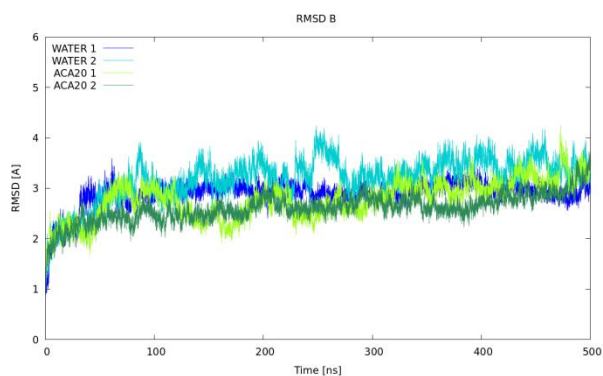
a)



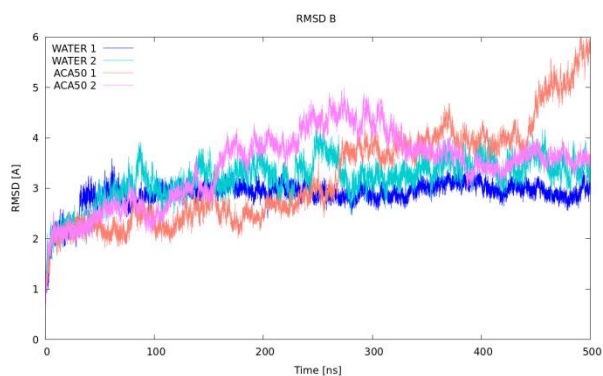
b)



c)



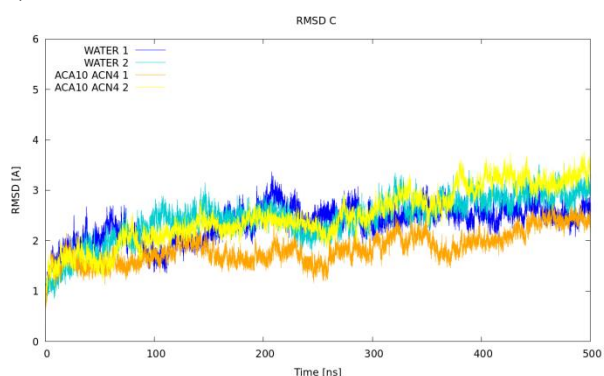
d)



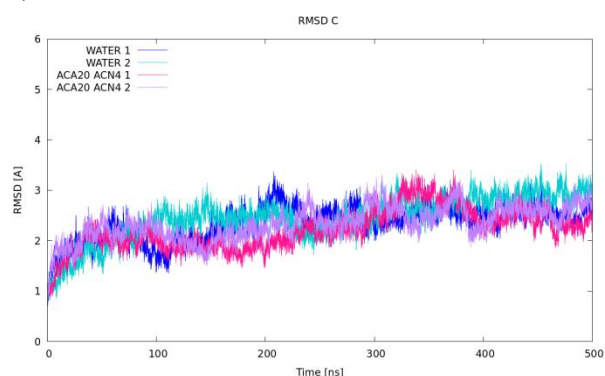
Rysunek 7.7 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla podjednostki B NHazy w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz dwie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

Domena C

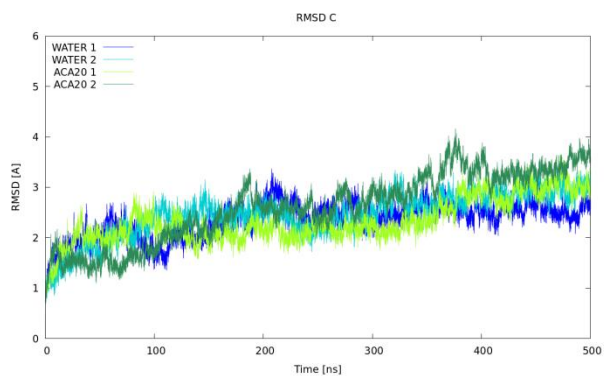
a)



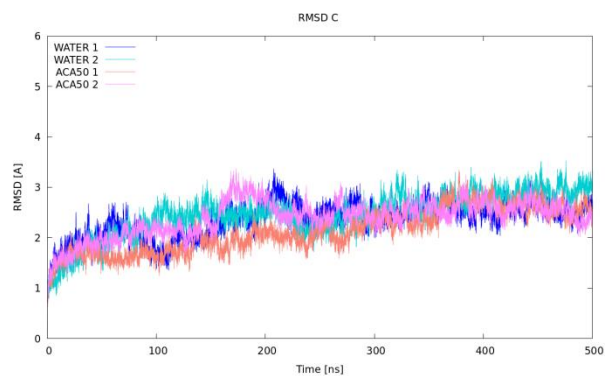
b)



c)

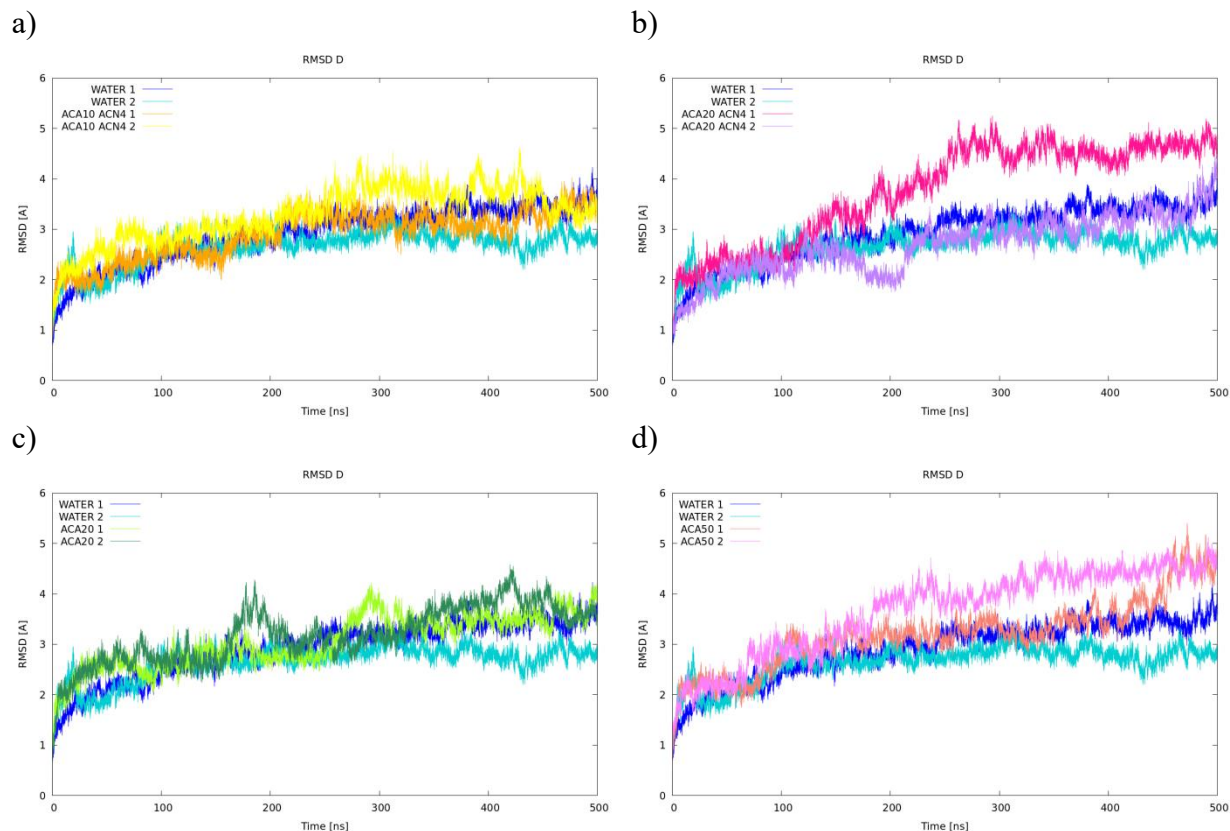


d)



Rysunek 7.8 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla podjednostki C NHazy w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz dwie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

Domena D



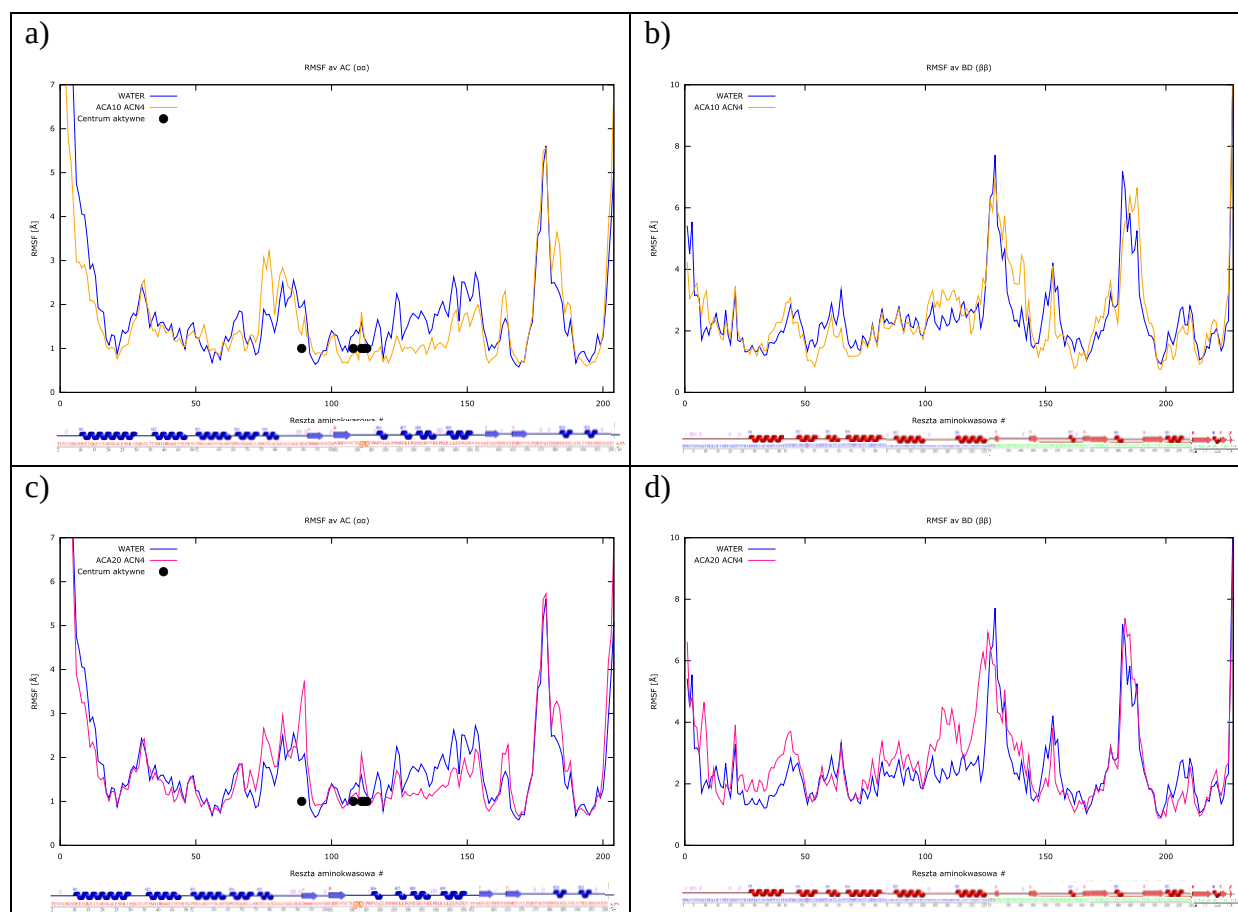
Rysunek 7.9 Wykresy odległości RMSD (w Å) dla podjednostki D NHazy w stosunku do minimalnej struktury startowej modelu mierzone po atomach ciężkich szkieletu. Dla lepszego porównania danych na każdym panelu umieszczono wykresy dla dwóch niezależnych trajektorii po 500 ns każda oraz dwie trajektorie uzyskane dla czystej wody (WATER). Panel a) roztwór 10% akrylamidu i 4% akrylonitrylu b) roztwór 20% akrylamidu i 4% akrylonitrylu c) roztwór 20% akrylamidu d) roztwór 50% akrylamidu.

Analiza wykresów RMSD dla indywidualnych domen przedstawionych na Rysunkach 7.6-7.9 prowadzi do bardzo interesujących wniosków: Wzrost stężenia obcych ligandów ACN i ACA w zasadzie w bardzo małym stopniu zaburza podjednostki α NHazy. Na Rysunku 7.6 (domena A) i 7.9 (domena C) wszystkie wykresy są niemal płaskie, podobne do tych dla wody, a RMSD z głównej części trajektorii nie przekracza 3 Å. Można zaryzykować tezę: nic się nie dzieje. Dla odmiany na wykresach z Rysunek 7.7 (domena B) oraz Rysunek 7.9 (domena D) mamy wykresy niekiedy wyraźnie wznoszące się (np. Rysunek 7.9 d)), zmiany konformacyjne (Rysunek 7.9 c)), a nawet objawy rozplatania domeny (Rysunek 7.7 d)), roztwór ACA50). Symulacje MD pokazują, że wysokie stężenie amidu ma wpływ na stabilność i konformacje indywidualnych podjednostek β . Sprawdzimy, czy ta hipoteza znajdzie odzwierciedlenie w innych parametrach dynamicznych obliczonych w tym projekcie. Warto tutaj wspomnieć, że przy badaniu termostabilności podobnie uważa się, że podjednostka α jest bardziej stabilna niż podjednostka β i to częściej w tej drugiej podjednostce wprowadza się mutacje poprawiające termostabilność [27].

7.5 Analiza fluktuacji położeń aminokwasów – parametry RMSF

Parametr RMSF opisujący fluktuacje indywidualnych aminokwasów w trakcie symulacji ma dużą wartość informacyjną. Na rysunkach 7.10 i 7.11 przedstawiono w sposób porównawczy fluktuacje obliczone dla zagregowanych (połączonych) danych w dwóch 500 ns trajektorii dla wszystkich badanych w ramach tej rozprawy środowisk NHazy (roztworów).

Niskie fluktuacje świadczą, że dany rejon białka jest sztywny i zachowuje swoją strukturę. Brak zmiany parametrów RMSF dla danego rejonu oznacza, że zmieniające się otoczenie nie ma wpływu na dynamikę znajdujących się tam aminokwasów. Z kolei zaobserwowanie dużych zmian w RMSF przy zmianie otoczenia białka oznacza, że roztwór destabilizuje pewne obszary i zaburza w ten sposób funkcje enzymatyczne. Dyskusję rozpoczniemy od analizy Rysunku 7.10, gdzie osobno przedstawiono RMSF dla podjednostek α (lewa strona) i β (prawa strona) w wodzie, roztworze ACA10 ACN4 oraz ACA20 ACN4.

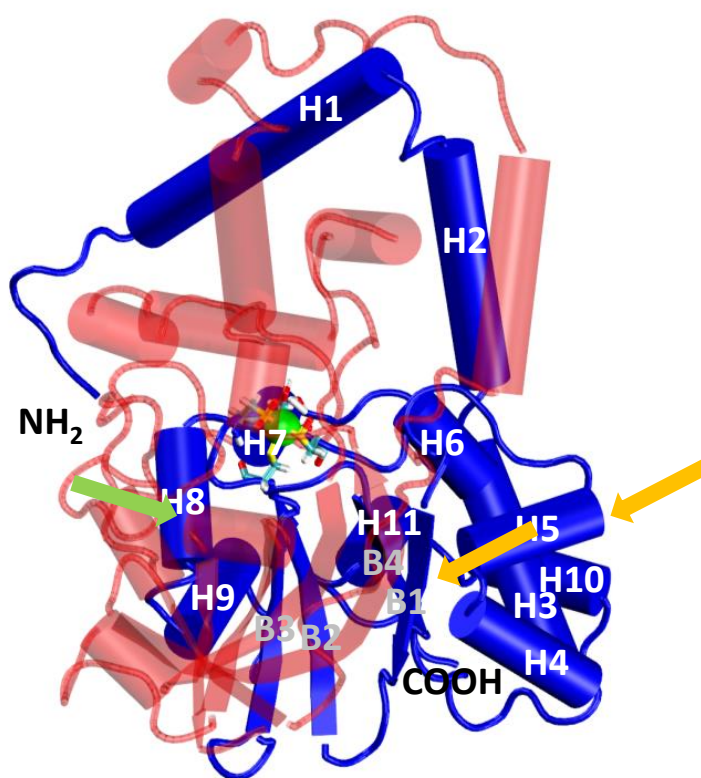


Rysunek 7.10 RMSF dla podjednostek α (lewa strona) i β (prawa strona) w wodzie, roztworze ACA10 ACN4 oraz ACA20 ACN4.

Widzimy z Rysunek 7.10, że odpowiedź NHazy na wzrost produktu, diskutowana w tym podrozdziale, może być trojaka:

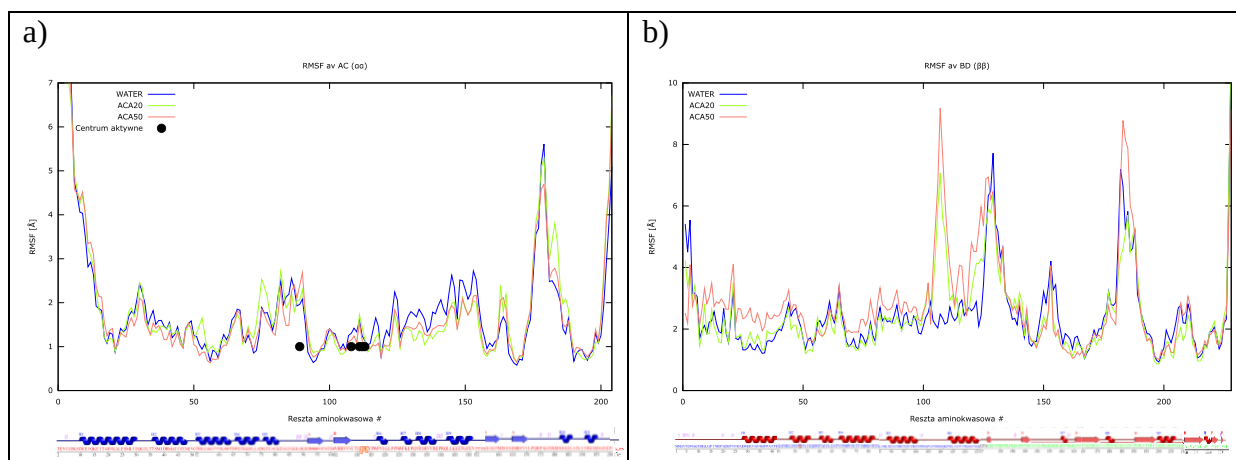
- (a) brak wpływu
- (b) większy lub mniejszy wzrost fluktuacji w roztworach „niewodnych”
- (c) efekt stabilizujący amidu (spadek RMSF).

Na Rysunek 7.10 są przykłady wszystkich tych sytuacji, chociaż dominuje przypadek a) czyli wpływ otoczenia jest niewielki (na poziomie szumu). Szczególnie ważne jest to z punktu widzenia dynamiki centrum aktywnego znajdującego się w podjednostce α . W podjednostce α znajdują się aminokwasy tworzące centrum aktywne [28]. Dane obliczeniowe pokazują, że bezpośrednie otoczenie jonu kobaltu (pierwsza sfera koordynacyjna) nie zmienia swojej dynamiki w roztworach typu ACA10 ACN4 (Rysunek 7.10 a), nieco silniejsze zmiany pojawiają się dla ACA20 ACN4 (Rysunek 7.10 c) i dotyczy to aminokwasów 108 i 111, 112, 113 oznaczonych kropką na wykresie. Co zaskakuje, to fakt, że w rejonie 125-150 podjednostek α (helisy H7, H8, H9, Rys. Rysunek 7.10 a), zarówno dla roztworu 10% jak i 20% amidu widzimy wręcz spadek fluktuacji w stosunku do wody, czyli przypadek c). Z licznych analiz kanałów NHazy umożliwiających dojście substratu do centrum aktywnego wynika, że omawiany rejon w znacznym stopniu pokrywa się z wejściem do kanału głównego. Wraz ze wzrostem stężenia ACN czy ACA ligandy te wypierają wodę i lokują się w obszarze kanału (będzie to diskutowanie w dalszej części). Stosunkowo duże molekuły ligandów ACA i ACN „zatykają” kanał i tym samym nieco ograniczają zwykłą swobodę konformacyjną obszaru wejścia, okolice 125-135 aminokwasu podjednostki α .



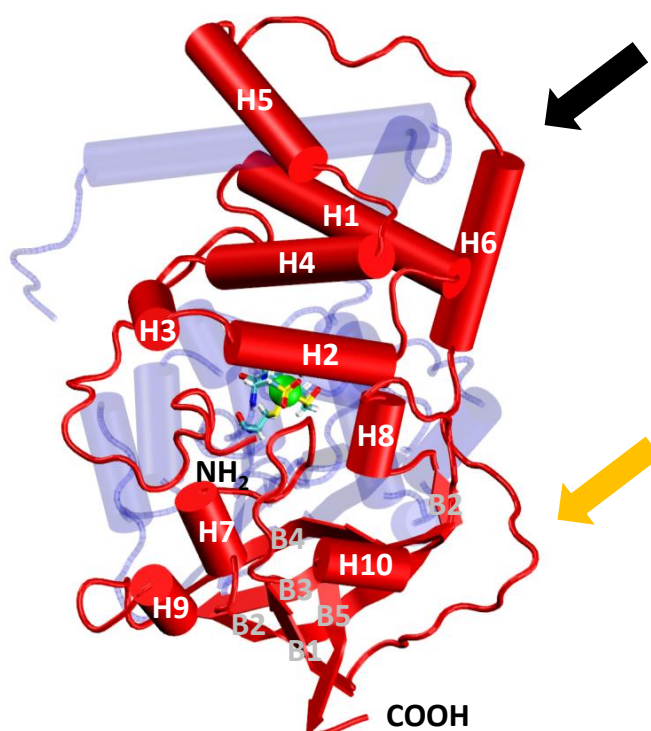
Rysunek 7.11 Obszary, w których fluktuacje rosną (pomarańczowe strzałki) i maleją (zielona strzałka) po przejściu z otoczenia wodnego do roztworu ACA10 ACN4.

Z kolei w podjednostkach β (Rysunek 7.10 b), d) stabilizacja jest mała i występuje rzadko (np. 50-70), za to mamy do czynienia z wyraźną destabilizacją rejonów β : 30-50 (helisa β H1) oraz 100-125 (pętla przy helisach β H5-6 i helisa β H6). Efekt jest bardziej wyraźny dla ACA20 niż ACA10, i wnosimy stąd, że rosnące stężenie amidów wpływa na dynamikę tych dwóch obszarów. Aminokwasy 20-50 budują helisę tworzącą „górną” część kieszeni nad centrum katalitycznym oraz część wejścia do kanału.



Rysunek 7.12 RMSF dla podjednostek α (lewa strona) i β (prawa strona) w wodzie i w roztworze ACA20 i ACA50.

Wzrost fluktuacji w tym rejonie, czyli pętli przy helisach H5-6 i helisy β H6, jest szczególnie dramatyczny dla roztworu ACA50 (Rysunek 7.12 b)). Widzimy, że wielkość fluktuacji koreluje dobrze ze stężeniem amidu. Obszar ten wyróżniono strzałką czarną na Rysunek 7.13. fragment ten oddziałuje z podjednostką α . Helisa β H6 w tym wariantcie NHazy uważana jest za fragment wykazujący się niską termostabilnością. Jej zamiana z wariantu bardziej stabilnego termicznie powodowała, że NHaza stawała się bardziej termostabilna [190]. Wynika z tego, że utrata aktywności w wysokich stężeniach przynajmniej częściowo może mieć ten sam czynnik jak w przypadku utraty aktywności w wysokiej temperaturze.



Rysunek 7.13 Obszar podwyższonych fluktuacji w roztworach o dużych stężeniach amidów, na przykład ACA50.

