



RADA DYSCYPLINY NAUK CHEMICZNYCH

mgr inż. Maria BZÓWKA

**ANALIZA MOLEKULARNYCH ASPEKTÓW REGULACJI BIAŁEK  
Z UWZGLĘDNIENIEM CZĄSTECZEK WODY  
JAKO POTENCJALNEGO MEDIATORA  
W ODDZIAŁYWANIACH MIĘDZYCZĄSTECZKOWYCH**

STRESZCZENIE POSZERZONE

Promotor: dr hab. Artur GÓRA, prof. PŚ

Gliwice, 2023

## Zakres rozprawy doktorskiej

Bezprecedensowe znaczenie roli wody w różnych procesach biologicznych było główną motywacją do podjęcia tego tematu w trakcie studiów doktoranckich. W rozprawie doktorskiej przedstawiono wyniki prac związanych z modelowaniem dynamiki cząsteczek wody w układach biologicznych, wynikających z zastosowania dedykowanego oprogramowania i metod obliczeniowych. Wyniki dotyczą analiz różnych funkcji pełnionych przez cząsteczki wody w białkach, w szczególności obejmują trzy obszary zastosowań: projektowanie leków, regulację i inżynierię białek, a także badania reakcji enzymatycznych.

## Cele rozprawy doktorskiej

Zdefiniowano cztery cele rozprawy doktorskiej. Były one następujące:

1. Przegląd dostępnych narzędzi obliczeniowych wykorzystujących cząsteczki wody do badania właściwości makrocząsteczek oraz udział w opracowaniu nowej wersji narzędzia umożliwiającego analizę strukturalną i funkcjonalną makrocząsteczek z wykorzystaniem perspektywy „pustych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych”.
2. Przedstawienie zastosowań cząsteczek wody oraz dodatkowych rozpuszczalników (ko-rozpuszczalników) w badaniach związanych z komputerowym projektowaniem leków.
3. Przedstawienie zastosowań cząsteczek wody w badaniach związanych z inżynierią białek oraz regulacją makrocząsteczek.
4. Charakterystyka roli wody w reakcji enzymatycznej, na przykładzie reakcji rozszczepienia proteolitycznego, procesu związanego z regulacją szlaku sygnałowego.

Aby zrealizować pierwszy cel, brałam udział w przygotowaniu artykułu przeglądowego (**Artykuł 1**) [1] podsumowującego informacje na temat różnych programów i narzędzi, które wykorzystują obecne w systemie cząsteczki wody i których można użyć do badania właściwości makrocząsteczek. Ponadto byłam członkiem zespołu, który rozwijał nową wersję narzędzia AQUA-DUCT (AQ 1.0) przeznaczoną do prowadzenia analiz strukturalnych i funkcjonalnych makrocząsteczek z wykorzystaniem nowej perspektywy, tzw. pustych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych (**Artykuł 2**) [2]. Aby osiągnąć drugi cel, byłam zaangażowana w prowadzenie analiz i opisywanie możliwych zastosowań cząsteczek wody i ko-rozpuszczalników w badaniach obliczeniowych związanych z projektowaniem leków dla

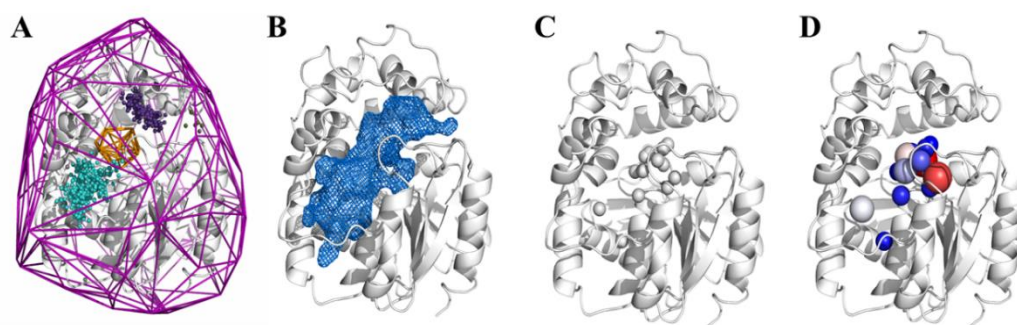
następujących celów molekularnych: głównej proteazy drugiego koronawirusa ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (SARS-CoV-2 Mpro) (**Artykuł 3**) [3], tego samego enzymu wraz z panelem wybranych proteaz (**Artykuł 4**) [4] oraz ludzkiej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (hsEH) (**Artykuł 5**) [5]. Aby zrealizować trzeci cel, brałam udział w badaniach podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych (sEH) i opisanii związku pomiędzy ich strukturą a umiejscowieniem sieci tuneli (**Artykuł 6**) [6]. Brałam udział w porównaniu metod służących do wykrywania i analizowania tuneli w białkach – wykorzystujących podejście geometryczne oraz opartych o śledzenie małych cząsteczek (**Artykuł 7**) [7]. Tunele zidentyfikowane w enzymach z podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych zbadałam również pod kątem ich ewolucji (**Artykuł 8**) [8]. Aby zrealizować ostatni cel, w pierwszej kolejności nakreśliłam problem związany z badaniem reakcji cięcia proteolitycznego w receptorach Toll-podobnych (TLR) (**Artykuł 9**) [9]. Następnie brałam udział w analizie tego procesu, przy szczególnym uwzględnieniu roli cząsteczek wody w czasie przebiegu reakcji enzymatycznej. Wyniki tych badań zostały opublikowane w formie preprintu (**Preprint 1**) [10].