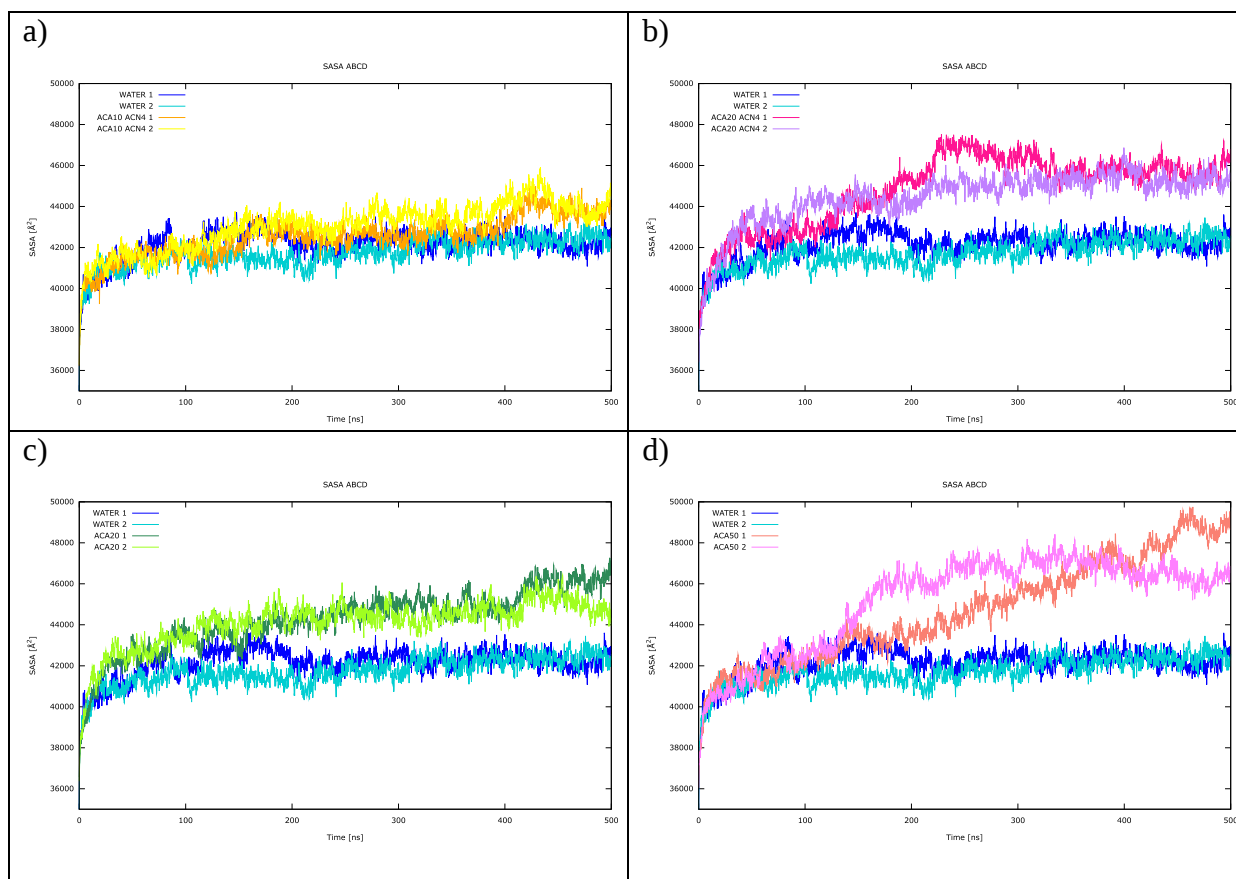
Jest to pierwszy objaw wczesnej denaturacji białka w sytuacji, gdy amidów jest bardzo dużo. To mogłoby tłumaczyć obserwowany spadek aktywności enzymu i zahamowanie produkcji amidu wówczas, gdy roztwór jest silnie amidem nasycony. Co ciekawe, dynamika (przynajmniej fluktuacje) w podjednostce α nie jest zbyt zaburzona w ACA50 (Rysunek 7.12). Dotyczy to również obszaru centrum aktywnego. Rejon α 125-150, podobnie jak poprzednio (Rysunek 7.10 a), c) w roztworach ACA20 i ACA50 ulega wręcz stabilizacji (fluktuacje są mniejsze niż w wodzie).

7.6 Ocena dostępu molekuł rozpuszczalnika do białka – SASA

NHaza w czasie procesu biotechnologicznego występuje co najmniej w formie tetramerycznej. Tetramer ten ma zwartą globularną budowę i tylko dzięki kanałom substraty mogą dotrzeć do centrum aktywnego i właśnie kanały są niezbędne by produkty opuściły białko. Kształt ogólny NHazy, a co za tym idzie dostępność centrum katalitycznego, może

zależać od środowiska, w którym białko się znajduje. Użytecznym parametrem pozwalającym śledzić pewne aspekty zmian konformacyjnych białka jest parametr SASA (*Solvent Accessible Surface Area*) wyrażany zwykle w $\text{\AA}^2$. W sekcji tej analizowane są wyniki obliczeń tego parametru uzyskane przy pomocy programu opartego na narzędziach VMD [58]. Dane SASA dla tetrameru ABCD przedstawiono na

Rysunek 7.14.



Rysunek 7.14 Ewolucja SASA (w $\text{\AA}^2$) tetrameru NHazy dla różnych roztworów, porównanie z wynikami dla wody.

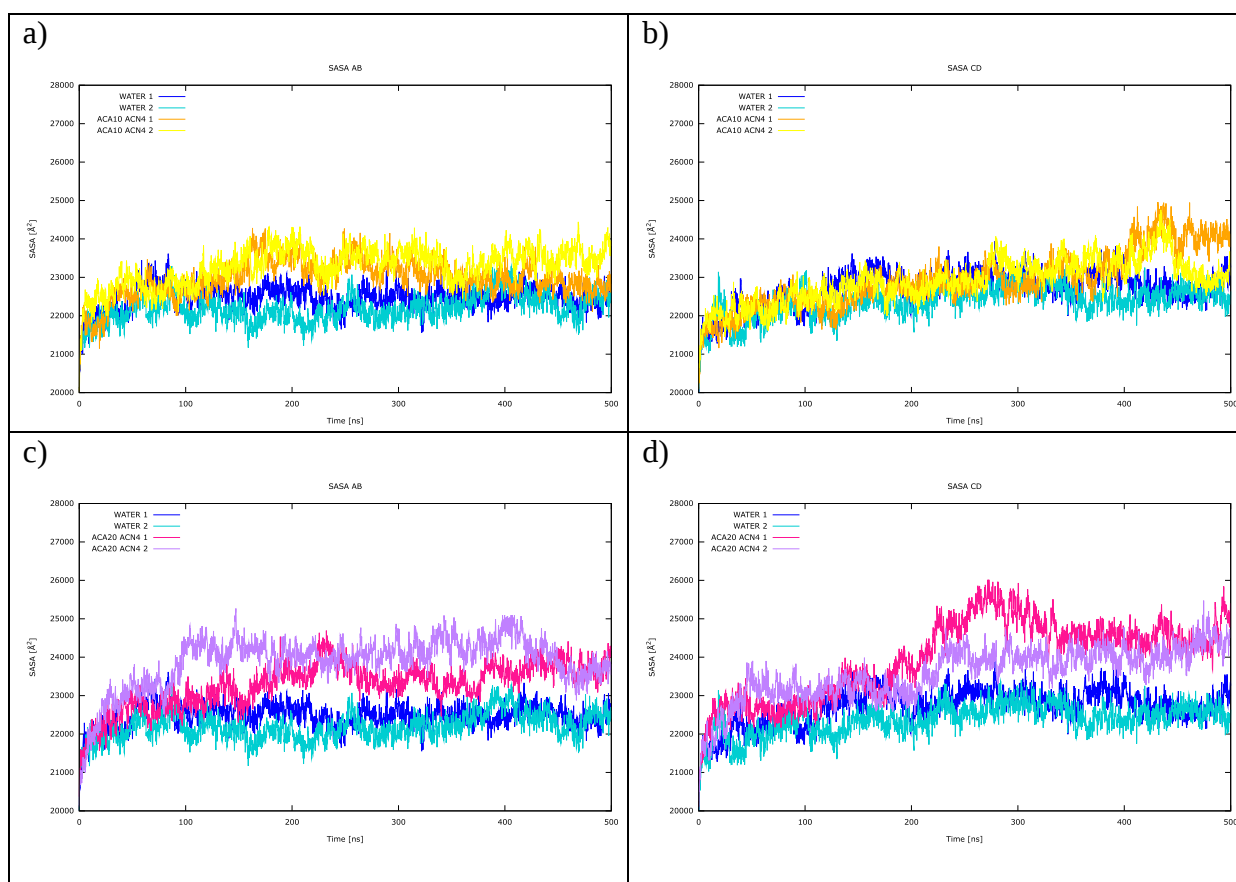
Z Rysunku 7.13 można zauważyć natychmiast, że SASA obliczone dla NHazy w wodzie (kolory niebieskie) osiąga wartość 4100-4200 $\text{\AA}^2$ i w trakcie symulacji, po okresie ekwilibracji, pozostaje w zasadzie stałe. Można ocenić, że nieuniknione fluktuacje tej wartości są na poziomie 1000 $\text{\AA}^2$. Dla roztworów ACA20 (kolory zielone, Rysunek 7.14 c)) woda jako rozpuszczalnik ma większy dostęp do powierzchni białka – SASA oscyluje w granicach 4400-4500 $\text{\AA}^2$. Interesujące są przypadki ACA50 (Rysunek 7.14 d)), gdzie dla jednej trajektorii wartości SASA są jeszcze większe (4600-4800 $\text{\AA}^2$), zaś dla drugiej SASA wręcz monotonicznie rośnie (od 3800 na starcie, do ok. 5000 $\text{\AA}^2$ w okolicy 500 ns, Rysunek 7.14 d). Oznacza to, że w tym przypadku efekt ACA jest bardzo silny i białko zaczyna rozluźniać się, a może nawet denaturować, w sensie poważnej zmiany struktury

czwartorzędowej. Dopiero analiza szczegółowa składników SASA może nam podpowiedzieć z czego wynikają obserwowane efekty strukturalne.

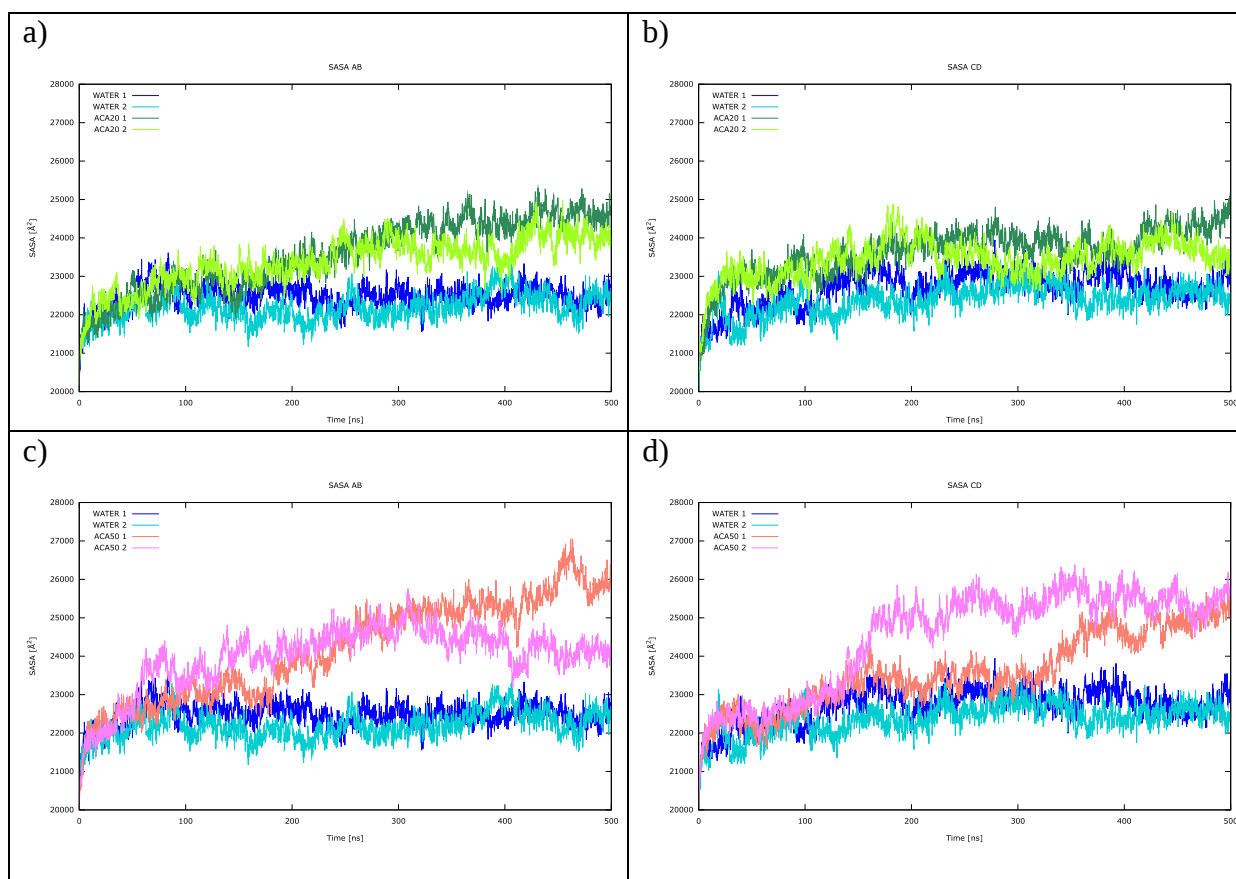
Na

Rysunek 7.15 oraz

Rysunek 7.16 porównano SASA dla dimerów NHaz AB (panełe lewe) oraz CD (panełe prawe) w badanych środowiskach o rosnącym stężeniu amidów z wartościami obliczonymi dla wody.



Rysunek 7.15 Porównanie SASA dla dimerów NHaz a) AB b) CD w roztworze ACA10 ACN4 oraz c) AB i d) CD w roztworze ACA20 ACN4 w wartościach dla wody (kolor niebieski).

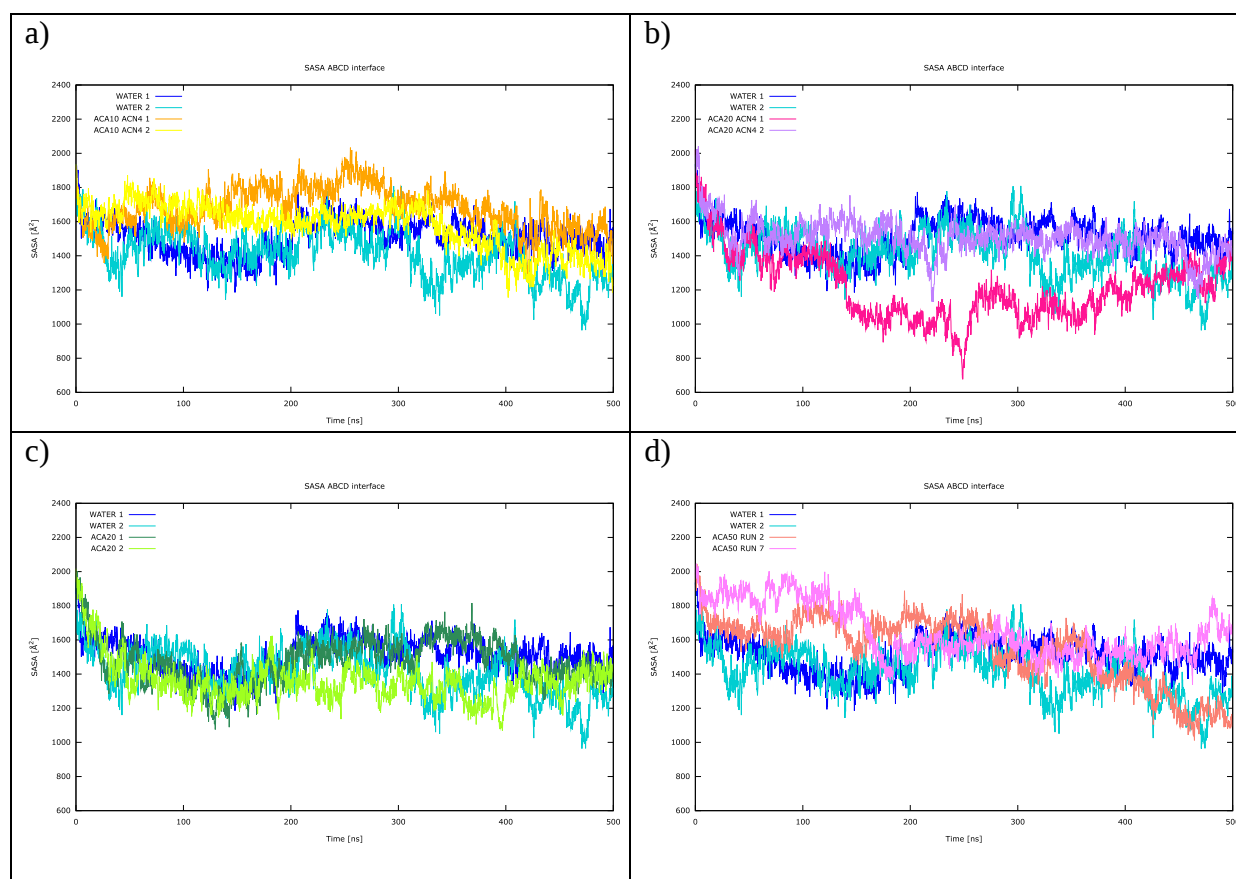


Rysunek 7.16 Porównanie SASA dla dimerów NHaz a) AB b) CD w roztworze ACA20 oraz c) AB i d) CD w roztworze ACA50 w wartościach dla wody (kolor niebieski).

Analiza wykresów dla obu dimerów prowadzi zasadniczo do tych samych wniosków: wartość SASA rośnie wraz z rosnącym stężeniem ACA czy też dodatkiem ACN. Oznacza to, że sam kompleks podjednostek α i β jest wrażliwy na obecność „obcych” ligandów. Efekty te są wyraźne w roztworach 20%, zaś bardzo poważne rozluźnienie struktury dimerycznej obserwujemy dla ACA50. SASA dla dimeru w wodzie oscyluje w granicach 2200-2300 Å², w roztworach 20% 2300-2500 Å², zaś w 50% - 2400-2500 Å². Wzrost powierzchni enzymu indukowany obecnością produktu reakcji hydratacji sięga zatem 10 procent. Jest to poważny efekt, nie odnotowywany wcześniej w literaturze. Można przypuszczać, że reorganizacji struktury enzymu, nawet na poziomie dimeru, zmienia jego aktywność ponieważ procesy transportowe będą przebiegały inaczej, geometria kanałów nie pozostaje stała w trakcie sukcesywnego generowania kolejnych molekuł amidu. Wzrost wartości SASA ma też

związek z częściową denaturacją aminokwasów 100-125 z podjednostki β (pętla pomiędzy helisami H5 i H6 i helisa β H6), co widać było na wykresach RMSF. Rozplatanie tego fragmentu powoduje, że przestaje on po części oddziaływać z resztą białka (głównie z podjednostki α) i tworzy się wolna przestrzeń, pod pętlą i helisą, w którą wchodzi solwent.

Wiemy, że do wydajnej katalizy NHazy powinna zachowywać strukturę przynajmniej tetrametru. Przy pomocy specjalnego skryptu policzono tzw. SASA różnicowe (Rysunek 7.17). Jest to różnica pomiędzy SASA dla dimeru w obecności drugiego dimeru (geometria z tetrametru) i bez tego dimeru. Różnica w tych polach SASA daje pole powierzchni oddziaływania z drugą podjednostką. Dla zwiększenia precyzji w każdej ramce symulacji pola powierzchni oddziaływania z drugą podjednostką była liczona zarówno dla AB jak i CD a następnie uśredniana. Uzyskane rezultaty były zbieżne z polem oddziaływania wyznaczonymi przez serwer PDBSum [57].



Rysunek 7.17 Ewolucja parametru $SASA_{interface}$ NHazy w badanych roztworach. Parametr $SASA_{interface}$ ilustruje powierzchnię styku dimerów AB oraz CD w tetramerze ABCD.

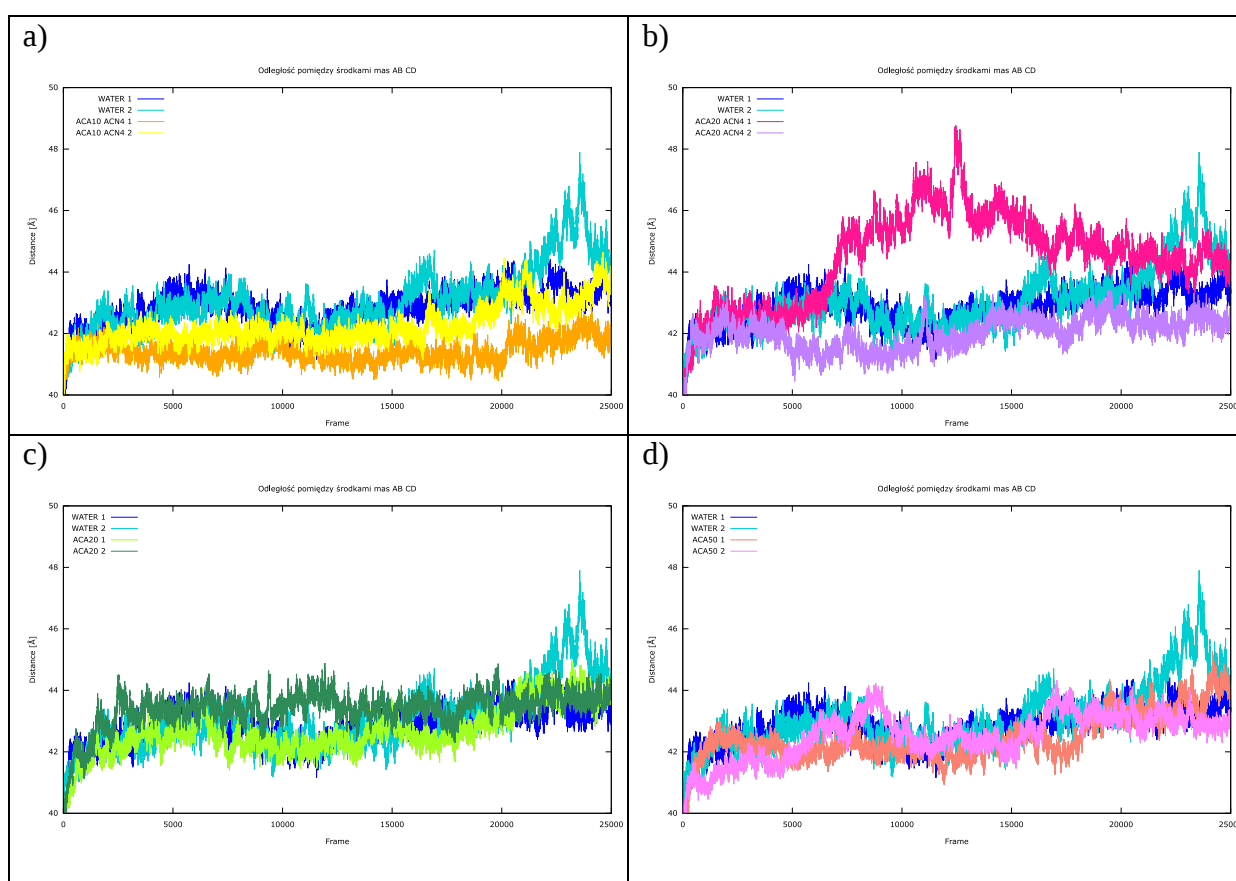
Jak widzimy z Rysunek 7.17 powierzchnia kontaktu też znacznie zależy od rodzaju roztworu, w którym znajduje się modelowany układ. Co ciekawe, analizując dane dla samej wody szacujemy, że po ekwilibracji parametr ten waha się od 1200 Å^2 do 1600 Å^2 , a czasem na krótko spada do 1000 Å^2 , więc nie jest to kontakt sztywny, tylko raczej luźny. Wpływ otoczenia na wielkość powierzchni tak obliczonego interfejsu nie jest jednoznaczny. Na panelu a) z Rysunku 7.16 widzimy, że kontakt między dimerami AB i CD jest

w roztworze ACA10 ACN4 wręcz lepszy niż w wodzie. W roztworze ACA20 (panel c)) ani nawet w roztworze ACA50 nie obserwujemy różnic w stosunku do wody. Za to na panelu Rys.7.16 b) jedna z trajektorii dla ACA20 ACN4 miała wyraźny „incydent” polegający na częściowej dysocjacji obu dimerów, gdyż dyskutowany parametr spadł przy 250 ns do poziomu 600-700 Å².

Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że powierzchnia kontaktu pomiędzy podjednostkami α i β nie jest stała, obszar ten podlega sporym fluktuacjom. Na dostępnej skali czasowej 500 ns nie zauważono by wzrost stężenia amidów jakoś dramatycznie dysocjował tetramer. Warto przypomnieć, że dimery AB i CD nie są połączone kowalencyjnie, wiążą się głównie siłami van der Waalsa i nielicznymi wiązaniami wodorowym. W obszarze tego interfejsu zaobserwowano w symulacjach nie tylko wodę, ale również molekuły ACN i ACA. Warto zbadać doświadczalnie czy obszar ten nie jest zaangażowany w alternatywny transport substratów i produktów do/z centrum aktywnego.

7.7 Odległości między środkami mas dimerów. Analiza RoG

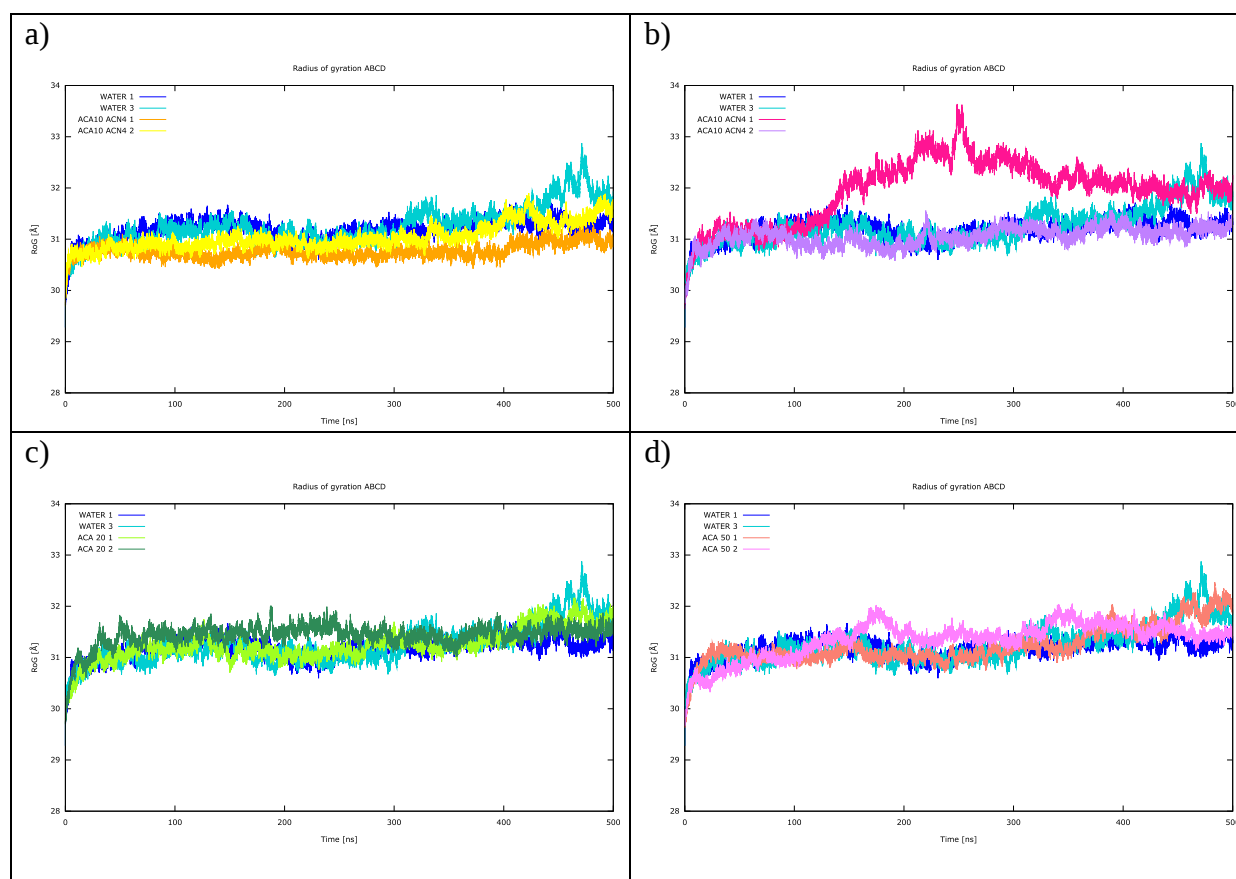
Prostym testem potencjalnego wpływu otoczenie na strukturę tetrameru NHazy jest porównanie wykresów odległości pomiędzy dimerami AB i CD zaprezentowane na Rysunek 7.18



Rysunek 7.18 Odległość pomiędzy środkami mas w podjednostkach AB i CD enzymu w różnych roztworach.

W naszym modelu dystans ten początkowo szybko zwiększa się z „krystalograficznego” 40 Å, do wartości ok. 42-44 Å. Jak zauważono wcześniej efekty otoczenia nie zmieniają znacząco tego parametru. Widać jednak dwa istotne zdarzenia: w jednej z symulacji w wodzie (jasnoniebieski wykres) pod koniec wygenerowanej trajektorii (ok 450 ns) mamy wyraźny (ale chwilowy) wzrost wartości odległości do ok. 48 Å. Wydarzenie takie, znacznie silniejsze i dłużej trwające, wystąpiło również dla roztworu ACA20 ACN4 (Rysunek 7.18 b) kolor czerwony). Po dłuższym czasie (ok 200 ns) również w tym przypadku nastąpił powrót do typowej odległości dimer-dimer. Obserwacje takich zdarzeń są zbyt mało liczne by wyciągać poważniejsze wnioski, ale można spekulować, że w trakcie swojej aktywności katalitycznej NH₄ przez pewne okresy traci strukturę czwartorzędową, rozluźnia interfejs AB/CD i być może w ten sposób modyfikuje dostęp do centrum katalitycznego. Potwierdzenie lub odrzucenie tej hipotezy wymaga przeprowadzenia znacznie większej liczby dłuższych symulacji (np. 10-20), co obecnie jest bardzo kosztowne.

Obserwacje poczynione powyżej w oparciu o prosty parametr odległościowy są potwierdzone danymi zamieszczonymi na Rysunek 7.19, gdzie przedstawiono promień bezwładności, czyli RoG (*radius of gyration*) dla tetrametu NH₄ w różnych roztworach.



Rysunek 7.19 Zmiana parametru promień bezwładności (RoG) całego tetrametu ABCD enzymu w różnych roztworach.

Widzimy, że poza jednym „incydentem” dla jednej z trajektorii w wodzie (okolicie 450 ns) jest on tak jak byśmy oczekiwali stały. W roztworach o małych stężeniach ligandów

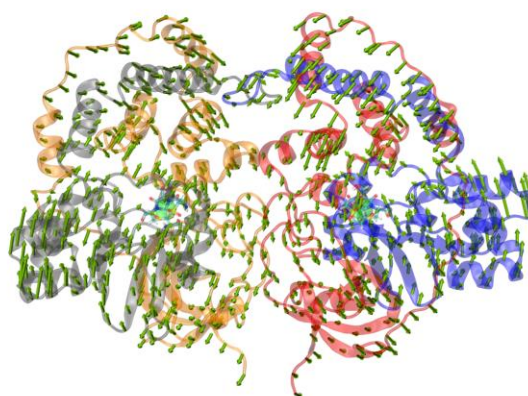
(ACA10 ACN4) zależność RoG od czasu jest też bardzo mała i NHazy jest stabilna i może nawet nieco bardziej zwarta (Rysunek 7.19 a)). Jednak dla ACA20 ACN4 (Rysunek 7.19 b)) w jednej z trajektorii mamy wyraźne rozluźnienie struktury NHazy. W trajektoriach dla ACA20 (Panel c) Rysunek 7.19) tego nie widać, ale w panelu d, w roztworze ACA50 fluktuacje struktury tetrameru są już większe niż w wodzie. Zmiany RoG, poza tym jednym „incydentem” potwierdzają wcześniejsze obserwacje, że na skali 500 ns nie ma wyraźnej denaturacji białka, nawet w środowisku z dużym stężeniu amidu.

7.8 Dynamika tetrameru NHazy. Mody normalne i macierze korelacji.

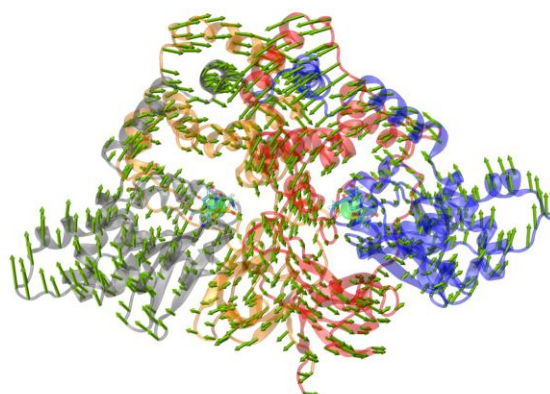
Użytecznym źródłem informacji o dynamice białek jest analiza modów normalnych. Drgania NHazy o niskich częstościach mają zwykle dużą amplitudę i mogą mieć znaczenie fizjologiczne. Korzystając z pluginu ProDy [103] w pakiecie VMD [58] obliczono mody drgań NHazy stosując wyjściową strukturę opartą na 1IRE pdb. Do analizy przyjęto standardowy w ProDy model gruboziarnisty białka oraz Anisotropic Network Model (ANM) [104]. Drgania atomów są reprezentowane graficznie przy pomocy narzędzia ProDy i VMD. Kilka rzutów dla modu o najniższej częstości (mod1) dla przedstawiono na Rysunek 7.20.

Widzimy, że można wyróżnić pewne fragmenty podjednostek, zarówno w α jak i w β , które w tym modzie wykazują kolektywne ruchy. Nie zauważono by całe podjednostki A, B, C czy D stanowiły takie klastry, dynamika NHazy jest bardziej złożona. Ruchy te, trudne do opisanie w tekście (możliwe ruchy „oddychające”, panel c) Rys. Rysunek 7.20) mają wpływ na pewne odległości krytyczne dla transportu ligandów w kanałach wiodących do jonów kobaltu.

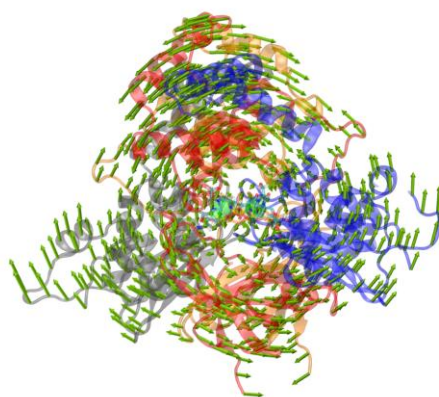
a)



b)



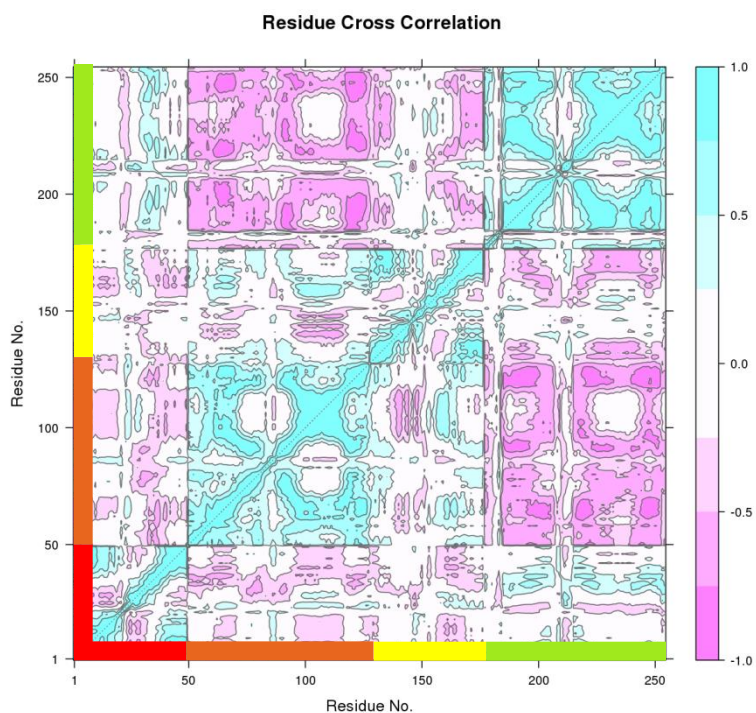
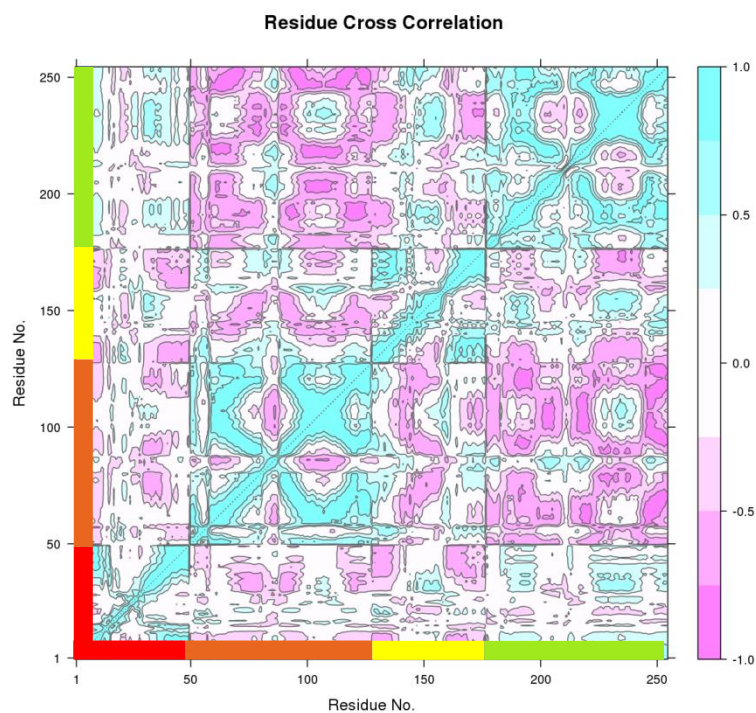
c)

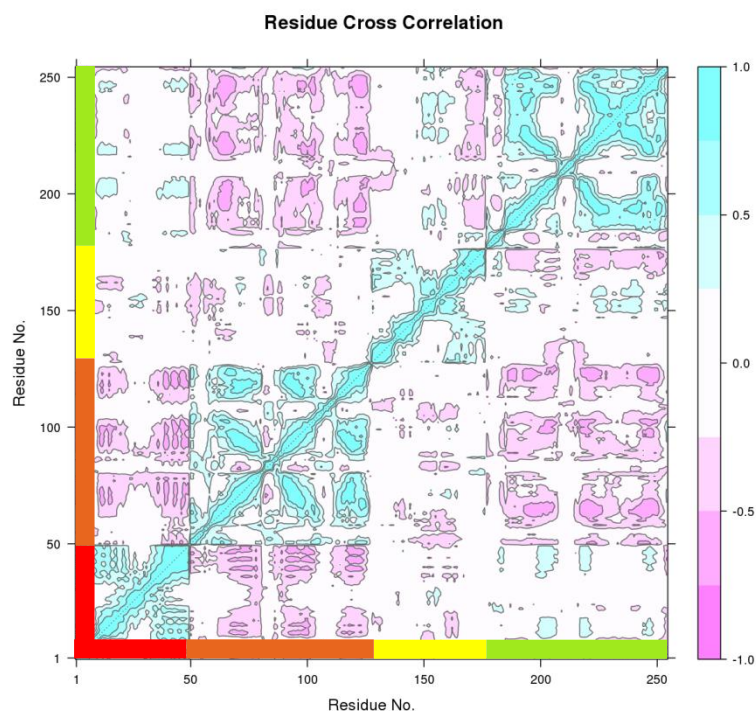


Rysunek 7.20 Wybrane rzuty pierwszego modu NHazy obliczone metodą gruboziarnistą ANM [103, 104]

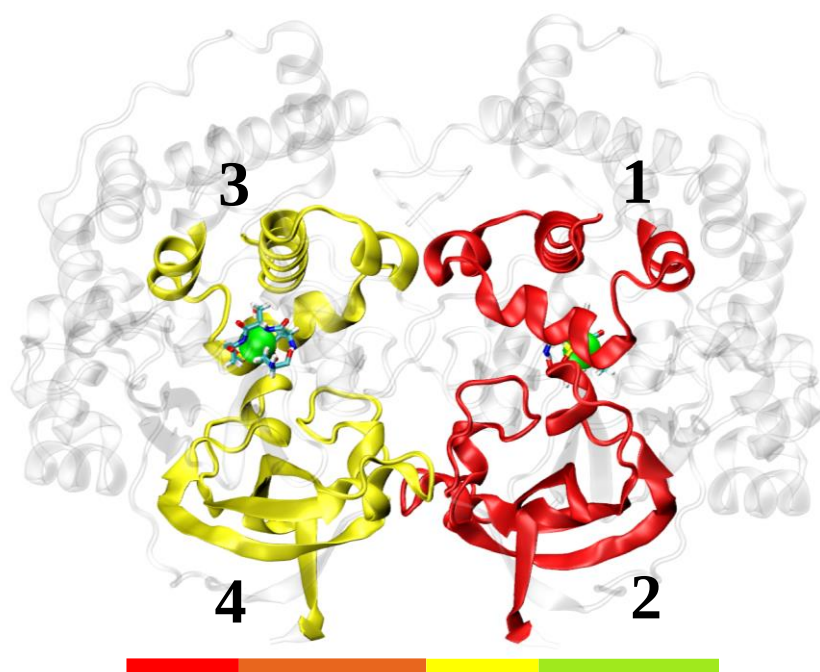
Dla dokładniejszego zbadania wybranych fragmentów podjednostek β wykonano analizę korelacji i obliczono macierze wzajemnej korelacji DCCM z użyciem programu Bio3D z pakietu statystycznego R [100]. Do analiz wybrano ostatnie 400 ns trajektorii i tylko te fragmenty podjednostek β , które z analiz graficznych wyglądały na najsilniej skorelowane. Wyniki przedstawiono na Rysunek 7.21. Na tych diagramach kolor jasnoniebieski oznacza, że ruchy odpowiednich rejonów są skorelowane (fragmenty poruszają się w tę samą stronę), zaś kolor fioletowy, że są anty-skorelowane (w przeciwne strony). Analizując barwy widzimy wyraźny efekt rozpuszczalnika, który sprawia, że odległe w sekwencji, ale skorelowane

dynamicznie rejony podjednostek β w wodzie, tracą stopniowo poziom tej korelacji gdy stężenie amidu znacząco rośnie. Oznacza to, że chociaż poważnej denaturacji enzymu pod wpływem rosnącego stężenia amidu nie ma, to zdolność do propagowania informacji strukturalnej wyraźnie słabnie. Można przypuszczać, że dynamika rejonów tuneli jaki centrów aktywnych w tetramerze też jest zaburzona gdy amidów powstaje coraz więcej.



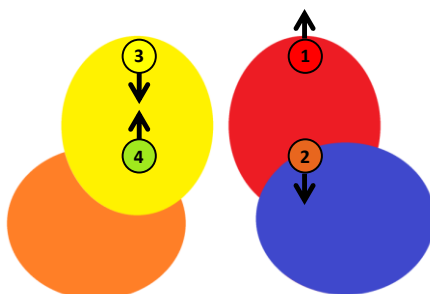


Rysunek 7.21 Macierze korelacji dla wybranych fragmentów podjednostek β w NHazie, dla różnych roztworów, od góry: woda, ACA20, ACA50. Opis analizowanych fragmentów przedstawiono na Rysunek 7.22



Rysunek 7.22 Ilustracja opisu Rysunek 7.21 Fragmenty wybrane do analizy macierzy kroskorelacji dla fragmentów podjednostek B oraz kody kolorów na macierzy korelacji (Rysunek 7.21): (1) β 37-85 (czerwony), (2) β 150-227 (pomarańczowy), (3) β' 37-85 (żółty), (4) β'' 150-227 (zielony).

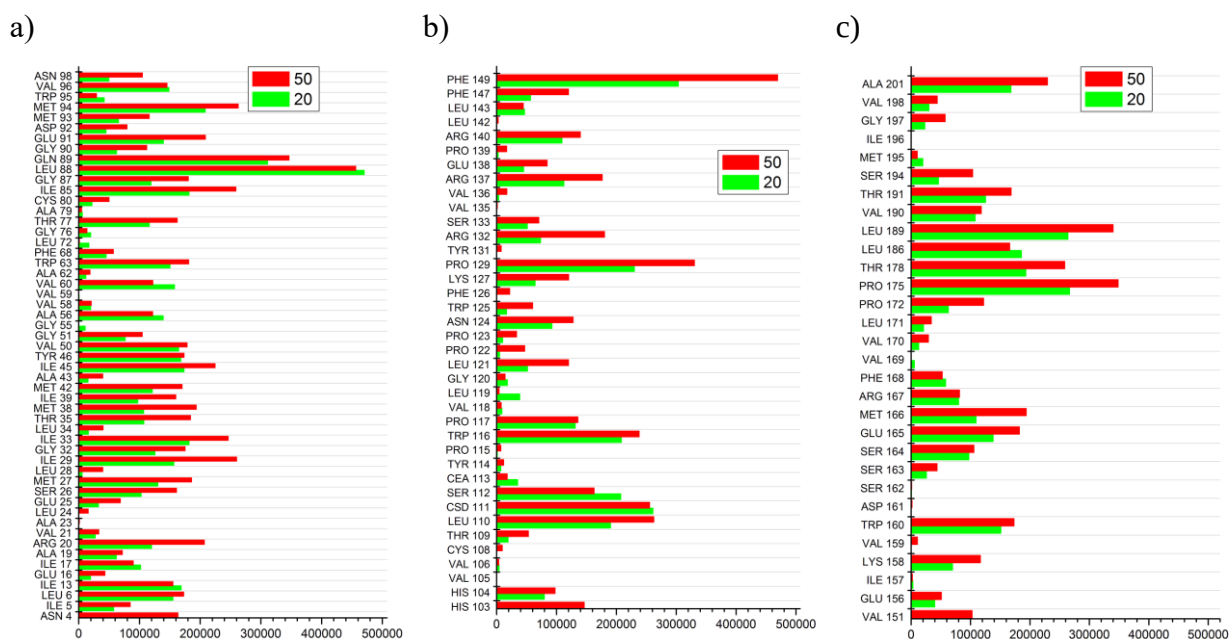
Jakościowe zrozumienie ujawnionych ruchów (dynamiki) NHazy ułatwia diagram przedstawiony na Rysunek 7.23, który należy analizować w połączeniu z Rysunek 7.21.



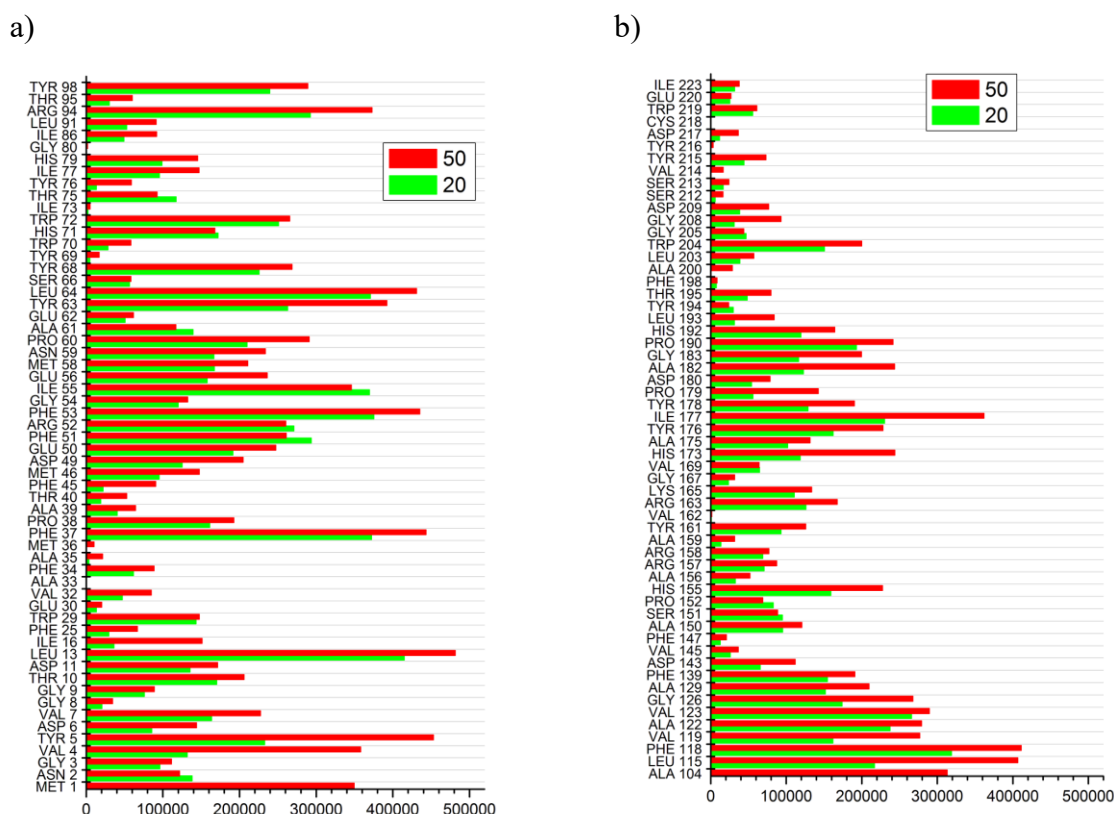
Rysunek 7.23. Ilustracja opisu Rys. 7.20 i Rys. 7.21, ruchy domen NHazy wynikające z macierzy kros-korelacji.

7.9 Badanie rozkładu amidów w NHazy. Kontakty ligandów z białkiem

W miarę produkcji enzymatycznej amidów ich stężenie w roztworze rośnie, zatem rośnie też prawdopodobieństwo, że amidy będą wnikać do NHazy, ewentualnie obsadzać miejsca na powierzchni białka konkurując z molekułami wody. Do badania tego procesu wykorzystano specjalnie napisany program w języku C przez mgr. Łukasza Damsa, byłego studenta prof. W. Nowaka, aby zmierzyć arbitralnie zdefiniowane kontakty molekuł ACA z atomami poszczególnych aminokwasów z NHazy. Przyjęto założenie, że kontakt ma miejsce wtedy, gdy odległość pomiędzy jakimikolwiek atomami z obu molekuł (ligand, badany aminokwas) jest mniejsza niż 3.5 Å. Wyniki zebrano w dwóch Rysunek 7.24 i Rysunek 7.25, zauważmy, że z powodu ilości danych każdy rysunek ma kilka części.