## **Podsumowanie wyników oraz wkładu własnego**

### **Analiza struktury, właściwości oraz funkcjonowania makrocząsteczek z wykorzystaniem cząsteczek wody**

W **Artykule 1** [1] “Applications of water molecules for analysis of macromolecule properties” przeprowadzono przegląd dostępnych metod obliczeniowych wykorzystujących cząsteczki wody do analizy właściwości, struktury oraz dynamiki makrocząsteczek. Artykuł został podzielony na trzy części. Pierwsza część skupiała się na opisie narzędzi służących do analizy hydratacji białek. Druga część była poświęcona narzędziom do wykrywania miejsc o wysokiej dystrybucji rozpuszczalnika (wody) oraz analizie zdarzeń związanych z wiązaniem ligandów. W trzeciej części przedstawiono narzędzia służące do wykrywania tuneli i analizy różnych zjawisk transportowych w białkach. Mój udział polegał na zebraniu informacji oraz opisanii zastosowań i funkcjonalności narzędzi omawianych w drugiej i trzeciej części artykułu. Brałam udział w katalogowaniu danych, przygotowaniu manuskryptu, edycji i redagowaniu jego docelowej wersji oraz udzielaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

W **Artykule 2** [2] “AQUA-DUCT 1.0: structural and functional analysis of macromolecules from an intramolecular voids perspective” zaprezentowano nowe funkcje programu AQUA-DUCT (AQ). W szczególności skupiono się na dwóch rodzajach analiz, jakie można wykonać za pomocą tego narzędzia – zaawansowanym śledzeniu małych cząsteczek (rozpuszczalnika bądź innych cząsteczek) oraz analizie ich lokalnej dystrybucji. Brałam udział w rozwoju nowej wersji narzędzia, głównie poprzez testowanie nowych funkcji, które zostały dodane do odpowiednich sterowników służących do wykonywania dedykowanych analiz. Wraz z głównym twórcą narzędzia, pracowałam nad optymalizacją sterownika służącego do analizy lokalnej dystrybucji cząsteczek, za pomocą którego jest możliwe analizowanie dynamiki wewnętrznych kieszeni w makrocząsteczkach oraz identyfikowanie regionów o dużej dystrybucji (dużej gęstości) danego typu cząsteczek, tzw. hot-spotów (**Rysunek 1**). Ponadto testowałam różne tryby prowadzenia analiz, które zostały zaimplementowane w nowej wersji AQ. Przeprowadzałam analizy dla następujących systemów: ludzkiej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej, ziemniaczanej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej, dehalogenazy haloalkanowej LinB. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków, edycję oraz redagowanie docelowej wersji manuskryptu, jak również w udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

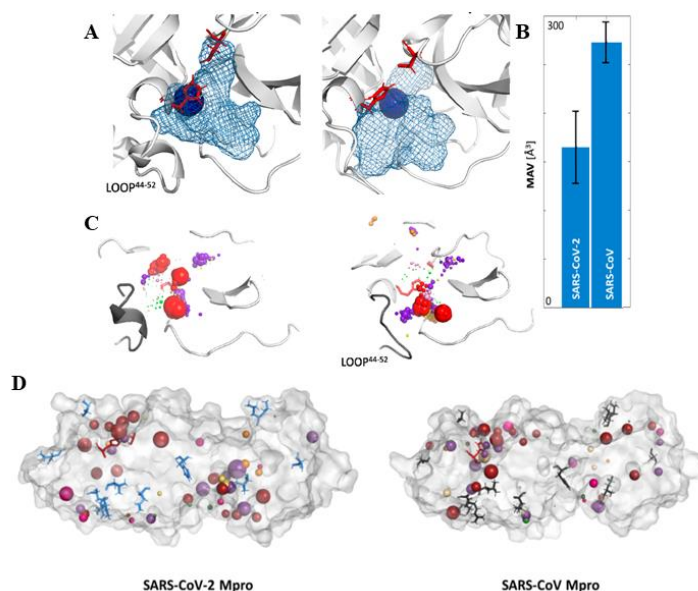


**Rysunek 1** Przykład analizy lokalnej dystrybucji rozpuszczalnika wykonanej za pomocą programu AQUA-DUCT 1.0. **(A)** Wizualizacja skupisk cząsteczek rozpuszczalnika penetrujących wewnątrz białka. **(B)** Wizualizacja kieszeni zidentyfikowanych we wnętrzu białka. **(C)** Wizualizacja obszarów o zwiększonej dystrybucji cząsteczek wody (hot-spotów). **(D)** Wizualizacja hot-spotów odzwierciedlająca ich gęstość. Rysunek zaadaptowany z publikacji [11] z pewnymi modyfikacjami.

## **Zastosowanie cząsteczek wody oraz dodatkowych rozpuszczalników (ko-rozpuszczalników) w badaniach związanych z komputerowym projektowaniem leków**

Pierwsze zastosowanie cząsteczek wody i ko-rozpuszczalników w badaniach związanych z komputerowym projektowaniem leków obejmowało prace nad główną proteazą SARS-CoV-2 – SARS-CoV-2 Mpro. Wyniki analiz przedstawiono w **Artykule 3** [3] “SARS-CoV-2 Mpro as a challenging molecular target for small-molecule inhibitor design”. W artykule wniosłam równy wkład pierwszo-autorski z Karoliną Mitusińską. Podczas prowadzonych badań byłam odpowiedzialna za przeprowadzenie wszystkich symulacji dynamiki molekularnej (MD) wykorzystujących różne mieszaniny rozpuszczalników oraz za ich dalszą analizę za pomocą narzędzia AQUA-DUCT 1.0, obejmującą analizę pustych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych i identyfikację hot-spotów. Byłam także zaangażowana w przeprowadzenie tego samego typu analiz dla klasycznych symulacji MD z wodą. Razem z Karoliną Mitusińską przeprowadziłyśmy porównanie struktur głównych proteaz dla SARS-CoV-2 oraz SARS-CoV wraz z analizą plastyczności ich kieszeni wiążących. Brałam również udział w analizie potencjalnej zmienności (mutowalności) SARS-CoV-2 Mpro. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków, edycję oraz redagowanie docelowej wersji manuskryptu, jak również w udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