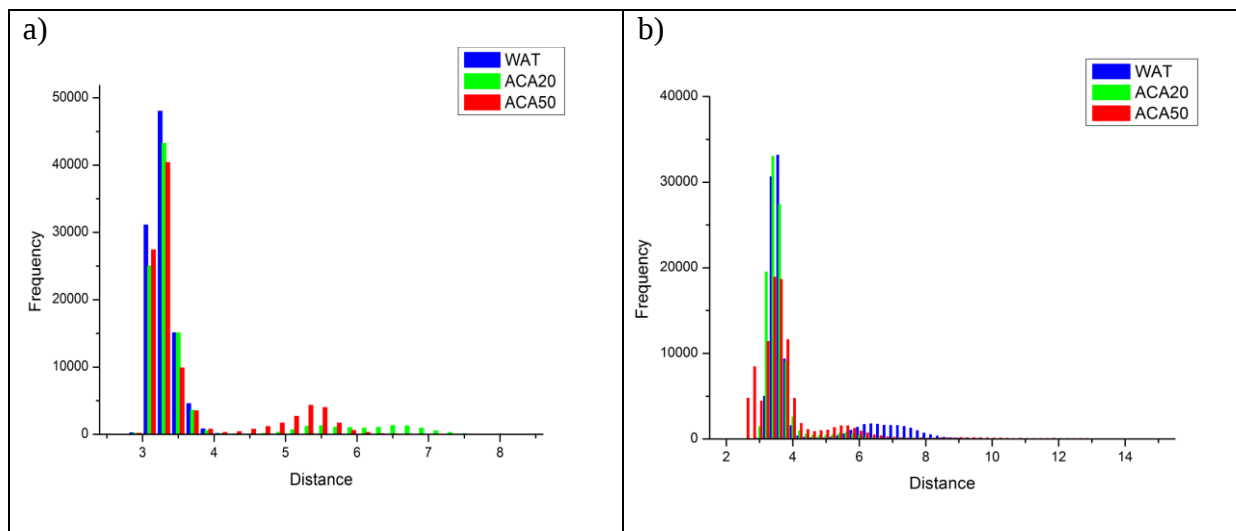
Rysunek 7.24 Liczba kontaktów ($r < 3.5$ Å) amidów z poszczególnymi aminokwasami podjednostki α NHazy. Dane zagregowane.



Rysunek 7.25 Liczba kontaktów ($r < 3.5$ Å) amidów z poszczególnymi aminokwasami podjednostki β NHazy. Dane zagregowane.

Jak widzimy z Rysunek 7.24 i Rysunek 7.25 szacunkowo tylko niewielka grupa ok. 5-8% aminokwasów NHazy ma szczególnie częsty kontakt z amidami (zobacz Rysunek 7.27,

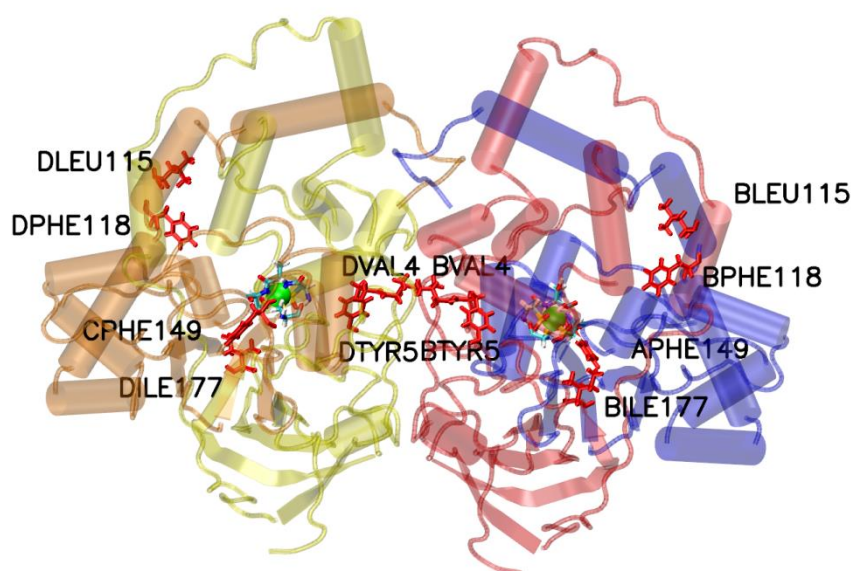
reprezentacja *licorice*). Można przypuszczać, że rejony, w których te aminokwasy się znajdują, oznaczają obszary ważne w transporcie produktu. Oczekujemy, że będą to np. tunele transportowe, którymi amid opuszcza białko. Są to też miejsca, które potencjalnie mogą (poprzez obecność amidów, indukujących subtelne zmiany konformacyjne) dezaktywować enzym, kiedy stężenie amidów osiąga doświadczalne 50%. Dlatego na Rysunek 7.27, w kolorze czerwonym wyróżniono te aminokwasy, które zyskały najwięcej kontaktów przy wzroście stężenia amidu z 20% do 50%, co więcej, przyjęto do selekcji dodatkowe kryterium by były ułożone raczej wewnątrz białka, czyli miały te aminokwasy niską wartość indeksu SASA. W większości są to aminokwasy powierzchniowe i wzrost ilości kontaktów dla tych aminokwasów jest zrozumiały w wyższym stężeniu. Jeśli z analizy wykluczamy aminokwasy powierzchniowe, okazuje się, że zwiększonymi kontaktami z amidami wykazuje się tylko kilka aminokwasów. Są to głównie aminokwasy z podjednostki β : Val4, Tyr5, Leu115, Phe118, Ile177 oraz jeden aminokwas z podjednostki α : Phe149 (Rysunek 7.24). Co ciekawe wszystkie te aminokwasy poza tyrozyną są hydrofobowe. Val4 znajduje się na interfejsie dwóch dimerów i oddziałują ze sobą poprzez oddziaływania hydrofobowe (Val4 z podjednostki B z Val4 z podjednostki D). Pomimo znacznego zwiększenia kontaktów amidów z tymi aminokwasami z interfejsu dwóch podjednostek nie zaobserwowano zwiększenia odległości pomiędzy podjednostkami w wyższych stężeniach. Może to oznaczać, że amid w tym miejscu blokuje częściowo allosteryczność, jeśli ona istnieje. β Tyr5 pomimo, że sekwencyjnie występuje blisko Val4, jej łańcuch boczny skierowany w kierunku ważnej od strony aktywności katalitycznej Arg157 (odległość w kryształach poniżej 4Å) [23], [19], [183] .



Rysunek 7.26 Histogram odległości pomiędzy aminokwasami Cys111 Arg157 a) oraz Cys111 Arg52 b). Zależność od rodzaju roztworu.

Analiza odległości pomiędzy Arg157 oraz centrum aktywnym (Rysunek 7.26) pokazuje, że w szczególności w 50% stężeniu amidu aminokwas ten nie oddziałuje tak jak w wodzie i widać bardzo dużo zliczeń odległości powyżej 4.5Å (w wodzie większość zliczeń odległości jest między 3 a 3.5Å). Wskazuje to, że zaburzenie dynamiki arginin oddziałujących bezpośrednio z centrum aktywnym może mieć wpływ na aktywność katalityczną, zmieniając

rozkład ładunków w pobliżu centrum katalitycznego. Aminokwasy β Leu115, β Phe118 znajdują się w helisie H6, o której dyskutowano już w poprzednich rozdziałach. Zwiększone oddziaływania z tymi aminokwasami mogą być przyczynkiem do częściowego rozplatania białka w obszarze od β 110 do β 125 (zwiększone RMSF). Ostatni aminokwas z podjednostki β – Ile177 znajduje się w ważnym fragmencie enzymu złożonego z krótkiej helisy H8 i pętli z aminokwasami o numerach od 185 do 190, blisko początku kanału. Fragment ten był dyskutowany w poprzednich artykułach jako niezwykle ważny [23], bo stabilizuje on dwie wspomniane wcześniej argininy z łańcucha β (52 i 157). Widać, że zaburzenie jednego tylko aminokwasu z tego regionu może zaburzyć oddziaływania arginin z centrum katalitycznym.



Rysunek 7.27 Położenie aminokwasów (*licorice*), które mają najwięcej kontaktów z molekułami amidów. Kolorem czerwonym wyróżniono te aminokwasy, które miały mało kontaktów w ACA20 zaś pojawiły się w wykazie dużych częstości dla ACA50.

Z Rys. 7.24 widzimy, że krytyczne dla modulacji aktywności enzymu mogą być obszary wejścia do głównego kanału, okolice β Leu115 i β Phe118 (należące do helisy 6) a także β Ile177 oraz α Phe149, obszar interfejsu AB/CD β Val4. Ciekawie wygląda analiza kontaktów amidów z aminokwasami tworzącymi centrum aktywne (Cys108, Cys111, Ser112 i Cys113) oraz jon metalu. Spośród tych aminokwasów istotne oddziaływania z amidami można zauważyć tylko z Cys111 i Ser112 (około 50% maksymalnej liczby kontaktów), natomiast pozostałe aminokwasy z centrum i jon metalu (poniżej 1,5% maksymalnej liczby oddziaływań w obu przypadkach) prawie w ogóle nie oddziałują z amidami. Co więcej w ACA50 widzimy wręcz zmniejszenie liczby kontaktów. Wskazuje to, że samo centrum aktywne nie jest w żaden sposób zaburzane przez wysokie stężenia amidów.

Jeśli spojrzeć na inne aminokwasy istotne dla katalizy, tj. α Gln89, β Arg52, β Arg157, β Tyr68, β Trp72 - publikacje [19, 23, 36, 43, 183, 192, 193] (dwa ostatnie znajdują się bezpośrednio nad centrum katalitycznym i biorą udział w orientowaniu substratu względem centrum) to ponownie nie widać żadnych różnic w ilości kontaktów z tymi

aminokwasami. Oznacza to, że samo centrum oraz jego najbliższe sąsiedztwo dobrze chronione są przed dużą ilością amidów. Amidy mają jednak pośredni wpływ na β Arg52 i β Arg157, co przedyskutowano w poprzednim akapicie.

7.10 Analiza kanałów w NHazie

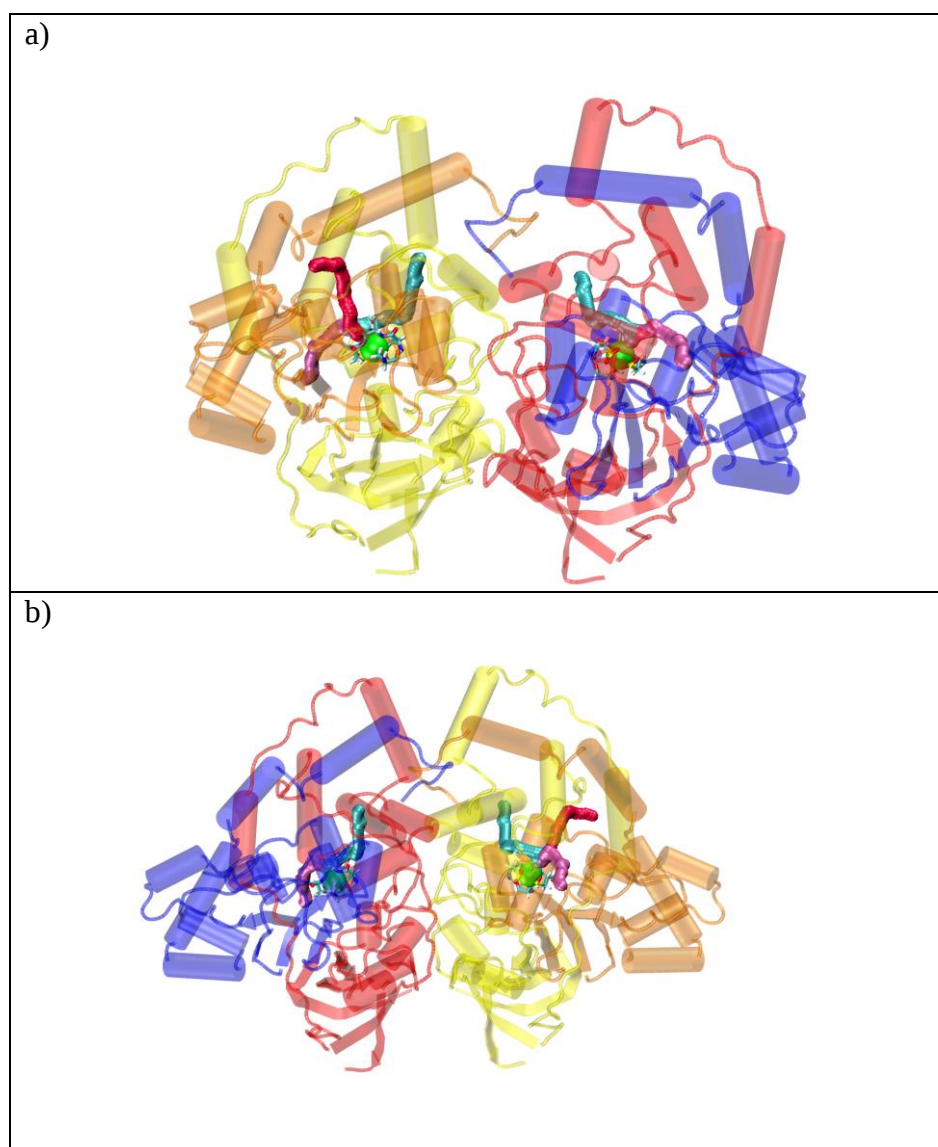
Centra aktywne enzymów często schowane są dość głęboko w strukturze białka [83] i proces katalityczny wymaga transportu substratów do centrum i usuwania produktów z centrum. Ścieżki dojścia są przedmiotem intensywnych badań, często z wykorzystaniem metod symulacyjnych, przykładem mogą być publikacja z naszej grupy [194, 195]. Kanały w NHazie były już przedmiotem badań teoretycznych [8, 9, 12, 13]. Wcześniejsze prace wykonywano w oparciu o krótkie symulacje, często dla hydratazy żelazowej i dla dimerów (L. Peplowski [8, 10, 11, 24, 196]). A później także dla tetramerów [26, 28]. Nasi współpracownicy z Chin znaleźli w hydratazie nitrylowej aż 7 kanałów [28]. Jednakże prawdopodobnie użyli oni struktury pdb bez dodanych atomów wodoru. Po dodaniu wodorów, w strukturze statycznej znajdowane były 3-4 kanały. W trakcie symulacji pojawiało się więcej kanałów. W ramach tej pracy doktorskiej zastosowano do pełnych tetramerów, w różnych środowiskach, dwa programy dedykowane do analizy tuneli, kanałów i wnęk w białkach: CAVER [83] i MDpocket [98]. Ponieważ podstawowym problemem badanym w tej części projektu była próba wyjaśnienia przyczyn utraty aktywności przy dużych stężeniach amidu, analizy danych dokonano głównie dla tej molekuly (ACA), w oparciu o trajektorie NHazy w roztworach ACA20 i ACA50.

7.11 Rozkład kanałów transportowych w NHazie wyznaczony programem CAVER.

CAVER [94] - wykorzystuje algorytm Woronoja [95]. Jest to teselacja, która dzieli przestrzeń na zestaw komórek zawierających wszystkie punkty, które są bliżej do tego „ziarna” niż do jakiegokolwiek innego. Caver przedstawia atomy jako zestaw kulek o jednakowych promieniach. Triangulacja Delaunaya zostaje użyta aby stworzyć wierzchołki i krawędzie diagramu Woronoja [96]. Jest to sposób połączenia zestawu punktów tak, żeby utworzyć trójkąty takie, których okręgi opisane nie zawierają żadnych punktów. Wierzchołki trójkątów odpowiadają generatorom Woronoja. Każdy atom jest generatorem do stworzenia diagramu Voronoia. Program dzieli przestrzeń na rejony bliskie do danego atomu. Ścieżka prowadzi przez krawędzie oraz wierzchołki Woronoja. Następnie na ścieżce ustawiane są okręgi w ten sposób, żeby nie kolidowały z atomami. Diagram umożliwia identyfikację regionów w przestrzeni które nie są zajmowane przez żadne atomy. Te regiony to potencjalne tunele. CAVER analizuje ciągłość tych tuneli. Trójkąt Delaunaya reprezentuje drogę łączącą atomy. CAVER może znaleźć tunele przez identyfikację ścieżek, które nie przecinają żadnych atomów. Kanałem nazywana jest w CAVERZE przestrzeń, która ma dwa wyjścia. Tunelem jest nazywana ścieżka łącząca powierzchnię z wewnętrzną wnęką [94, 97]. MDPocket także używa tego algorytmu [98].

Wyniki poszukiwania kanałów programem CAVER 3.0 są dość złożone i zależą od przyjętych parametrów. Przeprowadzone obliczenia pokazują, że dwa główne czynniki

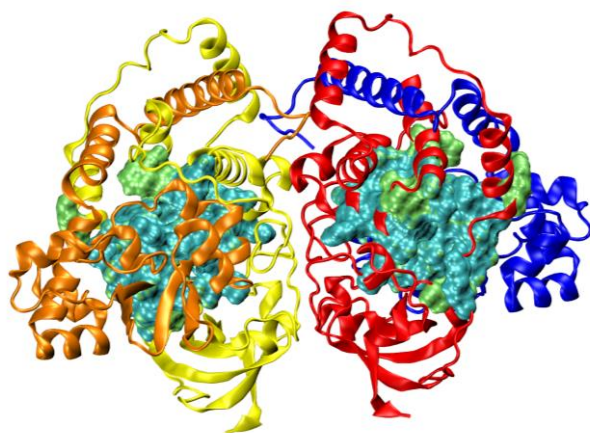
to założony promień sfery determinujący wymagania na pustą przestrzeń, by dany obszar zaliczyć do kanału oraz sposób klasteryzacji wyników, który pozwala oceniać różnorodność i dynamikę kanałów w białku. Typowe rezultaty analizy przedstawiono na Rys. 7.25. W dimerze AB można zaobserwować dwa kanały, zaś w CD – trzy. Dalsze dyskusje będą prowadzone w odniesieniu do dwóch najczęściej obserwowanych kanałów K1 („przedni”, według orientacji standardowej rysunków NHAzy prezentowanych w tym doktoracie) i K2 (kanał „tylny”).



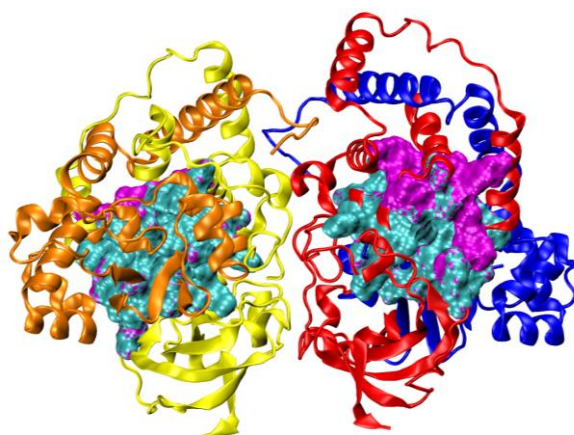
Rysunek 7.28 Przykładowy schemat kanałów transportu ligandów w NHAzie, struktura startowa w wodzie, obliczony programem CAVER. Przyjęto promień sondy 1.1 Å. W każdym dimerze (AB i CD) wyznaczone są trzy kanały, ale dokładna liczba zależy od konkretnej fazy symulacji i otoczenia rozpuszczalnikowego. Główne wejście to kanał K1 oznaczony kolorem fioletowym (*magenta*) na dimerze AB a). Kanał K2 (modry w dimerze AB – kolory białka niebieski i czerwony, panel b)) jest to rzadziej wykorzystywana ścieżka „tylna”. Tutaj „Caver” nie pokazuje obserwowanego niekiedy w dalszych symulacjach przestrzeni w obszarze interfejsu między tetramerami.

Rozpuszczalnik (otoczenie) ma wpływ na listę aminokwasów rozpoznawanych przez CAVER jako budujące kanał. Aminokwasy te przedstawiono na Rysunek 7.29.

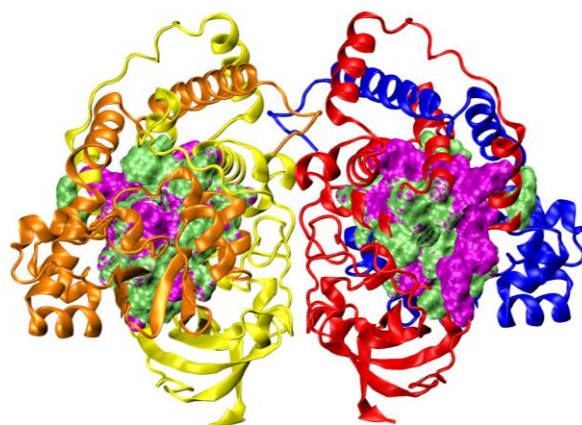
a)



b)



c)



Rysunek 7.29 Wizualizacja aminokwasów wchodzących w skład kanału K1, (reprezentacja Surface) wyznaczonych CAVEREM w środowisku wodnym, ACA20 i ACA50: a) różnica pomiędzy ACA20 a wodą, b) różnica pomiędzy ACA50 a wodą, c) różnica pomiędzy ACA50 a ACA20. Kolory: niebieski – woda, zielony – ACA20, fioletowy - ACA50.

Z Rys. 7.29 widzimy, że zakres aminokwasów (obszar białka) zaangażowanych w tworzenie tuneli transportowych rośnie wyraźnie w szeregu woda, ACA20, ACA50. Wynika stąd, że obserwowane w oparciu o wcześniejsze analizy strukturalne zmiany konformacyjne indukowane otoczeniem mają wpływ na geometrię kanałów w NHazy. Wniosek ten jest dodatkowo wzmocniony przez liczne dane zaprezentowane w DODATKU 1, gdzie zobrazowano długości i średnice kanału K1 w 100 ramkach próbkowanych co 4 ns ze wszystkich badanych odcinków 100-500 ns trajektorii (Rys. D1.1-D1-3).

Przydatne do projektowania potencjalnie lepszych mutantów NHazy jest sprawdzenie, jak zmieniają się udziały poszczególnych aminokwasów w budowie kanałów K1 i K2 przy zmianie otoczenia białka. Częstości wystąpień (maksymalna wartość to 4 razy) uśrednione po podjednostkach i trajektoriach w zakresie 100-500 ns podano w Tabeli 7.1.

Tabela 7.1. Częstości wystąpień aminokwasów w kanałach K1 i K2 dla podjednostki typu α a) i typu β b) określonych programem CAVER. Symulacje 500 ns.

Podjednostka A Aminokwas	K1 Liczba wystąpień			Podjednostka A Aminokwas	K2 Liczba wystąpień		
	WAT	ACA20	ACA50		WAT	ACA20	ACA50
M42	1	0	0	M1	1	1	0
Y46	1	0	0	G3	1	0	0
G86	0	0	1	V4	1	0	0
G87	2	1	1	R7	1	0	0
L88	2	1	2	D10	1	0	1
Q89	2	4	2	I13	0	0	1
G90	3	2	2	Q14	0	0	1
E91	3	3	2	N59	1	0	0
D92	3	2	1	P60	1	1	0
M93	0	0	1	Q89	2	3	2
C108	3	3	2	G90	1	0	0
C111	2	2	2	C108	3	2	2
S112	2	3	2	T109	1	2	1
C113	2	4	2	L110	2	2	2
Y114	2	1	2	C111	2	2	2
P115	0	1	1	S112	2	2	2
W116	2	2	2	C113	2	3	2
P117	1	0	1	Y114	2	1	2
G120	1	0	0	W116	2	2	2
P122	0	1	1	L121	1	0	0
R132	2	2	2	P122	2	0	1
S162	0	1	0	P123	1	0	0
S163	2	3	2	N124	2	2	2
S164	2	1	2	W125	1	0	0
E165	2	2	2	F126	3	2	1
M166	2	2	0	K127	2	2	2
R167	2	3	2	E128	2	2	2
				P129	2	3	2
				Q130	2	2	2
				R132	2	2	2
				S164	1	0	1
				E165	1	1	0
				R167	2	2	2

Podjednostka B K1				Podjednostka B K2			
Aminokwas		Liczba wystąpień		Aminokwas		Liczba wystąpień	
	WAT	ACA20	ACA50		WAT	ACA20	ACA50
CO	2	2	2	CO	1	1	2
Y5	0	1	0	V4	1	2	1
F34	1	3	1	Y5	2	2	2
F37	2	2	2	D6	0	2	0
P38	1	1	2	V7	1	2	1
T40	0	1	0	T10	1	0	0
F41	2	4	2	G12	1	1	0
G44	0	1	0	L13	1	1	1
M46	0	2	2	G14	0	1	0
G47	2	3	2	P15	0	0	1
L48	2	2	2	I16	0	0	1
D49	2	3	1	R18	0	0	1
F51	2	1	2	R26	1	1	2
R52	2	2	2	W29	0	0	1
F53	2	0	0	E30	1	0	0
I55	2	3	2	F34	0	2	0
E56	1	1	0	F37	2	2	2
Y68	2	3	2	F41	0	2	0
W72	2	4	2	M46	0	1	0
Y76	0	1	2	L48	2	2	2
F118	1	1	2	F51	2	1	2
V119	1	0	0	R52	2	2	2
Q121	1	0	0	F53	1	0	1
A122	1	1	1	G54	1	2	0
V123	1	1	1	I55	2	2	2
Y124	1	2	1	E56	2	1	0
G125	1	1	1	Q57	1	0	0
G126	1	0	1	M58	1	3	1
L127	1	1	2	E62	2	2	1
P128	1	1	2	Y63	4	3	3
A129	1	1	2	L64	2	2	2
R131	2	1	2	E65	2	2	2
A156	0	1	0	S66	2	1	2
R157	2	0	1	P67	2	2	2
Y176	0	2	0	Y68	2	2	2
I177	1	1	1	Y69	2	1	2
Y178	1	0	0	H71	2	1	2
P179	1	0	0	W72	2	3	2
A182	1	1	0	T75	0	3	1
G183	1	1	0	H155	0	1	0
G185	0	1	0	R157	2	0	0
L186	1	1	0				
E188	1	0	0				
L193	1	0	0				
W219	0	1	0				

Z analizy Tabeli 7.1 wynika, że mamy trzy rodzaje uśrednionych efektów otoczenia NHazy na aminokwasy tworzące kanały wyznaczone CAVEREM: a) w roztworach ACA20 lub ACA50 aminokwas zaczyna brać udział w ścieżce transportowej b) nie się nie zmienia c) udział danego aminokwasu maleje w ACA w stosunku do sytuacji początkowej w wodzie. Nowe w roztworach amidów aminokwasy są następujące K1 α : G44, M46, Y76, G93, P115; K1 β : T40, Y46, A156, Y176, G185, W219; K2 α : I13 Q14; K2 β : D6, G14, P15, I16, R18, W29, F34, F41, M46, T75, H155. Z kolei następujące aminokwasy przestają brać udział w budowie kanałów transportowych w miarę wzrostu stężenia amidów: K1 α : M42, Y46, G120; K2 α : G3, V4, R7, G90, L121, W125; K1 β : F53, Y119, Q121, Y178, P179, L193; K2 β : T10, Q57, R157. Podane aminokwasy mogą przyczyniać się do modulacji aktywności enzymu i mogą stanowić korzystny punkt wyjścia do mutagenazy związanej w poszukiwaniu stabilniejszych/efektywniejszych wariantów.