W artykule wykorzystano klasyczne symulacje MD z cząsteczkami wody jako sondami molekularnymi, aby zapewnić szczegółowy obraz dynamiki wewnętrznej głównych proteaz SARS-CoV-2 oraz SARS-CoV. Do oceny dostępności i porównania plastyczności kieszeni wiążącej (centrum aktywnego) zastosowano metodę śledzenia małych cząsteczek oraz analizę lokalnej dystrybucji cząsteczek w celu zapewnienia informacji na temat rozkładu rozpuszczalnika we wnętrzu białka. Aby zidentyfikować potencjalne miejsca wiązania/oddziaływania w strukturach Mpro przeprowadzono symulacje MD z wykorzystaniem mieszanin różnych rozpuszczalników (woda – ko-rozpuszczalnik). Rozkład globalny hot-spotów dla różnych ko-rozpuszczalników ujawnił możliwość specyficznych interakcji w różnych regionach analizowanych białek. Region miejsca aktywnego i region związany z dimeryzacją Mpro wykazały największą gęstość hot-spotów. Informacje na temat rozmieszczenia lokalnych hot-spotów w kieszeni wiążącej (centrum aktywnym) potwierdziły różnice w plastyczności miejsca wiązania pomiędzy głównymi proteazami SARS-CoV-2 oraz SARS-CoV (**Rysunek 2**).



**Rysunek 2** Różnice w obrębie kieszeni wiążących oraz w całej strukturze głównych proteaz SARS-CoV-2 oraz SARS-CoV. (A) i (B) Maksymalne dostępne przestrzenie dla cząsteczek rozpuszczalnika w kieszeniach wiążących głównych proteaz SARS-CoV-2 oraz SARS-CoV wraz ze zidentyfikowanymi hot-spotami o największej gęstości. (C) Lokalizacja hot-spotów dla różnych ko-rozpuszczalników zidentyfikowanych w kieszeni wiążącej obu enzymów. (D) Lokalizacja hot-spotów dla różnych ko-rozpuszczalników zidentyfikowana w obrębie całych struktur obu enzymów. Rysunek zaadaptowany z **Artykułu 3** [3] z pewnymi modyfikacjami.

W **Artykule 4** “Computational Selectivity Assessment of Protease Inhibitors against SARS-CoV-2”, protokoły symulacji dynamiki molekularnej wraz z dokowaniem molekularnym i profilowaniem toksyczności zostały wykorzystane do oceny selektywności niekowalencyjnych inhibitorów SARS-CoV-2 Mpro wobec ośmiu różnych proteaz oraz 16 innych celów molekularnych. W artykule tym wniosłam równy wkład autorski z André Fischera, Manuela Sellnera i Karoliny Mitusińskiej. Wszyscy byliśmy zaangażowani w wybór panelu proteaz do przeprowadzenia badań. Razem z Karoliną Mitusińską brałam udział w analizie podobieństw wybranych białek, szczególnie w kontekście porównania ich miejsc wiążących. Następnie przeprowadziłyśmy klasyczne symulacje MD wraz ze śledzeniem cząsteczek wody i identyfikacją ich hot-spotów. Poza tym brałam udział w analizie hot-spotów dla ko-rozpuszczalników, zidentyfikowanych w symulacjach MD przeprowadzonych przez partnerów z Uniwersytetu w Bazylei dla mieszanin woda – ko-rozpuszczalnik. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków, edycję oraz redagowanie docelowej wersji manuskryptu, jak również w udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów. Panel białek poddanych analizie obejmował następujące proteazy: SARS-CoV-2 Mpro, SARS-CoV Mpro, kaspazę-3, czynnik Xa, katepsynę G, C-końcową hydrolazę ubikwityny (UCHL1), prostazynę, trombinę i chymazę. Ocena selektywności z różnych perspektyw

obejmowała porównanie podobieństwa sekwencji i centrum aktywnego, analizę lokalizacji hot-spotów dla cząsteczek wody i ko-rozpuszczalników, a także dokowanie molekularne i profilowanie toksykologiczne. Biorąc pod uwagę wszystkie analizowane czynniki, największy potencjał nieselektywnego wiązania inhibitorów SARS-CoV-2 Mpro określono dla czynnika Xa, SARS-CoV Mpro i katepdyzy G, a także dla chymazy i UCHL1. Mniejsze prawdopodobieństwo nieselektywnego wiązania oszacowano dla prostazyny i trombiny, a najmniejsze dla kaspazy-3.

Kolejny przykład zastosowania cząsteczek wody w badaniach związanych z projektowaniem leków został przedstawiony w **Artykule 5** “Computational insights into the known inhibitors of human soluble epoxide hydrolase”. W artykule przeanalizowano wszystkie zdeponowane struktury ludzkiej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (hsEH)– ligand, aby uzyskać wgląd w wiązanie inhibitorów. Przeanalizowano również architekturę domeny hydrolazy hsEH poprzez analizę transportu rozpuszczalnika (wody) i dynamiki pustych przestrzeni wewnątrzcząsteczkowych. W tym artykule jestem pierwszym autorem i przeprowadziłam wszystkie analizy dla znanych inhibitorów skryształizowanych z hsEH. Przeprowadziłam analizę interakcji, w tym grupowanie aminokwasów i inhibitorów, wykonałam również symulacje MD, dzięki którym udało się zidentyfikować wejścia do tuneli i zbadać dynamikę wewnętrznych kieszeni w strukturze hsEH. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków, edycję oraz redagowanie docelowej wersji manuskryptu, jak również w udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Wyniki badań wskazały, że w przypadku hsEH interakcje ligandów z aminokwasami budującymi centrum aktywne i jego otoczenie nie są kluczowe dla skutecznego projektowania inhibitorów. Stwierdzono, że zamiast zajmowania przez ligandy dużej kieszeni hydrofobowej w obrębie centrum aktywnego, nowe, małe inhibitory mogłyby zostać umieszczone na granicy pomiędzy aminokwasami budującymi rdzeń białka a aminokwasami powierzchniowymi. Ponadto analiza wszystkich zdeponowanych struktur hsEH z inhibitorami wykazała, że związki te nie zajmują w pełni dostępnej kieszeni wewnętrznej i że nadal istnieją przestrzenie, w których mogłyby wiązać się nowe inhibitory. Również analiza oparta na symulacji MD dostarczyła informacji na temat dodatkowych potencjalnych lokalizacji (wejścia/wyjścia do tuneli), w których mogłyby wiązać się kolejne inhibitory. Możliwość celowania w potencjalne nowe miejsca wiązania została także potwierdzona poprzez przeprowadzenie dodatkowych symulacji MD dla hsEH z wodą z różnymi ko-rozpuszczalnikami [12]. Dzięki wszystkim analizom, wskazano trzy potencjalne miejsca dla wiązania nowych inhibitorów.

## **Zastosowanie cząsteczek wody w badaniach związanych z inżynierią białek oraz regulacją makrocząsteczek**

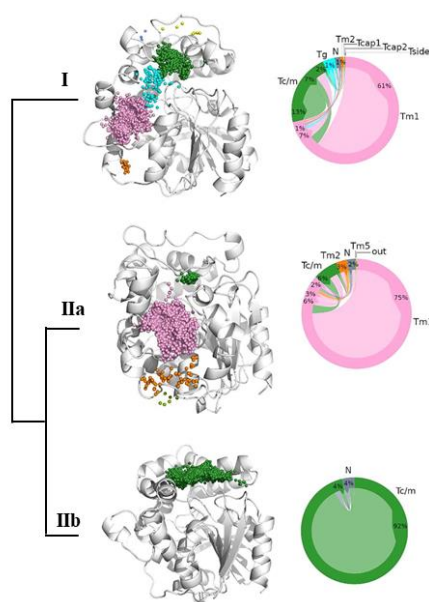
Analizy uwzględniające cząsteczki wody w regulacji i inżynierii białek przeprowadzono dla enzymów z podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych (sEH). Ze względu na dość zróżnicowaną sieć tuneli u członków podrodziny sEH enzymy te okazały się bardzo dobrym studium przypadku do scharakteryzowania ich sieci tuneli i wyciągnięcia wniosków, które mogą być przydatne m.in. w kontekście regulacji i inżynierii makrocząsteczek, także dla innych rodzin białek.

W **Artykule 6** “Structure-function relationship between soluble epoxide hydrolase structure and their tunnel network” (oraz w erracie do tego artykułu) przedstawiono dostępne struktury rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowanych i przeprowadzono kompleksową analizę sieci zidentyfikowanych tuneli. Dzięki wykorzystaniu cząsteczek wody jako sond molekularnych możliwe było uzyskanie wglądu w wewnętrzną architekturę tych białek. W przedstawionym artykule zajmowałam się głównie analizami przepływu cząsteczek wody w obrębie wszystkich analizowanych struktur enzymów; w szczególności zajęłam się doбором odpowiednich parametrów do wykrywania tuneli i następnie ich analizą. Brałam także udział w porównaniu reprezentantów podrodziny sEH, analizując ich cechy strukturalne. Brałam udział w katalogowaniu danych oraz w przygotowaniu manuskryptu, redagowaniu jego docelowej wersji oraz udzielaniu odpowiedzi na uwagi recenzentów.

W **Artykule 6** zbadano cechy strukturalne wybranych przedstawicieli podrodziny sEH. Na podstawie podobieństwa sekwencji i struktury analizowane enzymy podzielono na trzy grupy. Grupa I obejmowała enzymy ssacze i pochodzące od grzybów, grupa IIa składała się z enzymów roślinnych, a grupa IIb obejmowała enzymy bakteryjne i termofilne. Analiza transportu wody zapewniła wgląd w sieć tuneli w różnych regionach sEH. Biorąc pod uwagę informacje statystyczne dotyczące wykorzystania tuneli, możliwe było wskazanie, że niektórzy reprezentanci podrodziny sEH korzystają głównie z dwóch tuneli – Tc/m oraz Tm1 (przedstawiciele ssaków i grzybów), inni zaś wykorzystują jeden z wcześniej wymienionych tuneli – Tc/m (przedstawiciele bakterii oraz enzymów termofilnych o nieznanym pochodzeniu) bądź Tm/1 (przedstawiciele roślin) (**Rysunek 3**). Te wyraźne wzorce użytkowania tuneli były zgodne z analizą cech strukturalnych, co wskazuje na związek między strukturą i funkcją przedstawicieli rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych. Stwierdzono także, że cechy strukturalne i dynamika białek przekładają się na kształt, wielkość



i użyteczność poszczególnych tuneli, co w konsekwencji może łączyć się z preferencją rozpoznawanych substratów i dalszą wydajnością katalityczną.



**Rysunek 3** Zidentyfikowane wejścia/wyjścia do tuneli wybranych przedstawicieli podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych (sEH) wraz z wykresem przepływu wody pomiędzy tunelami. Wyniki zaprezentowano dla trzech wybranych przedstawicieli sEH – z grupy I dla ludzkiej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (hsEH), z grupy IIa dla ziemniaczanej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (StEH1) i z grupy IIb dla bakteryjnej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (bmEH), reprezentujących różne wzorce używania tuneli. Rysunek zaadoptowany z **Artykułu 6** [6] z pewnymi modyfikacjami.