Ciekawa sugestia pojawia się z porównania liczebności molekuł amidu w odległości 3 Å od jonu kobaltu pojawiających się kiedykolwiek (dane globalne w tabeli) w poszczególnych symulacjach (RUN1, RUN2) przedstawionych w Tabeli 7.2.

Tabela 7.2. Populacje molekuł ACA w okolicy centrum aktywnego NHazy (< 3 Å od jonu kobaltu).

ACA20				ACA50			
RUN1		RUN2		RUN1		RUN2	
AB	CD	AB	CD	AB	CD	AB	CD
25	5	6	12	17	7	6	20

Jak widać, cząsteczki akrylamidu zwykle w czasie trwania symulacji kontaktują się w znacznie większej liczbie z centrum aktywnego jednego z dimerów (może to być AB lub CD, losowo). Wówczas w drugim dimerze obserwujemy znacznie mniej molekuł akrylamidu (relacje 5:1, 2:1, 2.5:1, 3:1). Istnieją doniesienia o tym, że enzymy multimeryczne wykazują działanie kooperatywne. Ich podjednostki mogą naprzemiennie otwierać się i zamykać. Może być to korzystne ze względu na energię swobodną układu. Nie wiadomo, czy dane z Tabeli 7.2 to przypadek, czy takie zjawisko faktycznie zachodzi w tym enzymie. Powyższe obserwacja wymaga potwierdzenia na jeszcze większej statystyce trajektorii MD i w badaniach doświadczalnych [197].

Jak wspomniano, w ramach projektu doktorskiego podjęto próbę oceny ewolucji czasowej kanałów w NHazie. Wyniki mają charakter przybliżony (nie mamy pewności, że CAVER nie wprowadza artefaktów do tetramerów) i dlatego przedstawiono je w Dodatku 1. Dane wskazują, że kanały w NHazie mają charakter dynamiczny. Są one szersze przy powierzchni białka. Statystyka trajektorii jest mała, ale na tym poziomie widzimy pewną asymetrię w rozkładzie kanałów w dimerach AB i CD. Rosnące stężenie amidów powoduje wzrost częstości występowania kanałów obliczonych CAVEREM w MD (Dodatek 1). Obserwacje wpływu stężenia amidu na strukturę i dynamikę kanałów transportowych w NHazie otoczonej 20% roztworem akryloamidu (ACA20) potwierdzają się przy analizie danych dla roztworu 50% zamieszczonych na Rys. D1.3. Widzimy wyraźnie, że w porównaniu z wodą częstość występowania kanału K1 w obu podjednostkach jest zdecydowanie większa, zaś sam kanał często znacznie szerszy (dużo zielonego na panelach b)

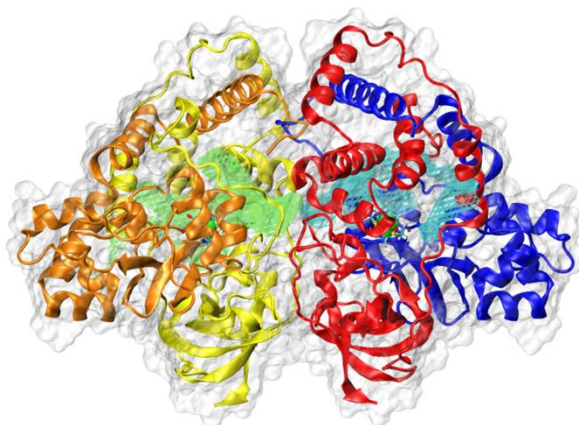
i d)). Wyjaśnienie tej obserwacji jest dość proste: duża liczba amidów (kilkanaście) okupująca kanał uniemożliwia jego zamykanie się, struktura NHazy w pewnych rejonach jest zmieniona pod wpływem otoczenia. Chociaż kanał jest szerszy, nie znaczy to, że transport amidów jest szybszy. Jeśli ich lokalne stężenie jest duże, może następować efekt blokowania transportu produktu do roztworu i wówczas enzym nie może kontynuować katalizy, bowiem cykl katalityczny się zatrzymuje. Obserwacja ta stanowi argument na rzecz hipotezy C z rozdziału 2) tłumaczące spadek aktywności NHazy w roztworach amidów powyżej 50 % w trakcie ich produkcji.

7.12 Analiza kanałów transportowych w NHazie programem MDpocket

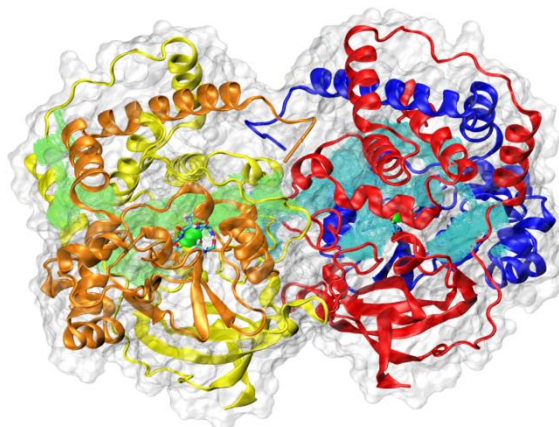
Program otwartoźródłowy MDpocket, opracowany w roku 2011 [98] jest też często stosowany do analiz kanałów w białkach i ma pewne możliwości niedostępne w programie CAVER 3.0. Główną zaletą MDpocket jest możliwość wykrywania chwilowych pustych przestrzeni w białkach pojawiających się w trakcie symulacji MD i obliczanie deskryptorów znalezionych kieszeni. Program analizuje struktury reprezentatywne, uzyskane w wyniku wcześniejszej klasteryzacji, przedstawiając wyniki na siatce trójwymiarowej. Główna część programu opiera się na procedurze Fpocket opracowanej wcześniej [198], wykorzystującej teselację Voronoja oraz pomysł wykorzystania α -sfer.

W tym projekcie zastosowano program MDpocket do analizy trajektorii NHazy by wyznaczyć niezależnie deskryptory charakteryzujące kanały w białku. Porównanie ich pomoże ocenić przemiany w białku znajdującym się w różnych roztworach. Przykładowe wyniki obrazowania wolnych przestrzeni NHazy, w tym kanałów, przedstawiono na Rysunek 7.30.

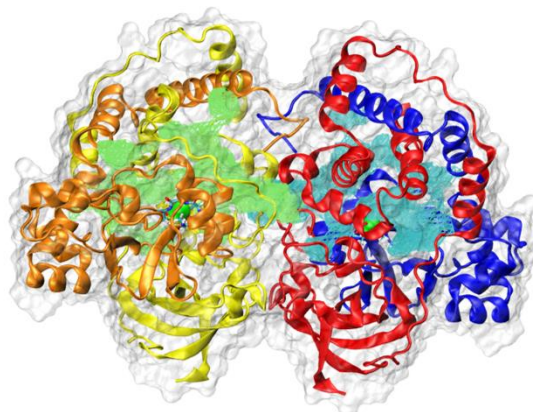
a)



b)



c)



Rysunek 7.30 Wolne przestrzenie przedstawione w postaci niebieskiej siatki, w tym kanały, w NHazie, obliczone programem MDpocket a) w wodzie, b) w ACA20 , c) w ACA50.

Porównanie kanałów obliczonych CAVEREM i MDpocket jest trudne, ze względu na ich złożone kształty. Można stwierdzić, że kanały K1 i K2 są również obecne na Rys. 7.29. Otoczenie nie zmienia zasadniczo topologii przestrzeni dostępnych dla zewnętrznych ligandów, aproksymowanych w programie MDpocket przy pomocy sfer (o promieniu $3 < x < 6$)

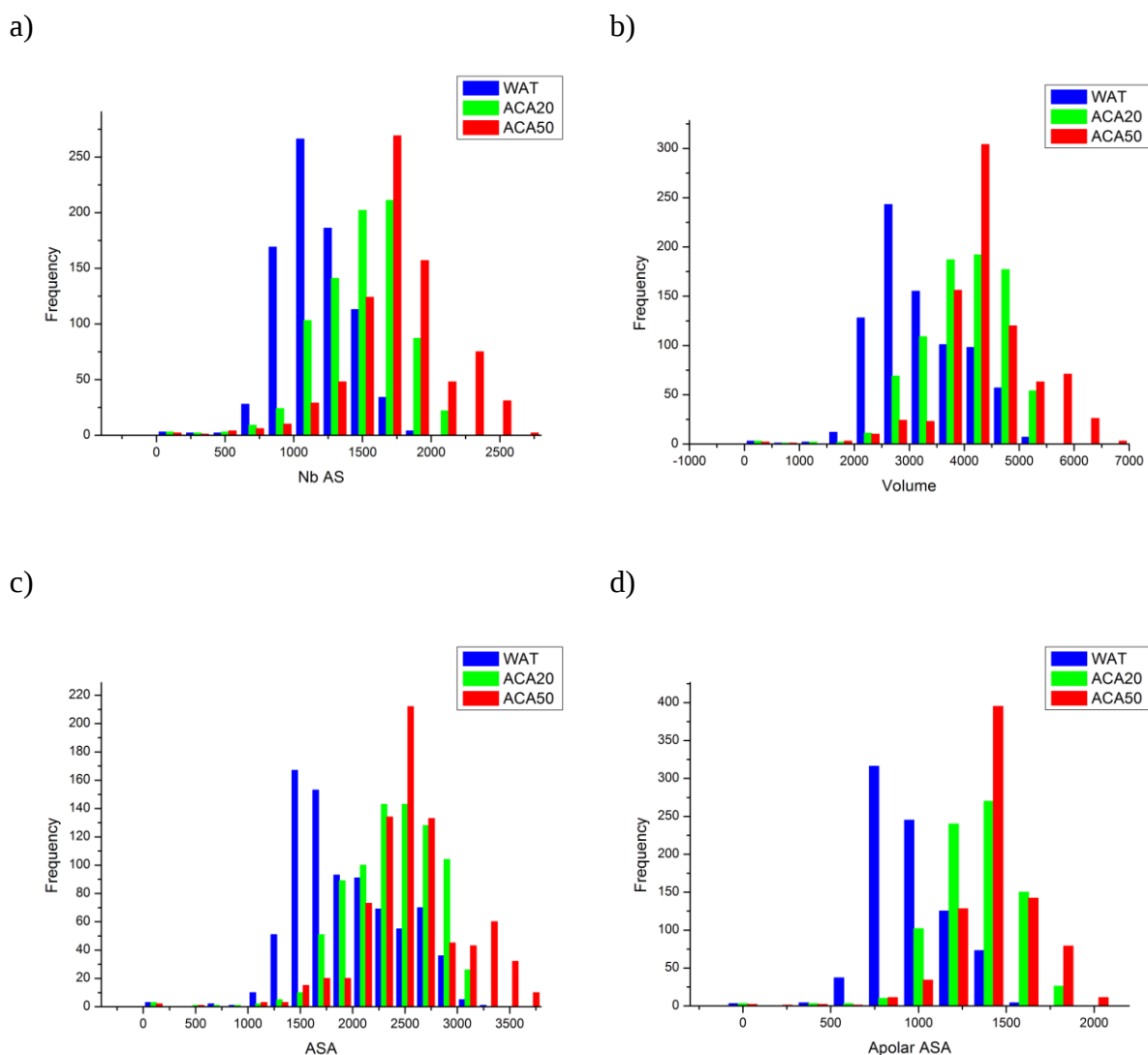
Poziom zgodności wyników przewidywania kanałów programami CAVER i MDpocket przedstawiono w Tabeli 7.3:

Tabela 7.3. Aminokwasy wchodzące w skład kanałów NHazy wyznaczone za pomocą programu MDpocket. Pogrubione zostały aminokwasy, które zostały także wyznaczone przez CAVER.

A	GLY	51
A	PRO	52
A	LEU	88
A	GLN	89
A	GLU	91
A	THR	109
A	LEU	110
A	CYS	111
A	SER	112
A	CYS	113
A	GLY	120
A	PRO	123
A	ASN	124
A	TRP	125
A	LYS	127
A	GLU	128
A	PRO	129
A	GLN	130
A	ARG	132
A	SER	133
B	ASN	2
B	GLY	3
B	VAL	4
B	TYR	5
B	ASP	6
B	VAL	7
B	GLY	8
B	THR	10
B	ASP	11
B	GLY	12
B	LEU	13
B	GLY	14
B	PRO	19
B	ASP	21
B	GLU	22
B	PRO	23
B	VAL	24
B	PRO	38
B	ARG	52
B	MET	58
B	ASN	59
B	PRO	60

B	ALA	61
B	LEU	64
B	GLU	65
B	PRO	67
B	TYR	68
B	HIS	71
B	VAL	119
B	ALA	122
B	VAL	123
B	TYR	124
B	GLY	125
B	GLY	126
B	LEU	127
B	PRO	128
B	ALA	129
B	SER	130
B	ILE	177

Więcej informacji o wpływie otoczenia na NHazę niosą parametry obliczone z MDpocket przedstawione na Rysunek 7.31.



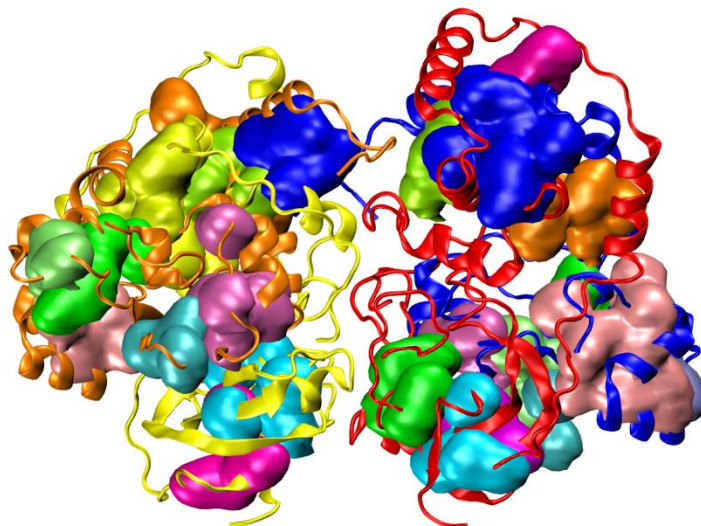
Rysunek 7.31 a) Liczba sfer potrzebnych do wypełnienia wolnych przestrzeni w NHazie wyznaczona programem MDpocket dla struktur w wodzie (WAT) roztworach 20% (ACA20) i 50% (ACA50) akrylamidu. b) Objętość sfer wypełniających wolną przestrzeń (w $\text{\AA}^3$) c) Powierzchnia dostępna dla rozpuszczalnika d) Powierzchnia aminokwasów niepolarnych dostępna dla rozpuszczalnika.

Diagramy (Rysunek 7.31 a) i b)) wyraźnie pokazują, że zarówno liczba sfer z programu MDpocket wypełniających pustą przestrzeń jak i ich objętości łączne rosną w porządku WAT, ACA20, ACA50. Dane te silnie wskazują na rozluźnienie struktury NHazy w miarę wzrostu stężenia amidów. Rozpuszczalnik, (w tym ligandy) ma coraz łatwiejszy dostęp do wnętrza białka (panel c)). Co więcej, dostęp do aminokwasów polarnych nie

zmienia się zbyt szybko (dane nie pokazane) ale do niepolarnych, normalnie ukrytych wewnątrz już tak – jest największy dla roztworu ACA50 d).

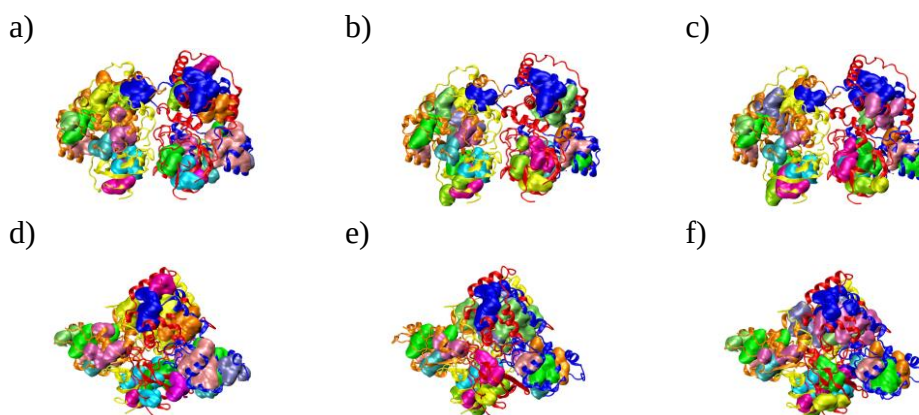
7.13 Analiza klastrow hydrofobowych w NHazie

Ten ostatni rezultat z MDpocket sprawił, że sprawdzono rozkład klastrow hydrofobowych w NHazie w różnych środowiskach. Klasteryzacje przeprowadzono przy pomocy programu Eucb [102]. Typowe klastry zobrazowano na Rysunek 7.32. Ciekawą obserwacją jest fakt, że obszar centrum aktywnego nie należy do jednego klastra hydrofobowego – jest raczej hydrofilowy i jest ograniczony wieloma klastrami.

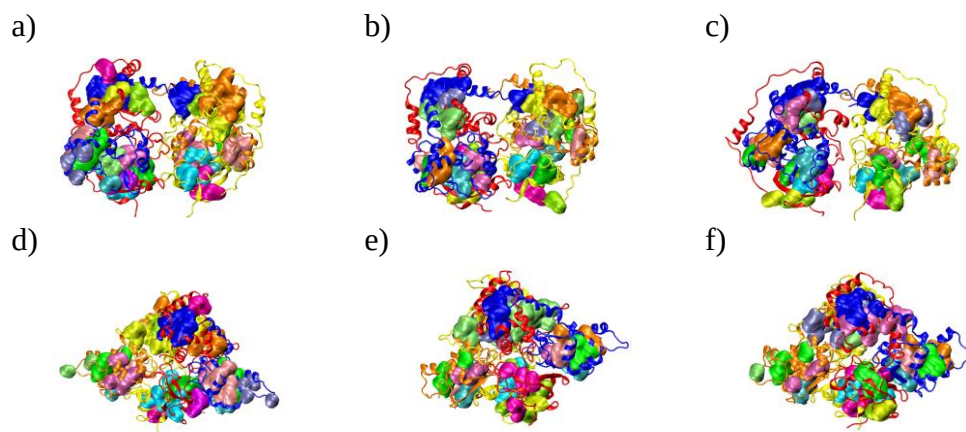


Rysunek 7.32 Lokalizacja klastrow hydrofobowych aminokwasów w NHazie – struktura z symulacji MD w wodzie obliczona program Eucb [102].

Wcześniejsze analizy pokazały, że struktura NHazy w roztworach o dużej zawartości amidu ulega „rozluźnieniu”. Zachowanie, czyli rozkład klastrow hydrofobowych na początku symulacji pokazano na Rys. 7.32 a na końcu na Rys. 7.33. Program znalazł dla WAT 25 klastrow, dla ACA20 – 24, zaś dla ACA50 – 26. Klastry miały ok. 4-5 aminokwasów.



Rysunek 7.33 Lokalizacja klastrow na początku symulacji a) i d) woda, b) i e) – ACA20, c) i f) – ACA50. Panele w dolnym rzędzie obrócone są względem pionowej osi o 90 stopni w porównaniu do górnego rzędu

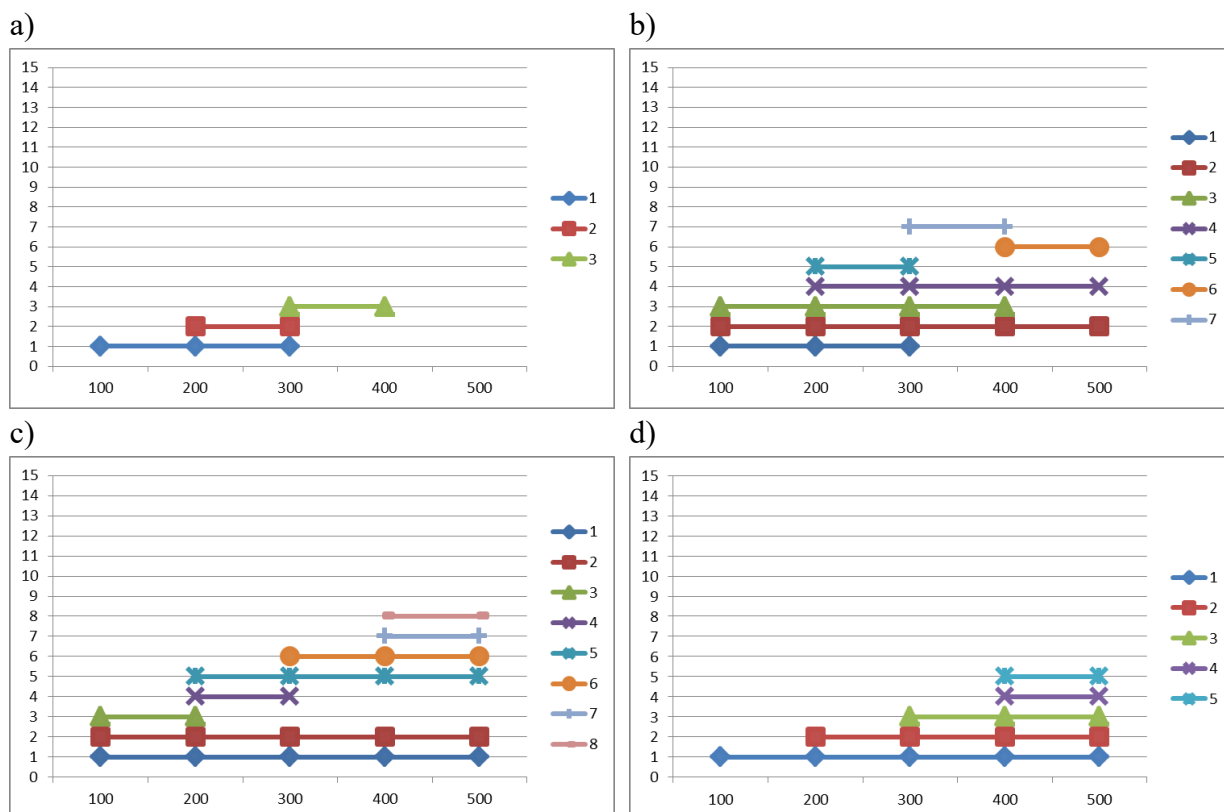


Rysunek 7.34 Lokalizacja klastków na końcu symulacji a) i d) woda, b) i e) – ACA20, c) i f) – ACA50. Panele w dolnym rzędzie obrócone są o 90 stopni względem pionowej osi o 90 stopni w porównaniu do górnego rzędu.

Analiza na grafice komputerowej nie przyniosła zauważenia jakiś spektakularnych efektów jeśli chodzi o dystrybucje klastków hydrofobowych. Pewne rozluźnienie interfejsu AB/CD w ACA50 było już omawiane. Liczby klastków ani ich liczebności nie zmieniają się znacząco. Dane te wskazują, że jeśli amidy wywołują jakieś aminy konformacyjne czy strukturalne w NHazie, to są one albo stosunkowo nieduże, albo zachodzą w skali czasowej znacznie przekraczającej założoną w tych symulacjach.