Przedstawiciele sEH stanowili dobry zbiór danych, który można było wykorzystać do przeprowadzenia szczegółowego porównania różnych podejść mających na celu identyfikację tuneli w białkach. Przeprowadzono takie porównanie, a wyniki opublikowano w **Artykule 7** “Geometry-based versus small-molecule tracking method for tunnel identification: benefits and pitfalls”. Do identyfikacji tuneli zastosowano dwa różne narzędzia: AQUA-DUCT 1.0 wykorzystujący śledzenia małych cząsteczek, a także CAVER 3.0 PyMOL wraz z CAVER 3.02 wykorzystujące metody oparte na geometrii. W artykule tym wniosłam równy wkład pierwszo-autorski z Karoliną Mitusińską. Analizy przeprowadziłyśmy z następującym podziałem: ja zajmowałam się identyfikacją tuneli w symulacjach MD z wykorzystaniem podejścia śledzenia małych cząsteczek, natomiast Karolina Mitusińska skupiła się na analizie symulacji MD z zastosowaniem podejścia opartego na geometrii. Wspólnie zidentyfikowałyśmy również tunele w strukturach krystalograficznych, stosując podejście oparte na geometrii. Ponadto brałam udział w udoskonalaniu metody porównywania tuneli identyfikowanych w strukturach krystalograficznych z tunelami zidentyfikowanymi

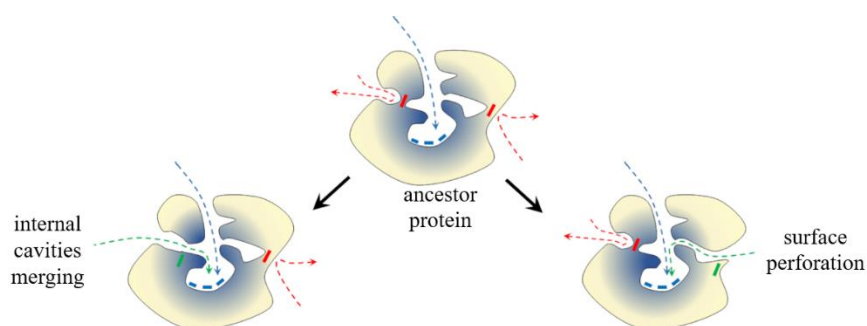
w symulacjach MD. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków, edycję oraz redagowanie docelowej wersji manuskryptu, jak również w udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

Odzwierciedlenie typowego podejścia do analizy tuneli w białkach zostało przedstawione w **Artykule 7**. Badania rozpoczęto od najprostszej analizy struktur krystalograficznych wykorzystującej metody oparte na geometrii. Następnie analizę rozszerzono, aby uwzględnić informacje z symulacji MD i porównać metody oparte na geometrii wraz z tymi opartymi na śledzeniu małych cząsteczek. Takie kompleksowe podejście pozwoliło na porównanie wyników uzyskanych różnymi metodami, podkreślając zalety i ograniczenia obu metod oraz potencjalne problemy z ich użytkowaniem, które mogłyby wpłynąć na interpretację wyników. Podkreślono, że symulacje dynamiki molekularnej mogą zapewnić pełniejszą charakterystykę sieci tuneli w strukturach białek oraz, że podejście polegające na śledzeniu małych cząsteczek stanowi uzupełnienie metod opartych na geometrii.

Zwieńczeniem prac związanych z badaniem tuneli w sEH była analiza ich ewolucji, opisana w **Artykule 8** "Evolution of tunnels in  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold proteins – What can we learn from studying epoxide hydrolases". W artykule tym ponownie wniosłam równy wkład pierwszoautorski z Karoliną Mitusińską. W tym artykule przedstawiłyśmy koncepcję analizy ewolucyjnej tuneli, a także innych istotnych elementów strukturalnych, w enzymach z podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych. Oceńłam ogólną zmienność, zarówno dla elementów referencyjnych, jak i tuneli. Poza tym brałam udział w przedstawieniu ogólnej charakterystyki ewolucyjnej tuneli w białkach oraz szczegółowej charakterystyki wybranych przypadków. Efektem prac było zaproponowanie mechanizmu pojawiania się tuneli, który można zastosować jako strategię projektowania tuneli *de novo*.

Analiza ewolucyjna elementów referencyjnych wykazała, że aminokwasy w centrum aktywnym są konserwatywne, natomiast aminokwasy powierzchniowe są najbardziej zmienne. Potwierdziło to dobrze znaną obserwację o szybszej ewolucji aminokwasów powierzchniowych w porównaniu z aminokwasami zlokalizowanymi w centrum aktywnym. Pozostałe aminokwasy tworzące rdzeń białka również wykazywały stosunkowo małą zmienność. Elementy referencyjne typowe dla podrodziny sEH, takie jak pętla cap (cap-loop) bądź pętla NC (NC-loop), scharakteryzowano jako zmienne u wszystkich analizowanych przedstawicieli sEH, za wyjątkiem pętli NC w jednym z termofilnych enzymów, CH65-EH. Również  $\alpha$ -helisy i pętle zostały określone jako zmienne, za wyjątkiem tych obecnych w strukturach ludzkiej i ziemniaczanej. Z kolei harmonijki beta (beta-kartki) były