7.14 Ruchliwość ligandów w kanałach NHazy

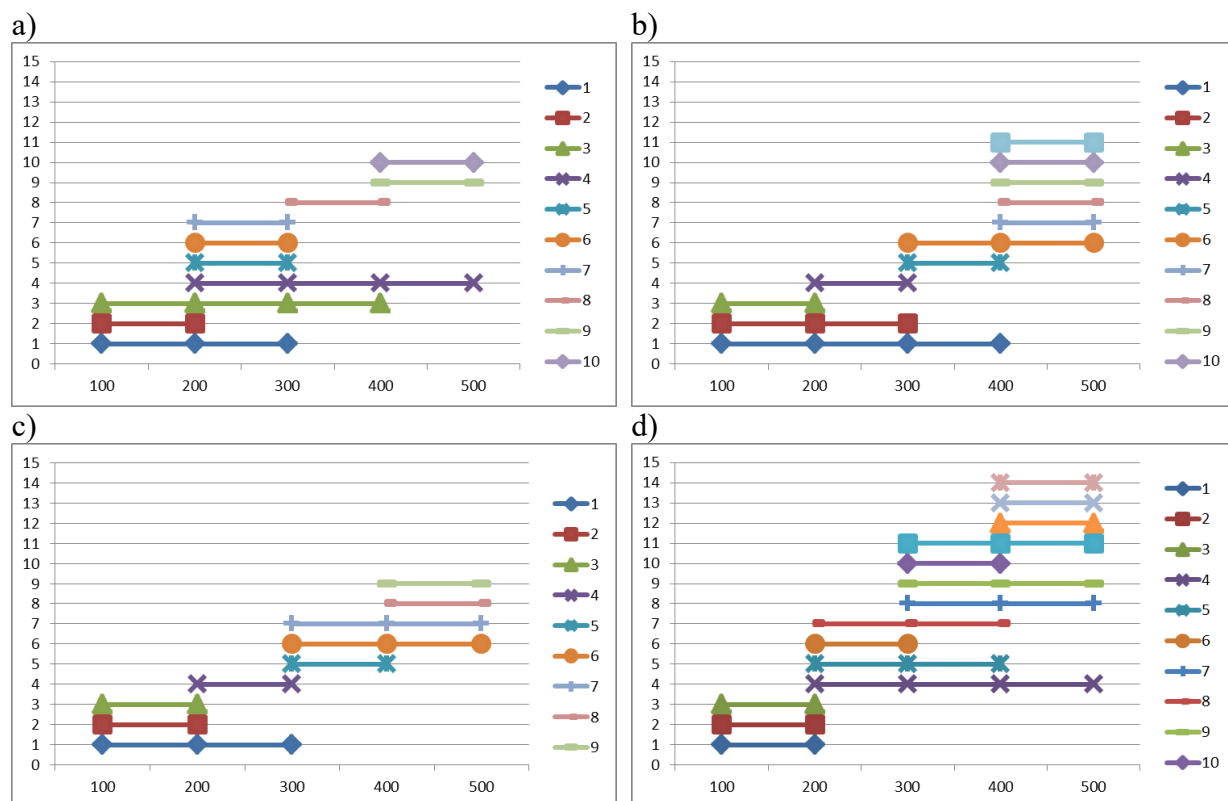
Kanały K1 i K2 w NHazie służą do transportu substratów (ACN) i produktów (ACA). W trakcie symulacji ligandy te ulegają oczywiście wymianie, jedne cząsteczki wchodzi do wnętrza białka, inne je opuszczają. Korzystając z wiedzy o kanałach wyznaczonych przez MDpocket oraz stacji graficznych określono, które molekuły amidów dłużej (>100 ns) rezydują w kanałach. Analizowano osobno dimer AB i osobno CD. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 7.34 - 7.37. Osie pionowe na tych diagramach nie mają jednostek, służą tylko do rozsunienia przestrzennego linii reprezentujących poszczególne molekuły amidów.



Rysunek 7.35 Informacje na temat przedziałów czasu w symulacji 500 ns dla molekuł amidów przebywających w kanale K1 lub K2 w otoczeniu ACA20 przez okres nie krótszy niż 100 ns a) oraz c) w podjednostkach AB; b) i d) w podjednostkach CD. Na osi pionowej jest liczba porządkowa amidu, na osi poziomej czas w ns.

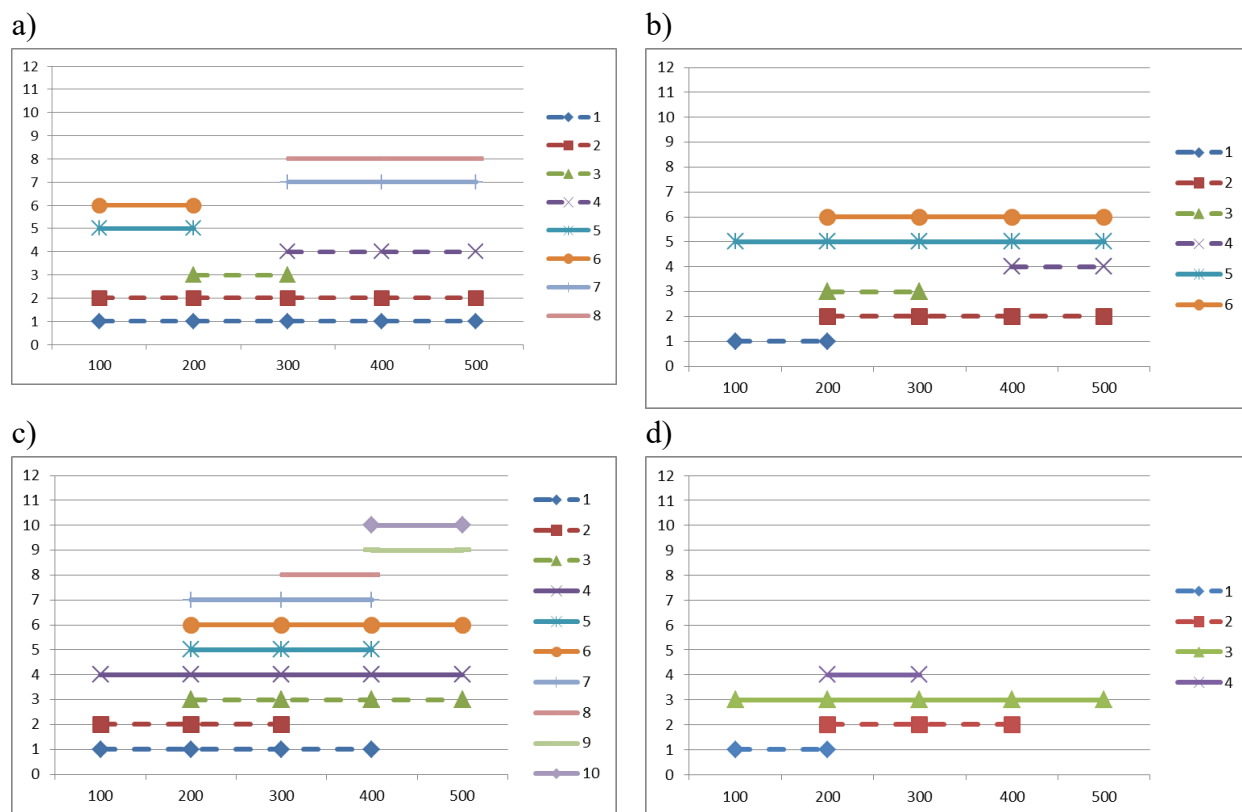
W oparciu o Rysunek 7.35 można zauważyć, że wymiana amidów w obu podjednostkach AB i CD ma odmienny charakter: z panelu a) widzimy, że mało molekuł przebywa długo w kanale, oznacza to że wymiana jest szybka. W tej samej trajektorii liczba amidów przebywających minimum 100 ns jest dużo większa w podjednostce CD – wymiana jest wolna. Z kolei w innej trajektorii (panełe c) i d)) mamy sytuację dokładnie odwrotną: w AB jest mniej wymiany niż w CD. Obserwacja ta może być kolejnym argumentem za możliwym zjawiskiem kooperatywności w NHazy.

W przypadku roztworu ACA50 asymetria pomiędzy czasem przebywania amidów wAB, a CD się zaciera (zob. Rys.7.35). W obu podjednostkach, w obu trajektoriach mamy po ok. 10 amidów przebywających po 100 ns lub więcej w kanale. Ich liczba jest duża bowiem, jak już wspomniano, struktura NHazy ulega rozluźnieniu kiedy stężenie amidów jest bardzo duże.

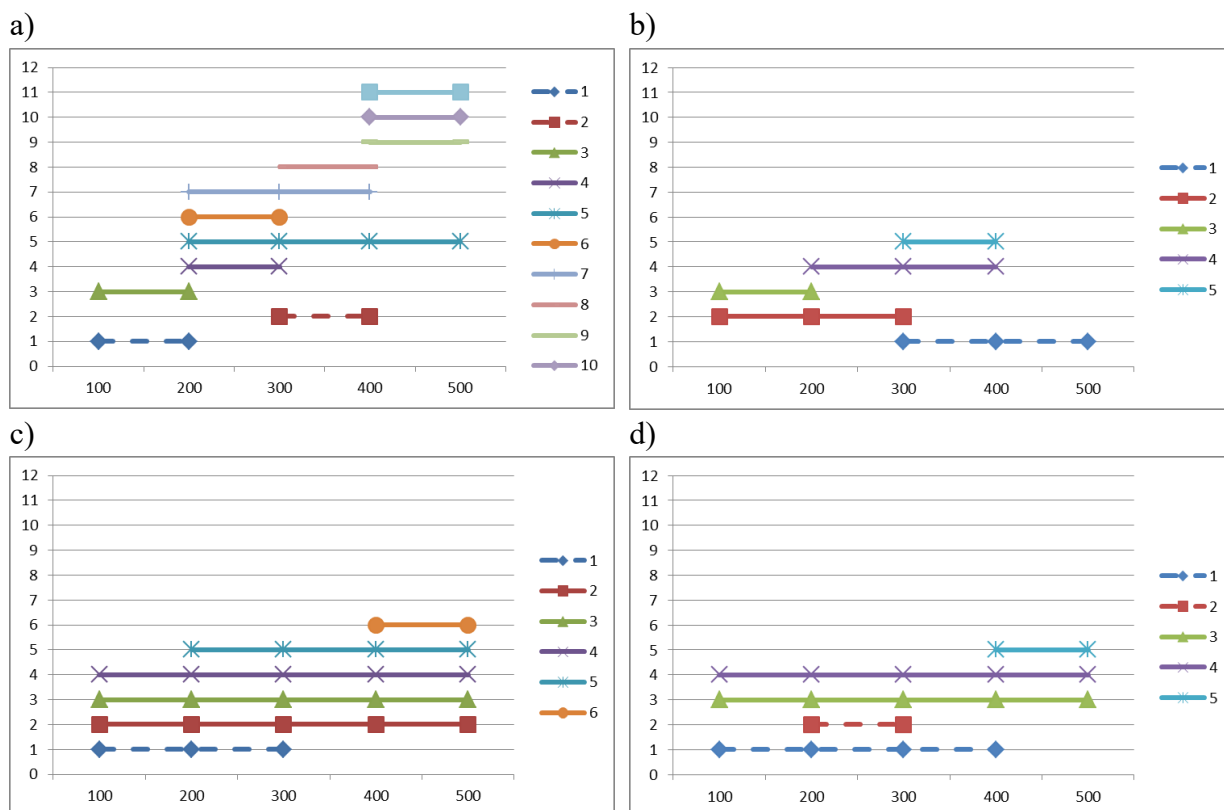


Rysunek 7.36 Informacje o molekułach amidów przebywających w kanale K1 lub K2 w otoczeniu ACA50 przez okres nie krótszy niż 100 ns. a) oraz c) w podjednostkach AB; b) i d) w podjednostkach CD.

Na kolejnych rysunkach 7.36 i 7.37 przedstawiono czasy przebywania najmniej „ruchliwych” ligandów odpowiednio w rozworach mieszanych ACA10 ACN4 i ACA20 ACN4.



Rysunek 7.37 Informacje o molekułach amidów (linia ciągła) i nitryli (linia przerywana) przebywających w kanale K1 lub K2 w otoczeniu ACA10 ACN4 przez okres nie krótszy niż 100 ns a) oraz c) w podjednostkach AB; b) i d) w podjednostkach CD.



Rysunek 7.38. Informacje o molekułach amidów (linia ciągła) lub nityli (linia przerywana) przebywających w kanale K1 lub K2 w otoczeniu ACA20 ACN4 przez okres nie krótszy niż 100 ns. a) oraz c) w podjednostkach AB; b) i d) w podjednostkach CD.

W dwóch przypadkach (Rys. 7.36 c i d oraz Rys. 7.37 a) i b) mamy asymetrię między dimerami, jeśli chodzi o liczbę ligandów dłużej rezydujących w kanale. Asymetria ta nie jest systematyczna, ale obserwacja ta wskazuje, że warto poprawić statystykę i wyjaśnić definitywnie czy jest to cecha NHazy, czy tylko fluktuacja wyników. Z analizy powyższych danych można zauważyć pewną nadreprezentację nityli, zważywszy na niewielkie stężenie tych ligandów (4%) są one wyraźnie obecne w kanałach transportowych NHazy, kwestia ta dyskutowana będzie poniżej.

7.15 Czy NHaza preferuje nitryle?

Dużym nakładem pracy wykonano analizy rozkładu ligandów w NHazie w kanałach prowadzących do centrum aktywnego i w samy centrum aktywnym. Z braku miejsca obszerne tabele nie są tutaj zamieszczone, jednak wyniki średnie zebrano w Tabeli 7.4.

Tabela 7.4 Średnie liczby ligandów (ACN i ACA łącznie) obserwowane w dimerach NHazy.

	AB	CD	RAZEM NHaza	~Średnio
ACA10 ACN4	9.6	5.6	15.2	16
	11.2	6.0	17.2	
ACA20	9.2	9.8	19	18
	8.8	7.4	16.2	
ACA20 ACN4	13	11.8	24.8	23
	9.6	11.2	20.8	
ACA50	13.2	11.8	25	27
	10.2	18	28	

Dane z tabeli pozwalają stwierdzić, że liczba ligandów okupujących wolne przestrzenie w NHazie zależy ściśle od stężenia roztworu i rośnie od 16 do (roztwory „14%”) do 27 (roztwory 50%). Po uśrednieniu nie widać preferencji co do obsadzania przez ligandy dimerów AB czy CD, skrajne dysproporcje na poziomie 1:2 należy przypisać ograniczonej statystyce. Najciekawszy jest jednak wynik oceny jakie molekuly wnikają do NHazy w roztworach mieszanych, zobacz Tabela 7.5.

Tabela 7.5

Stosunek liczby molekuł akrylonitrylu ACN do liczby molekuł akrylamidu w poszczególnych dimerach.

ACA10_ACN_4 RUN1	AB	CD
Oczekiwana	1/ 2.5	1/ 2.5
100 ns	2/11	2/2
200 ns	5/7	4/2
300 ns	6/4	2/2
400 ns	3/3	3/3
500 ns	3/4	4/4
Średnia	3.8/5.8	3/2.6
ACA 10 ACN 4 RUN2	AB	CD
100 ns	4/2	5/1
200 ns	6/5	5/4
300 ns	5/6	2/3
400 ns	4/10	5/4
500 ns	3/12	3/2
średnia	4.4/7	4/2.8
ACA 20 ACN 4 RUN2	AB	CD
oczekiwana	1/5	1/5
100 ns	1/13	6/6
200 ns	3/11	3/11
300 ns	2/11	2/9
400 ns	6/9	3/14
500 ns	3/8	5/5
średnia	3/10.4	3.8/9.0
ACA 20 ACN 4 RUN3	AB	CD
100 ns	5/11	2/6
200 ns	2/5	4/5
300 ns	2/10	4/6
400 ns	1/7	4/11
500 ns	1/5	4/12
średnia	2.2/7.6	3.6/8

Zakładając, że NHaza nie ma preferencji do żadnego z ligandów, proporcje liczby molekuł ACN do ACA powinny odpowiadać stężeniom procentowym badanych roztworów. W trakcie symulacji nie wstawiano sztucznie ligandów do kanałów. Dane z Tab. 7.4 wskazują, że zarówno dla ACA10_ACN4 jak i dla ACA20_ACN4 NHaza wyraźnie preferuje obecność nitryli a „defaworyzuje” amidy. W pierwszym przypadku spodziewany stosunek ACN:ACA wynosi 1:2.5, zaś w symulacjach obserwujemy ok. 1:1! Oznacza to ok. dwukrotną nadreprezentację nitryli. Podobnie jest w rozworach ACA10_ACN4, spodziewana proporcja to 1:5 zaś widzimy proporcję ok. 1:2.5, czyli znów dwukrotny nadmiar nitryli. Na tym etapie badań trudno jest wskazać fizyczną przyczynę tej preferencji, można jedynie spekulować, że większe powinowactwo kanałów NHazy do nitryli w stosunku do amidów jest zgodne z funkcją fizjologiczną tego enzymu, który w bakteriach pobiera właśnie nitryle, a po hydratacji wyrzuca amidy. Dokładniejsze zbadanie tej zależności to ciekawy temat przyszłych modelowań.

Podsumowanie i wnioski

W rozprawie zbadano metodami teoretycznej biofizyki molekularnej, głównie metodą MD, kluczowy enzym stosowany w biotechnologicznej produkcji akrylamidu – hydratazę nitrylową. Enzym (różne warianty) pochodzi z bakterii *P. thermophila* JCM 3095 (pdb:1IRE), *Streptomyces thermoautotrophicus* lub *P. putida* (pdb: 3QXE). W łagodnych warunkach fizykochemicznych katalizuje on hydratację akrylonitryli do akrylamidów. Jak opisano we wprowadzeniu, szczegółowy mechanizm katalityczny działania enzymu jest do tej pory przedmiotem dyskusji i nie ma konsensusu. W niniejszej rozprawie skupiono się nad trzema praktycznymi aspektami związanymi z fizykochemicznym otoczeniem NHazy: a) polepszaniem aktywności; b) poprawą termostabilności tego białka oraz c) wyjaśnieniem przyczyn spadku aktywności enzymu przy dużych stężeniach produktu. Wyniki obliczeń i analiz przedstawiono odpowiednio w Rozdziałach 5, 6 i 7.

Wykonano konstrukcje wybranych modeli białek przy pomocy metod modelowania homologicznego oraz przeprowadzono symulacje MD przy pomocy pola siłowego CHARMM27 dla formy natywnej WT oraz wielu wariantów (m.in. Leu48Asp). Ponieważ ten metaloenzym zawiera niestandardowe aminokwasy w centrum katalitycznym, stosowano zestaw oryginalnych parametrów opracowanych wcześniej przez dr hab. Ł. Peplowskiego, prof. UMK. Uzyskano łącznie ok. 1 mikrosekundę danych trajektorii MD. Wykazano, m.in., że helikalne linkery (EAAAK-x8 - dość sztywne, tworzące helisy) pomiędzy podjednostkami B i A dają najlepszą termostabilność NHazy. Mutant Leu48Asp ma aktywność zwiększoną około siedem razy w stosunku do WT – ponad 700% [20].

Ponadto zbadano szczegółowo dynamikę białka WT w roztworach wodnych zawierających 0%, 20%, 50% (stężeń wagowych) akrylamidu, poszukując efektów wywołanych silną zmianą charakteru otoczenia poprzez postęp reakcji. Wykonano analizy par 500 ns symulacji pełnych tetramerów NHazy (statystyka dla 4 dimerów, AB i CD). W dostępnej skali czasowej enzym nie rozpada się całkowicie pod wpływem produktu, widać jednak systematyczne zmiany strukturalne. W zakresie pojedynczego dimeru rejon helisy (pętla przed helisą β H6, helisa β H6 plus krótka helisa β H8 i jej najbliższe okolice) wykazuje początki procesu denaturacji. Symulacje wskazują, że ten obszar znacząco wpływa na istotne dla katalizy aminokwasy: β Arg52 i β Arg157. Widać też w symulacjach ogólne „rozluźnienie” struktury - dla dimeru wyraźnie rośnie parametr RoG. Starannie zbadano transport ligandów w białku, w szczególności cechy geometryczne kanału prowadzącego do centrum aktywnego. Określono wpływ tego otoczenia na rozmiary kanału. Modelowanie wskazuje na stosunkowo mały efekt zmiany charakteru rozpuszczalnika wynikającego z rosnącego stężenia produktu. Liczba ligandów, które wchodzić poprzez główny kanał do centrum aktywnego zwiększa się przy dużym stężeniu akrylamidu. Ważnym wynikiem był zaobserwowany rozkład amidów w pobliżu centrum katalitycznego czyli jonu metalu residuów sulfenocysteiny i sulfinocysteiny oraz seryny, jest on z dokładnością do zmian statystycznych taki sam, niezależnie od otoczenia rozpuszczalnikowego. Można by stąd przypuszczać, że spadek aktywności enzymu nie jest związany z autoinhibicją enzymu. Ważniejszą rolę odgrywa częściowa denaturacja oraz wraz ze stężeniem amidów zanik oddziaływań z centrum katalitycznym dwóch istotnych

dla reakcji enzymatycznej arginin (β Arg52 i β Arg157). Wynik ten jest ważny, ponieważ oznacza, że warto poszukiwać bardziej stabilnych wariantów – mogą one dać zyski ekonomiczne w produkcji.

W wyniku projektu zauważono pewne przejawy kooperatywności – w komunikacji pomiędzy dimerami w tetramerze. Jednym z nich są diametralnie odmienne charakterystyki dynamiki ligandów w kanałach w poszczególnych dimerach NHazy. Duża wymiana populacji akrylamidu w jednym kanale związana jest zwykle z niską dynamiką wymiany amidów w drugiej podjednostce.

Nigdy wcześniej nie było raportowane zjawisko, że amidy lokują się w obszarze interfejsu hydrofobowego pomiędzy dwoma podjednostkami AB i CD. Prezentowane w rozprawie analizy pokazały, że w NHazie występują z pewnością dwa kanały prowadzące do centrum aktywnego (K1 i K2). Statystyki wskazują, iż dominuje ścieżka dostępu do jonu kobaltu przez kanał główny K1, wcześniej opisywany [8], zaś poboczną funkcję w działaniu enzymu ma też kanał K2, sygnalizowany wcześniej (2008) w doktoracie dr hab. Ł. Peplowskiego prof. UMK oraz publikacji [28]. Analiza roztworów zawierających jednocześnie aminy i nityle pokazuje, że budowa kanałów w NHazie jest taka, że preferują one obecność nityli. Jest to intrygująca obserwacja, wymagająca zebrania większej statystyki i analiz wykraczających poza zakres tej rozprawy, które mogłyby wyjaśnić przyczynę tej preferencji.

Cele postawione w projekcie zostały osiągnięte, jednak trzeba na zakończenie podkreślić, że ograniczone możliwości obliczeniowe i ludzkie pozwoliły na badania w stosunkowo małej skali czasowej, mniejszej niż proces zachodzący w fabryce biotechnologicznej. Układy modelowe są przygotowane, zatem polepszenie statystyki i wydłużenie czasu symulacji jest możliwe. W wyniku realizacji doktoratu otwierają się też możliwości badania dowolnych wariantów tego fascynującego, skomplikowanego i pożytecznego białka.

Publikacje mgr Juli Berdychowskiej

1. Guo J, **Berdychowska J A**, Lai Q, Meng Y, Cheng Z, Peplowski Ł, Zhou Z: "Toolbox" construction of an extremophilic nitrile hydratase from *Streptomyces thermoautotrophicus* for the promising industrial production of various amides, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 221, 2022, s. 1103-1111, DOI:10.1016/j.ijbiomac.2022.09.071, 100 pkt., IF (8,2) , Elsevier – nauki biologiczne/fizyczne
2. Guo J, Cheng Z, **Berdychowska J A**, Zhu X, Wang L, Peplowski Ł, Zhou Z: Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase, International Journal of Biological Macromolecules, vol. 181, 2021, s. 444-451, 100 pkt., IF (8,025); Elsevier – nauki biologiczne/fizyczne

Nie związane z pracą doktorską:

3. **Berdychowska Julia Alicja**, Boniecka Justyna, Dąbrowska Grażyna B.: The stringent response and its involvement in the reactions of bacterial cells to stress, Postępy Mikrobiologii, Polskie Towarzystwo Mikrobiologów, vol. 58, nr 2, 2019, s. 127-142, DOI:10.21307/PM-2019.58.2.127, 20 punktów, IF(0,263)
4. Boniecka Justyna, Kotowicz Karolina, Skrzypek Edyta, Dziurka Kinga, Rewers Monika, Jędrzejczyk Iwona, Wilmowicz Emilia, **Berdychowska Julia Alicja**, Dąbrowska Grażyna: Potential biochemical, genetic and molecular markers of deterioration advancement in seeds of oilseed rape (*Brassica napus*L.), Industrial Crops and Products, vol. 130, 2019, s. 478-490, DOI:10.1016/j.indcrop.2018.12.098, 200 punktów, IF(4,244)
5. Mierek-Adamska Agnieszka, Kotowicz Karolina, Goc Anna, Boniecka Justyna, **Berdychowska Julia Alicja**, Dąbrowska Grażyna: Potential involvement of rapeseed (*Brassica napus*L.) metallothioneins in the hydrogen peroxide-induced regulation of seed vigour, Journal of Agronomy and Crop Science, vol. 205, nr 6, 2019, s. 598-607, DOI:10.1111/jac.12361, 140 punktów, IF(3,057)

DODATEK 1

Program CAVER [83], opisany w Sekcji 7.7.1 pozwala na znajdowanie kanałów w białkach. Wykorzystano go do analizy wszystkich trajektorii NHAzy w roztworach o zmiennej zawartości amidów, próbując po 100 ramek z każdego układu. Kanały określane tym programem nie są stałe – powstają i znikają w wyniku fluktuacji aminokwasów i drgań całego białka.

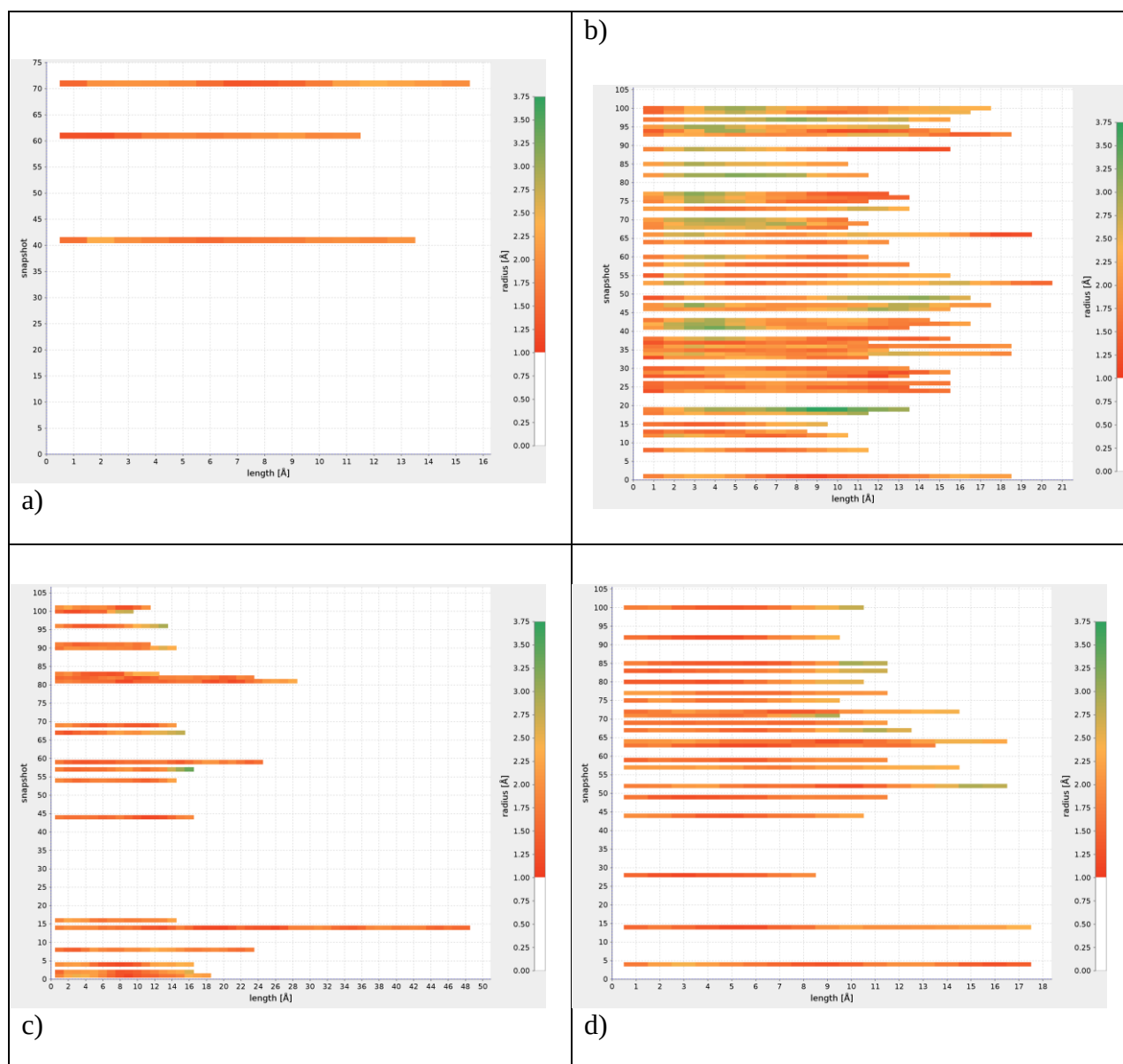
Na serii diagramów zaprezentowanych poniżej na Rys. D11- D1.3. pokazano kiedy w czasie trajektorii (100-500 ns) CAVER „widzi” ciągłe kanały łączące centrum aktywne z roztworem. Niskie liczby w skali długości odpowiadają rejonom bliskim danego jonu kobaltu kanał jest określany począwszy od jonu centralnego. Długości kanałów są bardzo zmienne, i w naszej ocenie nieco problematyczne, bo mogą być artefaktem programu CAVER i założonego małego promienia obiektu próbnego. Duże znaczenie w określaniu kanałów mają naturalne fluktuacje białka i zmiany położenia grup bocznych aminokwasów. Skalą barwną zaznaczono promień kanału. Badano CAVERem po 100 ramek w każdej trajektorii. Stosowano konieczne nakładanie struktur z MD kolejno na podjednostkę A (lewe panele) i na podjednostkę C (prawe panele) monitorując losy kanałów typu K1 najpierw w dimerze AB (dwie trajektorie : panele a) oraz c)) a potem w dimerze CD (panele b) i d)).

Na Rys. D1.1 dość zaskakująca jest asymetria tych paneli np. a) i b). W tej trajektorii struktura tetrameru, jeśli chodzi o kanał K1, nie była symetryczna w obu dimerach. Transport amidów zachodził głównie podjednostce CD. Kanał nie był obecny przez całą trajektorię, można zaryzykować tezę, że przypadku podjednostki AB więcej go nie było, niż był (Rys. D1 a,c). Innym wnioskiem wynikającym z danych na Rys. D1 jest fakt, że kanały w NHazie mają charakter dynamiczny: zarówno ich średnica jak i szczegółowy kształt podlegają znacznym fluktuacjom.

Fakt umieszczenia w układzie symulacyjnym znacznej liczby molekuł produktu, czyli ACA, znajduje swoje odbicie zarówno w strukturze jak i dynamice kanału K1. Dane przedstawione na Rys. D1.2 jasno pokazują, że kanał ten jest obecny w NHazie znacznie częściej przy ACA20 niż w wodzie, chociaż też występują okresy w symulacji kiedy on staje się zbyt wąski by program go wykrył, można powiedzieć, że się zamyka. Szerokość kanału jest też średnio nieco większa, co świadczy, że amidy „rozpychają” nieco kanał, zaś NHaza się do tego adaptuje. Być może otoczenie „nie czysto wodne” też przyczynia się do rozluźnienia struktury NHazy. Asymetria AB vs. CD też występuje, ale jest nieco mniej widoczna.

Lewe panele – dimer AB

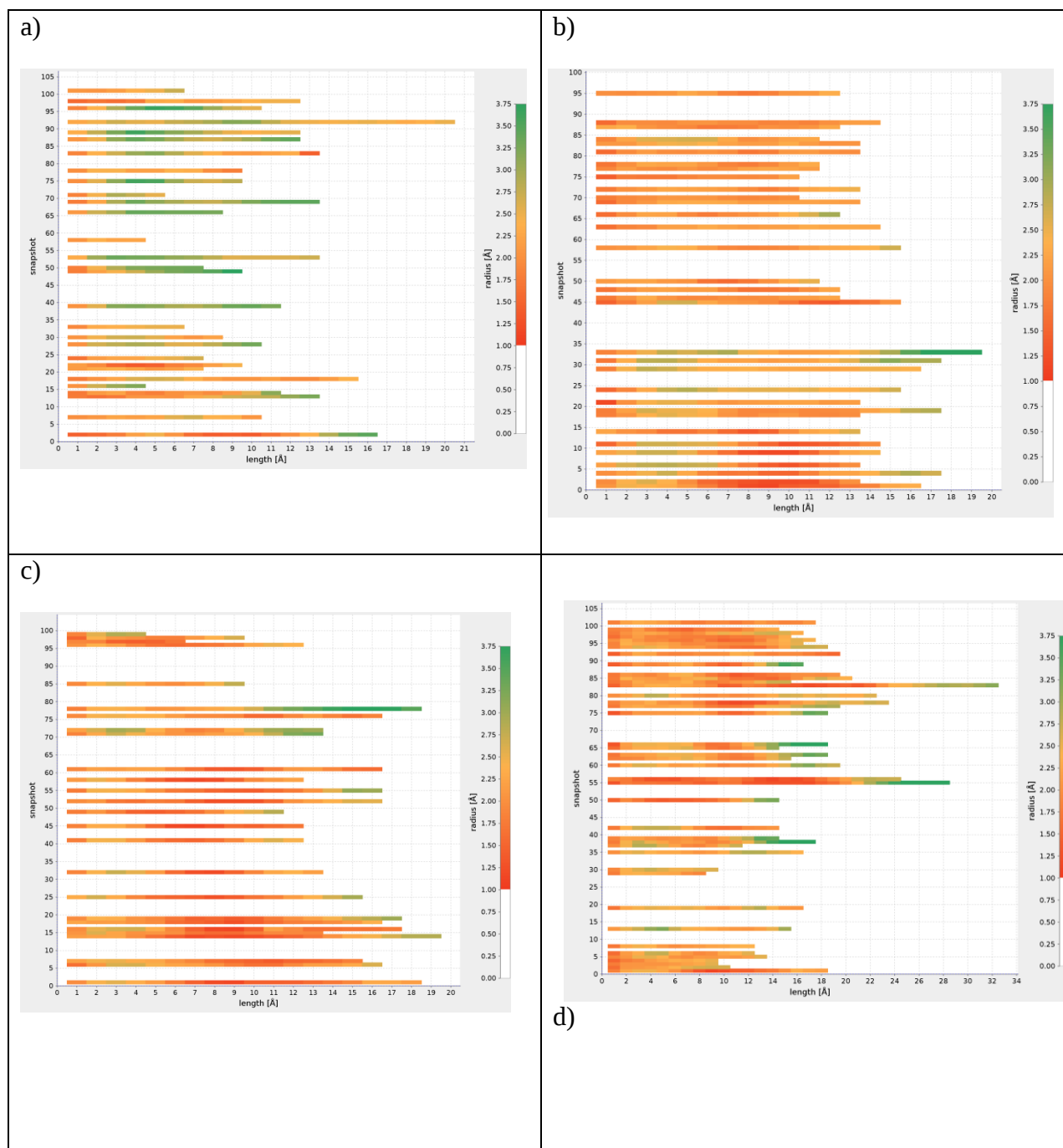
prawe panele - CD



Rysunek D1.1. Diagramy pokazujące występowanie kanałów typu K1 w poszczególnych ramach trajektorii NHazy w wodzie, ramki zapisywano co 4 ns w przedziale 100-500 ns symulacji MD. Opis nakładania struktur w tekście. Kolorem zaznaczono obliczony CAVEREM promień kanału.

Lewe panele – dimer AB

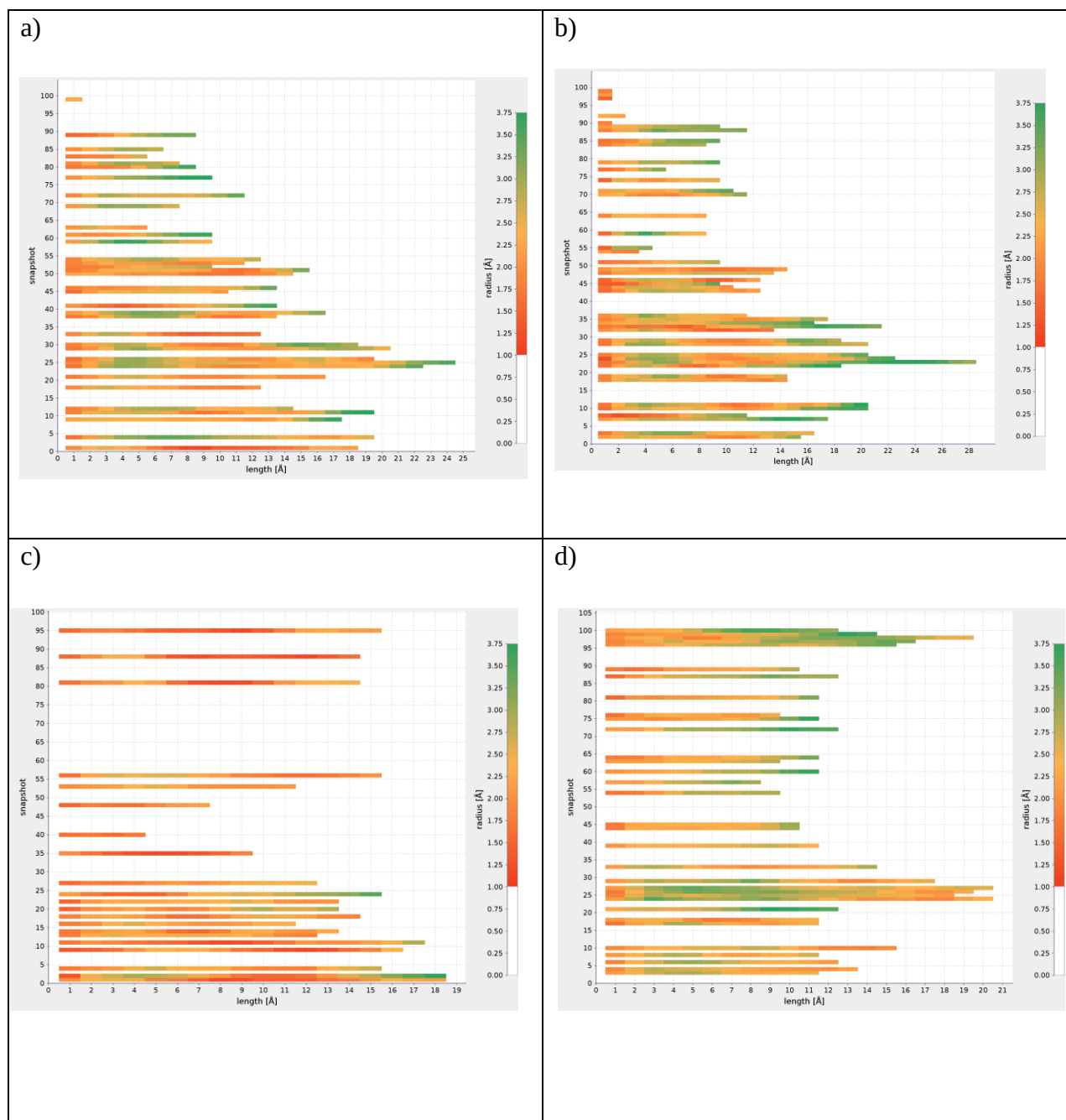
prawe panele - CD



Rysunek D1.2. Diagramy pokazujące występowanie kanałów typu K1 i ich długość w poszczególnych ramkach trajektorii NHazy (a, b – Run1, c,d – Run2) w roztworze ACA20, ramki zapisywano co 4 ns w przedziale 100-500 ns symulacji MD. Opis nakładania struktur w tekście. Kolorem zaznaczono obliczony CAVEREM promień kanału.

Lewe panele – dimer AB

prawe panele - CD



Rysunek D1.3. Diagramy pokazujące występowanie kanałów typu K1 i ich długość w poszczególnych ramkach trajektorii NHazy w roztworze ACA50, ramki zapisywano co 4 ns w przedziale 100-500 ns symulacji MD. Opis nakładania struktur w tekście – Rozdział 7. Kolorem zaznaczono obliczony CAVEREM promień kanału.

Bibliografia

1. O'Connell, A., et al., *Biocatalysis: landmark discoveries and applications in chemical synthesis*. Chemical Society Reviews, 2024.
2. Kobayashi, M. and S. Shimizu, *Metalloenzyme nitrile hydratase: structure, regulation, and application to biotechnology*. Nat Biotechnol, 1998. **16**(8): p. 733-6.
3. Kobayashi, M. and S. Shimizu, *Nitrile hydrolases*. Current Opinion in Chemical Biology, 2000. **4**(1): p. 95-102.
4. Yamada, H. and M. Kobayashi, *Nitrile hydratase and its application to industrial production of acrylamide*. Biosci Biotechnol Biochem, 1996. **60**(9): p. 1391-400.
5. Asano, Y., Y. Tani, and Y. H., *A New Enzyme "Nitrile Hydratase" which Degrades Acetonitrile in Combination with Amidase*. Agricultural and Biological Chemistry, 1980. **44**(9): p. 2251-2252.
6. 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).
7. Nowak, W., et al., *Density functional study on geometry and electronic structure of nitrile hydratase active site model*. Int J Quant Chem, 2002. **90**(3): p. 1174-1187.
8. 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.
9. Peplowski, L., K. Kubiak, and W. Nowak, *The Locally Enhanced Sampling Study of Large Ligands Diffusion inside Enzyme. Acrylonitrile and Acryloamide Journey in Nitrile Hydratase*. NIC Series, John von Neumann Institute for Computing, 2007. **36**: p. 259-262.
10. Peplowski, L., K. Kubiak, and W. Nowak, *Hydrataza Nitrylowa - aktywowany światłem enzym przemysłowy* Biotechnologia, 2007. **1**(76): p. 63-76.
11. Peplowski, L., K. Kubiak, and W. Nowak, *A Comparative DFT Study of Substrates and Products of Industrial Enzyme Nitrile Hydratase* Int J Quant Chem, 2008. **108**: p. 161-179.
12. 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.
13. Kubiak, K. and W. Nowak, *Molecular Dynamics Simulations of the Photoactive Protein Nitrile Hydratase*. Biophys J, 2008. **94**(10): p. 3824-3838.
14. Zhou, Z., et al., *Discovery of posttranslational maturation by self-subunit swapping*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(39): p. 14849-54.
15. Cheng, Z., et al., *Modulation of Nitrile Hydratase Regioselectivity towards Dinitriles by Tailoring the Substrate Binding Pocket Residues*. ChemCatChem, 2018. **10**(2): p. 449-458.

16. Cheng, Z., et al., *Identification of key residues modulating the stereoselectivity of nitrile hydratase toward rac-mandelonitrile by semi-rational engineering*. Biotechnology and Bioengineering, 2018. **115**(3): p. 524-535.
17. Xia, Y., et al., *Improving the Thermostability and Catalytic Efficiency of the Subunit-Fused Nitrile Hydratase by Semi-Rational Engineering*. ChemCatChem, 2018. **10**(6): p. 1370-1375.
18. Xia, Y., et al., *Metallochaperone function of the self-subunit swapping chaperone involved in the maturation of subunit-fused cobalt-type nitrile hydratase*. Biotechnology and Bioengineering, 2019. **116**(3): p. 481-489.
19. Cheng, Z., et al., *Computational Design of Nitrile Hydratase from Pseudonocardia thermophila JCM3095 for Improved Thermostability*. Molecules, 2020. **25**(20): p. 4806.
20. Guo, J., et al., *Effect and mechanism analysis of different linkers on efficient catalysis of subunit-fused nitrile hydratase*. Int J Biol Macromol, 2021. **181**: p. 444-451.
21. Cheng, Z., S. Jiang, and Z. Zhou, *Substrate access tunnel engineering for improving the catalytic activity of a thermophilic nitrile hydratase toward pyridine and pyrazine nitriles*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2021. **575**: p. 8-13.
22. Guo, J., et al., *“Toolbox” construction of an extremophilic nitrile hydratase from Streptomyces thermoautotrophicus for the promising industrial production of various amides*. International Journal of Biological Macromolecules, 2022. **221**: p. 1103-1111.
23. Ma, D., et al., *Insight into the broadened substrate scope of nitrile hydratase by static and dynamic structure analysis*. Chemical Science, 2022. **13**(28): p. 8417-8428.
24. Xia, Y., et al., *Tailoring the Hinge Residue at the Substrate Access Tunnel Entrance Improves the Catalytic Performance of Industrialized Nitrile Hydratase Toward 3-Cyanopyridine*. ChemistrySelect, 2022. **7**(34): p. e202201941.
25. Xia, Y., et al., *Discovery of the ATPase Activity of a Cobalt-Type Nitrile Hydratase Activator and Its Promoting Effect on Enzyme Maturation*. Biochemistry, 2022. **61**(24): p. 2940-2947.
26. Guo, J., et al., *Highly efficient biosynthesis of isonicotinamide through a substrate access tunnel engineered nitrile hydratase from Carbonactinospira thermoautotrophicus*. New Journal of Chemistry, 2023. **47**(28): p. 13279-13285.
27. Meng, Y., et al., *Multi-method analysis revealed the mechanism of substrate selectivity in NHase: A gatekeeper residue at the activity center*. International Journal of Biological Macromolecules, 2024. **279**: p. 135426.
28. Ma, D., et al., *Structure-oriented engineering of nitrile hydratase: Reshaping of substrate access tunnel and binding pocket for efficient synthesis of cinnamamide*. International Journal of Biological Macromolecules, 2024. **254**: p. 127800.
29. Industry, N.C., *European Patent 0445646A2*. 1990.
30. Mitsui Chemicals Inc., T., *US Patent 6,730,508 B1* 2004.
31. Hashimoto, K., et al., *Catalytic mechanism of nitrile hydratase proposed by time-resolved X-ray crystallography using a novel substrate, tert-butylisonitrile*. J Biol Chem, 2008. **283**(52): p. 36617-23.
32. Rao, S. and R.C. Holz, *Analyzing the catalytic mechanism of the Fe-type nitrile hydratase from Comamonas testosteroni Ni1*. Biochemistry, 2008. **47**(46): p. 12057-64.
33. Hopmann, K.H., J.-D. Guo, and F. Himo, *Theoretical Investigation of the First-Shell Mechanism of Nitrile Hydratase*. Inorganic Chemistry, 2007. **46**(12): p. 4850-4856.

34. Mascharak, P.K., *Structural and functional models of nitrile hydratase*. Coordination Chemistry Reviews, 2002. **225**(1-2): p. 201-214.
35. 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.
36. Hopmann, K.H. and F. Himo, *Theoretical Investigation of the Second-Shell Mechanism of Nitrile Hydratase*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2008. **2008**(9): p. 1406-1412.
37. Hopmann, K.H. and F. Himo, *On the Role of Tyrosine as Catalytic Base in Nitrile Hydratase*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2008. **2008**(22): p. 3452-3459.
38. Hopmann, K.H., *Full reaction mechanism of nitrile hydratase: a cyclic intermediate and an unexpected disulfide switch*. Inorg Chem, 2014. **53**(6): p. 2760-2.
39. Banerjee, A., R. Sharma, and U.C. Banerjee, *The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects*. Appl Microbiol Biotechnol, 2002. **60**(1-2): p. 33-44.
40. Yamada, H., S. Shimizu, and M. Kobayashi, *Hydratases involved in nitrile conversion: screening, characterization and application*. Chem Rec, 2001. **1**(2): p. 152-61.
41. Silaghi-Dumitrescu, R., *Nitrile hydration by the cobalt-containing nitrile hydratase. DFT investigation of the mechanism*. Rev. Chim., 2005. **56**: p. 359-362.
42. Kayanuma, M., et al., *A QM/MM study of the initial steps of catalytic mechanism of nitrile hydratase*. Chemical Physics Letters, 2015. **623**: p. 8-13.
43. Mitra, S. and R.C. Holz, *Unraveling the catalytic mechanism of nitrile hydratases*. J Biol Chem, 2007. **282**(10): p. 7397-404.
44. Kayanuma, M., et al., *Catalytic Mechanism of Nitrile Hydratase Subsequent to Cyclic Intermediate Formation: A QM/MM Study*. Journal of Physical Chemistry B, 2016. **120**(13): p. 3259-3266.
45. Xiang, S., et al., *Cytidine Deaminase Complexed to 3-Deazacytidine: A "Valence Buffer" in Zinc Enzyme Catalysis*. Biochemistry, 1996. **35**(5): p. 1335-1341.
46. Hann, E.C., et al., *5-Cyanovaleramide production using immobilized Pseudomonas chlororaphis B23*. Bioorg Med Chem, 1999. **7**(10): p. 2239-45.
47. Zhu, J., et al., *Triggered azobenzene-based prodrugs and drug delivery systems*. J Control Release, 2022. **345**: p. 475-493.
48. Zhao, Y.-X., et al., *Bioconversion of indole-3-acetonitrile by the N₂-fixing bacterium Ensifer meliloti CGMCC 7333 and its Escherichia coli-expressed nitrile hydratase*. International Microbiology, 2019.
49. Dama, A., et al., *Targeting metabolic diseases: the role of nutraceuticals in modulating oxidative stress and inflammation*. Nutrients, 2024. **16**(4): p. 507.
50. Prasad, S. and T.C. Bhalla, *Nitrile hydratases (NHases): at the interface of academia and industry*. Biotechnol Adv, 2010. **28**(6): p. 725-41.
51. Nagashima, S., et al., *Novel non-heme iron center of nitrile hydratase with a claw setting of oxygen atoms*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(5): p. 347-51.
52. Nakasako, M., et al., *Tertiary and quaternary structures of photoreactive Fe-type nitrile hydratase from Rhodococcus sp. N-771: roles of hydration water molecules in stabilizing the structures and the structural origin of the substrate specificity of the enzyme*. Biochemistry, 1999. **38**(31): p. 9887-98.
53. Endo, I., et al., *Fe-type nitrile hydratase*. J Inorg Biochem, 2001. **83**(4): p. 247-53.