konserwatywne we wszystkich analizowanych białkach, z wyjątkiem mysiej hydrolazy epoksydowej. Na potrzeby badania ewolucji tuneli postawiono hipotezę, że tunele powinny być raczej konserwatywne, ale z możliwością występowania pewnych części zmiennych. Wyniki potwierdziły, że niemal wszystkie analizowane tunele można uznać za konserwatywne. Aby uzyskać lepszy wgląd w charakterystykę aminokwasów budujących tunele, zarówno zmiennych, jak i konserwatywnych, przeprowadzono dodatkowe analizy. Zbadano trzy tunele zidentyfikowane w różnych rozpuszczalnych hydrolazach epoksydowych. Były to tunele Tc/m z ludzkiej sEH (hsEH) oraz Tm1 z ziemniaczanej sEH (StEH1), będące przedstawicielami najczęściej występujących i wykorzystywanych tuneli w sEH oraz tunel Tc/m\_back z bakteryjnej sEH (bmEH), w którym testowano wcześniej możliwość wprowadzania modyfikacji. Tunele te zostały wybrane do analizy również ze względu na fakt, iż wykazywały różne rozkłady wartości entropii dla aminokwasów. Dzięki przeprowadzonym badaniom było możliwe zaproponowanie mechanizmu dotyczącego pojawiania się/tworzenia nowych tuneli w białkach. Postawiono hipotezę, że nowe tunele mogą powstawać w wyniku mutacji zachodzących nie tylko na powierzchni białka, ale również na granicach kieszeni znajdujących się wewnątrz struktur białek. W ten sposób, mutacje w obrębie aminokwasów określonych jako zmienne mogłyby spontanicznie napędzać ewolucję dostępności do centrum aktywnego poprzez perforację powierzchni lub poprzez łączenie się wewnętrznych kieszeni (**Rysunek 4**). Taki mechanizm może być stosowany do modyfikowania enzymów, aby znacząco poprawić działanie enzymów, na przykład poprzez oddzielenie szlaków transportu substratu/produktu od szlaków dostarczania wody.



**Rysunek 4** Schematyczne przedstawienie proponowanej teorii powstawania tuneli w białkach – “model perforacji”. Pierwsza możliwość przedstawia pojawienie się nowego tunelu w wyniku połączenia się wewnętrznych kieszeni w białku, natomiast druga możliwość przedstawia powstanie nowego tunelu w wyniku perforacji powierzchni. Rysunek zaadaptowany z **Artykułu 8** [8] z pewnymi modyfikacjami.

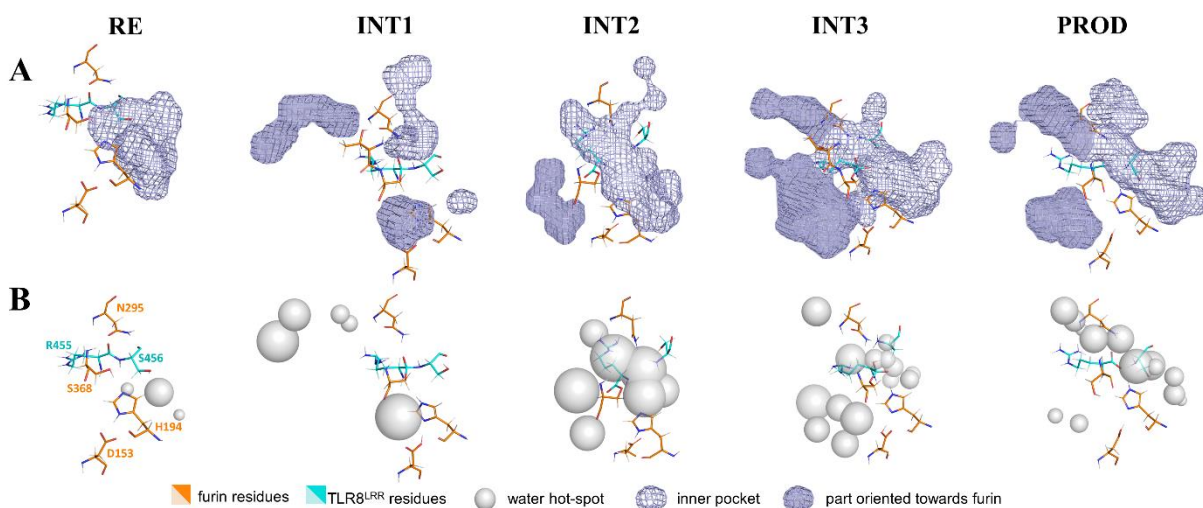
## Role cząsteczek wody w reakcji enzymatycznej

Podczas realizacji pracy doktorskiej skupiłam się również na badaniu bardziej złożonych makrocząsteczek, takich jak białka transbłonowe. W szczególności zajęłam się badaniem receptorów Toll-podobnych (TLR), które odgrywają ważną rolę w funkcjonowaniu układu odpornościowego. Moim celem było wykorzystanie metod obliczeniowych do badania mechanizmów regulacyjnych w receptorach TLR. Dlatego też konieczne było podsumowanie dotychczasowych badań w tym zakresie i określenie, co udało się osiągnąć, a co wciąż pozostaje wyzwaniem. W związku z tym opublikowano **Artykuł 9** “Recent Advances in Studying Toll-like Receptors with the Use of Computational Methods”, w którym receptory TLR zostały poddane analizie, zarówno pod kątem ich funkcjonowania, jak i mechanizmu działania. W tym artykule jestem pierwszym autorem, wykonałam większość przeglądu literatury i uporządkowałam wszystkie dane, a także byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, edycję i redagowanie jego docelowej wersji oraz udzielanie odpowiedzi na uwagi recenzentów.

W artykule zidentyfikowano kilka kluczowych obszarów związanych z receptorami TLR, które wymagają dalszych badań. Jednym z aspektów była potrzeba zbadania reakcji cięcia proteolitycznego konkretnej pętli (pętli Z) znajdującej się u niektórych członków rodziny TLR. Biorąc pod uwagę, że obecność wody ma kluczowe znaczenie w reakcji cięcia proteolitycznego, zaproponowałam, aby opisać rolę wody w układzie TLR-proteaza w całym cyklu reakcji enzymatycznej. W szczególności chciałam skupić się na analizie zachowania cząsteczek wody w miejscu reakcji. Do powyższej analizy wybrałam receptor TLR8, ponieważ dla niego potwierdzono, że forma z przeciętą pętlą jest niezbędna dla jego prawidłowego funkcjonowania. Wykorzystałam również informację sugerującą udział furyny w procesie cięcia proteolitycznego.