54. Endo, I., et al., *Structure and function of a photoreactive enzyme, nitrile hydratase: crystal structure analysis of the inactive enzyme at 1.7 angstrom resolution*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999. **74**(1-4): p. 22-22.
55. Miyanaga, A., et al., *Mutational and structural analysis of cobalt-containing nitrile hydratase on substrate and metal binding*. Eur J Biochem, 2004. **271**(2): p. 429-38.
56. Nagasawa, T., K. Takeuchi, and H. Yamada, *Characterization of a new cobalt-containing nitrile hydratase purified from urea-induced cells of Rhodococcus rhodochrous J1*. Eur J Biochem, 1991. **196**(3): p. 581-9.
57. Laskowski, R.A., et al., *PDBsum: Structural summaries of PDB entries*. Protein Sci, 2018. **27**(1): p. 129-134.
58. Humphrey, W., A. Dalke, and K. Schulten, *VMD: visual molecular dynamics*. J Mol Graph, 1996. **14**(1): p. 33-8, 27-8.
59. Miyanaga, A., et al., *Crystal structure of cobalt-containing nitrile hydratase*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **288**(5): p. 1169-74.
60. Nojiri, M., et al., *Cobalt-substituted Fe-type nitrile hydratase of Rhodococcus sp. N-771*. FEBS Lett, 2000. **465**(2-3): p. 173-7.
61. Hourai, S., et al., *Crystal structure of nitrile hydratase from a thermophilic Bacillus smithii*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **312**(2): p. 340-5.
62. Lu, J., et al., *Motif CXCC in nitrile hydratase activator is critical for NHase biogenesis in vivo*. FEBS Lett, 2003. **553**(3): p. 391-6.
63. Kovacs, J.A., *Synthetic Analogues of Cysteinate-Ligated Non-Heme Iron and Non-Corrinoid Cobalt Enzymes*. Chemical Reviews, 2004. **104**(2): p. 825-848.
64. Harrop, T.C. and P.K. Mascharak, *Fe(III) and Co(III) Centers with Carboxamido Nitrogen and Modified Sulfur Coordination: Lessons Learned from Nitrile Hydratase*. Accounts of Chemical Research, 2004. **37**(4): p. 253-260.
65. Desai, L.V. and M. Zimmer, *Substrate selectivity and conformational space available to bromoxynil and acrylonitrile in iron nitrile hydratase*. Dalton Transactions, 2004(6): p. 872-877.
66. Sugiura, Y., et al., *Nitrile hydratase. The first non-heme iron enzyme with a typical low-spin iron (III)-active center*. Journal of the American Chemical Society, 1987. **109**(19): p. 5848-5850.
67. Heinrich, L., et al., *Cobalt(III) Complexes with Carboxamido-N and Sulfenato-S or Sulfinato-S Ligands Suggest that a Coordinated Sulfenate-S is Essential for the Catalytic Activity of Nitrile Hydratases*. European Journal of Inorganic Chemistry, 2001. **2001**(9): p. 2203-2206.
68. Hopmann, K.H., J.D. Guo, and F. Himmo, *Theoretical investigation of the first-shell mechanism of nitrile hydratase*. Inorg Chem, 2007. **46**(12): p. 4850-6.
69. Kobayashi, M. and S. Shimizu, *Metalloenzyme nitrile hydratase: Structure, regulation, and application to biotechnology*. Nature Biotechnology, 1998. **16**(8): p. 733-736.
70. Yamada, H., S. Shimizu, and M. Kobayashi, *Hydratases involved in nitrile conversion: Screening, characterization and application*. The Chemical Record, 2001. **1**(2): p. 152-161.
71. Silaghi-Dumitrescu, R., *Nitrile hydration by the cobalt-containing nitrile hydratase DFT investigation of the mechanism*. Revista de Chimie -Bucharest- Original Edition-, 2005. **56**: p. 359-362.

72. Hopmann, K.H., *Full Reaction Mechanism of Nitrile Hydratase: A Cyclic Intermediate and an Unexpected Disulfide Switch*. Inorganic Chemistry, 2014. **53**(6): p. 2760-2762.
73. Kayanuma, M., et al., *Catalytic Mechanism of nitrile hydratase subsequent to cyclic intermediate formation: a QM/MM study*. The Journal of Physical Chemistry B, 2016. **120**(13): p. 3259-3266.
74. Nelp, M.T., et al., *A Protein-derived oxygen is the source of the amide oxygen of nitrile hydratases*. J Biol Chem, 2016. **291**(15): p. 7822-9.
75. Micaêlo, N.M. and C.M. Soares, *Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents*. The FEBS Journal, 2007. **274**(9): p. 2424-2436.
76. Malhotra, P. and J.B. Udgaonkar, *Secondary structural change can occur diffusely and not modularly during protein folding and unfolding reactions*. J Am Chem Soc, 2016. **138**(18): p. 5866-78.
77. Chatterjee, A., et al., *Equilibrium unfolding of DLC8 monomer by urea and guanidine hydrochloride: Distinctive global and residue level features*. Biochimie, 2007. **89**(1): p. 117-34.
78. Wang, L., et al., *High Regioselectivity Production of 5-Cyanovaleramide from Adiponitrile by a Novel Nitrile Hydratase Derived from Rhodococcus erythropolis CCM2595*. ACS Omega, 2020. **5**(29): p. 18397-18402.
79. Zheng, R.-C., X.-J. Yin, and Y.-G. Zheng, *Highly regioselective and efficient production of 1-cyanocyclohexanecetamide by Rhodococcus aetherivorans ZJB1208 nitrile hydratase*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2016. **91**(5): p. 1314-1319.
80. Shen, Y., *Stereoselective nitrile hydratase*. Vol. 6. 2012.
81. Mashweu, A.R., et al., *Substrate profiling of the cobalt nitrile hydratase from Rhodococcus rhodochrous ATCC BAA 870*. Molecules, 2020. **25**(1).
82. Wang, M.-X., *Enantioselective Biotransformations of Nitriles in Organic Synthesis*. Topics in Catalysis, 2005. **35**(1): p. 117-130.
83. Chovancova, E., et al., *CAVER 3.0: a tool for the analysis of transport pathways in dynamic protein structures*. 2012.
84. Noah, F., K. Benjamin, and I. Christopher, *Predicting Protein Thermostability Upon Mutation Using Molecular Dynamics Timeseries Data*. bioRxiv, 2016: p. 078246.
85. Chang, C.-E., et al., *Investigation of Structural Dynamics of Enzymes and Protonation States of Substrates Using Computational Tools*. Catalysts, 2016. **6**: p. 82.
86. Karplus, M. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations of biomolecules*. Nature Structural Biology, 2002. **9**(9): p. 646-652.
87. Verlet, L., *Computer "experiments" on classical fluids. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules*. Phys. Rev., 1967. **159**: p. 98-104.
88. Erwardt, P., K. Roszek, and M. Wiśniewski, *Determination of Graphene Oxide Adsorption Space by Lysozyme Uptake—Mechanistic Studies*. The Journal of Physical Chemistry B, 2022. **126**(4): p. 928-933.
89. Hetmann, A., et al., *Adenylate kinase immobilized on graphene oxide impairs progression of human lung carcinoma epithelial cells through adenosinergic pathway*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2023. **111**(10): p. 1565-1576.
90. 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.

91. Pearlman, A., et al., *AMBER, a computer program for applying molecular mechanics, normal mode analysis, molecular dynamics and free energy calculations to elucidate the structures and energies of molecules*. Comp Phys Commun, 1995. **91**: p. 1-41.
92. Abraham, M.J., et al., *GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers*. SoftwareX, 2015. **1-2**: p. 19-25.
93. Van Kampen, J.M., T. Hagg, and H.A. Robertson, *Induction of neurogenesis in the adult rat subventricular zone and neostriatum following dopamine D receptor stimulation*. Eur J Neurosci, 2004. **19**(9): p. 2377-87.
94. Chovancova, E., et al., *CAVER 3.0: A Tool for the Analysis of Transport Pathways in Dynamic Protein Structures*. PLOS Computational Biology, 2012. **8**(10): p. e1002708.
95. Voronoi, G., *Nouvelles applications des paramètres continus à la théorie des formes quadratiques. Deuxième mémoire. Recherches sur les paralléloèdres primitifs*. 1908. **1908**(134): p. 198-287.
96. Delaunay, B., *Sur la sphère vide. A la mémoire de Georges Voronoi*. Bulletin de l'Académie des Sciences de l'URSS. Classe des sciences mathématiques et na, 1934(6): p. 793-800.
97. 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.
98. Schmidtke, P., et al., *MDpocket: open-source cavity detection and characterization on molecular dynamics trajectories*. Bioinformatics, 2011. **27**(23): p. 3276-3285.
99. Bolibok, P., et al. *A New Approach to Obtaining Nano-Sized Graphene Oxide for Biomedical Applications*. Materials, 2021. **14**, DOI: 10.3390/ma14061327.
100. Grant, B.J., et al., *Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures*. Bioinformatics, 2006. **22**(21): p. 2695-6.
101. Skjærven, L., et al., *Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D*. BMC Bioinformatics, 2014. **15**(1): p. 399.
102. Tsoulos, I.G. and A. Stavrakoudis, *Eucb: A C++ program for molecular dynamics trajectory analysis*. Computer Physics Communications, 2011. **182**(3): p. 834-841.
103. Bakan, A., L.M. Meireles, and I. Bahar, *ProDy: Protein Dynamics Inferred from Theory and Experiments*. Bioinformatics, 2011. **27**(11): p. 1575-1577.
104. Eyal, E., L.-W. Yang, and I. Bahar, *Anisotropic network model: systematic evaluation and a new web interface*. Bioinformatics, 2006. **22**(21): p. 2619-2627.
105. Guex, N., M.C. Peitsch, and T. Schwede, *Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective*. ELECTROPHORESIS, 2009. **30**(S1): p. S162-S173.
106. Waterhouse, A., et al., *SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes*. Nucleic Acids Research, 2018. **46**(W1): p. W296-W303.
107. Studer, G., et al., *QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation*. Bioinformatics, 2020. **36**(6): p. 1765-1771.
108. Eisenberg, D., R. Lüthy, and J.U. Bowie, *[20] VERIFY3D: Assessment of protein models with three-dimensional profiles*, in *Methods in Enzymology*. 1997, Academic Press. p. 396-404.
109. Chang, C.H., et al., *Toward a computational description of nitrile hydratase: studies of the ground state bonding and spin-dependent energetics of mononuclear, non-heme Fe(III) complexes*. Inorg Chem, 2004. **43**(2): p. 458-72.

110. Dolinsky, T.J., et al., *PDB2PQR: expanding and upgrading automated preparation of biomolecular structures for molecular simulations*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(Web Server issue): p. W522-5.
111. Phillips, J.C., et al., *Scalable molecular dynamics with NAMD*. J Comput Chem, 2005. **26**(16): p. 1781-802.
112. Phillips, J.C., et al., *Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD*. J Chem Phys, 2020. **153**(4): p. 044130.
113. Brooks, B.R., et al., *CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations*. Journal of Computational Chemistry, 1983. **4**(2): p. 187-217.
114. Brooks, B., *CHARMM: The Biomolecular Simulation Program*. 2009. **30**(10): p. 1545-614.
115. Essmann, U., et al., *A smooth particle mesh Ewald method*. The Journal of Chemical Physics, 1995. **103**(19): p. 8577-8593.
116. Pełowski, Ł., *Wykorzystanie metod dynamiki molekularnej i bioinformatyki do badania mechanizmów reakcji enzymatycznych, ze szczególnym uwzględnieniem hydratazy nitrylowej*, in *Katedra Biofizyki*. 2008, Uniwersytet Mikołaja Kopernika: Toruń.
117. William, H., D. Andrew, and S. Klaus, *VMD: Visual molecular dynamics*. Journal of Molecular Graphics, 1996. **14**(1): p. 33-38.
118. Roy, A., A. Kucukural, and Y. Zhang, *I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction*. Nat Protoc, 2010. **5**(4): p. 725-38.
119. Yang, J., et al., *The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction*. Nat Methods, 2015. **12**(1): p. 7-8.
120. Zhang, Y., *I-TASSER server for protein 3D structure prediction*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 40.
121. Desta, I.T., et al., *Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking*. Structure, 2020. **28**(9): p. 1071-1081.e3.
122. Eastman, P., et al., *OpenMM 7: Rapid development of high performance algorithms for molecular dynamics*. PLoS Comput Biol, 2017. **13**(7): p. e1005659.
123. Martínez, L., et al., *PACKMOL: A package for building initial configurations for molecular dynamics simulations*. Journal of Computational Chemistry, 2009. **30**(13): p. 2157-2164.
124. Olsson, M.H., et al., *PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions*. J Chem Theory Comput, 2011. **7**(2): p. 525-37.
125. Søndergaard, C.R., et al., *Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values*. J Chem Theory Comput, 2011. **7**(7): p. 2284-95.
126. Bellissent-Funel, M.-C., et al., *Water determines the structure and dynamics of proteins*. Chemical reviews, 2016. **116**(13): p. 7673-7697.
127. Laage, D., T. Elsaesser, and J.T. Hynes, *Water dynamics in the hydration shells of biomolecules*. Chemical Reviews, 2017. **117**(16): p. 10694-10725.
128. Canchi, D.R. and A.E. García, *Cosolvent effects on protein stability*. Annual review of physical chemistry, 2013. **64**(1): p. 273-293.
129. Zaks, A. and A.M. Klivanov, *Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents*. Journal of Biological Chemistry, 1988. **263**(7): p. 3194-3201.
130. Zaks, A. and A.M. Klivanov, *Enzyme-catalyzed processes in organic solvents*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1985. **82**(10): p. 3192-3196.

131. Klibanov, A.M., *Improving enzymes by using them in organic solvents*. nature, 2001. **409**(6817): p. 241-246.
132. Klibanov, A.M., *Why are enzymes less active in organic solvents than in water?* Trends in biotechnology, 1997. **15**(3): p. 97-101.
133. Zaks, A., *Industrial biocatalysis*. Curr Opin Chem Biol, 2001. **5**(2): p. 130-6.
134. Cui, H., et al., *How to engineer organic solvent resistant enzymes: Insights from combined molecular dynamics and directed evolution study*. ChemCatChem, 2020. **12**(16): p. 4073-4083.
135. Wang, S., et al., *Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review*. Catalysts, 2016. **6**(2).
136. Pluhařová, E., N. Chéron, and D. Laage, *Effects of Water and Non-aqueous Solvents on Enzyme Activity*, in *Simulating Enzyme Reactivity: Computational Methods in Enzyme Catalysis*, I. Tunon and V. Moliner, Editors. 2016, The Royal Society of Chemistry. p. 0.
137. Chapman, J., A.E. Ismail, and C.Z. Dinu, *Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks*. Catalysts, 2018. **8**(6): p. 238.
138. Adrio, J.L. and A.L. Demain, *Microbial enzymes: tools for biotechnological processes*. Biomolecules, 2014. **4**(1): p. 117-139.
139. Liu, X. and C. Kokare, *Microbial enzymes of use in industry*, in *Biotechnology of microbial enzymes*. 2023, Elsevier. p. 405-444.
140. Mokrani, S. and E.-H. Nabti, *Recent status in production, biotechnological applications, commercial aspects, and future prospects of microbial enzymes: A comprehensive review*. International Journal of Agricultural Science and Food Technology, 2024. **10**(1): p. 006-020.
141. Yi, D., et al., *Recent trends in biocatalysis*. Chemical Society Reviews, 2021. **50**(14): p. 8003-8049.
142. Victorino da Silva Amatto, I., et al., *Enzyme engineering and its industrial applications*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2022. **69**(2): p. 389-409.
143. Soares, C., V. Teixeira, and A. Baptista, *Protein Structure and Dynamics in Nonaqueous Solvents: Insights from Molecular Dynamics Simulation Studies*. Biophysical journal, 2003. **84**: p. 1628-41.
144. Lousa, D., A.M. Baptista, and C.M. Soares, *Analyzing the Molecular Basis of Enzyme Stability in Ethanol/Water Mixtures Using Molecular Dynamics Simulations*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(2): p. 465-473.
145. Lousa, D., A.M. Baptista, and C.M. Soares, *A molecular perspective on nonaqueous biocatalysis: contributions from simulation studies*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2013. **15**(33): p. 13723-13736.
146. Wang, S., Y. Xu, and X.-W. Yu, *Micro-aqueous organic system: A neglected model in computational lipase design?* Biomolecules, 2021. **11**(6): p. 848.
147. Trodler, P. and J. Pleiss, *Modeling structure and flexibility of Candida antarctica lipase B in organic solvents*. BMC Structural Biology, 2008. **8**(1): p. 9.
148. Li, C., et al., *Analysis of the Conformational Stability and Activity of Candida antarctica Lipase B in Organic Solvents: insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations**. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**(37): p. 28434-28441.

149. Johnson, Q.R., R.B. Nellas, and T. Shen, *Solvent-Dependent Gating Motions of an Extremophilic Lipase from Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 2012. **51**(31): p. 6238-6245.
150. Yenenler, A., et al., *Investigating the structural properties of the active conformation BTL2 of a lipase from Geobacillus thermocatenulatus in toluene using molecular dynamic simulations and engineering BTL2 via in-silico mutation*. *Journal of Molecular Modeling*, 2018. **24**(9): p. 229.
151. Tong, X., et al., *New insights into the molecular mechanism of methanol-induced inactivation of Thermomyces lanuginosus lipase: a molecular dynamics simulation study*. *Molecular Simulation*, 2016. **42**(5): p. 434-445.
152. Pramanik, S., et al., *How does surface charge engineering of bacillus subtilis lipase improve ionic liquid resistance? lessons learned from molecular dynamics simulations*. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2022. **10**(8): p. 2689-2698.
153. Cheng, W. and B. Nian, *Computer-Aided Lipase Engineering for Improving Their Stability and Activity in the Food Industry: State of the Art*. *Molecules*, 2023. **28**(15): p. 5848.
154. Qi, Y., et al., *Computer-aided engineering of lipases solvent tolerance enhanced their applications in sugar esters synthesis: State of the art*. *Trends in Food Science & Technology*, 2024: p. 104323.
155. Liu, C., et al., *Switch of substrate specificity of hyperthermophilic acylaminoacyl peptidase by combination of protein and solvent engineering*. *Protein & cell*, 2011. **2**(6): p. 497-506.
156. Park, H.J., et al., *Stabilization of Candida antarctica lipase B in hydrophilic organic solvent by rational design of hydrogen bond*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012. **17**(4): p. 722-728.
157. Cruz, A., et al., *Molecular dynamic study of subtilisin Carlsberg in aqueous and nonaqueous solvents*. *Molecular Simulation*, 2009. **35**(3): p. 205-212.
158. Zhu, L., et al., *Effects of Organic Solvent and Crystal Water on γ -Chymotrypsin in Acetonitrile Media: Observations from Molecular Dynamics Simulation and DFT Calculation*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2012. **116**(10): p. 3292-3304.
159. Gu, Z., et al., *Theoretical and experimental studies on the conformational changes of organic solvent-stable protease from Bacillus sphaericus DS11 in methanol/water mixtures*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2019. **128**: p. 603-609.
160. Roy, S., B. Jana, and B. Bagchi, *Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme*. *The Journal of Chemical Physics*, 2012. **136**(11): p. 115103.
161. Kragl, U., M. Eckstein, and N. Kaftzik, *Enzyme catalysis in ionic liquids*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2002. **13**(6): p. 565-571.
162. Itoh, T., *Ionic liquids as tool to improve enzymatic organic synthesis*. *Chemical Reviews*, 2017. **117**(15): p. 10567-10607.
163. Singh, O., et al., *Dual mechanism of ionic liquid-induced protein unfolding*. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2020. **22**(35): p. 19779-19786.
164. Das, S., T. Karmakar, and S. Balasubramanian, *Molecular Mechanism behind Solvent Concentration-Dependent Optimal Activity of Thermomyces lanuginosus Lipase in a Biocompatible Ionic Liquid: Interfacial Activation through Arginine Switch*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2016. **120**(45): p. 11720-11732.

165. Sprenger, K.G., et al., *Lytic Polysaccharide Monooxygenases ScLPMO10B and ScLPMO10C Are Stable in Ionic Liquids As Determined by Molecular Simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2016. **120**(16): p. 3863-3872.
166. Zhao, J., et al., *Unraveling the effects of amino acid substitutions enhancing lipase resistance to an ionic liquid: a molecular dynamics study*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2018. **20**(14): p. 9600-9609.
167. Manna, B. and A. Ghosh, *Understanding the conformational change and inhibition of hyperthermophilic GH10 xylanase in ionic liquid*. Journal of Molecular Liquids, 2021. **332**: p. 115875.
168. Pramanik, S., et al., *How to engineer ionic liquids resistant enzymes: Insights from combined molecular dynamics and directed evolution study*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(13): p. 11293-11302.
169. Taklimi, S.M., et al., *Effects of deep eutectic solvents on the activity and stability of enzymes*. Journal of Molecular Liquids, 2023. **377**: p. 121562.
170. Bittner, J.P., I. Smirnova, and S. Jakobtorweihen, *Investigating biomolecules in deep eutectic solvents with molecular dynamics simulations: current state, challenges and future perspectives*. Molecules, 2024. **29**(3): p. 703.
171. Monhemi, H., et al., *How a protein can remain stable in a solvent with high content of urea: insights from molecular dynamics simulation of Candida antarctica lipase B in urea: choline chloride deep eutectic solvent*. Physical Chemistry chemical physics, 2014. **16**(28): p. 14882-14893.
172. Malaeke, H., et al., *Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification*. Journal of molecular liquids, 2018. **263**: p. 193-199.
173. Nian, B., C. Cao, and Y. Liu, *Lipase and metal chloride hydrate-natural deep eutectic solvents synergistically catalyze amidation reaction via multiple noncovalent bond interactions*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(21): p. 18174-18184.
174. Nian, B., C. Cao, and Y. Liu, *How Candida antarctica lipase B can be activated in natural deep eutectic solvents: experimental and molecular dynamics studies*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2020. **95**(1): p. 86-93.
175. Shehata, M., et al., *Lipase and Water in a Deep Eutectic Solvent: Molecular Dynamics and Experimental Studies of the Effects of Water-In-Deep Eutectic Solvents on Lipase Stability*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(40): p. 8801-8810.
176. Qiao, Q., J. Shi, and Q. Shao, *Effects of water on the solvation and structure of lipase in deep eutectic solvents containing a protein destabilizer and stabilizer*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2021. **23**(40): p. 23372-23379.
177. Kumari, P., M. Kumari, and H.K. Kashyap, *How Pure and Hydrated Reline Deep Eutectic Solvents Affect the Conformation and Stability of Lysozyme: Insights from Atomistic Molecular Dynamics Simulations*. The Journal of Physical Chemistry B, 2020. **124**(52): p. 11919-11927.
178. Toledo, M.L., et al., *Laccase Activation in Deep Eutectic Solvents*. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019. **7**(13): p. 11806-11814.
179. Bittner, J.P., et al., *Impact of deep eutectic solvents (DESS) and individual DES components on alcohol dehydrogenase catalysis: connecting experimental data and molecular dynamics simulations*. Green chemistry, 2022. **24**(3): p. 1120-1131.

180. Huang, L., et al., *Modeling Alcohol Dehydrogenase Catalysis in Deep Eutectic Solvent/Water Mixtures*. ChemBioChem, 2020. **21**(6): p. 811-817.
181. Gajardo-Parra, N.F., et al., *Assessing the effect of deep eutectic solvents on α -chymotrypsin thermal stability and activity*. ChemSusChem: p. e202401414.
182. Korendovych, I.V., *Rational and Semirational Protein Design*, in *Protein Engineering: Methods and Protocols*, U.T. Bornscheuer and M. Höhne, Editors. 2018, Springer New York: New York, NY. p. 15-23.
183. 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.
184. Kawabata, T., *Detection of cave pockets in large molecules: Spaces into which internal probes can enter, but external probes from outside cannot*. (2189-4779 (Print)).
185. 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.
186. Berdychowska, J. and L. Peplowski. *Improving thermostability of biotechnological enzyme: nitrile hydratase case*. in *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 2021. Springer One New York pPlaza, Suite 4600, New York, NY, United States.
187. 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.
188. Cui, Y., et al., *Improvement of stability of nitrile hydratase via protein fragment swapping*. Biochem Biophys Res Commun, 2014. **450**(1): p. 401-8.
189. 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.
190. 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.
191. Zhang, L., et al., *N-terminal loops at the tetramer interface of nitrile hydratase act as "hooks" determining resistance to high amide concentrations*. International Journal of Biological Macromolecules, 2023. **245**: p. 125531.
192. Takarada, H., et al., *Mutational study on alphaGln90 of Fe-type nitrile hydratase from Rhodococcus sp. N771*. Biosci Biotechnol Biochem, 2006. **70**(4): p. 881-9.
193. Yamanaka, Y., et al., *Kinetic and structural studies on roles of the serine ligand and a strictly conserved tyrosine residue in nitrile hydratase*. J Biol Inorg Chem, 2010. **15**(5): p. 655-65.
194. Nowak, W.A., et al., *Photoswitchable Drugs and Insulin Release: Molecular Events in EPAC2A Protein*. Biophysical Journal, 2018. **114**(3): p. 31a.
195. Niklas, B., et al. *Toward Overcoming Pyrethroid Resistance in Mosquito Control: The Role of Sodium Channel Blocker Insecticides*. International Journal of Molecular Sciences, 2023. **24**, DOI: 10.3390/ijms241210334.
196. Peplowski, L. and W. Nowak, *Molecular Dynamics Simulations of the Metaloenzyme Thiocyanate Hydrolase with Non-Corrinoid Co(III) in Active Site*. NIC Series, John von Neumann Institute for Computing, 2008. **40**: p. 353-356.
197. Chen, K.-W., T.-Y. Sun, and Y.-D. Wu, *New Insights into the Cooperativity and Dynamics of Dimeric Enzymes*. Chemical Reviews, 2023. **123**(16): p. 9940-9981.

198. Le Guilloux, V., P. Schmidtke, and P. Tuffery, *Fpocket: an open source platform for ligand pocket detection*. BMC bioinformatics, 2009. **10**: p. 1-11.