Wyniki badań cięcia proteolitycznego opublikowano w postaci **Preprintu 1** “The proteolytic cleavage of TLR8 Z-loop by furin protease - molecular recognition, reaction mechanism and role of water molecules”. W tym artykule jestem pierwszym autorem i przeprowadziłam większość analiz związanych z przewidywaniem kompleksu TLR8-furyna, badaniem jego dynamiki i sieci interakcji oraz analizę reorganizacji cząsteczek wody w systemie. Przeprowadziłam symulacje MD oraz obliczenia z wykorzystaniem narzędzia AQUA-DUCT. Byłam zaangażowana w przygotowanie manuskryptu, rysunków i ogólną organizację danych. Dla każdego kompleksu TLR8-furyna, począwszy od reaktanta (RE), poprzez stany przejściowe (INT1-INT3), aż do produktu (PROD), przeprowadziłam symulacje dynamiki

molekularnej. Analiza sieci interakcji pomiędzy aminokwasami TLR8, furyny i cząsteczkami rozpuszczalnika wykazała, że ogólny rozkład oddziaływań może różnić się pomiędzy poszczególnymi etapami reakcji. Zauważono istotne różnice w rozmieszczeniu cząsteczek wody na różnych etapach reakcji. Na samym początku, w pobliżu miejsca reakcji, nie było prawie żadnych cząsteczek wody. W miarę postępu reakcji cząsteczki rozpuszczalnika wypełniały miejsce katalityczne oraz wewnątrz furyny, aby na końcu przemieścić się w kierunku interfejsu pomiędzy TLR8 a furyną (**Rysunek 5**).



**Rysunek 5** Analiza reorganizacji cząsteczek wody podczas reakcji cięcia proteolitycznego pętli Z receptora TLR8 przez proteazę furynową. (A) Wizualizacja wewnętrznych kieszeni w obrębie miejsca reakcji penetrowanych przez cząsteczki wody. (B) Lokalizacja hot-spotów zidentyfikowanych dla cząsteczek wody. Rysunek zaadaptowany z **Preprintu 1** [10] z pewnymi modyfikacjami.

Za pomocą analizy lokalnej dystrybucji cząsteczek rozpuszczalnika w układzie potwierdzono katalityczną rolę wody w reakcji (na etapie INT2). Oprócz tego przedstawiono również potencjalne role cząsteczek wody na innych etapach reakcji. Wskazano, że cząsteczki wody mogą potencjalnie brać udział w stabilizacji wysokoenergetycznych stanów przejściowych INT1 oraz INT3. Analizując symulacje MD dla wskazanych stanów przejściowych, w niektórych powtórzeniach zaobserwowano cząsteczki wody w pobliżu ładunku ujemnego, powstającego na atomie tlenu R455 w miejscu cięcia proteolitycznego receptora TLR8. Te cząsteczki wody mogłyby odgrywać rolę pomocniczą w stabilizacji tego ładunku, poprzez towarzyszenie aminokwasom z dziury oksyanionowej, bądź nawet poprzez przejęcie ich roli w stabilizacji. Dodatkowo dla kompleksów RE, INT3, oraz PROD zidentyfikowano hot-spoty tworzone przez cząsteczki rozpuszczalnika w lokalizacji sugerującej, że woda mogłaby uczestniczyć w transporcie protonu pomiędzy katalityczną histydyną furyny a innymi aminokwasami. Postawiono hipotezę, że taki transfer protonu z wykorzystaniem cząsteczek

wody mógłby otworzyć alternatywne szlaki reakcji enzymatycznej. Ostatnia obserwacja związana z przemieszczaniem się cząsteczek wody w kierunku interfejsu TLR8-furyna na końcowym etapie reakcji może potencjalnie wskazywać na udział cząsteczek rozpuszczalnika w procesie dysocjacji kompleksu TLR8-furyna. Zwiększona obecność cząsteczek wody pomiędzy interfejsem białek mogłaby osłabić silne oddziaływania elektrostatyczne, które utrzymują kompleks, ułatwiając w ten sposób jego separację.

## Wnioski

W pracy doktorskiej przedstawiłam w jaki sposób, włączając analizę cząsteczek wody do układów biologicznych, takich jak białka, naukowcy mogą przyczynić się do znacznie lepszego zrozumienia struktury, dynamiki, funkcjonowania i ogólnej regulacji makrocząsteczek. Pokazałam, że analizując zachowanie cząsteczek wody w białkach możemy wnieść wkład w takie dziedziny jak projektowanie leków czy inżynieria białek. Potwierdziłam również, że badając wodę w procesach enzymatycznych można odkryć jej wiele funkcji.

Prowadzenie tak kompleksowych badań nie byłoby możliwe bez zdobytej wiedzy na temat narzędzi obliczeniowych wykorzystujących cząsteczki wody do badania właściwości makrocząsteczek (**Artykuł 1**). Co ważniejsze, badania trudno byłoby przeprowadzić bez narzędzia AQUA-DUCT 1.0, w którego rozwój byłam zaangażowana (**Artykuł 2**).

W obszarze projektowania leków – przedstawiłam w jaki sposób, wykorzystując połączenie śledzenia małych cząsteczek (wody i innych ko-rozpuszczalników) i analizę lokalnej dystrybucji, możliwe jest opisanie zmian w dynamice kieszeni wewnętrznych w makrocząsteczkach oraz zidentyfikowanie nowych, potencjalnych miejsc wiążących ligandy. Przeprowadzając taką analizę dla głównej proteazy SARS-COV-2 można było wskazać, że próby wprowadzania inhibitorów do kieszeni wiążącej centrum aktywnego nie stanowią dobrej strategii badawczej (**Artykuł 3**). Dodatkowo, analiza lokalnej dystrybucji małych cząsteczek okazała się przydatna w ocenie potencjalnego ryzyka niespecyficznego wiązania się inhibitorów SARS-CoV-2 Mpro do innych proteaz (**Artykuł 4**). Ponadto, stosując wyżej wymienione podejście, mogłam zaproponować potencjalne miejsca wiązania dla nowych inhibitorów ludzkiej rozpuszczalnej hydrolazy epoksydowej (**Artykuł 5** oraz [12]). Prowadząc dalsze badania *in silico*, w których celem były wskazane miejsca, zaobserwowałam, że nowe proponowane inhibitory mają tendencję do wiązania się w tych regionach. Podczas walidacji

eksperymentalnej niektóre z zaproponowanych związków wykazały dość silny efekt hamujący działanie enzymu, co daje nadzieję, że przewidywania uzyskane za pomocą metod obliczeniowych są prawidłowe.

W przypadku analizy cząsteczek wody w regulacji i inżynierii białek – pokazałam, że śledząc cząsteczki wody podczas symulacji dynamiki molekularnej, można szczegółowo opisać sieci tuneli i zjawiska transportowe w białkach. Dzięki zastosowaniu takiego podejścia możliwe było określenie związku pomiędzy strukturą i funkcją białek z podrodziny rozpuszczalnych hydrolaz epoksydowych (**Artykuł 6**). Dodatkowo udało się przeprowadzić analizę porównawczą metod służących do wykrywania i analizowania tuneli w białkach. Zestawiono ze sobą wyżej wymienione metody oparte na śledzeniu małych cząsteczek wraz z metodami wykorzystującymi podejście geometryczne (**Artykuł 7**). Dodatkowo, dla zidentyfikowanych tuneli przeprowadzono analizę ewolucyjną i zaproponowano nową teorię dotyczącą sposobu powstawania tuneli w białkach (**Artykuł 8**). Wyniki te mogą być przydatne szczególnie w badaniach mających na celu racjonalną inżynierię białek, między innymi poprzez otwieranie tuneli *de novo*.

W przypadku analizy reakcji enzymatycznej – przedstawiłam, że cząsteczki wody mogą pełnić różne role podczas całego cyklu reakcji. Na przykładzie reakcji cięcia proteolitycznego w receptorze TLR8 pokazano, że woda, oprócz funkcji katalitycznej, może również pełnić inne role. Postawiono hipotezę o dodatkowych funkcjach cząsteczek wody, takich jak zapewnienie stabilizacji niektórych oddziaływań międzycząsteczkowych, pełnienie roli mediatora w przenoszeniu protonu pomiędzy określonymi aminokwasami lub uczestnictwo w procesie dysocjacji kompleksu białko-białko (**Artykuł 9, Preprint 1**).

## Bibliografia

1. Mitusińska K, Raczyńska A, Bzówka M, Bagrowska W, Góra A. Applications of water molecules for analysis of macromolecule properties. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020;18: 355–365. doi:10.1016/j.csbj.2020.02.001
2. Magdziarz T, Mitusińska K, Bzówka M, Raczyńska A, Stańczak A, Banas M, et al. AQUA-DUCT 1.0: structural and functional analysis of macromolecules from an intramolecular voids perspective. *Bioinformatics*. 2020;36: 2599–2601. doi:10.1093/bioinformatics/btz946
3. Bzówka M, Mitusińska K, Raczyńska A, Samol A, Tuszyński JA, Góra A. Structural and evolutionary analysis indicate that the sars-COV-2 mpro is a challenging target for small-molecule inhibitor design. *Int J Mol Sci*. 2020;21. doi:10.3390/ijms21093099
4. Fischer A, Sellner M, Mitusińska K, Bzówka M, Lill MA, Góra A, et al. Computational Selectivity Assessment of Protease Inhibitors against SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*. 2021;22: 2065. doi:10.3390/ijms22042065
5. Bzówka M, Mitusińska K, Hopko K, Góra A. Computational insights into the known inhibitors of human soluble epoxide hydrolase. *Drug Discov Today*. 2021;26: 1914–1921. doi:10.1016/j.drudis.2021.05.017
6. Mitusińska K, Wojsa P, Bzówka M, Raczyńska A, Bagrowska W, Samol A, et al. Structure-function relationship between soluble epoxide hydrolases structure and their tunnel network. *Comput Struct Biotechnol J*. 2022;20: 193–205. doi:10.1016/j.csbj.2021.10.042
7. Mitusińska K, Bzówka M, Magdziarz T, Góra A. Geometry-Based versus Small-Molecule Tracking Method for Tunnel Identification: Benefits and Pitfalls. *J Chem Inf Model*. 2022;62: 6803–6811. doi:10.1021/acs.jcim.2c00985
8. Bzówka M, Mitusińska K, Raczyńska A, Skalski T, Samol A, Bagrowska W, et al. Evolution of tunnels in  $\alpha/\beta$ -hydrolase fold proteins—What can we learn from studying epoxide hydrolases? *PLOS Comput Biol*. 2022;18: e1010119. doi:10.1371/journal.pcbi.1010119
9. Bzówka M, Bagrowska W, Góra A. Recent Advances in Studying Toll-like Receptors with the Use of Computational Methods. *J Chem Inf Model*. 2023;63: 3669–3687. doi:10.1021/acs.jcim.3c00419
10. Bzówka M, Szeleper K, Stańczak A, Borowski T, Góra A. The proteolytic cleavage of TLR8 Z-loop by furin protease - molecular recognition, reaction mechanism and role of water molecules. *Res Sq*. 2023. doi:10.21203/rs.3.rs-3590328/v1
11. Mitusińska K, Raczyńska A, Wojsa P, Bzówka M, Góra A. AQUA-DUCT: Analysis of Molecular Dynamics Simulations of Macromolecules with the use of Molecular Probes [Article v1.0]. *Living J Comput Mol Sci*. 2020;2. doi:10.33011/livecoms.2.1.21383
12. Bzówka M, Mitusińska K, Góra A. Novel Potential Binding Sites for Selective Inhibitor Design of Human Soluble Epoxide Hydrolase. *Res Sq*. 2020. doi:10.21203/rs.3.rs-29814/v1